

Universität für Bodenkultur Wien

Department für Nutzpflanzenwissenschaften

Abteilung Pflanzenschutz



**Untersuchungen zur
Kaffeefleckenkrankheit (*Botrytis* spp.)
an Speisezwiebel im Marchfeld**

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades Diplom-Ingenieur

verfasst und eingereicht von

Julia Votzi, BSc

Betreuer: Univ. Doz. Dr. phil. Gerhard Bedlan

Wien, Juni 2016

Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei jenen Personen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen der Masterarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Univ. Doz. Dr. phil. Gerhard Bedlan für die Ermöglichung der Masterarbeit, die hervorragende Betreuung sowie die fachliche Unterstützung.

Danke an die Mitarbeiter der Abteilung Pflanzengesundheit im Feld- und Gartenbau der AGES, insbesondere Frau Mag. Astrid Plenk, für die persönliche und fachliche Hilfe bei der Versuchsdurchführung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Richard Gottsberger (AGES, Abteilung für Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten) für die Möglichkeit der molekularbiologischen Analysen und die Hilfestellungen bezüglich der Analysen.

Ich bedanke mich auch bei den Marchfelder Landwirten für die Bereitstellung der für die Versuche benötigten Zwiebelproben.

Auch bei Dr. Lindsey du Toit bedanke ich mich für die Bereitstellung von *Botrytis*-Isolaten und den fachlichen Input recht herzlich.

Ich bedanke mich des Weiteren bei Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Karl Moder für die Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1. Zwiebel (<i>Allium cepa</i> L.) als Kulturpflanze	2
2.1.1. Morphologie, Wachstum und Entwicklung der Küchenzwiebel	2
2.1.2. Kultivierung von Speisezwiebel.....	5
2.1.3. Lagerung.....	7
2.2. <i>Botrytis</i> spp. an Speisezwiebel (<i>Allium cepa</i> L.).....	9
2.2.1. Taxonomie.....	9
2.2.2. Biologie.....	12
2.2.3. Die Pathogene.....	15
2.3. Die Kaffeeblutenkrankheit.....	22
2.3.1. Symptome und Krankheitsverlauf	22
2.3.2. Krankheitserreger.....	24
2.3.3. Gegenmaßnahmen	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Versuchsorganismen	25
3.1.1. Pathogene.....	25
3.1.2. Zwiebelsorten.....	26
3.2. Anzucht der Pilzkulturen.....	27
3.3. Vorversuche.....	29
3.4. Testung des Potenzials der <i>Botrytis</i> -Arten zur Verursachung der Kaffeeblutenkrankheit sowie der Sortenanfälligkeit.....	34
3.4.1. Aufbau und Durchführung der Versuchsreihen.....	34
3.4.2. Auswertung.....	36
3.4.3. Reisolation der Pathogene aus befallenem Zwiebelgewebe.....	36
3.5. Isolation des Erregers aus natürlich infizierten Freilandproben	37

3.5.1. Morphologische Analyse	37
3.5.2. Molekularbiologische Analyse	38
4. Ergebnisse.....	40
4.1. Vorversuche.....	40
4.2. Potenzial der <i>Botrytis</i> -Arten zur Verursachung der Kaffeefleckenkrankheit sowie Sortenanfälligkeit.....	43
4.3. Isolation aus natürlich infizierten Freilandproben.....	75
5. Diskussion.....	77
6. Zusammenfassung.....	82
7. Abstract.....	84
8. Literaturverzeichnis.....	85
9. Abbildungsverzeichnis.....	91
10. Tabellenverzeichnis	95
11. Abkürzungsverzeichnis.....	97
12. Autoren der Pilznamen.....	98

1. Einleitung

Die Zwiebel (*Allium cepa* L.) ist eine ökonomisch wichtige Kulturpflanze, welche weltweit als Gemüse-, Gewürz- und Heilpflanze genutzt wird (FRITSCH, 2005). Im Jahr 2015 wurden allein in Österreich auf einer Fläche von 3067,78 ha (davon 2711,89 ha Sommerzwiebel und 355,89 ha Winterzwiebel) 168089 Tonnen Zwiebel produziert (STATISTIK AUSTRIA, 2015). Der Pro-Kopf-Verbrauch an Zwiebel liegt mit 9,1 kg in Österreich an dritter Stelle hinter Paradeiser und Karotten (STATISTIK AUSTRIA, 2016). Neben dem Eferdinger Becken und dem Inntal stellt das Marchfeld eines der wichtigsten Zwiebelbaugebiete in Österreich dar.

Botrytis cinerea und andere Arten der Gattung *Botrytis* sind weltweit bedeutende Pathogene an Obst, Gemüse, Zierpflanzen und Feldkulturen, welche neben oberirdischen Pflanzenteilen in Entwicklungsstadien vor und nach der Ernte auch Zwiebeln, Saatgut und anderes Vermehrungsmaterial befallen (ELAD et al., 2004).

In der Lagersaison 2014/15 sind an Speisezwiebel verstärkt Symptome der Kaffeefleckenkrankheit aufgetreten, welche sich in dunkelbraunen und unregelmäßig zerfließenden Flecken auf den äußersten, trockenen Schalen der Zwiebelbulben äußern (BEDLAN, 2014). In der Literatur wird der Pilz *Botrytis cinerea* als Erreger der genannten Krankheit beschrieben, wobei insgesamt noch folgende weitere *Botrytis*-Arten mit Krankheiten an Speisezwiebel assoziiert werden: *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis byssoidea*, *Botrytis porri*, *Botrytis squamosa* und *Botrytis tulipae* (CLARK und LORBEER, 1973 a; CHILVERS und DU TOIT, 2006). Die Kaffeefleckenkrankheit stellt einen Qualitätsmangel an Speisezwiebel dar und führt bei starkem Befall dazu, dass die Zwiebeln nicht mehr marktfähig sind (BEDLAN, 2014).

Ziel der Arbeit war es, die genannten *Botrytis*-Arten auf ihr Potenzial, Symptome der Kaffeefleckenkrankheit zu verursachen, zu testen und in weiterer Folge zu prüfen, ob diesbezüglich Unterschiede zwischen Zwiebelsorten erkennbar sind. Weiters sollte anhand von natürlich infizierten Freilandproben untersucht werden, welche Art oder welche Arten die Kaffeeflecken im Produktionsgebiet Marchfeld hervorrufen.

2. Literaturübersicht

2.1. Zwiebel (*Allium cepa* L.) als Kulturpflanze

Die Gattung *Allium* zählt zu den Monokotyledonen (Klasse *Liliopsida*, Ordnung *Asparagales*) und ist mit etwa 780 zugehörigen Arten die umfangreichste Gattung der Familie *Alliaceae* (FRITSCH, 2005, FRIESEN et al., 2006). Im neuesten Vorschlag der taxonomischen Gruppierung werden 15 Untergattungen und 56 Sektionen vorgeschlagen, wobei die Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.) der Untergattung *Cepa* und weiters der Sektion *Cepa* zugeschrieben wird (FRIESEN et al., 2006; FISCHER et al., 2008). Daneben gehören auch andere ökonomisch wichtige Pflanzenarten, die weltweit als Gemüse-, Gewürz- und Heilpflanzen genutzt werden, zu der genannten Gattung, wie zum Beispiel Knoblauch (*Allium sativum* L.) oder Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.) (FRITSCH, 2005). Die Küchenzwiebel ist eine der ältesten Kulturpflanzen und wird seit mehr als 4000 Jahren angebaut (FRITSCH, 2005). Als Zentrum der primären Domestikation gilt Süd-West-Asien, wobei die ersten Domestikationen vermutlich in den Gebirgsregionen von Turkmenistan und Nord-Iran stattfanden (BREWSTER, 2008). Nachfolgend werden ausgewählte Aspekte zu der Kulturpflanze Küchenzwiebel, dem Zwiebelanbau und der Lagerung zusammengefasst.

2.1.1. Morphologie, Wachstum und Entwicklung der Küchenzwiebel

FRITSCH und KRETSCHMER (2005) beschreiben folgende botanische Merkmale: Die Küchenzwiebel ist eine ausdauernde Pflanze. Sie besitzt schnurförmige, 20 bis 50(80) cm lange Wurzeln. Der Spross wird auch Zwiebelscheibe oder Zwiebelkuchen genannt, ist stark gestaucht und zu einer Scheibe verbreitert. Die Laubblätter sind zweizeilig angeordnet und in eine basale Blattscheide (Unterblatt) und eine daran anschließende röhrenförmige Blattspreite (Oberblatt) gegliedert. Die Blattscheiden stehen teleskopartig ineinander und bilden oberirdisch einen Scheinstamm. Die dunkelgrünen Blattspreiten sind 0,5 bis 2(3) cm im Durchmesser und 14 bis 40(60) cm lang, hohl und mit einem graublauen Wachselag überzogen. Die Unterblätter werden später verdickt und bilden das Überdauerungsorgan, die Zwiebel, aus. Diese ist in Form und Größe variabel. Sie besitzt eine dünne, trockene Außenhülle, welche weiß, gelb, rot bis dunkelbraun oder violett gefärbt ist und aus 1 bis 3 Blattscheiden entstanden ist. Darunter sind die weißlichen, verdickten Unterblätter angeordnet, die oft als Zwiebelschuppen bezeichnet werden, sowie der Haupttrieb und meist ein Nebentrieb, welche etwa 5 Blattanlagen

tragen. Die blattlosen Blütenschäfte (meist 1 bis 8 pro Pflanze) entwickeln sich im zweiten Lebensjahr und sind (15)30 bis 120(200) cm lang, aufrecht und hohl. Der Blütenstand entwickelt sich in der Spatha, welche anfangs grün und blattartig, später tropfenförmig aufgeblasen mit schnabelartiger Spitze erscheint und beim Öffnen in zwei bis vier Klappen zerreißt. Der voll ausgebildete, kugelige Blütenstand (Scheindolde) ist (3)5 bis 8 cm im Durchmesser und weist 50 bis mehrere 100 Blüten auf, welche sternförmig erscheinen und auf Blütenstielen sitzen. Die einzelnen Tepalen sind weiß gefärbt und oft mit leichtem grünlichem oder bläulichem Schein. Auch die Staubblätter sind weiß und deutlich länger als die Tepalen. Der grüne Fruchtknoten ist dreikantig-flachkugelig und besitzt zwei Samenanlagen pro Fruchtknoten-fach, der Griffel ist hingegen weißlich gefärbt und zuletzt aus der Blüte deutlich herausragend mit einer kurzen, keulenförmig verdickten Narbe. Die schwarzen Samen sind dreikantig, stark schrumpelig und matt glänzend. Neben Blüten und Samen können bei der Küchenzwiebel auch kleine Bulbillen ausgebildet werden. (FRITSCH und KRETSCHMER, 2005)

Der Entwicklungszyklus der Zwiebelpflanze beginnt mit der vegetativen Wachstumsphase: Bei der Keimung wächst die Primärwurzel des Keimlings aus, welche nach kurzer Zeit ohne Dickenwachstum und Bildung von Seitenwurzeln wieder abstirbt (FRITSCH und KRETSCHMER, 2005). Alle danach auswachsenden Wurzeln entspringen der Sprossachse, wodurch bereits die Jungpflanzen ein homorhizes Wurzelsystem aufweisen (FRITSCH und KRETSCHMER, 2005). Neben einer ausreichenden Wasser- und Sauerstoffversorgung spielt auch die Temperatur eine entscheidende Rolle, wobei der optimale Keimtemperaturbereich zwischen 5 und 25 °C liegt (KRETSCHMER, 2005 a). Sobald das Kotyledon die Bodenoberfläche erreicht und Licht ausgesetzt ist, starten Chlorophyllbildung und Assimilation (KRETSCHMER, 2005 a). Mit der Entwicklung des Wurzelsystems ist auch die Bildung der Blätter verbunden: Das erste Laubblatt entwickelt sich noch vor dem Absterben des Keimblattes. (KRETSCHMER, 2005 a). Im weiteren Verlauf bilden sich nacheinander immer größere und längere Blätter, der Spross bleibt hingegen linsenförmig gestaucht und verborgen und wird herzförmig verdickt (FRITSCH und KRETSCHMER, 2005). In einem Temperaturbereich von 6 bis 27 °C wächst die Zwiebel aktiv, unterhalb von 6 °C stoppt das Wachstum (KRETSCHMER, 2005 a). In der letzten Phase des vegetativen Wachstums wird das Überdauerungsorgan vergrößert: Der Scheinspross schwillt an und verlängert sich, gleichzeitig verdicken die einzelnen Unterblätter durch Zellstreckung, ohne dass eine zusätzliche Zellvermehrung stattfindet, und ein Teil der verdickten Blattbasen wird zu Speicherschuppen (KRETSCHMER, 2005; FRITSCH und KRETSCHMER, 2005). Weiters finden folgende Prozesse mit dem Eintritt der Zwiebelvergrößerung statt: Die Laub-

blätter einschließlich der jüngeren Blätter beenden ihr Wachstum, die Anlage neuer Wurzeln wird gestoppt und die übrigen Wurzeln trocknen ein, ältere Blätter beginnen von der Spitze aus abwärts zu altern und ein Verlust der Turgeszenz im oberen Teil des Scheinsprosses tritt ein, wodurch die Blätter zu Boden fallen, absterben und der Zwiebelhals eintrocknet (KRETSCHMER, 2005 a). Auch Reservekohlenhydrate und Stickstoffverbindungen werden in die Speicherblätter exportiert (PRAEGER, 2005 a). Während der Reife der Zwiebelbulbe verlieren die äußersten Unterblätter Wasser, trocknen aus und bilden eine dünne Hülle, welche die inneren, fleischigen Schalen vollständig umgibt und vor Verletzungen, Pathogenen sowie Wasserverlust schützt (BREWSTER, 2008). Im Laufe dieses Prozesses werden die Pigmente chemisch verändert, wodurch die Schale ihre endgültige Ausfärbung erhält, phenolische Substanzen werden im Zuge dieses Prozesses produziert, welche eine Rolle in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen spielen, und die Zusammensetzung der Kohlenhydrate in den Zellwänden wird verändert, wodurch die Zwiebelschale widerstandsfähiger wird (BREWSTER, 2008). Hinsichtlich der Pigmentierung sind zwei Gruppen der Flavonoide essentiell: Anthocyane sind für die Färbung von rotschaligen Zwiebelsorten verantwortlich, wohingegen die gelben bis bräunlichen Pigmente in gelbschaligen Sorten durch chemische Umwandlung der Flavonole gebildet werden (BREWSTER, 2008). Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Induktion der Zwiebelbildung eine ausreichend lange Photoperiode unerlässlich ist: Unterhalb der kritischen Photoperiode verbleibt die Zwiebelpflanze in einem lauchähnlichen Zustand, aber auch Teilungen, bei denen sich mehrere Pflanzen entwickeln, oder Dickhäuse können auftreten (KRETSCHMER, 2005 a). Versuche mit europäischen Sorten haben gezeigt, dass eine Photoperiode von 16 Stunden zu einer vollständigen Ausbildung der Zwiebeln führt (KRETSCHMER, 2005 a). Mit dem Abschluss der Zwiebelbildung beginnt die Ruhephase (PRAEGER, 2005 a).

Nach der Überwinterung geht die Zwiebelpflanze im zweiten Jahr in die generative Phase über: Mit dem Beginn der Bildung von Wurzeln und einer gewissen Blattanzahl (Jugendphase) ist die Ruhephase beendet und die Blüteninduktion durch niedrige Temperaturen ist möglich (Temperaturphase). Die Blütenanlage kann durch höhere Temperaturen, welche für das Zwiebelwachstum verantwortlich sind, allerdings wieder zerstört werden, es besteht daher ein Wettbewerb zwischen der Blütenanlagenentwicklung und dem Zwiebelwachstum (Konkurrenzphase). In der Abschlussphase bevorzugt die heranwachsende Blüte etwas höhere Temperaturen bis schlussendlich der Blütenschaft mit Spatha und Blütenstand an der Spitze entwickelt ist. Die nachfolgende Blüte, eine Bestäubung sowie eine erfolgreiche Befruchtung führen zur Samenbildung. Teilweise erfolgt die Bildung von Blütenständen schon im ersten Ve-

getationsjahr, welche in Form von ungewollter Schosser im Bestand sichtbar werden. (KRETSCHMER, 2005 a)

2.1.2. Kultivierung von Speisezwiebel

Im Folgenden werden die pflanzenbaulichen Eckdaten bei Sätzwiebel erläutert, auf die Produktion von Saatgut und die Kultivierung von Pflanzgut, zum Beispiel Steckzwiebel, wird nicht weiter eingegangen.

Im praktischen Anbau wird zwischen Sommer- und Winterzwiebel unterschieden: Pflanzen der Sorten von *Allium cepa* L., deren Zwiebeln im Langtag gebildet und im Sommer geerntet werden, zählen zu den Sommerzwiebeln, wohingegen jene Pflanzen, welche über den Winter auf dem Feld stehen, im Kurztag des Frühjahrs ihre Zwiebeln bilden und bereits im Juni abreifen, zu den Winterzwiebeln zusammengefasst werden. Die genannten Begriffe sind somit von *Allium fistulosum* L., dem Winterhecken-, Winterheck- oder Winterzwiebel, abzugrenzen, welcher aufgrund seiner Laubbildung als Bundzwiebel vermarktet wird. (KRETSCHMER, 2005 b)

Die Zwiebelpflanze stellt keine besonderen Ansprüche an das Klima und wächst sortenabhängig in weiten Bereichen, trotzdem sind milde und trockenere Regionen besser geeignet, um qualitativ hochwertige Zwiebeln zu produzieren (BACKHAUS, 2005). Mittlere humose Böden gewährleisten eine ausreichende Wasserführung und Durchwurzelung und bieten gute Wachstumsbedingungen, wohingegen schwere Böden, wie Tone, weniger empfehlenswert sind (MÜLLER, 2005). Verdichtete und zur Staunässe neigende Standorte, extrem leichte Böden und jene, deren pH-Wert unter 5 beziehungsweise über 7,5 liegt, sind für den Speisezwiebelanbau nicht geeignet (BACKHAUS, 2005). Steinfreie Böden sind vorteilhaft und erlauben einen schonenden Technikeinsatz (MÜLLER, 2005).

Hinsichtlich der Fruchtfolge ist einerseits auf eine mindestens fünffährige Anbaupause zu achten und andererseits sind Vorfrüchte zu wählen, welche ohne Strukturschäden des Bodens abgeerntet werden können und danach noch ausreichend Zeit für die Bodenvorbereitungen bleibt (BACKHAUS, 2005).

Die Aussaat von Sommerzwiebeln erfolgt ab Ende Februar bis etwa Anfang April, jene von Winterzwiebeln richtet sich nach den sortentypischen Empfehlungen der Züchter und erfolgt in Österreich in der Regel Ende August (KRETSCHMER, 2005 b). Die Pflanzen müssen vor Vegetationsende im Herbst drei bis vier Blätter aufweisen, um Auswinterungsschäden zu überstehen (KRETSCHMER, 2005 b). Wichtig ist ein homogenes, ebenes Saatbett mit guter Wasserführung und einer lockeren Bodenschicht im Abdeckhorizont, welches durch eine fla-

che Saatbettbereitung im Frühjahr erzielt wird (KLEISINGER, 2005). Die Aussaatmenge richtet sich nach den gewünschten Kalibergrößen der Zwiebeln: Die Haushaltsgröße tendiert zu den Kalibern 50 bis 70 mm, wofür bei Sommerzwiebel 3,5 bis 4 Saatguteinheiten pro Hektar (eine Einheit entspricht 250.000 Samen) gesät werden (KRETSCHMER, 2005 b). Aufgrund der zu erwartenden Auswinterungsverluste bei Winterzwiebeln, muss die Aussaatmenge gegenüber Sommerzwiebeln um etwa 10 Prozent erhöht werden (KRETSCHMER, 2005 b). Die Aussaat erfolgt fast ausschließlich mittels Einzelkornsämaschine mit Nachlaufwerkzeugen bei einer Aussaattiefe von 2 bis 3 cm (KRETSCHMER, 2005 b; KLEISINGER, 2005).

Die weitere Bestandespflege umfasst eine sachgerechte Anwendung von Pflanzenschutzmitteln und bei Verzicht auf Herbizide eine mechanische Unkrautregulierung, zum Beispiel mittels Scharhacke (KLEISINGER, 2005). Um Wasserstress zu verhindern, auf welchen die Pflanze zur Zeit der Zwiebelbildung besonders empfindlich reagiert, und eine optimale Entwicklung zu gewährleisten, ist des Weiteren eine Bewässerungsplanung nötig (KRETSCHMER, 2005 b). Als Vorgabe der Bewässerungshöhe werden je nach Bodenbedingungen und Tiefe des Wurzelsystems 20 bis 30 mm pro Gabe vorgeschlagen (KRETSCHMER, 2005 b). Des Weiteren werden auf Grundlage von Bodenuntersuchungen und den daraus resultierenden Versorgungsstufen die Düngemaßnahmen geplant, wobei Erträge von etwa 60 Tonnen pro Hektar eine mittlere Gesamtaufnahme von folgenden Makronährelementen in Kilogramm je Hektar benötigen: 125 Stickstoff, 160 Kalium, 20 Phosphor, 20 Magnesium und 25 Schwefel (MÜLLER, 2005). Die Aufnahme von etwa 40 kg Kalzium bleibt hierbei unberücksichtigt, da eine Kalkung nur bei einer etwaigen Korrektur des pH-Wertes vorgenommen wird (MÜLLER, 2005).

KLEISINGER (2005) beschreibt folgende Arbeitsschritte im Rahmen der Zwiebelernte: Grundsätzlich wird zwischen einer einphasigen Ernte, bei welcher die Funktionen Roden und Überladen in einer Maschine kombiniert werden und völlig auf die Feldnachreife verzichtet wird, und einer mehrphasigen Ernte unterschieden. Vor dem Roden der Zwiebeln erfolgt ein Schlottenschnitt auf etwa 8 bis 10 cm, damit die teilweise noch grünen Schlotten rasch einziehen und in weiterer Folge eine ausreichende Durchlüftung im Lager gewährleistet ist. Dieser wird entweder mit Zwiebelkrautschläger im Heckenbau oder kombiniert mit dem Rodevorgang im Frontanbau durchgeführt. Der Rodevorgang dient dazu, die Zwiebeln mit möglichst wenig Erdanhang und unter Vermeidung von Klutenbildung auf einer ebenen und festen Bodenoberfläche auf Schwade abzulegen. Auf leichten bis mittelschweren Böden erfolgt dieser Arbeitsschritt mittels Siebketten-Vorratsroder mit Rodewelle. Anschließend erfolgt die Feldtrocknung für eine Dauer von etwa 10 Tagen. Um eine gleichmäßige Trocknung zu ge-

währleisten, insbesondere nach starken Niederschlägen, kann ein Wenden der Zwiebelchwade durchgeführt werden, welches aber eine zusätzliche Beanspruchung des Erntegutes darstellt und in der Regel nicht durchgeführt wird. Die Ernte selbst erfolgt vorzugsweise im Überladeverfahren mit parallel fahrenden Traktoren, wobei auch Kartoffel-Bunkersammelroder hierfür umgerüstet werden können. Das Erntegut wird dabei entweder in Großkisten, in den Traktoranhänger selbst oder in einen LKW-Anhänger überführt. Die Großkisten mit dem darin befindlichen Erntegut können direkt eingelagert werden, die losen Zwiebeln im Anhänger müssen mittels Abkippsband oder Sturzbunker noch in Großkisten gefüllt oder in das Schüttlager transportiert werden. (KLEISINGER, 2005)

2.1.3. Lagerung

PRAEGER (2005 b) erwähnt folgende Aspekte der Lagerung von Speisezwiebel: Bevor die Absenkung der Temperatur erfolgen kann, ist bei einer mehrphasigen Ernte meist eine Nachtrocknung (3 bis 4 Wochen) mit Warmluft nötig. Unbeheizte Außenluft sollte nur verwendet werden, wenn deren Temperatur höher ist als die Produkttemperatur und der absolute Feuchtigkeitsgehalt nicht zu hoch ist. Zur Beschleunigung der Trocknung ist die Erhitzung der Außenluft (höchstens auf 30 °C Produkttemperatur) ratsam. Wenn die Zwiebeln bei Bewegung rascheln und fest geschlossene Hälse aufweisen, deren Blätter sich bei Druck zwischen Daumen und Zeigefinger nicht mehr gegeneinander bewegen lassen, ist die Trocknung abgeschlossen. Besteht die Gefahr, dass die Zwiebeln während der Feldtrocknung Niederschlägen oder starker Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind, ist eine einphasige Ernte empfehlenswert, wobei eine intensivere Trocknung erforderlich ist: Diese sollte bei einer relativen Feuchtigkeit von 30 bis 70 % und maximal 28 °C (Winterzwiebeln) oder besser bei 20 bis 25 °C (Sommerzwiebeln) für 1 bis 2 Wochen erfolgen mit anschließender Nachtrocknung mit Außenluft. Nach der Trocknung kann die Temperatur im Lager in kleinen Schritten gesenkt werden, um Kondenswasserbildung an den Zwiebeln zu vermeiden, bis schließlich eine konstante Temperatur zwischen 0 und 2,5 °C für die Langzeitlagerung erreicht ist. Bei kurzzeitiger Lagerung bis Dezember sind 5 °C ausreichend. Die niedrigen Temperaturen hemmen den Sprossaustrieb, verringern Fäulnisverluste und reduzieren den Reservestoffabbau. Der Gefrierpunkt von -0,8 °C sollte aber nicht unterschritten werden, da bei Bewegung der Zwiebel Frostschäden verursacht werden können. Neben dem Frischluftlager, bei welchem nur die Außenluft zur Kühlung des Lagergutes verwendet wird, besteht auch die Möglichkeit einer maschinengekühlten Lagerung. Auch die Lagerung unter CA-Bedingungen („controlled atmosphere“) stellt eine Möglichkeit dar bei welcher die Messung und Regelung der Atmosphä-

renzusammensetzung stattfindet: Durch verringerte O₂- und erhöhte CO₂- Konzentrationen werden hemmende Effekte auf die Stoffwechselaktivität der Zwiebeln und den Pathogenbefall erzielt, der Sprossaustrieb wird verringert und die Zwiebelfestigkeit bleibt erhalten. Empfehlungen für geeignete Konzentrationen liegen bei 1 bis 3 % O₂ und 0 bis 5 % CO₂, wobei die beste Qualitätserhaltung unter Ultra-Low-Oxygen-Bedingungen (ULO) erzielt wurde (O₂-Konzentration 1% und CO₂-Konzentration < 1%). Die CA-Lagerung findet in der Praxis allerdings kaum Anwendung. Um den Feuchteverlust der Zwiebeln ausreichend einzuschränken ist eine relative Luftfeuchtigkeit von 75 - 78 % empfehlenswert. Des Weiteren ist eine regelmäßige Luftbewegung während der Lagerung nötig, um die durch Atmung und Transpiration entstandene Wärme und Feuchtigkeit abzutransportieren. Die übliche wöchentliche Belüftungsdauer liegt bei etwa 5 Stunden. Bei der Auslagerung sollte die Temperatur für einige Tage wieder langsam erhöht werden, um Kondensation an den Zwiebelschalen zu vermeiden. Hinsichtlich der Lagerformen wird zwischen Schüttlager und Kistenlagerung unterschieden: Bei der Schüttlagerung werden die Zwiebeln lose im Lagerraum aufgeschichtet, wobei der Raum entweder über die ganze Fläche befüllt wird oder durch Trennwände in Boxen unterteilt ist. Für die Kistenlagerung werden in der Regel Holzkisten mit geschlitzten Seitenwänden und Palettenböden verwendet, welche im Lagerraum übereinander gestapelt werden. (PRAEGER, 2005 b)

Die mögliche Lagerdauer von Speisezwiebel wird vor allem durch die Temperatur bestimmt und liegt bei 1 °C und gut lagerfähigen Sommerzwiebelsorten zwischen 6 und 8 Monaten, unter CA-Bedingungen ist eine Verlängerung um 1 bis 2 Monate möglich (PRAEGER, 2005 b). Aufgrund des geringen Trockensubstanzgehaltes von 9 bis 10 Prozent, sind Winterzwiebeln für eine längere Lagerung nicht geeignet (KRETSCHMER, 2005 b).

2.2. *Botrytis* spp. an Speisezwiebel (*Allium cepa* L.)

Pilzarten der Gattung *Botrytis* verursachen an Speisezwiebel (*Allium cepa* L.) sowohl am Feld und im geschützten Anbau als auch am Lager wichtige Krankheiten und hohe ökonomische Verluste, zum Beispiel durch die *Botrytis*-Blattfleckenkrankheit oder eine sogenannte Halsfäule (LORBEER et al., 2004). Nachfolgend werden die pathogenen Arten an Speisezwiebel charakterisiert sowie deren Taxonomie und Biologie behandelt.

2.2.1. Taxonomie

Tabelle 1: Taxonomie der Gattung *Botrytis* (WILLIAMSON et al., 2007).

Reich	Fungi
Abteilung	Ascomycota
Unterabteilung	Pezizomycotina
Klasse	Leotiomycetes
Ordnung	Helotiales
Familie	Sclerotiniaceae
Gattung	<i>Botryotinia</i> (asexuelles Stadium: <i>Botrytis</i>)

Das asexuelle Stadium *Botrytis* wurde im Jahr 1729 von Micheli beschrieben und umfasst mehr als 20 Arten, bei welchen teilweise sexuelle Stadien als *Botryotinia* bekannt sind (ELAD et al., 2004; BEEVER und WEEDS, 2004). Es wurden weiterhin neue *Botrytis*-Arten entdeckt, wie zum Beispiel *Botrytis sinoallii* J. Zhang, G.Q. Li & W.Y. Zhuang im Jahr 2010 (ZHANG et al., 2010). Manche bereits beschriebene Arten der genannten Gattung sind allerdings nur

sehr dürftig charakterisiert und es wird vermutet, dass einige Pilzarten, welche der eng verwandten Gattung *Sclerotinia* zugeschrieben werden, eigentlich der Gattung *Botryotinia* angehören (KOHN, 1979).

Insgesamt werden sieben Arten der Gattung *Botrytis* mit Krankheiten an Speisezwiebel assoziiert, wobei von vier Arten auch ein sexuelles Stadium bekannt ist (CHILVERS und DU TOIT, 2006). Diese sind in der nachstehenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: *Botrytis*-Arten an Speisezwiebel.

Asexuelles Stadium	Sexuelles Stadium
<i>Botrytis aclada</i> Fresen.	unbekannt
<i>Botrytis allii</i> Munn	unbekannt
<i>Botrytis byssoidea</i> J. C. Walker	<i>Botryotinia allii</i> (Sawada) W. Yamam.
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	<i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel
<i>Botrytis porri</i> N. F. Buchw.	<i>Botryotinia porri</i> (J.F.H. Beyma) Whetzel
<i>Botrytis squamosa</i> J. C. Walker	<i>Botryotinia squamosa</i> Vienn.-Bourg.
<i>Botrytis tulipae</i> Lind	unbekannt

Botrytis aclada und *Botrytis byssoidea* konnten in der Vergangenheit nicht immer eindeutig differenziert werden und wurden zum Teil als ein und dieselbe Art angesehen, wohingegen *Botrytis aclada* und *Botrytis allii* als Synonyme gehandhabt wurden (YOHALEM et al., 2003). Durch intensive Forschung und die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden zur

Artdifferenzierung konnte einerseits gezeigt werden, dass es sich bei *Botrytis aclada* und *Botrytis byssoidea* um zwei verschiedene Pilzarten handelt, welche morphologisch und molekularbiologisch unterscheidbar sind (OWEN et al., 1950; NIELSEN et al., 2001; YOHAELEM et al., 2003). Andererseits wurde festgestellt, dass innerhalb der Pilzart *Botrytis aclada* zwei genetisch unterschiedliche Gruppen (AI und AII) differenziert werden können (NIELSEN et al., 2001; YOHAELEM et al., 2003). Die beiden Gruppen lassen sich des Weiteren anhand der Chromosomenzahl unterscheiden (AII besitzt 32 und AI 16 Chromosomen) und auch die Unterschiede in der Sporengröße sind statistisch signifikant, obwohl teilweise Überlappungen vorhanden sind (SHIRANE et al., 1989; NIELSEN et al., 2001; YOHAELEM et al., 2003). Es wird vermutet, dass *Botrytis aclada* AII ein polyploider Hybrid ist, welcher durch zwischenartliche Kreuzung von *Botrytis aclada* AI und *Botrytis byssoidea* entstanden ist (NIELSEN und YOHAELEM, 2001). Von YOHAELEM et al. (2003) wurde der Subgruppe, welche kleinere Sporen ausbildet (*Botrytis aclada* AI), der Name *Botrytis aclada* Fresen. zugewiesen und der Subgruppe mit den größeren Sporen (*Botrytis aclada* AII) der Name *Botrytis allii* Munn. Diese sind durch nachgewiesene morphologische, zytologische und genetische Unterschiede als unterschiedliche Arten anzusehen (YOHAELEM et al., 2003).

Botryotinia allii (Sawada) W. Yamam. wurde von Yamamoto 1956 als sexuelles Stadium von *Botrytis byssoidea* angegeben (BEEVER und WEEDS, 2004). *Botryotinia allii* wurde bisher nur in Japan entdeckt, es ist daher möglich, dass sich der Pilz in den Vereinigten Staaten von Amerika und Europa vor allem asexuell reproduziert oder aber *Botryotinia allii* ist nicht das sexuelle Stadium von *Botrytis byssoidea* (NIELSEN et al., 2001). Nach KOHN (1979) bildet *Sclerotinia allii* Sawada kein asexuelles Stadium, wodurch sie *Sclerotinia allii* Sawada zu *Ciborinia allii* (Sawada) L. M. Kohn neu kombinierte. Die genauen Zusammenhänge sind allerdings noch nicht hinreichend geklärt (BEEVER und WEEDS, 2004). In den beiden Repositorien „Mycobank“ und „Index Fungorum“ werden derzeit unterschiedliche gültige Namen für den Pilz angeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sich an dem Repositorium „Mycobank“ orientiert, in welchem *Botryotinia allii* (Sawada) W. Yamam. als sexuelles Stadium angegeben wird.

LIND (1913) gibt für *Botrytis parasitica* Cavara einen nomen novum, weil er meint, dass der Name *Botrytis parasitica* früher bereits von Fries verwendet wurde. *Botrytis parasitica* wurde durch Fries angenommen und dadurch sanktioniert (FRIES, 1829-32). In den beiden Repositorien „Index Fungorum“ und „Mycobank“ sind *Botrytis parastica* Pers. und *Botrytis parasitica*

Schleiden angeführt. Die Sklerotienform von *Botrytis parasitica* Cavara ist *Sclerotium tulipae* Lib. (LIND, 1913).

Der neue Name für *Botrytis parasitica* Cavara lautet *Botrytis tulipae* Lind und bezieht sich daher auf dasselbe Basionym.

Botrytis parasitica Cavara (1888) und *Botrytis parasitica* Schleid. (1845) sind Homonyme zu *Botrytis parasitica* Pers. (1796).

Sclerotium tulipae Lib. ist nicht das Basionym zu *Botrytis tulipae* Lind und daher die Bezeichnung *Botrytis tulipae* (Lib.) Lind in „Index Fungorum“ nicht richtig. „Mycobank“ führt dies nicht so (BEDLAN, 2016).

Die *Botrytis parasitica* von Persoon heißt heute *Hyaloperonospora parasitica* und ist ein Falscher Mehltau.

Die *Botrytis tulipae* von Hopkins (1921) ist ein Homonym, taxonomisch ist es aber *Botrytis tulipae* Lind aus 1913. Hopkins gibt einen nom. nov.: *Botrytis tulipae* (Libert) Hopkins, weil er ebenfalls *Sclerotium tulipae* Lib. als Basionym verwendet.

Botrytis parasitica von Schleiden (1845) = *Peronospora schleideni* Unger (1847) = *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. ex Berk., der Falsche Zwiebelmehltau.

2.2.2. Biologie

Arten der Gattung *Botrytis* sind weltweit verbreitet und kommen sowohl in subtropischen und tropischen als auch in gemäßigten und kühlen Regionen der Erde vor (ELAD et al., 2004). Sie überdauern als Sklerotien im Boden oder als Myzel in beziehungsweise auf befallenen Pflanzenrückständen (AGRIOS, 2005). Sklerotien sind durch Rindenpigmente (Melanin) schwarz gefärbte, kompakte Zusammenlagerungen von Myzel, die als Dauerorgane fungieren und mehrere Jahre im Boden überleben können (HOLZ et al., 2004; AGRIOS, 2005). Manche Arten können auch in die Samen ihrer Wirtspflanzen eindringen und darin überdauern, wie zum Beispiel *Botrytis aclada* (BEDLAN, 2012). In gemäßigten Regionen entwickelt sich im Frühjahr aus den Sklerotien ein graues Myzel, welches zusammen mit dem in Pflanzenresten überwinterten Myzel als primäres Inokulum fungiert und Konidienträger mit Konidien produziert (WILLIAMSON et al., 2007). Die eiförmigen, einzelligen Konidien sind hyalin oder gräulich gefärbt und werden freistehend in Gruppen an den apikalen Zellen der Konidienträger gebildet, welche dadurch ein bäumchenförmiges Aussehen erhalten (AGRIOS, 2005).

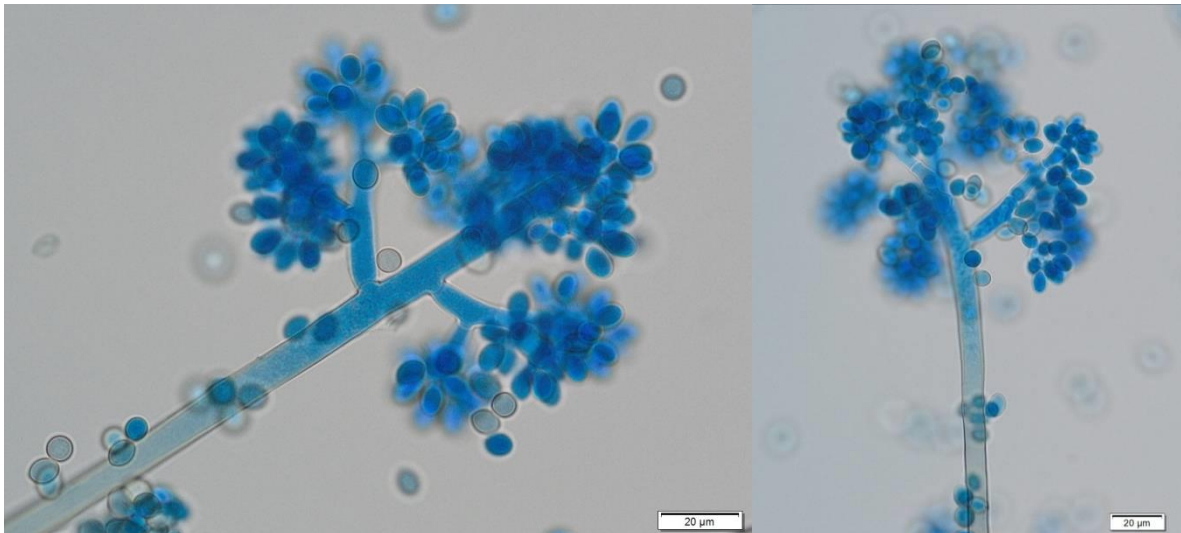


Abb. 1 Konidienträger mit darauf sitzenden Konidien von dem Pilz *Botrytis cinerea*, angefärbt mittels Wittmann's Blau.

Feuchtkühles Wetter und Temperaturen von 15-20 °C begünstigen Wachstum, Sporulation und Keimung der Konidien und somit eine erfolgreiche Infektion der Wirtspflanzen (BEDLAN, 2012). *Botrytis*-Arten sind auch bei niedrigen Temperaturen von etwa 0-10 °C aktiv, wodurch sie auch am Lager zu erheblichen Verlusten führen können (AGRIOS, 2005). Die keimenden Konidien können sowohl direkt über die unverletzte Kutikula als auch über Wunden und natürliche Öffnungen, wie zum Beispiel Stomata, eindringen (HOLZ et al., 2005). Arten der Gattung *Botrytis* sind nekrotroph und entwickeln sich nach erfolgreicher Infektion und Abtöten des Wirtsgewebes als Saprophyten auf dem abgestorbenen Gewebe (HOLZ et al., 2004). Die Zellen des befallenen Wirtsgewebes beginnen im Zuge dessen zu kollabieren und zerfallen, wodurch sich diese Partien verfärben und weich werden (AGRIOS, 2005). Schließlich werden die befallenen Gewebepartien mit dem für *Botrytis* spp. charakteristischen grauen Konidienrasen überzogen (BEDLAN, 2012). Die Bildung von sekundärem Inokulum wiederholt sich im Laufe der Vegetationsperiode mehrmals, wodurch sich die Krankheit im Bestand ausbreitet und Epidemien ausgelöst werden können (LORBEER et al., 2004). Weiters werden auch Sklerotien innerhalb des absterbenden Wirtsgewebes gebildet (WILLIAMSON et al., 2007). Der asexuelle Entwicklungszyklus ist in der nachstehenden Abb. 2 grafisch veranschaulicht. Neben der vegetativen Vermehrung ist für einige *Botrytis*-Arten auch eine sexuelle Entwicklung bekannt: Sexuell entstandene Sklerotien bilden Apothezien, welche Asci mit jeweils acht Ascosporen enthalten (WILLIAMSON et al., 2007). Die Apothezien werden allerdings nur sehr selten gebildet und in befallenen Kulturen kaum beobachtet (WILLIAMSON et al., 2007). Die Details des sexuellen Vermehrungszyklus sind allerdings noch nicht ausreichend erforscht

und auch die Rolle der Ascosporen innerhalb der Epidemiologie der *Botrytis*-Arten ist noch nicht hinreichend geklärt (WILLIAMSON et al., 2007).

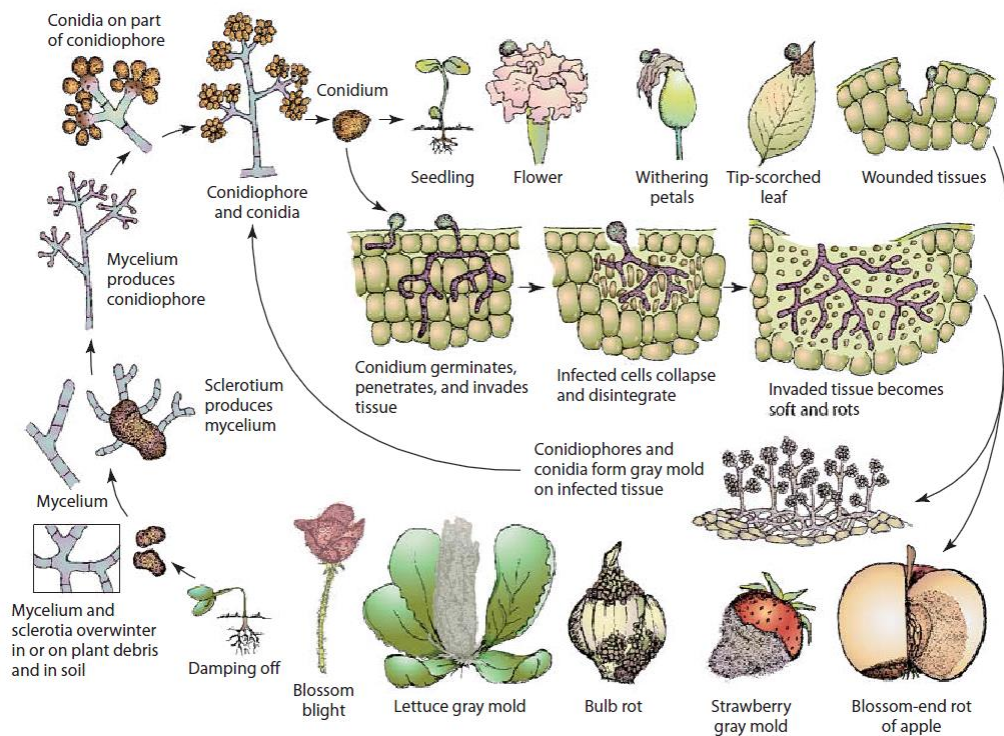


Abb. 2 Asexueller Entwicklungszyklus von *Botrytis* spp. (AGRIOS, 2005).

Die Verbreitung von infektiösen Einheiten erfolgt vor allem durch den Wind, aber auch Regen und Insekten können hierbei eine Rolle spielen (HOLZ et al., 2004). Die Ausbreitung kann des Weiteren durch kontaminiertes Saatgut erfolgen und auch Pflanzenrückstände, die auf dem Feld verbleiben, stellen Infektionsquellen dar (AGRIOS, 2005).

Für die Überdauerung ungünstiger Umweltbedingungen sind die bereits erwähnten Sklerotien von großer Bedeutung, die von allen *Botrytis*-Arten gebildet werden und in Größe und Form variieren können (HOLZ et al., 2004). Bei einigen Arten, wie zum Beispiel *Botrytis cinerea*, wurde speziell in älteren Pilzkulturen auch die Bildung von Chlamydosporen beobachtet, durch die der Pilz ungünstige Bedingungen für kurze Zeit überstehen kann (URBASCH, 1983).

2.2.3. Die Pathogene

Sieben Arten der Gattung *Botrytis* verursachen an Speisezwiebel das Krankheitsbild Grauschimmel: *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis byssoidea*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis porri*, *Botrytis squamosa* und *Botrytis tulipae* (BEDLAN, 2014). Der Wirtspflanzenkreis von *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis byssoidea* und *Botrytis squamosa* beschränkt sich vor allem auf Pflanzenarten der Gattung *Allium*, insbesondere Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.), Schalotte (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.), Porree (*Allium ampeloparsum* ssp. *porrum* L.), Knoblauch (*Allium sativum* L.) sowie Unkräuter der genannten Gattung werden befallen (FRITSCH, 2005; CHILVERS und DU TOIT, 2006; FISCHER et al., 2008). *Botrytis porri* kommt hauptsächlich an Porree und Knoblauch vor (BEDLAN, 2014). *Botrytis tulipae* ist hingegen auf Pflanzenarten der Gattung *Tulipa* spezialisiert, befällt äußerst selten aber auch die Küchenzwiebel (CHILVERS und DU TOIT, 2006). Im Gegensatz zu den anderen Arten der Gattung *Botrytis*, welche ein enges Wirtspflanzenpektrum aufweisen, befällt die am häufigsten auftretende Art *Botrytis cinerea* weltweit mehr als 200 verschiedene Kulturpflanzenarten aus unterschiedlichen Pflanzenfamilien und -gattungen, wodurch die genannte Art einen enorm großen Wirtspflanzenkreis aufweist (WILLIAMSON et al., 2007). Die wirtsspezifischen *Botrytis*-Arten sind allerdings vielfach in der Lage Nicht-Wirtspflanzen zu befallen, bei denen kleine Läsionen entstehen aber die Krankheit nicht weiter fortschreitet, und können saprophytisch auch auf abgestorbenen Pflanzenmaterial von Nicht-Wirtspflanzen überdauern (LORBEER et al., 2004).

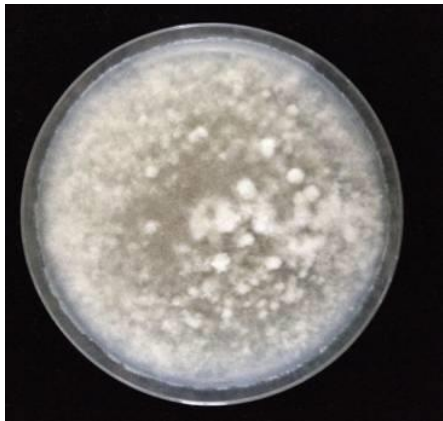
Die wichtigsten morphologischen und zytologischen Charakteristika der einzelnen Arten sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 3: Morphologische Charakteristika der *Botrytis*-Arten.

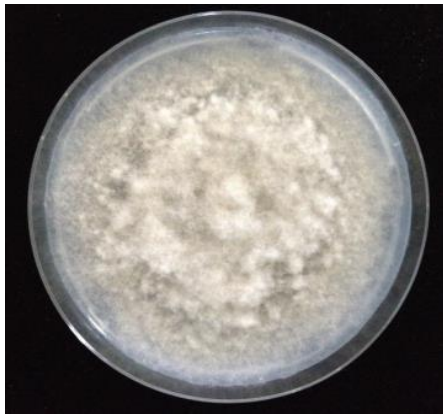
<i>Botrytis</i>-Art	Morphologie der Pilzkultur¹	Wachstumsrate²
<i>B. aclada</i>	Weißes, flaumiges Myzel; gleichmäßig über die gesamte Petrischale verteilte, dicht stehende Konidienträger mit Konidien, die Pilzkultur wirkt gräulich	intermediär
<i>B. allii</i>	Weißes, flaumiges Myzel; gleichmäßig über die gesamte Petrischale verteilte, dicht stehende Konidienträger mit Konidien; die Pilzkultur wirkt gräulich	intermediär
<i>B. byssoidea</i>	Weißes, flaumiges Myzel; keine Sporulation	intermediär
<i>B. cinerea</i>	Weißes, flaumiges Myzel, welches mit fortschreitendem Alter bräunlich bis gräulich gefärbt ist; Bildung von dicht stehenden Konidienträgern mit Konidien	schnell
<i>B. porri</i>	Weißliches bis gräuliches Myzel; am Rand der Petrischale starke Bildung von flauschigem Myzel, welches den Deckel der Petrischale erreicht; keine Sporulation	schnell
<i>B. squamosa</i>	Weißliches bis gräuliches, relativ flaches und flockiges Myzel; keine Sporulation	intermediär
<i>B. tulipae</i>	Weißes, flaches Myzel; keine Sporulation	—

¹ Kultivierung auf PDA bei 20 °C und Schwarzlicht.

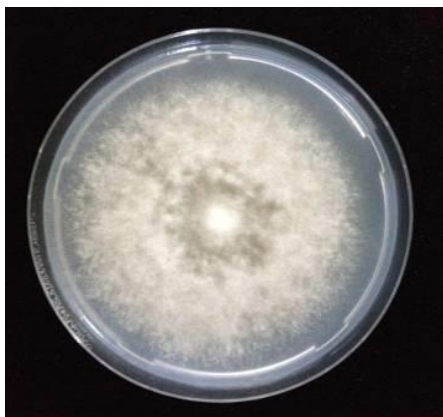
² Die Wachstumsrate gibt an, wie viele Tage der Pilz bei 25 ± 3 °C benötigt, um eine Petrischale mit PDA (10 cm) ausgehend von einem mit dem Pilz bewachsenen Agarstück in der Mitte der Petrischale (5 mm) bis zum Rand zu bewachsen: intermediär = 3 bis 6 und schnell = 6 bis 10 (CHILVERS und DU TOIT, 2006). Es wird keine Wachstumsrate für *Botrytis tulipae* angegeben.



Botrytis aclada



Botrytis allii



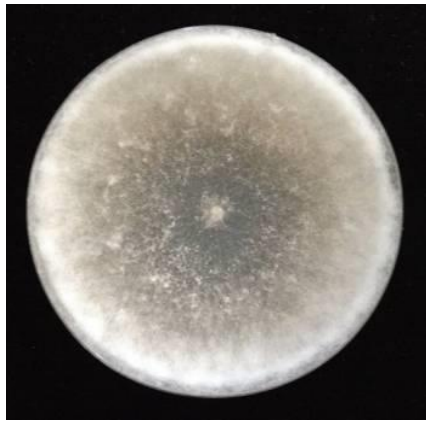
Botrytis byssoidea



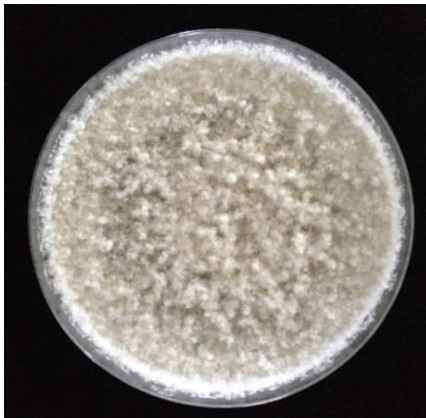
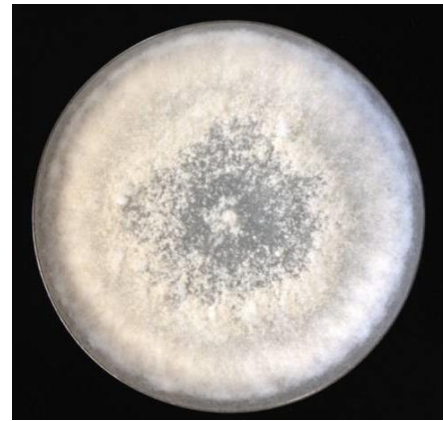
Botrytis cinerea



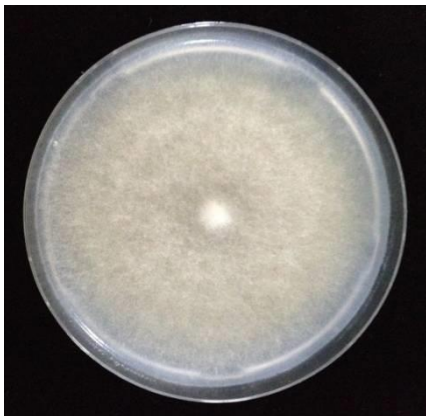
Abb. 3: Morphologie der Pilzkulturen von *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis byssoidea* und *Botrytis cinerea* auf PDA nach 7 (links) und 14 Tagen (rechts) Wachstum bei 20 °C und Schwarzlicht ausgehend von einem mit dem Pilz bewachsenen Agarstück (5 mm im Durchmesser).



Botrytis porri



Botrytis squamosa



Botrytis tulipae

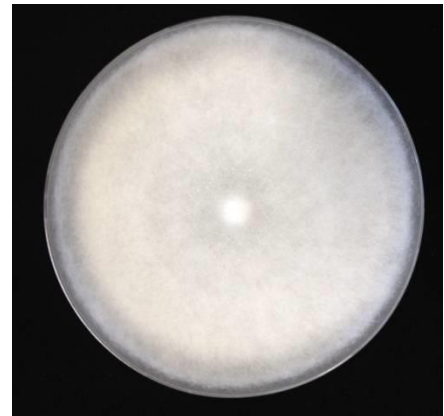


Abb. 4 Morphologie der Pilzkulturen von *Botrytis porri*, *Botrytis squamosa* und *Botrytis tulipae* auf PDA nach 7 (links) und 14 Tagen (rechts) Wachstum bei 20 °C und Schwarzlicht ausgehend von einem mit dem Pilz bewachsenen Agarstück (5 mm im Durchmesser).

Tabelle 4: Konidienlänge und -breite [µm] sowie Chromosomenzahl pro Konidie für die ausgewählten *Botrytis*-Arten.

<i>Botrytis</i>-Art	Konidienlänge [µm]	Konidienbreite [µm]	Chromosomenzahl/Konidie³
<i>B. aclada</i>	9,5 ³ (8,4 - 12,1)	5,2 ³ (4,6 - 5,6)	16
<i>B. allii</i>	10,3 ⁴ (7,1 - 16,2)	5,1 ⁴ (3,8 - 6,3)	32
<i>B. byssoidea</i>	meist 10,0 - 14,0 ⁵ (8,0 - 19,0)	meist 6,0 - 9,0 ⁵ (5,0 - 11,0)	16
<i>B. cinerea</i>	9,0 - 11,0 ³	6,0 - 8,0 ³	16
<i>B. porri</i>	11,38 ⁶ (10,0 - 12,0)	8,46 ⁶ (8,0 - 10,0)	— ⁷
<i>B. squamosa</i>	meist 15,0 - 20,0 ⁵ (13,0 - 22,0)	meist 12,0 - 15,0 ⁵ (10,0 - 17,0)	16
<i>B. tulipae</i>	13,8 - 22,5 ⁸	8,0 - 12,5 ⁸	16

³ nach YOHALEM et al., 2001

⁴ nach MUNN, 1917

⁵ nach WALKER, 1925

⁶ nach BUCHWALD, 1949

⁷ Bei der Art *Botrytis porri* liegen hierzu keine Angaben vor.

⁸ nach HONG et al., 2002

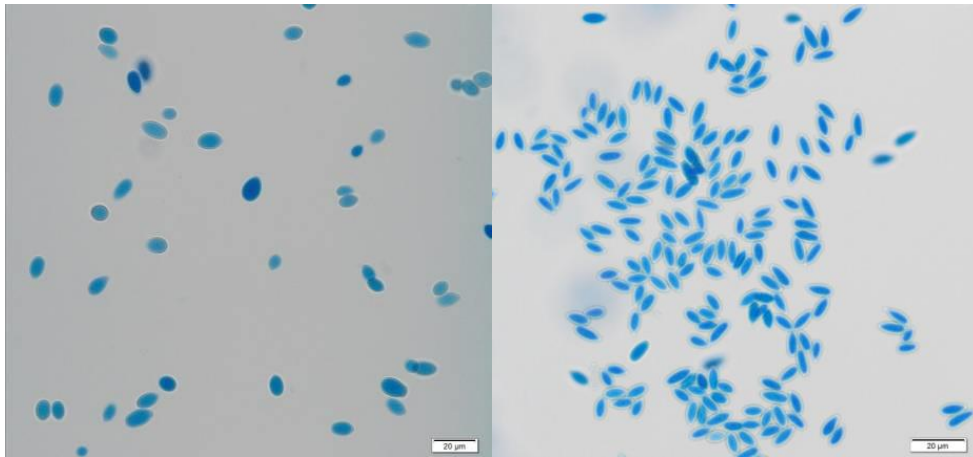


Abb. 5: Konidien von *Botrytis cinerea* (links) und *Botrytis allii* (rechts), angefärbt mittels Wittmann's Blau.

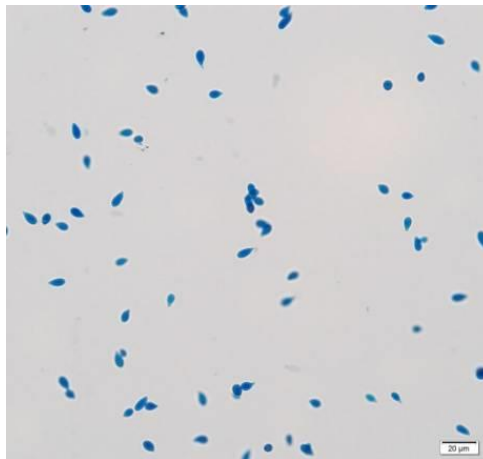


Abb. 6: Konidien von *Botrytis aclada*, angefärbt mittels Wittmann's Blau.

Die genannten Arten verursachen an Speisezwiebel unterschiedliche Symptome:

Botrytis aclada und *Botrytis allii* führen an den Bulben zu einer Halsfäule, welche weltweit eine der wichtigsten Krankheiten an Zwiebel darstellt (LORBEER et al., 2004). Diese äußert sich nach einigen Wochen Lagerung im Halsbereich der Zwiebelbulben in braun verfärbten und weichen Stellen, welche schließlich mit einem grauen Konidienrasen überzogen sind (BEDLAN, 2012). Auch Sklerotien können zwischen den Zwiebelschalen gebildet werden (LORBEER et al., 2004). Die beiden Arten können des Weiteren oberflächliche Flecken an den Schlotten verursachen sowie den Blütenschaft und die Blüten befallen, wodurch die Samenproduktion beeinträchtigt wird (HANCOCK und LORBEER, 1963; RAMSEY und LORBEER, 1986; LORBEER et al., 2004).

Auch *Botrytis byssoides* kann den Blütenstand der Zwiebelpflanzen befallen und wird als Verursacher einer Halsfäule an den Bulben beschrieben, wobei dieser Pilz im Gegensatz zu

Botrytis aclada und *Botrytis allii* massenhaft Myzel erzeugt aber keine beziehungsweise nur eine geringe Bildung von Sklerotien und Konidien erfolgt (RAMSEY und LORBEER, 1986; LORBEER et al., 2004).

Botrytis squamosa befällt hauptsächlich die Schlotten (*Botrytis*-Blattfleckenkrankheit), verursacht gelegentlich aber auch eine Halsfäule an den Bulben (CHILVERS und DU TOIT, 2006). Die *Botrytis*-Blattfleckenkrankheit äußert sich zunächst in zahlreichen runden bis länglichen und weißlichen Flecken, welche leicht eingesunken sind, und einer Bildung von Sklerotien auf den Schlotten und führt bei starker Sonneneinstrahlung und hohen Temperaturen schließlich zum Absterben des Laubes (BEDLAN, 2012). Auch der Blütenstand kann von dem Pilz befallen werden, wodurch dieser zu faulen beginnt und weniger Samen produziert werden (ELLERBROCK und LORBEER, 1976).



Abb. 7: *Botrytis*-Blattfleckenkrankheit an Zwiebel, Quelle: J. Kreiselmaier, DLR-Rheinpfalz.



Abb. 8: Halsfäule an Speisezwiebel, Quelle: Gerhard Bedlan.

Botrytis porri wurde aus natürlich infizierten Zwiebelpflanzen isoliert und auch die Samenübertragbarkeit wurde nachgewiesen, allerdings ist noch weitere Forschung nötig, um dessen Rolle als Pathogen an Zwiebel abklären zu können (DU TOIT et al., 2002).

Botrytis tulipae wird, wie bereits erwähnt, nur äußerst selten an Zwiebel beobachtet und kann eine Halsfäule beziehungsweise generell eine Fäule an den Bulben hervorrufen (SUMNER et al., 1994; CHILVERS und DU TOIT, 2006).

Botrytis cinerea ist ein häufiger Saprophyt an nekrotischen Zwiebelschlotten und kann bei günstigen Umweltbedingungen oberflächliche Flecken an den Schlotten bilden, die allerdings zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung der Pflanze führen, und auch den Blütenstand be-

fallen (HANCOCK und LORBEER, 1963; ELLERBROCK und LORBEER, 1976; LORBEER et al., 2004). Der Pilz ist ebenfalls in der Lage eine Halsfäule an den Zwiebelbulben zu verursachen (BEDLAN, 2012). Nach LORBEER et al. (1973) wird *Botrytis cinerea* weiters als Erreger der Kaffeefleckenkrankheit beschrieben, welche in dem nachfolgenden Kapitel 2.3 ausführlich behandelt wird.

2.3. Die Kaffeefleckenkrankheit

Die Kaffeefleckenkrankheit wurde in der Literatur erstmalig von LORBEER und CLARK (1973) als Krankheit an Speisezwiebel (*Allium cepa* L.) erwähnt und beschrieben. Die genannte Krankheit stellt einen kosmetischen Schaden an den Zwiebelbulben und somit einen Qualitätsmangel dar und führt bei starkem Befall dazu, dass die Zwiebeln nicht mehr marktfähig sind (BEDLAN, 2014). Nachfolgend werden Symptome und Krankheitsverlauf, der Krankheitserreger und mögliche Gegenmaßnahmen erläutert.

2.3.1. Symptome und Krankheitsverlauf

Das Pathogen dringt am Feld in die Zwiebelpflanze ein, wobei zwei unterschiedliche Infektionswege denkbar sind: Entweder wird die Schale der Bulbe direkt penetriert oder der Pilz dringt in die Schlotten ein und wächst von dort aus in die Schalen hinab (CLARK und LORBEER, 1973 a). CLARK und LORBEER (1973 a) beschreiben die nachfolgend entstehenden Symptome folgendermaßen: Auf den Zwiebelschalen entwickeln sich dunkelbraune Flecken, welche entweder rundlich und vollständig dunkel gefärbt sind oder unregelmäßig kreisförmig zerfließen. Letztere sind am Rand dunkelbraun bis schwarz gefärbt, wohingegen der Bereich in der Mitte hellbraun koloriert ist, und entstehen häufig im Hals- und Schulterbereich der Zwiebeln. An der äußeren Schalenseite können auf dem verfärbten Zwiebelgewebe 1-3 mm große und etwa 1 mm dicke Sklerotien gebildet werden. Das Pathogen breitet sich interzellulär hauptsächlich im Mesophyll aus und verursacht dabei nur einen geringen sichtbaren Gewebeschaden. Eine oberflächliche Sporulation des Pilzes wird nur sehr selten beobachtet. (CLARK und LORBEER, 1973 a)

Die beschriebenen Symptome beschränken sich im Gegensatz zu anderen von *Botrytis*-Arten verursachten Krankheiten an Zwiebelbulben in der Regel auf die äußersten, trockenen und pigmentierten Schalen (BEDLAN, 2014). Der Pilz breitet sich von bereits befallenen Schalen

scheinbar nicht in die benachbarten, gesunden Schichten aus: Bei Untersuchungen von befallenen Zwiebelschalen konnten keine Hyphen gefunden werden, welche benachbarte Schalen penetrieren, des Weiteren wurden bei befallenen Zwiebelbulben symptomatische Schalen inmitten von gesunden Schalen beobachtet beziehungsweise zeigte nur die äußerste Schale Flecken, die darunterliegenden Schichten waren hingegen ohne Symptome (CLARK und LORBEER, 1973 a).



Abb. 10: Zerfließende Flecken auf der äußersten, trockenen Zwiebelschale, Quelle: Gerhard Bedlan.



Abb. 9: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit an natürlich infizierten Zwiebelschalen.

Die Untersuchungen von CLARK und LORBEER (1973 a, 1975) haben gezeigt, dass sich die beschriebenen Kaffeeflecken gleichermaßen auf rot- und gelbschaligen Zwiebelbulben entwickeln, aber weißschalige Sorten keine beziehungsweise nur sehr schwache, vernachlässigbare Symptome aufweisen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass weiße Zwiebelschalen die phenolische Substanz Brenzkatechin nicht enthalten (LINK, 1933). Brenzkatechin fungiert mit großer Wahrscheinlichkeit als Substrat für die chemische Farbreaktion, die zu den dunkelbraunen Kaffeeflecken auf den Zwiebelschalen führt (CLARK und LORBEER, 1975).

Das Krankheitsbild wird bereits bei der Ernte sichtbar. Bei den Untersuchungen von CLARK und LORBEER (1973 b) zum Verlauf der Kaffeefleckenkrankheit am Lager wurde in einigen Fällen eine Zunahme der Symptome an den Zwiebeln beobachtet. Dies deutet auf das Vorhandensein von latenten Infektionen hin, welche sich erst während der Lagerung manifestieren. Andererseits wurde auch eine Reduktion der Anzahl an symptomatischen Zwiebeln durch das Abfallen der äußersten, trockenen Schalen festgestellt, welche je nach Zwiebelsorte, Dau-

er der Lagerung und Lagerbedingungen unterschiedlich hoch ausgefallen ist (CLARK und LORBEER, 1973 b).

2.3.2. Krankheitserreger

Der Pilz *Botrytis cinerea* wird als Erreger der Kaffeefleckenkrankheit im Freiland beschrieben (CLARK und LORBEER, 1973 a). Taxonomie, Biologie sowie die Charakteristika der genannten Pilzart wurden in dem vorangegangenen Kapitel 2.2 „*Botrytis* spp. an Speisezwiebel (*Allium cepa* L.)“ bereits ausführlich behandelt. Zwei weitere an Speisezwiebel pathogene *Botrytis*-Arten, *Botrytis allii* und *Botrytis squamosa*, verursachten nach künstlicher Inokulation der Zwiebelbulben ebenfalls Symptome der Kaffeefleckenkrankheit, allerdings wurden diese beiden Arten, im Gegensatz zu *Botrytis cinerea*, nicht aus natürlich infizierten Freilandproben isoliert (CLARK und LORBEER, 1973 a).

2.3.3. Gegenmaßnahmen

Durch pflanzenbauliche Maßnahmen sollen gleichmäßige und nicht zu mastige Pflanzenbestände erreicht werden, wobei vor allem eine korrekte Saat und eine sachgemäße Düngung ausschlaggebend sind (BEDLAN, 2012). Im Bestand können Infektionen weitestgehend durch die Applikation von Fungiziden, welche gegen *Botrytis* spp. wirksam sind, verhindert werden (BACKHAUS, 2005). Hierzu stehen für den Zwiebelanbau in Österreich chemische Pflanzenschutzmittel mit unterschiedlichen Wirkstoffen und Wirkmechanismen zur Verfügung. Biologische Präparate sind für die genannte Kulturart laut österreichischem Pflanzenschutzmittelregister (Stand: März 2016) derzeit keine zugelassen, obwohl in den vergangenen Jahren intensiv an antagonistischen Mikroorganismen gegen *Botrytis* spp. geforscht wurde und diese für andere Einsatzgebiete bereits verfügbar sind, zum Beispiel der Bodenpilz *Gliocladium catenulatum* gegen *Botrytis cinerea* bei Erdbeeren (LORBEER et al., 2005). Des Weiteren ist darauf zu achten, dass mechanische Verletzungen der Zwiebeln vor und bei der Ernte verhindert werden und ein schnelles Abtrocknen im Lager sowie regelmäßiges Lüften erfolgt (BACKHAUS, 2005). Partien mit leichtem Befall können nachsortiert und noch vermarktet werden (BEDLAN, 2012). Die Putzabfälle sollen des Weiteren nicht auf die Felder gebracht werden (BACKHAUS, 2005).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsorganismen

3.1.1. Pathogene

In die Untersuchungen wurden jene sieben *Botrytis*-Arten mit einbezogen, welche an Speisewiebel das Krankheitsbild Grauschimmel verursachen. Folgende Isolate wurden verwendet:

- *Botrytis aclada*: Das Isolat DSMZ-62081 wurde vom Leibniz-Institut DSMZ bestellt. Dieses wurde von *Allium cepa* L. in Deutschland isoliert.
- *Botrytis allii* und *Botrytis porri*: Die Isolate BA3 (*Botrytis allii*) sowie 249 (*Botrytis porri*) wurden von Dr. Lindsey du Toit (Department of Plant Pathology, Washington State University Mount Vernon NWREC) bereitgestellt. Beide Isolate wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika von *Allium cepa* L. isoliert.
- *Botrytis byssoidea* und *Botrytis tulipae*: Die Isolate CBS 104.23 (*Botrytis byssoidea*) und CBS 110.57 (*Botrytis tulipae*) wurden vom Centraalbureau voor Schimmelcultures herangezogen. Letzteres wurde von Pflanzen der Gattung *Tulipa* in den Niederlanden isoliert, das Isolat von *Botrytis byssoidea* hingegen von *Allium cepa* L. in den Vereinigten Staaten von Amerika.
- *Botrytis cinerea*: Das Isolat des Pilzes *Botrytis cinerea* wurde von Pflanzen der Gattung *Rubus* (Sorte 'Nessy') isoliert: Infizierte Brombeermumien aus dem 13. Bezirk in Wien wurden am 09.02.2015 gesammelt und in einer Feuchtkammer bei 24 °C (± 4 °C bedingt durch Tag-Nacht-Schwankungen) und Tageslicht inkubiert. Von dem entstandenen, oberflächlichen Sporenrasen wurden einzelne Sporen auf Petrischalen mit PDA zur Herstellung von Reinkulturen übertragen. Abschließend wurden die Reinkulturen durch Messung von Konidienlänge und -breite auf die gewünschte *Botrytis*-Art überprüft. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sporenmessungen wurde das Mikroskop Olympus BX53F mit der Kamera Olympus XC50 und das Computerprogramm „labSens“ von Olympus verwendet.
- *Botrytis squamosa*: Das Isolat ATCC® 60833TM wurde von der American Type Culture Collection bestellt. Dieses wurde in England von *Allium cepa* L. isoliert.

3.1.2. Zwiebelsorten

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sechs Speisezwiebelsorten getestet, welche typischerweise im Marchfeld kultiviert werden: ‘Electric’, ‘Mustang’, ‘Olympic’, ‘Rawhide’, ‘Red Tide’ und ‘Wiro’. Die Sorteneigenschaften sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 5: Eigenschaften der getesteten Winterzwiebelsorten, Quelle: Austrosaat Katalog Gemüse 2015.

Sorte	Reife	Größe	Form	Schalenfärbung	Lagerfähigkeit	Schossresistenz	Anmerkung
Olympic	mittelfrüh	groß	rund	gelb	gut	gut	Säzwiebel, gute Schalenfestigkeit, ertragreiche Qualitätssorte
Electric	mittelspät	mittelgroß	rund	rot	mittel	mittel	Säzwiebel, gute Innenausfärbung

Tabelle 6: Eigenschaften der getesteten Sommerzwiebelsorten, Quelle: Austrosaat Katalog Gemüse 2015.

Sorte	Reife	Größe	Form	Schalenfärbung	Lagerfähigkeit	Schossresistenz	Anmerkung
Mustang	mittel	mittelgroß	Rund	bronzebraun	sehr gut	sehr gut	Säzwiebel, sehr schalenfest
Rawhide	mittel	mittelgroß	Rund	bronze	sehr gut	sehr gut	Säzwiebel, leuchtende Schalenfarbe, Qualitätssorte, für Beregnungsgebiete
Red Tide	mittel	mittelgroß	Rund	dunkelrot	sehr gut	sehr gut	Säzwiebel, kräftige Entwicklung, für Beregnungsgebiete
Wiro	mittel	mittelgroß	Rund	dunkelrot	sehr gut	sehr gut	Säzwiebel, sehr starkes Wurzelsystem

Mit den ausgewählten Sorten wurden sowohl rotschalige als auch gelbschalige Winter- und Sommerzwiebelsorten berücksichtigt. Weißschalige Zwiebelsorten wurden nicht getestet, da vorangegangene Untersuchungen von CLARK und LORBEER (1973 a, 1975) gezeigt haben, dass diese Sorten keine beziehungsweise nur sehr schwache, vernachlässigbare Symptome der Kaffeeblutkrankheit zeigen (siehe Kapitel 2.3 „Die Kaffeeblutkrankheit“).

Die benötigten Zwiebelproben der unterschiedlichen Sorten wurden von landwirtschaftlichen Betrieben aus dem Produktionsgebiet Marchfeld zur Verfügung gestellt. Die Zwiebelproben der Sorten ‘Mustang’ und ‘Red Tide’ stammten aus der Ernte- und Lagersaison 2014/15. Diese wurden bis zur Verwendung in einem Klimaschrank bei 2 °C in Dunkelheit gelagert. Die Zwiebelproben der restlichen vier Sorten konnten während der Erntesaison 2015 direkt aus dem Zwiebellager der Landwirte für die Versuche bezogen werden.

3.2. Anzucht der Pilzkulturen

Für die Anzucht der Pilzkulturen wurden drei verschiedene Nährmedien verwendet: Potato-Dextrose-Agar (PDA), Onion-Leaf-Extract-Agar (OLEA) und Zwiebel-Agar (ZA). Die Bestandteile der Medien sind in der nachstehenden Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien für die Anzucht der Pilzkulturen.

Potato-Dextrose-Agar (PDA)	
Kartoffelpepton	4,0 g
Glucose	20,0 g
Agar	15,0 g
Wasser	1,0 l
Onion-Leaf-Extract-Agar (OLEA)	
Zwiebelblätter	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser	1,0 l
Zwiebel-Agar (ZA)	
Zwiebelbulben	260,0 g
Agar	15,0 g
Wasser	1,0 l

Für die Herstellung der Nährmedien wurden ausschließlich frische Zwiebelblätter und frische, geschälte Zwiebelbulben verwendet, welche mit einem Mixgerät (Illico Moulinex) zerkleinert wurden. Nach dem Autoklavieren wurden pro Petrischale (9 cm Durchmesser) etwa 25 ml des jeweiligen Nährmediums ausgegossen. Die Petrischalen wurden nach dem Auskühlen des Nährmediums bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 5 °C gelagert.

Um ein aktives Wachstum der Pilzkulturen zu erzielen, wurden alle sieben *Botrytis*-Arten zunächst auf Petrischalen mit PDA überimpft und im Brutschrank bei 20 °C und Weißlicht (Osram L18W/840 Lumilux cool white) kultiviert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Anschließend wurden die verschiedenen Pilzarten entsprechend ihrer unterschiedlichen Ansprüche zur Induktion der Sporulation auf verschiedenen Nährmedien und unter spezifischen Wachstumsbedingungen kultiviert:

- *Botrytis aclada* und *Botrytis allii* wurden auf Zwiebel-Agar bei 20 °C und Schwarzlicht (Osram L18/73) im Brutschrank zur Sporenbildung angeregt.
- *Botrytis cinerea* wurde auf PDA bei 20 °C und Schwarzlicht (Osram L18/73) im Brutschrank kultiviert.
- *Botrytis byssoidea*, *Botrytis porri*, *Botrytis squamosa* und *Botrytis tulipae* wurden auf alle drei Nährmedien überimpft. Die Petrischalen wurden im Brutschrank sowohl mit Weißlicht (Osram L18W/840 Lumilux cool white) als auch mit Schwarzlicht (Osram L18/73) bei folgenden Temperaturstufen kultiviert: 5 °C, 10 °C, 15 °C und 20 °C. *Botrytis squamosa* zeigte bei 5 °C und Schwarzlicht auf OLEA vereinzelt eine spärliche Konidienbildung ($0,38 \times 10^6$ Konidien/ml). Die anderen drei Arten konnten nicht zur Sporulation angeregt werden. Daher wurden diese vier Arten für die weiteren Versuche im Brutschrank auf PDA bei 20 °C und Schwarzlicht kultiviert, um ein ausgeprägtes vegetatives Wachstum und somit dicht bewachsene Myzelkulturen zu erhalten.

Zur Förderung der Bildung von Sklerotien wurden alle sieben Pilzarten einerseits auf Petrischalen mit Zwiebel-Agar und andererseits auf Petrischalen mit PDA überimpft und unter Dunkelheit im Brutschrank bei 15 °C und 20 °C kultiviert.

Die verschiedenen Pilzarten wurden alle zwei bis drei Wochen auf frische Nährmedien überimpft und unter den genannten Bedingungen kultiviert.

3.3. Vorversuche

Im Rahmen von Vorversuchen wurde eine Methode zur künstlichen Infektion der Zwiebeln und Reproduktion der charakteristischen Kaffeeflecken auf den Zwiebelschalen erarbeitet. Hierfür wurden unterschiedliche Inokulationsmethoden und Inkubationsbedingungen getestet, welche nachfolgend zusammengefasst sind.

Für die Durchführung der Vorversuche wurden Zwiebeln der Sorten 'Mustang' und 'Red Tide' verwendet. Für jede zu testende Variante der unterschiedlichen Methoden wurden insgesamt 22 Zwiebelbulben (12 Bulben der Sorte 'Mustang' und 10 Bulben der Sorte 'Red Tide'), die weder verletzt waren noch einen sichtbaren Fremdbefall aufwiesen, vorbereitet: Bei der Hälfte der Zwiebeln (sechs gelb- und fünf rotschalige Zwiebelbulben) wurden die äußeren, trockenen Schalen bis zur ersten fleischigen Schale entfernt (geschälte Zwiebelbulben), bei der anderen Hälfte der Zwiebeln wurde lediglich die äußerste, trockene Schale entfernt und die Bulben wurden mit Leitungswasser gewaschen (ungeschälte Zwiebelbulben).

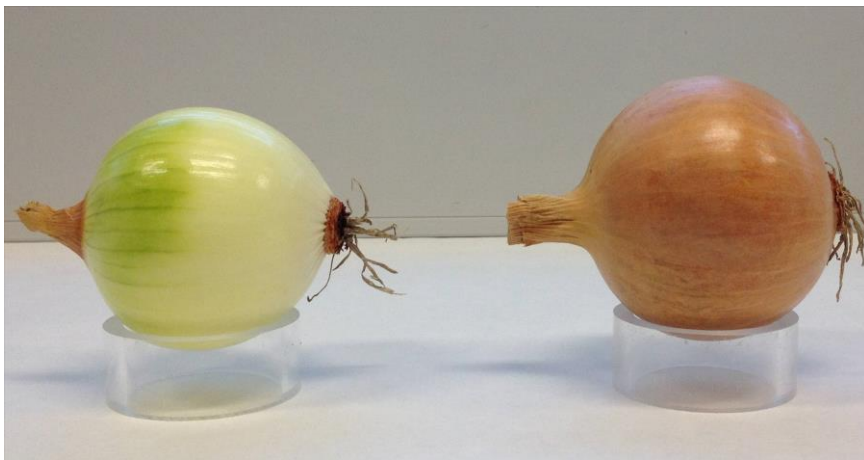


Abb. 11: Vorbereitung der Proben für die Inokulation: Vergleich einer geschälten (links) sowie einer ungeschälten (rechts) Zwiebel.

Des Weiteren wurde der eingetrocknete Zwiebelhals auf etwa 4 cm gekürzt. Im Anschluss daran erfolgte eine Oberflächendesinfektion: Die Zwiebeln wurden für 30 Minuten in eine 0,5-prozentige Natriumhypochlorit-Lösung gelegt, sodass die Bulben zur Gänze mit der Lösung bedeckt waren. Danach wurden sie für 2 Minuten mit Leitungswasser gespült, um die noch anhaftende Oberflächendesinfektionslösung zu entfernen, und einzeln auf Acrylglasringen platziert. Die Acrylglasringe wurden vor deren Verwendung in gleicher Weise wie die Zwiebelbulben oberflächendesinfiziert.

Anschließend erfolgte die Inokulation, wobei folgende vier Methoden mit unterschiedlichen Varianten getestet wurden:

- Inokulation mittels Sporensuspension: Zur Herstellung der Sporensuspension wurde eine Petrischale, welche mit einer zwei bis drei Wochen alten, gut sporulierenden Myzelkultur bewachsen war, mit 5 ml sterilem Wasser geflutet. Anschließend wurden die Konidienträger mit einer sterilen Impföse leicht von der Agaroberfläche abgeschabt, um möglichst viele Konidien freizusetzen. Die entstandene Suspension wurde mittels steriler Pipette in ein Becherglas überführt und gut durchgemischt. Die Bestimmung der Konidienzahl/ml erfolgte durch zweimaliges Auszählen mit der Bürker-Türk-Zählkammer. Die endgültige Konzentration von etwa $2,4 \times 10^6$ Konidien/ml, welche für alle Vorversuche verwendet wurde, wurde durch Verdünnen der Suspension im Becherglas mit sterilem Wasser erreicht. Alle im Rahmen dieser Arbeit benötigten Sporensuspensionen wurden auf diese Weise hergestellt.

Variante 1: Die unverletzten Zwiebelbulben wurden oberflächlich jeweils mit 100 µl Sporensuspension pro Zwiebel inokuliert.

Variante 2: Auf die Oberfläche der Zwiebelbulben wurde eine Spatelspitze Korund (Körnung: 500) gestreut und mit einem Glasspatel auf der Zwiebelschale verrieben, wodurch die Schale künstlich verletzt wurde. Das überschüssige Pulver wurde danach mit sterilem Wasser abgewaschen. Auf die geschaffene Verletzungsfläche wurden jeweils 100 µl Sporensuspension appliziert.

Variante 3a: Alle Zwiebeln wurden mittels Insektennadel verletzt, indem 12 feine Stiche auf einer kreisrunden Fläche (etwa 1 cm Durchmesser) gesetzt wurden. Danach wurden auf jede Verletzungsfläche 100 µl Sporensuspension pipettiert.

Variante 3b: Auf die Zwiebeloberfläche wurde ein Kreis mit Vaseline gezogen. Innerhalb des Kreises wurden die Verletzung und die Inokulation wie bei Variante 3a beschrieben durchgeführt.

Variante 4: Die Insektennadel wurde für 5 Sekunden in die hergestellte Sporensuspension getaucht und anschließend in die äußerste Zwiebelschale gesteckt. Diese wurde erst nach der Auswertung wieder entnommen.

Variante 5: Die Sporensuspension wurde mit einer Einwegspritze (1 ml) aufgezogen und anschließend wurden pro Zwiebelbulbe 100 µl langsam unter die äußerste Schale injiziert.

Variante 6: Auf die Oberfläche der Zwiebeln wurde ein Mikronadel-Stempel (1 cm Durchmesser) aufgesetzt und komplett durchgedrückt, sodass die 12 Mikronadeln in

die Schale der Zwiebeln gestoßen wurden. Anschließend wurden 100 µl Sporensuspension pro Zwiebel auf die entstandene Wunde pipettiert.

Bei jeder Variante wurde eine geschälte und eine ungeschälte Zwiebelbulbe der Sorte ‘Mustang’ als Kontrolle verwendet, bei welchen steriles Wasser anstatt der Sporensuspension appliziert wurde. Die restlichen 10 Zwiebeln der Sorte ‘Mustang’ und 10 Zwiebeln der Sorte ‘Red Tide’ wurden mit der hergestellten Sporensuspension inokuliert. Die Flüssigkeit wurde dabei so auf die Oberfläche der Zwiebeln pipettiert, dass die entstandenen Tropfen weder abgeronnen noch zerflossen sind. Weiters wurde die Suspension vor jeder Inokulation mittels Pipette durchgemischt, um ein Absetzen der Konidien zu verhindern.

- Inokulation mittels infizierter Zwiebelblattstücke: Frische Zwiebelblätter wurden in 6 bis 8 cm große Stücke geschnitten und anschließend in einer 0,5-prozentigen Natriumhypochlorit-Lösung für 5 Minuten oberflächendesinfiziert. Die Blattstücke wurden danach 1 Minute in sterilem Wasser gespült und einzeln in Petrischalen (9 cm Durchmesser) auf feuchtes Filterpapier platziert. Auf ein Zwiebelblattstück (Kontrolle) wurde 1 ml steriles Wasser appliziert, die restlichen Zwiebelblattstücke wurden jeweils mit 1 ml Sporensuspension inokuliert. Die Inkubation erfolgte im Labor bei Tageslicht und 24 °C (± 4 °C bedingt durch Tag-Nacht-Schwankungen). Nach zwei Tagen wurden aus den infizierten Zwiebelblattstücken mit einem Korkbohrer (Nummer 4) runde Stücke ausgestanzt und anschließend für die Inokulation der Zwiebeln verwendet.

Variante 1: Mit einer sterilen Pinzette wurde jeweils ein ausgestochenes Blattstück pro Bulbe auf die unverletzte Zwiebelschale aufgesetzt.

Variante 2 (Korund) und 3 (Insektennadel): Die Oberfläche der Zwiebeln wurde, wie bereits bei der Inokulation mittels Sporensuspension beschrieben, mit Korund beziehungsweise einer Insektennadel künstlich verletzt. Auf jede Verletzungsstelle wurde ein ausgestochenes Blattstück mit einer Pinzette platziert.

Variante 4: Von den Zwiebelbulben wurde mittels Korkbohrer (Nummer 4) ein Stück der äußersten Schale ausgestochen. In die Wunde wurde ein Blattstück platziert, danach wurde das ausgestochene Zwiebelstück wieder aufgesetzt.

Auch bei dieser Inokulationsmethode wurden bei jeder Variante jeweils eine geschälte und eine ungeschälte Zwiebel der Sorte ‘Mustang’ als Kontrolle herangezogen. Bei

den Kontrollen wurden jene Blattstücke verwendet, auf welche 1 ml steriles Wasser anstatt der Konidiensuspension appliziert wurde.

- Inokulation mittels mit Myzel bewachsener Agarstücke: Mit einem Korkbohrer (Nummer 4) wurde aus den vorbereiteten Zwiebelbulben jeweils ein Stück der äußersten fleischigen Schale ausgestochen. Bei einer geschälten und einer ungeschälten Zwiebel der Sorte ‘Mustang’ wurde als Kontrolle ein steriles Agarstück in die Wunde gelegt. In die Wunden der restlichen 20 Zwiebeln der beiden Sorten wurde jeweils ein mit Myzel bewachsenes Agarstück, welches zuvor von einer zwei bis drei Wochen alten Myzelkultur ausgestochen wurde, eingesetzt. Das zuvor ausgestanzte Zwiebelschalstück wurde abschließend wieder aufgesetzt und die Wunde somit verschlossen.
- Inokulation mittels Sklerotien: Die äußerste fleischige Schale der Zwiebelbulben wurden mit einem sterilen Skalpell eingeschnitten. In die entstandene Wunde wurde pro Zwiebel ein Sklerotium, welches zuvor von einer zwei bis drei Wochen alten Pilzkultur entnommen wurde, mit einer Pinzette gelegt. Eine geschälte und eine ungeschälte Kontrollzwiebel der Sorte ‘Mustang’ wurden nur mittels Skalpell verwundet, aber nicht mit einem Sklerotium inokuliert.

Jede Variante der genannten Inokulationsmethoden wurde sowohl mit dem Pathogen *Botrytis cinerea* als auch mit dem Pathogen *Botrytis aclada* durchgeführt. Die verwendeten Utensilien wie Glasspatel, Insektennadel oder Pinzette wurden mit Ethanol (96 %) nach jeder Zwiebelbulbe desinfiziert und in steriles Wasser getaucht. Zur Desinfektion der Oberflächen wurde Meliseptol® verwendet.

Nach der Inokulation wurden folgende Inkubationsbedingungen für jede der beschriebenen Varianten getestet:

- Inkubation im Labor: Die inokulierten Zwiebelbulben wurden auf den Acrylglasringen einzeln in beschrifteten Kunststoffboxen, in welche jeweils 100 ml Leitungswasser gefüllt wurden, bei Tageslicht, 24 °C (± 4 °C bedingt durch Tag-Nacht-Schwankungen) und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Deckel der Kunststoffbox wurde dabei nur aufgelegt und diese somit nicht luftdicht verschlossen.
- Inkubation im Brutschrank: In eine Kunststoffkiste wurden 1,5 l Leitungswasser gefüllt. Anschließend wurden die Zwiebelproben mit den Acrylglasringen darin platziert

und im Brutschrank bei 20 °C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit einerseits mit Weißlicht (Osram L18W/840 Lumilux cool white) und andererseits mit Schwarzlicht (Osram L18/73) inkubiert. Eine sterile Insektennadel mit Beschriftungsfähnchen wurde in den trockenen Zwiebelhals jeder Zwiebel gesteckt. Aufgrund der hohen Verdunstung des Wassers wurden regelmäßig 0,5 l Leitungswasser in die Kunststoffkiste nachgegossen.

- Inkubation in der Klimazelle: Um die Inkubationsbedingungen an die Bedingungen eines Zwiebellagers annähern zu können, wurden die inokulierten Zwiebelbulben auf den Acrylglasringen in einer Klimazelle in Dunkelheit bei 5 °C und 86 % relativer Luftfeuchtigkeit einzeln in beschrifteten Kunststoffboxen inkubiert.

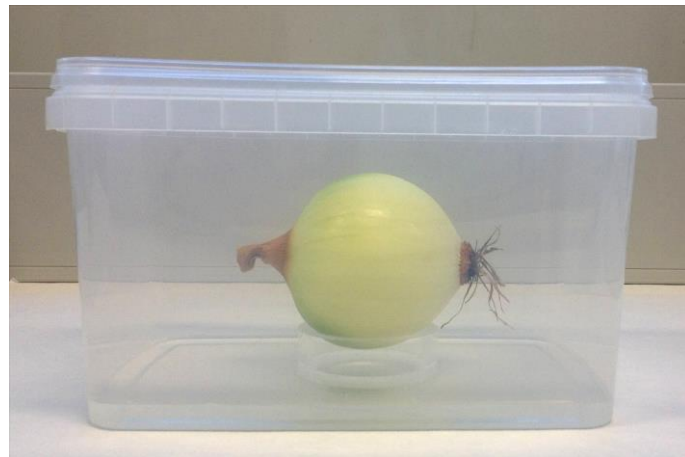


Abb. 12: Inkubation im Labor.

Die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit wurden mit einem Tinytag Plus 2 Datenlogger (TGP-4505) ermittelt, welcher je nach Inkubationsmethode entweder auf einem Acrylglasring in der Kunststoffkiste oder in einer Kunststoffbox platziert wurde. Die Zwiebelbulben wurden drei Wochen lang inkubiert, anschließend wurde die Auswertung vorgenommen. Jene Varianten, bei welchen Symptome der Kaffeefleckenkrankheit entstanden sind, wurden zwei- bis dreimal wiederholt. Danach konnte die passende Methode für die weiteren Versuche selektiert werden.

3.4. Testung des Potenzials der *Botrytis*-Arten zur Verursachung der Kaffeefleckenkrankheit sowie der Sortenanfälligkeit

Die sieben Spezies der Gattung *Botrytis* wurden auf ihr Potenzial, Symptome der Kaffeefleckenkrankheit hervorzurufen, getestet. Des Weiteren wurde untersucht, ob es hinsichtlich der Ausprägung der Symptome Unterschiede zwischen den Zwiebelsorten gibt.

3.4.1. Aufbau und Durchführung der Versuchsreihen

Insgesamt wurden jeweils zehn Zwiebelbulben von jeder Sorte mit jedem der sieben Pathogene infiziert. Daneben wurde für jedes Pathogen und jede Sorte eine weitere Zwiebelbulbe als Kontrolle mit einbezogen. Eine Versuchsreihe bestand somit aus 77 Zwiebelproben der gleichen Sorte. Da sechs verschiedene Zwiebelsorten getestet wurden, wurden in Summe sechs Versuchsreihen durchgeführt.

Die Zwiebelproben sowie die restlichen benötigten Utensilien wurden für die Inokulation folgendermaßen vorbereitet: Die Bulben wurden bis zur ersten fleischigen Schale geschält und der eingetrocknete Zwiebelhals wurde auf etwa 4 cm gekürzt. Jene Zwiebeln, bei denen die erste fleischige Schale verletzt war oder Zwiebelbulben, die einen sichtbaren Fremdbefall aufwiesen, wurden verworfen. Nach dem Schälen wurden die Bulben für 30 Minuten in einer 0,5-prozentigen Natriumhypochlorit-Lösung oberflächendesinfiziert und dann für 2 Minuten mit Leitungswasser gespült. Für jede Versuchsreihe wurden des Weiteren 77 Acrylglasringe benötigt, welche vor deren Verwendung in gleicher Weise oberflächendesinfiziert wurden. Zur Desinfektion der Oberflächen im Labor wurde Meliseptol® verwendet. Die desinfizierten Acrylglasringe wurden einzeln in beschriftete, sterile Kunststoffboxen verteilt, in welche jeweils 100 ml Leitungswasser gefüllt wurden. Anschließend wurde jeweils eine vorbereitete Zwiebelbulbe auf einen Acrylglasring platziert und ein Deckel auf die Kunststoffbox aufgelegt. Nachdem die Zwiebeln auf die Kunststoffboxen verteilt waren, wurde eine Konidiensuspension mit einer Konzentration von $2,4 \times 10^6$ Konidien/ml vorbereitet. Im Anschluss daran wurde die äußerste fleischige Schale jeder Zwiebel mit 12 feinen Stichen verletzt, die auf einer kreisrunden Fläche (etwa 1 cm Durchmesser) angeordnet waren. Die Insektennadel wurde vor der ersten Verwendung sowie nach jeder Zwiebel mit Ethanol (96 %) desinfiziert und in steriles Wasser getaucht. Innerhalb einer Versuchsreihe wurden für jedes zu testende Pathogen 11 Zwiebelbulben vorbereitet. Davon wurde eine Bulbe als Kontrolle verwendet, auf de-

ren Verletzungsfläche 100 µl steriles Wasser anstatt der Konidiensuspension appliziert wurden. Die restlichen 10 Zwiebeln wurden mit dem jeweiligen Pathogen inokuliert, indem 100 µl der hergestellten Konidiensuspension auf die Wunde pipettiert wurden. Wie bei den Vorversuchen bereits erwähnt, wurde die Flüssigkeit dabei so aufgesetzt, dass die entstandenen Tropfen weder abgeronnen noch zerflossen sind. Des Weiteren wurde die Konidiensuspension immer wieder mit der Pipette durchgemischt, um ein Absetzen der Konidien zu verhindern. Die Inkubation der Zwiebelbulben erfolgte in den Kunststoffboxen im Labor bei 24 °C ($\pm$ 4 °C bedingt durch Tag-Nacht-Schwankungen), Tageslicht und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit. Die Temperatur sowie die relative Luftfeuchtigkeit wurden mittels Tinytag Plus 2 Datenlogger (TGP-4505) gemessen, dessen Messfühler in eine Referenz-Kunststoffbox mit 100 ml Leitungswasser platziert wurde.



Abb. 13: Zwiebelbulbe, welche mit 100 µl Konidiensuspension inokuliert wurde.

Die beschriebene Vorgangsweise der Vorbereitung, Inokulation und Inkubation wurde für alle Pathogene innerhalb einer Versuchsreihe und in weiterer Folge für jede Versuchsreihe durchgeführt. Eine Abwandlung wurde für jene vier *Botrytis*-Arten vorgenommen, welche zu keiner beziehungsweise zu keiner ausreichenden Sporenbildung angeregt werden konnten (*Botrytis byssoidea*, *Botrytis porri*, *Botrytis squamosa* und *Botrytis tulipae*): Bei diesen Arten wurde zur Inokulation der Zwiebelbulben eine Myzelsuspension anstatt der Konidiensuspension verwendet, welche folgendermaßen hergestellt wurde: Eine Petrischale (9 cm Durchmesser) mit einer zwei bis drei Wochen alten Pilzkultur, welche bis zum Rand dicht mit Myzel bewachsen war, wurde mit 9 ml sterilem Wasser vollständig bedeckt. Anschließend wurde das Myzel mittels steriler Kunststofföse von der Oberfläche des Nährmediums abgeschabt. Die entstandene Suspension wurde in ein steriles Becherglas überführt und gut durchgemischt.

Zur Inokulation wurden, wie bei der Sporensuspension, 100 µl Myzelsuspension pro Bulbe verwendet.

3.4.2. Auswertung

Die inokulierten Zwiebelbulben wurden jeden zweiten Tag auf die Entstehung erster Symptome kontrolliert, um den Zeitpunkt des Auftretens der ersten Kaffeeflecken ermitteln zu können. Die erste Auswertung der jeweiligen Versuchsreihe erfolgte nach einer dreiwöchigen Inkubation: Jede Zwiebel wurde einzeln auf das Vorhandensein von Symptomen der Kaffeefleckenkrankheit überprüft. Weiters wurde die Anzahl der Flecken pro Zwiebelbulbe ermittelt sowie deren Durchmesser beziehungsweise Länge und Breite mit einem Lineal gemessen. Es wurde auch festgehalten, ob eine oberflächliche Sporulation aufgetreten ist. Ein vorhandener Fremdbefall mit anderen Pathogenen oder sonstige Auffälligkeiten wurden ebenfalls vermerkt. Die Zwiebeln wurden anschließend weitere drei Wochen inkubiert, um die Entwicklung der Flecken zu beobachten und zu überprüfen, ob weitere Kaffeeflecken entstehen. Die statistische Analyse der gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit dem Programm „SAS 9.4“.

3.4.3. Reisolation der Pathogene aus befallenem Zwiebelgewebe

Abschließend wurde bei jenen Zwiebelbulben, welche Symptome der Kaffeefleckenkrankheit zeigten, eine Reisolation der Pathogene aus dem befallenen Zwiebelgewebe durchgeführt: Aus den verfärbten Zwiebelschalen wurden mit einem sterilen Skalpell kleine Stücke herausgeschnitten (etwa 5 x 5 mm). Diese wurden mit einer Pinzette 2 Sekunden in Ethanol (96%) und dann 2 Sekunden in sterilem Wasser geschwenkt und anschließend einzeln auf Petrischalen mit PDA platziert. Die Petrischalen wurden im Labor bei 24 °C (± 4 °C bedingt durch Tag-Nacht-Schwankungen) und Tageslicht gelagert. Myzel, welches von den ausgestochenen Zwiebelschalenstücken ausgewachsen ist, wurde auf frische Petrischalen mit PDA überimpft und weiterhin im Labor unter den genannten Bedingungen inkubiert. Die entstandenen Pilzkulturen wurden nach etwa zwei Wochen mikroskopiert und von den gebildeten Sporen wurden die Längen und Breiten mit dem Computerprogramm „labSens“ vermessen. Dadurch konnte die Pilzart identifiziert werden.

3.5. Isolation des Erregers aus natürlich infizierten Freilandproben

Um abklären zu können, welcher beziehungsweise welche Erreger der Gattung *Botrytis* die Kaffeefleckenkrankheit im Produktionsgebiet Marchfeld hervorrufen, wurden gelb- und rot-schalige Zwiebelproben, welche vermeintliche Symptome der Kaffeefleckenkrankheit zeigten und im Marchfeld im Freiland kultiviert wurden, gesammelt und analysiert. Mit den nachfolgend beschriebenen Methoden wurde auf unterschiedliche Weise versucht, den Erreger aus der äußersten trockenen Zwiebelschale zu isolieren und eine Reinkultur zur Bestimmung der Pilzart herzustellen.

3.5.1. Morphologische Analyse

Für die morphologische Analyse wurden die äußersten trockenen Schalen der Zwiebeln abgeschält und mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden mit einem abgeflamten Korkbohrer (Nummer 4) Löcher von den dunkelbraunen Verfärbungen der Zwiebelschale ausgestochen beziehungsweise größere Stücke (etwa 1 x 0,5 cm) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, wobei Proben sowohl vom Rand als auch von der Mitte der Flecken entnommen wurden. Die Schalenstücke wurden danach mit einer Pinzette für 5 Sekunden in Ethanol (96 %) getaucht und für 1 Minute oberflächendesinfiziert. Für die Oberflächendesinfektion wurde sowohl eine 0,5-prozentige als auch eine 5-prozentige Natriumhypochlorit-Lösung getestet. Zum Abschluss wurden die Zwiebelschalenstücke noch 1 Minute in sterilem Wasser gespült. Zur Isolation des Pathogenes wurden folgende zwei Methoden angewandt:

- Isolation mittels Nährmedium: Jeweils drei oberflächendesinfizierte Schalenstücke wurden in eine Petrischale mit PDA (9 cm Durchmesser) platziert. Diese wurde danach mit Parafilm verschlossen und sowohl im Brutschrank bei 20 °C und Schwarzlicht (Osram L18/73) als auch im Labor bei 24 °C (± 4 °C bedingt durch Tag-Nacht-Schwankungen) und Tageslicht inkubiert.
- Isolation mittels Feuchtkammer: Petrischalen (9 cm Durchmesser) wurden jeweils mit zwei Stück Filterpapier ausgelegt, welches mit sterilem Wasser befeuchtet wurde. Anschließend wurden pro vorbereiteter Petrischale drei Zwiebelblattstücke ausgelegt: Die Petrischalen wurden danach mit Parafilm verschlossen und ebenfalls im Labor bei 24 °C (± 4 °C bedingt durch Tag-Nacht-Schwankungen) und Tageslicht sowie im Brutschrank bei 20 °C und Schwarzlicht (Osram L18/73) kultiviert.

Myzel, welches von den ausgestochenen Zwiebelschalenstücken ausgewachsen ist, wurde auf Petrischalen mit PDA überimpft und unter den jeweiligen Bedingungen inkubiert. Die verwendeten Utensilien wurden nach jeder Probe mit Ethanol (96 %) desinfiziert und/oder abgeflammt.

Nach etwa zwei Wochen wurden die morphologischen Strukturen der entstandenen Pilzkulturen mikroskopiert. Im Falle einer Sporenbildung konnten die Sporenlängen und -breiten vermessen und die Pilzart bestimmt werden.

3.5.2. Molekularbiologische Analyse

Die Analyse der Zwiebelschalen mittels molekularbiologischer Methoden wurde mit Unterstützung von Dr. Richard Gottsberger (Abteilung Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten, AGES) durchgeführt.

Die Zwiebelschalen wurden von den zuvor gesammelten Freilandproben entnommen, wobei sowohl rotschalige als auch gelbschalige Bulben berücksichtigt wurden. Die nachstehenden Angaben zur Durchführung der Analysen beruhen auf den persönlichen Mitteilungen von Dr. Richard Gottsberger: Aus den symptomatischen Zwiebelschalen im Übergang vom gesunden in den nekrotischen Bereich wurden aus mehreren Schichten 100 mg Pflanzenmaterial entnommen und ein Zellaufschluss in Lysing Matrix A (MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland) mit einem FastPrep® 24 (MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland) Homogenisator durchgeführt. Dafür wurde der Puffer AP1 aus dem DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) zugegeben und die Homogenisierung zwei Mal bei 6,5 m/s und 30 Sekunden durchgeführt. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion laut Protokoll des Erzeugers (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN GmbH). Die eluierte Gesamt-DNA wurde nochmals 1:20 mit PCR-Wasser verdünnt, um mögliche Inhibitoren heraus zu verdünnen. Es wurde sowohl die original als auch die verdünnte DNA-Lösung für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Der molekulargenetische Nachweis von *Botrytis* spp. erfolgte mittels zwei verschiedener PCRs. Die eine Methode nach RIGOTTI et al. (2006) ermöglicht den spezifischen und direkten Nachweis der Pilzart *Botrytis cinerea*. Die zweite Methode nach NIELSEN et al. (2002) lässt einen Nachweis von folgenden weiteren *Botrytis*-Arten unter anderem zu: *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis byssoides* und *Botrytis squamosa* (CHILVERS und DU TOIT, 2006). Die Bedingungen für die PCRs waren 95 °C für 2 Minuten und 30 Sekunden, dann 40 Zyklen mit 95 °C für 30 Sekunden, 60 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 30 Sekunden, gefolgt von 72 °C für 5 Minuten und wurden in einem Biometra T3000 (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) Thermocycler durchgeführt. Die PCRs wurden

mit dem 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load with 7,5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Tartu, Estland) angesetzt. Die PCR-Produkte wurden direkt auf ein 2% Agarosegel geladen und 55 Minuten bei 115 V aufgetrennt. Die Einfärbung der PCR-Produkte erfolgte mit Ethidiumbromid und die Visualisierung wurde mit einem UVP GelDoc-It Imager (Ultra-Violet Products, Upland, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt. Bei der zweiten Methode wurde das PCR-Produkt mit dem MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und als „premix sample“ an Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) zum Sequenzieren geschickt. Anschließend wurden die Sequenzen von der Eurofins-Homepage heruntergeladen und mittels CAP3 Sequence Assembly Program (HUANG und MADAN, 1999) zusammengeführt. Um die Arten voneinander unterscheiden zu können, wurde eine Sequenzanalyse mittels „BLAST Search“ (ALTSCHUL et al., 1990) durchgeführt. (GOTTSBERGER, 2016)

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuche

Von den getesteten Inokulationsmethoden führten folgende Varianten zu einer erfolgreichen Reproduktion der Kaffeeflecken:

Inokulation mittels Sporensuspension, Varianten 3a und 3b: Leichte Verfärbungen bis hin zu charakteristischen Symptomen auf und um die Verletzungsfläche waren bei einigen Zwiebelproben bereits nach wenigen Tagen Inkubation sichtbar. Nach etwa zwei Wochen waren eindeutige Kaffeeflecken zu erkennen, welche sich in der Regel weiter ausbreiteten. Auch eine oberflächliche Sporulation auf der Verletzungsfläche wurde beobachtet. Die Zwiebeln blieben fest und wurden nicht weichfaul. Durchschnittlich zeigten bei diesen Varianten 80 % der inokulierten Bulben die gewünschten Symptome. Der zusätzliche Ring, welcher mittels Vaseline um die Verletzungsfläche gezogen wurde, hatte keine Auswirkungen auf das Inokulationsergebnis.



Abb. 14: Leichte Verfärbungen eine Woche nach der Inokulation (links) sowie charakteristische Symptome eine Woche (mittig) und zwei Wochen (rechts) nach der Inokulation mittels Sporensuspension (Variante 3a).

Inokulation mittels infizierter Zwiebelblattstücke, Variante 4: Bei dieser Variante zeigten nur 25 % der inokulierten Zwiebelproben Symptome und blieben fest, die restlichen Zwiebeln wurden weich und zeigten keinerlei Verfärbungen. Die charakteristischen Flecken waren durchschnittlich nach 10 Tagen zu erkennen. Desweiteren trat bei den symptomatischen Bulben eine Konidienbildung im Bereich der Wundstelle auf.

Inokulation mittels Myzel bewachsener Agarstücke: Die ersten Verfärbungen traten hierbei nach etwa einer Woche Inkubation auf. Nach etwa 10 bis 14 Tagen waren deutliche Kaffeeflecken sichtbar, wobei die Zwiebeln fest blieben und eine sehr starke Konidienbildung im

Bereich der Wundstelle zu beobachten war. Durchschnittlich entwickelten 60% der inokulierten Zwiebelbulben Symptome.



Abb. 15: Verfärbungen zwei Wochen nach der Inokulation mittels infizierter Zwiebelblattstücke (Variante 4, links), eine Woche nach der Inokulation mit Myzel bewachsener Agarstücke (mittig) und vier Wochen nach der Inokulation mittels Einwegspritze und Sporensuspension (Variante 5, rechts).

Die Inokulation mittels Einwegspritze führte bei 25% der inokulierten Zwiebelbulben zu leichten Verbräunungen um die Einstichstellen, allerdings entwickelten sich innerhalb der dreiwöchigen Inkubation keine charakteristischen Symptome der Kaffeefleckenkrankheit. Bei $\frac{2}{3}$ der Proben wurde des Weiteren eine oberflächliche Sporulation beobachtet.

Die beschriebenen Varianten führten sowohl bei Inkubation im Labor als auch im Brutschrank zur Bildung von Kaffeeflecken. Letztere war für die Inkubation weniger geeignet, da eine konstant hohe Luftfeuchtigkeit schwieriger zu erreichen war und die äußerste Schale bei den geschälten Bulben daher schneller austrocknete. Bei der Inkubation in der Klimazelle entwickelten sich innerhalb des beobachteten Zeitraumes von drei Wochen keine Symptome.

Jene Varianten, bei welchen die Bulben ohne Verletzung inokuliert wurden, führten bei keiner der getesteten Inkubationsbedingungen zu Symptomen. Die Sporensuspension verdampfte und die infizierten Blattstücke trockneten entweder vollständig ein oder es fand eine oberflächliche Myzelentwicklung statt. Teilweise konnte auch eine Konidienbildung beobachtet werden.

Auch die Verletzung mittels Korund in Kombination mit unterschiedlichen Inokula führte bei keiner der getesteten Varianten und Inkubationsbedingungen zu einer Entwicklung von Kaffeeflecken. Das Gewebe auf und um die Verletzungsfläche blieb unverändert.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Inokulation mit Sklerotien: hierbei entstanden ebenfalls keine gewünschten Symptome. Die Verletzungsstelle blieb in der Regel unverändert, teilweise sank sie ein oder wurde weich.

Bei der Inokulation mittels infizierter Zwiebelblattstücke war bis auf die bereits erwähnte Variante 4 keine weitere Variante erfolgreich. Wurden die Bulben zusätzlich mittels Insektennadel verletzt, waren teilweise leichte, unspezifische Verfärbungen zu sehen, jedoch bildeten sich keine charakteristischen Kaffeeflecken.

Jene Zwiebeln, welche mit dem Mikronadel-Stempel verletzt und anschließend inokuliert wurden, entwickelten ebenfalls keine Symptome. Bei einigen Proben war eine oberflächliche Sporulation zu erkennen, ansonsten blieb die Verletzungsfläche unverändert.

Bei der Variante, bei welcher die Insektennadel dauerhaft in der Zwiebelschale verblieben ist, waren bereits nach zwei Tagen Inkubation dunkle Verfärbungen um die Einstichstellen sichtbar. Diese breiteten sich im Laufe der Inkubation fast über die gesamte Zwiebelbulbe aus, wobei nur die äußerste Schale betroffen war. Von den verfärbten Geweben konnte allerdings keine *Botrytis*-Art isoliert werden. Des Weiteren waren die Verfärbungen in gleichem Ausmaß auch bei der Kontrolle vorhanden. Die Flecken wurden somit nicht von dem Pathogen verursacht.



Abb. 17: Entstehung von dunklen Verfärbungen sowohl bei der Kontrolle (links) als auch bei den inokulierten Bulben.



Abb. 16: Ausbreitung der Verfärbung über die gesamte äußere Zwiebelschale.

Bei geschälten Zwiebeln erfolgte die Entwicklung von Kaffeeflecken sehr schnell nach der Inokulation. Bei ungeschälten Bulben haben sich in dem beobachteten Zeitraum keine charakteristischen Symptome entwickelt, sondern nur unspezifische, dunkle Verfärbungen.



Abb. 18: Vergleich der Symptome einer geschälten (links) und einer ungeschälten (rechts) Bulbe. Beide Zwiebeln wurden zuvor in gleicher Weise inokuliert und drei Wochen inkubiert.

Zusammenfassend hat sich eine Variante klar herauskristallisiert: Variante 3a der Inokulation mittels Sporensuspension in Kombination mit geschälten Bulben und der Inkubation im Labor. Die restlichen beschriebenen Varianten und Inkubationsbedingungen waren für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geeignet.

4.2. Potenzial der *Botrytis*-Arten zur Verursachung der Kaffeefleckenkrankheit sowie Sortenanfälligkeit

Von den sieben getesteten *Botrytis*-Arten konnten folgende Pilze Symptome der Kaffeefleckenkrankheit hervorrufen: *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis squamosa*. Nachfolgend sind die Ergebnisse zu den genannten Pilzarten getrennt nach Zwiebelsorten zusammengefasst:

Botrytis aclada

- ‘Mustang’: Die ersten Verfärbungen traten nach 10 Tagen Inkubation auf, die ersten charakteristischen Symptome konnten nach 18 Tagen beobachtet werden. Nach dreiwöchiger Inkubation lag die Befallsrate, das heißt die Anzahl der symptomatischen Bulben in Prozent, bei 80%. In den weiteren drei Inkubationswochen vergrößerten sich die bereits vorhandenen Kaffeeflecken und sind unregelmäßig zerflossen. Die Befallsrate blieb unverändert bei 80%, allerdings entwickelten sich bei 20% der Bulben, welche nach der dritten Inkubationswoche bereits Symptome gezeigt hatten, durchschnittlich zwei neue Kaffeeflecken. Im Mittel wurden pro symptomatischer Bulbe drei 1,35 cm große Kaffeeflecken gebildet. Eine oberflächliche Sporulation wurde nicht beobachtet.



Abb. 19: Kaffeeflecken nach drei- (links) beziehungsweise vierwöchiger (rechts) Inkubation.



Abb. 20: Entwicklung der Kaffeecken innerhalb von drei Wochen (links oben und unten: drei Wochen nach Inokulation; rechts oben und unten: sechs Wochen nach Inokulation).

- ‘Red Tide’: Auch bei dieser Zwiebelsorte waren die ersten Verfärbungen 10 Tage nach der Inokulation zu beobachten, die ersten Kaffeecken erschienen nach 20 Tagen. Nach dreiwöchiger Inkubation lag die Befallsrate bei 40%. Bei der Hälfte der symptomatischen Zwiebeln war eine oberflächliche Sporulation von *Botrytis aclada* auf der Verletzungsfläche sichtbar. Nach insgesamt sechs Wochen Inkubation haben sich die Verfärbungen weiter ausgedehnt. Neue Kaffeecken sind allerdings nicht entstanden und die Befallsrate blieb unverändert bei 40%. Im Mittel sind zwei Kaffeecken pro symptomatischer Bulbe mit einem Durchmesser von 2,10 cm kreisförmig um die Verletzungsstelle entstanden.



Abb. 21: Kaffeecken nach drei- (links), vier- (mittig) und sechswöchiger (rechts) Inkubation.

- ‘Olympic’: Nach acht Tagen Inkubation waren die ersten bräunlichen Verfärbungen vorhanden. Nach drei Wochen Inkubation konnten die ersten Kaffeeplecken beobachtet werden. Die Befallsrate lag zu diesem Zeitpunkt bei 10%, wobei erst anfängliche Verfärbungen vorhanden waren und eine oberflächliche Konidienbildung stattfand. Nach sechs Wochen Inkubation belief sich die Befallsrate auf 30%. Bei den neu entstandenen Verfärbungen wurde keine oberflächliche Sporulation entdeckt. Jene Kaffeeplecken, welche bereits nach dreiwöchiger Inkubation vorhanden waren, dehnten sich weiter aus. Durchschnittlich entwickelten sich drei Verfärbungen mit einer Größe von 1,5 cm pro symptomatischer Zwiebelbulbe.



Abb. 22: Anfängliche Verfärbungen nach dreiwöchiger Inkubation (links oben) sowie Symptome nach vierwöchiger (links unten; mittig oben und unten) und sechswöchiger (rechts oben und unten) Inkubation.

- ‘Electric’: Die ersten Verfärbungen entwickelten sich im Laufe der vierten Inkubationswoche, die Befallsrate nach dreiwöchiger Inkubation lag somit bei 0%. Charakteristische Symptome entstanden nach vier Wochen Inkubation bei 10% der inokulierten Zwiebeln. Nach sechswöchiger Inkubation ist die Befallsrate auf 50% angestiegen, wobei bei allen symptomatischen Bulben eine oberflächliche Sporulation aufgetreten ist. Insgesamt wurden pro symptomatischer Bulbe durchschnittlich drei Verfärbungen ausgebildet. Diese waren im Mittel 1,0 cm groß.



Abb. 23: Kaffeelecken mit oberflächlicher Sporulation nach vier (links) und sechs (rechts) Wochen Inkubation.

- ‘Rawhide’: Die ersten Verfärbungen entstanden nach zweiwöchiger Inkubation, die ersten Symptome entwickelten sich daraus nach weiteren drei Tagen. Die Befallsrate nach drei Wochen Inkubation lag bei 10% und ist nach weiteren drei Wochen auf 20% gestiegen. Durchschnittlich wurden zwei Kaffeelecken pro symptomatischer Bulbe mit einem Durchmesser von 0,15 cm gebildet. Die Kaffeelecken sind im Laufe der weiteren Inkubation nicht gewachsen. Eine geringe Myzel- und Konidienbildung war auf dem verfärbten Gewebe sichtbar. Eine inokulierte Bulbe wies eine starke Sporulation und bräunliche Verfärbung im Bereich der Verletzungsfläche auf. Diese war für die Kaffeeleckenkrankheit allerdings nicht charakteristisch. Weiters konnte die *Botrytis*-Art aus dem verfärbten Gewebe nicht reisoliert werden.



Abb. 24: Kaffeelecken (links) sowie starke oberflächliche Sporulation (rechts) nach vier Wochen Inkubation.

- ‘Wiro’: Bereits nach acht Tagen Inkubation konnten bei dieser Sorte leichte Verfärbungen und eine oberflächliche Konidienbildung festgestellt werden. Die ersten Kaffeelecken waren nach 10 Tagen Inkubation sichtbar. Nach dreiwöchiger Inkubation zeigte sich eine Befallsrate von 50%. Bei allen symptomatischen Zwiebeln war eine oberflächliche Myzel- und Konidienentwicklung vorhanden. Nach weiteren drei Wochen Inkubation ist die Befallsrate auf 60% angestiegen. Bei 20% der Zwiebeln, wel-

che bereits nach drei Wochen Symptome der Kaffeefleckenkrankheit zeigten, sind zusätzliche Verfärbungen entstanden. Des Weiteren sind die bereits vorhandenen Flecken leicht gewachsen. Im Mittel wiesen die symptomatischen Bulben jeweils vier Kaffeeflecken mit einem Durchmesser von 0,18 cm auf.



Abb. 25: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit mit oberflächlicher Myzel- und Konidienbildung nach drei- (links) und sechswöchiger (rechts) Inkubation.

Botrytis allii

- ‘Mustang’: Die ersten Verfärbungen waren auf der Verletzungsfläche nach zwei Wochen Inkubation sichtbar, nach 16 Tagen entwickelten sich die ersten Symptome. Die Befallsrate nach dreiwöchiger Inkubation lag bei 50%. Nach sechs Wochen Inkubation ist die Befallsrate auf 70% gestiegen. Bei 30% der Bulben, welche bereits nach drei Wochen Inkubation Symptome zeigten, sind im Mittel zwei neue Flecken entstanden. Die durchschnittliche Größe der Verfärbungen belief sich nach sechswöchiger Inkubation auf 1,0 cm. Insgesamt wurden im Mittel zwei Flecken pro symptomatischer Bulbe gebildet. Eine oberflächliche Sporulation von *Botrytis allii* konnte nicht beobachtet werden.



Abb. 26: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit nach dreiwöchiger Inkubation.

- ‘Red Tide’: Nach 12 Tagen Inkubation entwickelten sich die ersten bräunlichen Verfärbungen auf der Zwiebelschale und eine oberflächliche Myzel- und Konidienbildung wurde festgestellt. Nach 16 Tagen waren die ersten Kaffeeflecken sichtbar. Insgesamt lag die Befallsrate nach dreiwöchiger Inkubation bei 20%. Durchschnittlich wurde ein Kaffeefleck pro Bulbe mit einem Durchmesser von 1,5 cm gebildet. Nach sechs Wochen Inkubation lag die Befallsrate weiterhin bei 20%. Die Fleckenzahl pro symptomatischer Bulbe blieb ebenfalls unverändert, wohingegen sich die ringförmigen Verfärbungen auf durchschnittlich 1,9 cm vergrößerten.



Abb. 27: Ringförmige Verfärbungen nach dreiwöchiger Inkubation.

- ‘Olympic’: Nach dreiwöchiger Inkubation waren weder unspezifische Verfärbungen noch Symptome vorhanden. Auch nach weiteren drei Wochen Inkubation waren bei 30% der inokulierten Bulben nur unspezifische bräunliche Verfärbungen, aber keine Kaffeeflecken zu beobachten. Die Befallsrate lag daher weiterhin bei 0%.
- ‘Electric’: Leichte Verfärbungen waren bei dieser Sorte nach zwei Wochen Inkubation sichtbar. Die ersten Symptome konnten nach 23 Tagen Inkubation beobachtet werden. Nach sechswöchiger Inkubation lag die Befallsrate bei 20%. Bei weiteren 20% der inokulierten Bulben sind unspezifische, bräunliche Verfärbungen entstanden, aus welchen sich bei weiterer Inkubation Kaffeeflecken entwickeln könnten. Im Mittel wurden pro symptomatischer Bulbe vier Kaffeeflecken mit einem Durchmesser von 0,5 cm gebildet: Eine oberflächliche Sporulation von *Botrytis allii* war vorhanden.



Abb. 28: Kaffeeflecken (links) und braune Verfärbungen (rechts) nach sechswöchiger Inkubation.

- ‘Rawhide’: Anfängliche unspezifische Verfärbungen waren nach 19 Tagen Inkubation sichtbar. Nach dreiwöchiger Inkubation wurde eine Befallsrate von 10% ermittelt, welche nach weiteren drei Wochen Inkubation auf 20% angestiegen ist. Die bereits nach dreiwöchiger Inkubation vorhandenen Flecken sind weiter gewachsen. Neu hinzugekommen ist lediglich ein Fleck mit einer konstanten Größe von 0,1 cm. Im Mittel waren zwei 0,4 cm große Verfärbungen pro symptomatischer Zwiebel vorhanden. Eine oberflächliche Sporulation war bei 50% der symptomatischen Bulben sichtbar.



Abb. 29: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit nach drei- (links) und sechswöchiger (rechts) Inkubation.

- ‘Wiro’: Nach acht Tagen Inkubation waren die ersten Schalenverfärbungen vorhanden, nach weiteren zwei Tagen entstanden daraus Kaffeeflecken. Die Befallsrate belief sich sowohl nach drei- als auch nach sechswöchiger Inkubation auf 10%. Im Mittel waren drei Kaffeeflecken mit einem Durchmesser von 0,3 cm vorhanden, welche sich zwischen dritter und sechster Inkubationswoche leicht vergrößert hatten. Eine geringe oberflächliche Myzel- und Konidienbildung konnte ebenfalls beobachtet werden.



Abb. 30: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit nach dreiwöchiger Inkubation (links) sowie bräunliche Verfärbungen nach sechswöchiger Inkubation (rechts).

Botrytis cinerea

- ‘Mustang’: Nach 16-tägiger Inkubation konnten die ersten bräunlichen Verfärbungen auf der Verletzungsfläche beobachtet werden. Die Befallsrate lag sowohl nach dreiwöchiger als auch nach sechswöchiger Inkubation bei 10%. Neue Kaffeeflecken wurden zwischen dritter und sechster Inkubationswoche nicht gebildet, die bereits vorhandenen Verfärbungen vergrößerten sich allerdings. Insgesamt wurde ein Kaffeefleck mit einem Durchmesser von 1,2 cm pro symptomatischer Bulbe gebildet. Eine oberflächliche Sporulation von *Botrytis cinerea* wurde nicht beobachtet.



Abb. 31: Entwicklung von Kaffeeflecken nach dreiwöchiger Inkubation.

- ‘Red Tide’: Auch bei dieser Sorte waren die ersten bräunlichen Verfärbungen nach 16 Tagen Inkubation sichtbar, nach drei Wochen lag die Befallsrate bei 30%. Nach weiteren drei Wochen Inkubation lag die Befallsrate ebenfalls bei 30%, wobei durchschnittlich zwei Verfärbungen pro symptomatischer Bulbe vorhanden waren. Die Kaffeeflecken waren im Mittel 1,3 cm groß. Eine Sporulation von *Botrytis cinerea* konnte an der Zwiebeloberfläche nicht beobachtet werden.



Abb. 32: Kaffeecken nach dreiwöchiger (links, mittig) und vierwöchiger (rechts) Inkubation.

- ‘Olympic’: Bereits drei Tage nach der Inokulation waren erste unspezifische Verfärbungen auf der Verletzungsfläche sichtbar. Konkrete Symptome konnten nach dreiwöchiger Inkubation nicht beobachtet werden. Im Laufe der weiteren Inkubation stieg die Befallsrate auf 20%, wobei sich im Mittel vier Flecken mit einem Durchmesser von 0,45 cm pro symptomatischer Zwiebel bildeten. Eine oberflächliche Sporulation des Pilzes wurde nicht beobachtet.



Abb. 33: Anfängliche unspezifische Verfärbungen nach dreiwöchiger Inkubation (links) sowie Entwicklung von Kaffeecken nach sechswöchiger (mittig, rechts) Inkubation.

- ‘Electric’: Die ersten Verfärbungen waren nach fünf Tagen Inkubation sichtbar, die ersten Kaffeecken konnten in weiterer Folge nach 10 Tagen Inkubation beobachtet werden. Nach dreiwöchiger Inkubation wurde eine Befallsrate von 10% ermittelt. Diese ist nach sechs Wochen auf 30% gestiegen, wobei jeweils ein Kaffeeleck pro symptomatischer Bulbe gebildet wurde. Dieser war durchschnittlich 1,5 cm groß und hat sich ringförmig um die Verletzungsstelle ausgedehnt. Eine oberflächliche Sporulation des Pathogens konnten bei $\frac{2}{3}$ der symptomatischen Bulben beobachtet werden.



Abb. 34: Ringförmig ausgedehnte Kaffeelecken nach sechs Wochen Inkubation.

- ‘Rawhide’: Erste unspezifische Verbräunungen waren nach acht Tagen Inkubation zu erkennen, charakteristische Symptome wurden in dem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen allerdings nicht gebildet. Die Befallsrate belief sich sowohl nach dreimal als auch nach sechswöchiger Inkubation auf 0%.
- ‘Wiro’: Während der ersten drei Inkubationswochen sind keine Symptome entstanden, die Befallsrate lag somit bei 0%. Nach weiteren drei Wochen Inkubation konnten bei 30% der inokulierten Bulben unspezifische, bräunliche Verfärbungen beobachtet werden, welche für die Kaffeeleckenkrankheit nicht charakteristisch sind. Die Befallsrate blieb daher unverändert bei 0%.

Botrytis squamosa

- ‘Mustang’: Die ersten bräunlichen Verfärbungen waren nach zwei Wochen Inkubation sichtbar, nach weiteren fünf Tagen bildeten sich charakteristische Kaffeelecken. Die Befallsrate lag nach dreiwöchiger Inkubation bei 40% und stieg nach sechswöchiger Inkubation auf 50% an. Es wurden durchschnittlich zwei Kaffeelecken pro symptomatischer Bulbe ausgebildet, welche im Mittel 1,1 cm groß waren. Bei allen symptomatischen Zwiebeln war eine oberflächliche Myzel- und Konidienbildung von *Botrytis squamosa* zu erkennen, meist in der Mitte der entstandenen Kaffeelecken.



Abb. 35: Kaffeeflecken und oberflächliche Myzelbildung nach vierwöchiger Inkubation.

- ‘Red Tide’: Nach 16 Tagen Inkubation waren unspezifische, braune Verfärbungen zu erkennen. Nach dreiwöchiger Inkubation zeigten 20% der inokulierten Bulben Symptome der Kaffeefleckenkrankheit. Die Befallsrate lag auch nach weiteren drei Wochen Inkubation unverändert bei 20%. Es wurde durchschnittlich ein ringförmiger Kaffeeleck pro symptomatischer Bulbe gebildet, welcher im Mittel 2,15 cm groß war. Im Zentrum der Verfärbung war eine deutliche Myzel- und Konidienbildung sichtbar.



Abb. 36: Verfärbungen der Schale mit mittiger Myzel- und Konidienbildung nach dreiwöchiger Inkubation.

Bei den Zwiebelsorten ‘Olympic’, ‘Electric’, ‘Rawhide’ und ‘Wiro’ konnten nach Inokulation mit *Botrytis squamosa* im Laufe der Inkubation von sechs Wochen keine Symptome der Kaffeefleckenkrankheit beobachtet werden. Auf der Verletzungsfläche waren teilweise nur unspezifische, bräunliche Verfärbungen zu erkennen. Eine oberflächliche Myzel- oder Konidienbildung ist nicht aufgetreten. Bei den Winterzwiebelsorten ‘Olympic’ und ‘Electric’ traten auch leichte Gewebedeformationen auf der Verletzungsstelle auf.

Alle Zwiebelbulben, welche nach Inokulation mit den Arten *Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis squamosa* Symptome der Kaffeefleckenkrankheit entwickelten, blieben fest und wurden nicht weichfaul. Die dunkelbraune Verfärbung beschränkte sich jeweils auf die äußerste Zwiebelschale, welche vor der Inokulation künstlich verletzt wurde, und breitete sich nicht in darunter liegende Zwiebelschuppen aus. Weiters ging aus den Versuchen hervor, dass sich die Kaffeeflecken nur auf jenen Schalen entwickelten, bei welchen bereits die Trocknung und damit verbundene biochemische Veränderungen eingesetzt haben. Je stärker diese Prozesse fortgeschritten waren, umso intensiver waren die Kaffeeflecken gefärbt. Hinsichtlich der Symptome wurden sowohl ringförmig zerfließende Flecken, welche am Rand dunkelbraun und im Zentrum hellbraun gefärbt waren, gebildet, als auch rundliche, durchgehend dunkelbraun gefärbte Flecken. Letztere zeigten sich bei 63% der symptomatischen Zwiebelbulben, 5% zeigten nur die zerfließenden Symptome und die restlichen 32% wiesen beide Symptomausprägungen auf.

Die Reisolation der Pathogene aus dem symptomatischen Zwiebelgewebe war für alle Zwiebelproben, welche im Rahmen der Versuche Symptome der Kaffeefleckenkrankheit zeigten, erfolgreich. Die jeweilige *Botrytis*-Art, mit welcher die Zwiebeln zuvor inokuliert wurden, konnte durch Mikroskopie und Messung der Konidienbreite und -länge eindeutig bestimmt werden.

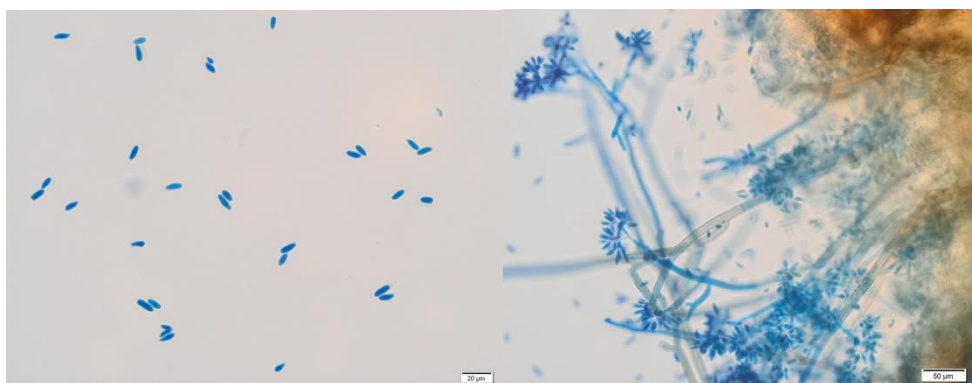


Abb. 37: Reisolation von *Botrytis aclada* aus symptomatischem Zwiebelgewebe: Konidien (links) und aus dem Zwiebelgewebe auswachsende Konidienträger (rechts).

Die Pilzarten *Botrytis byssoidea*, *Botrytis porri* und *Botrytis tulipae* verursachten in den durchgeführten Versuchen keine Symptome der Kaffeefleckenkrankheit. Bei den Zwiebelproben der Sorten ‘Mustang’ und ‘Red Tide’, welche mit *Botrytis porri* inokuliert wurden, waren unspezifische Verfärbungen auf der Schale sichtbar, daraus entwickelten sich allerdings keine

Kaffeeplecken. Bei den Sorten ‘Rawhide’ und ‘Wiro’ war eine starke oberflächliche Myzel- und Konidienbildung von *Botrytis porri* auffällig, welche sich bei der Sorte ‘Rawhide’ bei 40% und bei der Sorte ‘Wiro’ bei 10% der inokulierten Zwiebeln zeigte. Hingegen blieben die mit *Botrytis porri* inokulierten Zwiebelproben bei den beiden Winterzwiebeln ‘Olympic’ und ‘Electric’ bis auf leichte Gewebedeformationen auf der Verletzungsfläche unverändert. Es konnten keinerlei Verfärbungen festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den Zwiebelproben, welche mit *Botrytis bysoidea* beziehungsweise *Botrytis tulipae* inokuliert wurden: Hierbei blieb die Verletzungsfläche der inokulierten Bulben nahezu unverändert oder es waren leichte Gewebedeformationen zu sehen. Eine oberflächliche Myzelentwicklung oder Sporulation der *Botrytis*-Arten konnte nicht beobachtet werden.

Die beschriebenen Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst und durch Abbildungen grafisch veranschaulicht. Hierbei wird sich auf jene vier Pathogene (*Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis squamosa*) beschränkt, welche in den Versuchen Symptome der Kaffeepleckenkrankheit hervorriefen.

Tabelle 8: Befallsrate der einzelnen Sorten nach Inokulation mit den unterschiedlichen Pathogenen nach drei- und sechswöchiger Inkubation.

<i>Botrytis</i>-Art	Sorte	Befallsrate nach drei- wöchiger Inkubation [%]	Befallsrate nach sechs- wöchiger Inkubation [%]
<i>Botrytis aclada</i>	Mustang	80	80
	Red Tide	40	40
	Olympic	10	30
	Electric	0	50
	Rawhide	10	20
	Wiro	50	60
<i>Botrytis allii</i>	Mustang	50	70
	Red Tide	20	20
	Olympic	-	-
	Electric	0	20
	Rawhide	10	20
	Wiro	10	10
<i>Botrytis cinerea</i>	Mustang	10	10
	Red Tide	30	30
	Olympic	0	20
	Electric	10	30
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-
<i>Botrytis squamosa</i>	Mustang	40	50
	Red Tide	20	20
	Olympic	-	-
	Electric	-	-
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-

Entwicklung der Befallsrate

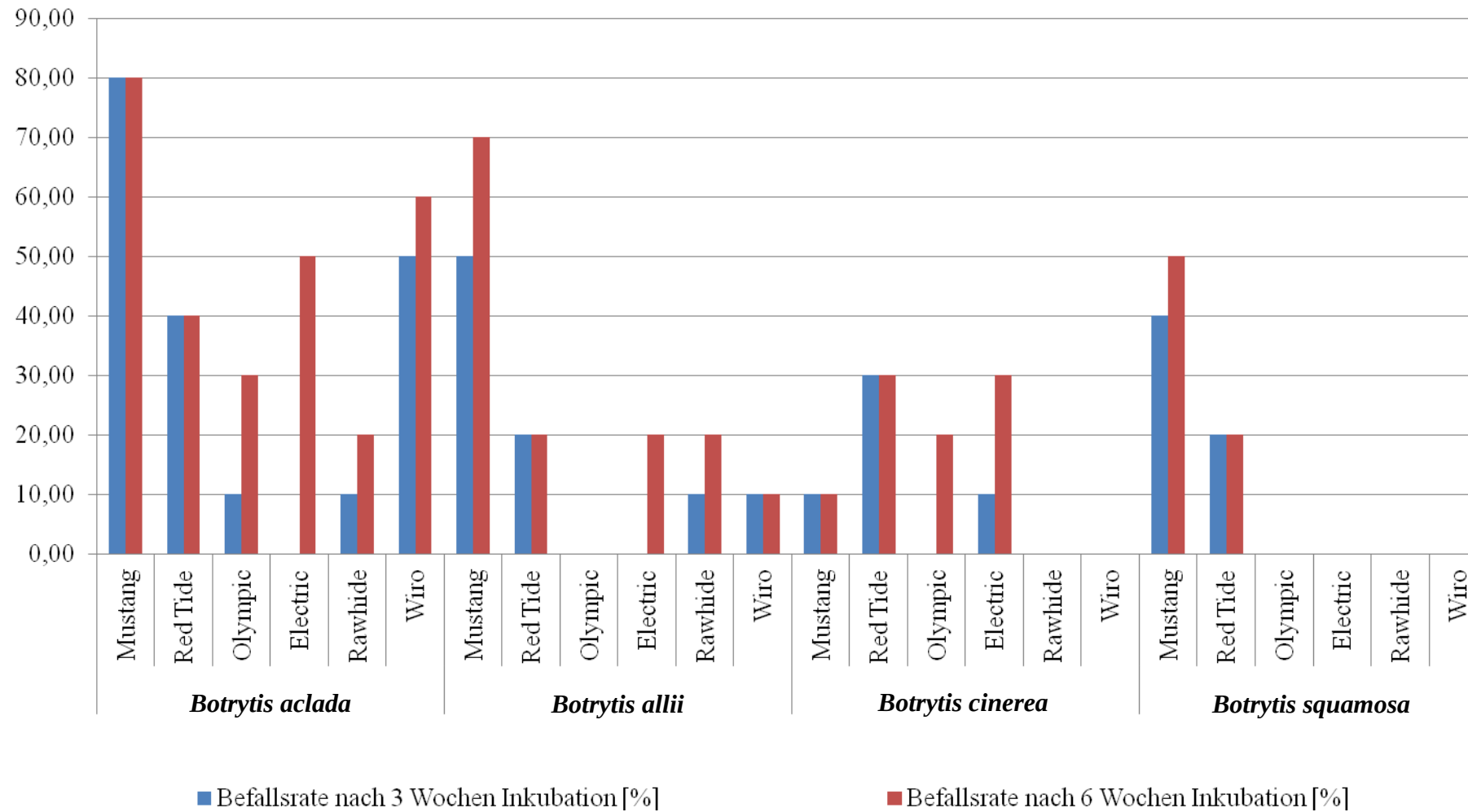


Abb. 38: Befallsrate der getesteten Zwiebelsorten nach der dritten und sechsten Inkubationswoche.

Tabelle 9: Zweifaktorielle Varianzanalyse der Befallsrate für die beiden Faktoren Sorte und *Botrytis*-Art ($\alpha = 0,05$).

Quelle	DF	Summe der Quadrate	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Modell	8	9266.66667	1158.33333	4.94	0.0039
Error	15	3516.66667	234.44444		
Korrigierte Summe	23	12783.33333			

R-Quadrat	Koeff.var	Wurzel MSE	Befallsrate Mittelwert
0.724902	63.35826	15.31158	24.16667

Quelle	DF	Typ I SS	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Pathogen	3	4483.33333	1494.44444	6.37	0.0053
Sorte	5	4783.33333	956.66667	4.08	0.0154

In dem Betrachtungszeitraum von sechs Wochen verursachte *Botrytis allii* an fünf der getesteten Zwiebsorten Symptome der Kaffeefleckenkrankheit. Nur an der Sorte ‘Olympic’ sind nach der Inokulation mit der genannten *Botrytis*-Art keine Kaffeeflecken entstanden. *Botrytis cinerea* rief an den Sorten ‘Mustang’, ‘Red Tide’, ‘Olympic’ und ‘Electric’ Symptome hervor und *Botrytis squamosa* an den Sorten ‘Mustang’ und ‘Red Tide’. *Botrytis aclada* verursachte als einzige der getesteten *Botrytis*-Arten an allen sechs Zwiebsorten Symptome. Dieser Pilz erreichte insgesamt auch die höchste Befallsrate von 80%. In dem durchgeführten Versuch lag die Befallsrate generell in einem Bereich von 0 bis 80%. Die statistische Auswertung hat ergeben, dass sich *Botrytis aclada* hinsichtlich der Befallsrate von den restlichen Pathogenen signifikant unterscheidet. Zwischen den Befallsraten von *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis squamosa* besteht kein statistisch gesicherter Unterschied. Im Mittel wies *Botrytis aclada* die höchste Befallsrate und *Botrytis squamosa* die geringste Befallsrate auf. Die exakten Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung der Befallsrate für die einzelnen Pathogene.

<i>Botrytis</i>-Art	Mittelwert der Befallsrate [%]	Standardabweichung
<i>Botrytis aclada</i>	46,67	21,60
<i>Botrytis allii</i>	23,33	24,22
<i>Botrytis cinerea</i>	15,00	13,78
<i>Botrytis squamosa</i>	11,67	20,41

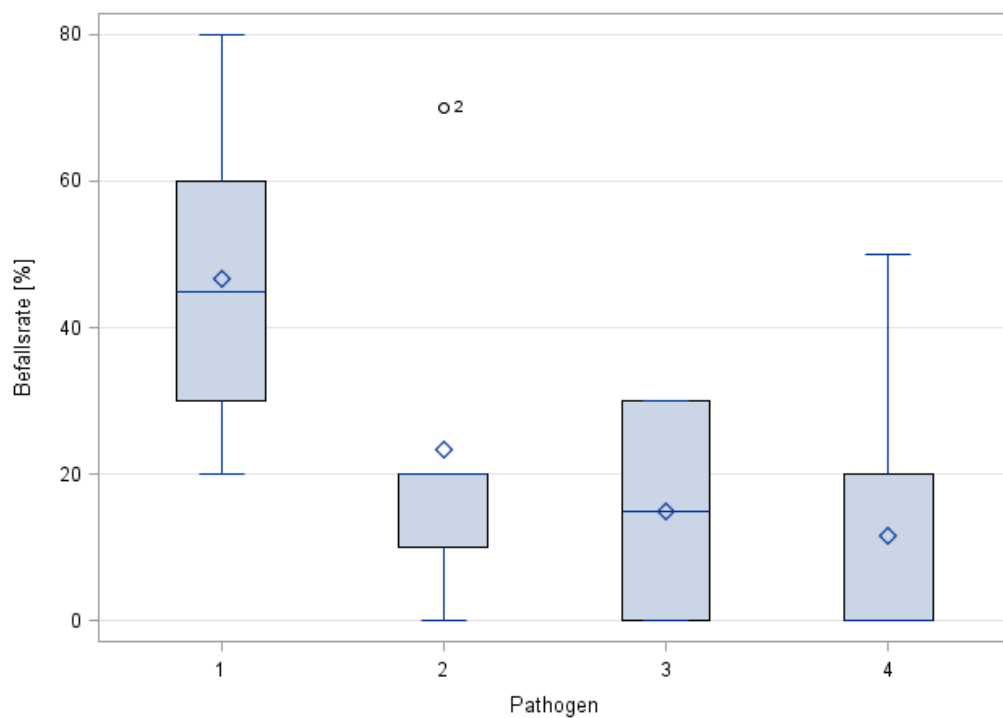


Abb. 39: Boxplot-Diagramm für die Befallsrate bei den unterschiedlichen *Botrytis*-Arten (1=*Botrytis aclada*, 2=*Botrytis allii*, 3=*Botrytis cinerea* und 4=*Botrytis squamosa*).

Hinsichtlich der Zwiebelsorten ergab die statistische Auswertung folgende Ergebnisse: Die Befallsrate der Sorte ‘Mustang’ unterscheidet sich signifikant zu den anderen beiden

gelbschaligen Sorten sowie der Sorte ‘Wiro’, aber nicht zu den Sorten ‘Red Tide’ und ‘Electric’. Ansonsten konnten keine statistisch gesicherten Unterschiede festgestellt werden. Weiters konnten an den Sorten ‘Mustang’ und ‘Red Tide’ alle vier Pathogene Symptome der Kaffeefleckenkrankheit hervorrufen. Bei der Sorte ‘Red Tide’ war auch auffällig, dass sich die Anzahl der symptomatischen Bulben bei allen Pathogenen zwischen dritter und sechster Inkubationswoche nicht mehr verändert hat. Die durchschnittlich niedrigste Befallsrate wurde innerhalb der gelbschaligen Zwiebelsorten bei der Sorte ‘Rawhide’ (10%) festgestellt, die durchschnittlich Höchste bei der Sorte ‘Mustang’ (52,50%). Die beiden genannten Sorten wiesen auch bei der gemeinsamen Betrachtung von allen sechs Sorten die im Mittel niedrigste beziehungsweise höchste Befallsrate auf. Innerhalb der rotschaligen Zwiebelsorten konnte die im Mittel niedrigste Befallsrate bei der Sorte ‘Wiro’ (17,50%) und die durchschnittlich höchste Befallsrate bei der Sorte ‘Red Tide’ (27,50%) festgestellt werden. Die Mittelwerte sind in Tabelle 11 veranschaulicht.

Tabelle 11: Mittelwert und Standardabweichung der Befallsrate nach sechswöchiger Inkubation von den Sorten.

Sorte	Mittelwert der Befallsrate [%]	Standardabweichung
Mustang	52,50	30,96
Red Tide	27,50	9,57
Olympic	12,50	15,00
Electric	25,00	20,82
Rawhide	10,00	11,55
Wiro	17,50	28,72

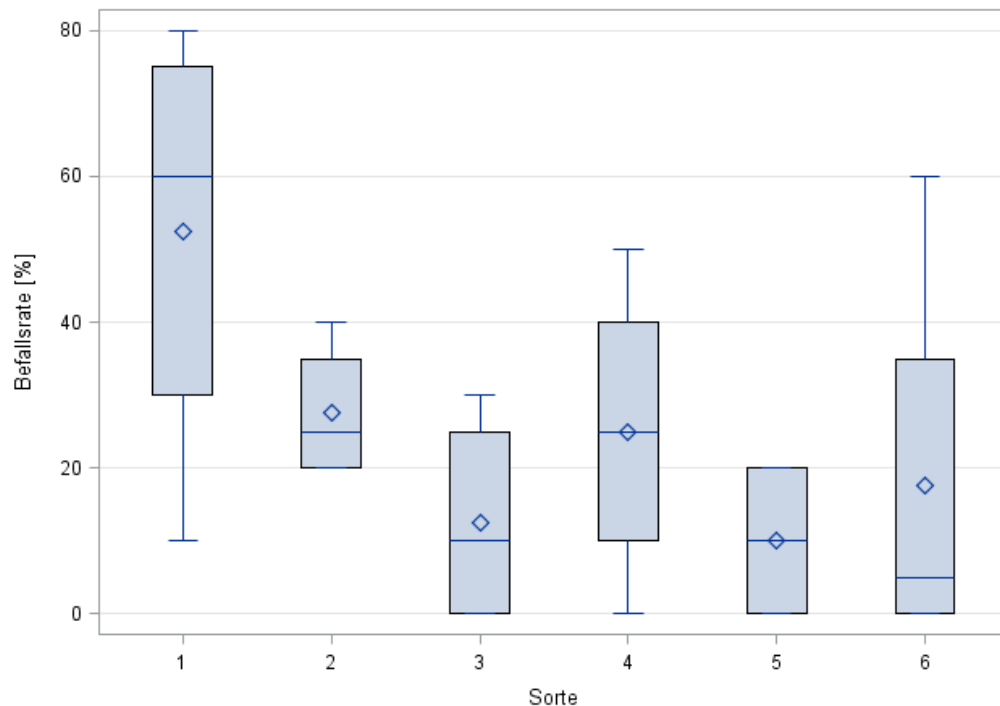


Abb. 40: Boxplot-Diagramm für die Befallsrate bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).

Tabelle 12: Zweifaktorielle Varianzanalyse für die Anzahl der Tage bis zum Entstehen der ersten Kaffee-flecken ($\alpha=0,05$).

Quelle	DF	Summe der Quadrate	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Modell	16	717.238793	44.827425	5.20	<.0001
Error	41	353.675000	8.626220		
Korrigierte Summe	57	1070.913793			

R-Quadrat	Koeff.var	Wurzel MSE	Tage Mittelwert
0.669745	14.54727	2.937043	20.18966

Quelle	DF	Typ I SS	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Pathogen	3	24.6764305	8.2254768	0.95	0.4238
Sorte	5	557.8536578	111.5707316	12.93	<.0001
Pathogen*Sorte	8	134.7087049	16.8385881	1.95	0.0778

Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung für die Anzahl der Tage bis zum Entstehen der ersten Kaffeefflecken für die einzelnen *Botrytis*-Arten und Sorten.

<i>Botrytis</i>-Art	Sorte	Mittelwert	Standardabweichung
<i>Botrytis aclada</i>	Mustang	19,63	1,41
	Red Tide	20,50	0,58
	Olympic	23,00	1,73
	Electric	27,20	2,28
	Rawhide	19,00	2,83
	Wiro	14,33	4,41
<i>Botrytis allii</i>	Mustang	18,33	3,14
	Red Tide	17,00	1,42
	Olympic	0,00	0,00
	Electric	25,00	2,83
	Rawhide	22,00	2,83
	Wiro	10,00	-
<i>Botrytis cinerea</i>	Mustang	20,00	-
	Red Tide	20,33	1,15
	Olympic	23,33	0,58
	Electric	19,00	7,81
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-
<i>Botrytis squamosa</i>	Mustang	21,00	1,87
	Red Tide	21,00	0,00
	Olympic	-	-
	Electric	-	-
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-

Die statistische Auswertung hat gezeigt, dass sich die vier Pathogene hinsichtlich der Zeitspanne in Tagen bis zur Entwicklung von Kaffeeflecken nicht signifikant unterscheiden. Durchschnittlich entwickelten sich die Symptome nach 19 bis 21 Tagen (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung der Tageszahl bis zur Kaffeefleckenentwicklung.

Botrytis-Art	Mittelwert der Anzahl der Tage	Standardabweichung
<i>Botrytis aclada</i>	21,00	4,82
<i>Botrytis allii</i>	20,80	4,55
<i>Botrytis cinerea</i>	20,29	4,16
<i>Botrytis squamosa</i>	19,08	1,53

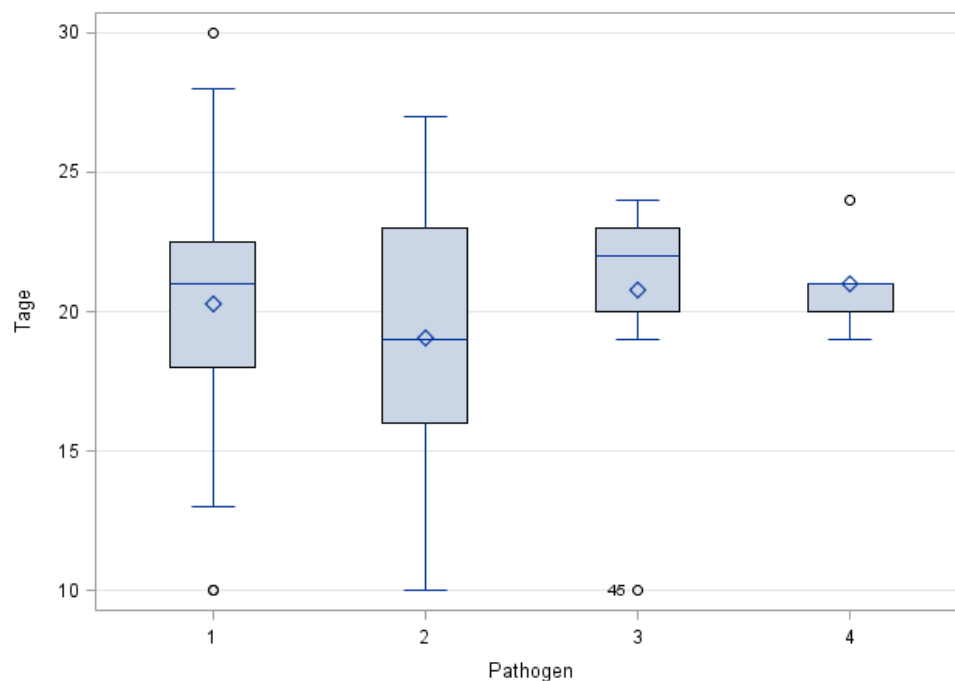


Abb. 41: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Tage bis zur Entwicklung von Kaffeeflecken bei den unterschiedlichen Botrytis-Arten (1=Botrytis aclada, 2=Botrytis allii, 3=Botrytis cinerea und 4=Botrytis squamosa).

Hinsichtlich der Zwiebelsorten konnte festgestellt werden, dass sich die Sorte ‘Wiro’ zu allen anderen getesteten Sorten signifikant unterscheidet. Bei den genannten Sorten entstanden die Symptome durchschnittlich am schnellsten nach etwa 14 Tagen. Die beiden Winterzwiebelsorten ‘Olympic’ und ‘Electric’ wiesen keine signifikanten Unterschiede auf, allerdings konnten statistisch gesicherte Unterschiede zwischen ‘Electric’ und den vier Sommerzwiebelsorten festgestellt werden. Im Mittel benötigte die Entwicklung der Kaffeeflecken bei der Sorte ‘Electric’ die längste Zeitspanne von etwa 25 Tagen.

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl an Tagen bis zur Kaffeefleckenentwicklung für die getesteten Sorten.

Sorte	Mittelwert der Anzahl der Tage	Standardabweichung
Mustang	19,60	2,26
Red Tide	19,91	1,64
Olympic	23,17	1,17
Electric	24,30	5,56
Rawhide	20,50	2,89
Wiro	13,71	4,35

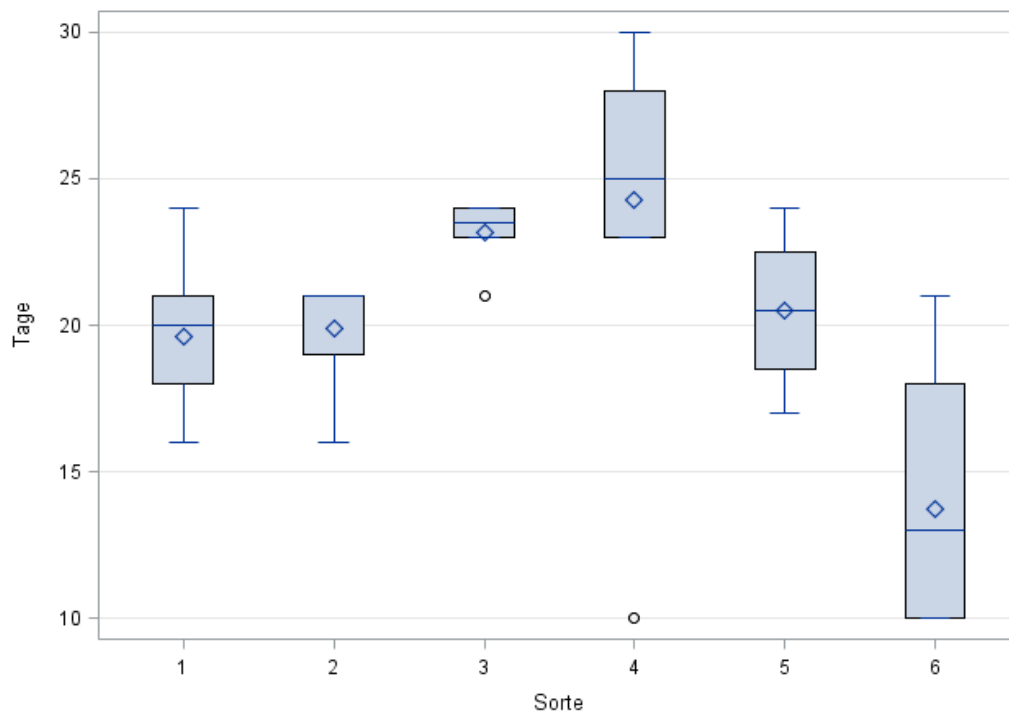


Abb. 42: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Tage bis zur Entwicklung von Kaffeeflecken bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).

Tabelle 16: Zweifaktorielle Varianzanalyse für die Anzahl der Kaffeeflecken pro symptomatischer Zwiebelbulbe ($\alpha=0,05$).

Quelle	DF	Summe der Quadrate	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Modell	16	49.1468801	3.0716800	1.13	0.3618
Error	41	111.4738095	2.7188734		
Korrigierte Summe	57	160.6206897			

R-Quadrat	Koeff.var	Wurzel MSE	Anzahl der Flecken Mittelwert
0.305981	73.56634	1.648901	2.241379

Quelle	DF	Typ I SS	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Pathogen	3	7.06513410	2.35504470	0.87	0.4664
Sorte	5	25.34875734	5.06975147	1.86	0.1217
Pathogen*Sorte	8	16.73298869	2.09162359	0.77	0.6315

Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeefleckenzahl pro symptomatischer Bulbe für die einzelnen *Botrytis*-Arten und Sorten.

<i>Botrytis</i>-Art	Sorte	Mittelwert	Standardabweichung
<i>Botrytis aclada</i>	Mustang	2,75	1,49
	Red Tide	1,25	0,50
	Olympic	2,67	2,89
	Electric	2,40	1,67
	Rawhide	1,50	0,71
	Wiro	3,67	1,37
<i>Botrytis allii</i>	Mustang	1,86	1,46
	Red Tide	1,00	0,00
	Olympic	-	-
	Electric	4,00	4,24
	Rawhide	2,00	0,00
	Wiro	3,00	-
<i>Botrytis cinerea</i>	Mustang	1,00	-
	Red Tide	1,33	0,58
	Olympic	4,00	4,24
	Electric	1,00	0,00
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-
<i>Botrytis squamosa</i>	Mustang	2,00	1,41
	Red Tide	1,00	0,00
	Olympic	-	-
	Electric	-	-
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-

Durchschnittlich wurden 1 bis 4 Kaffeefflecken pro symptomatischer Bulbe gebildet. Sowohl die Pathogene als auch die getesteten Zwiebelsorten haben sich hinsichtlich dieses Parameters nicht signifikant unterschieden. Die durchschnittlichen Unterschiede zwischen den Pathogenen hinsichtlich dieses Parameters waren minimal (siehe Tabelle 18). Im Mittel entstanden bei den Sorten ‘Olympic’ und ‘Wiro’ die meisten Verfärbungen, die Sorten ‘Rawhide’ und ‘Red Tide’ wiesen die geringste Kaffeeffleckenanzahl auf. Die Werte sind für alle Sorten in der untenstehenden Tabelle 19 veranschaulicht.

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichung der Kaffeeffleckenanzahl pro symptomatischer Bulbe für die *Botrytis*-Arten.

<i>Botrytis</i>-Art	Mittelwert der Kaffeeffleckenanzahl pro symptomatischer Bulbe	Standardabweichung
<i>Botrytis aclada</i>	2,57	1,62
<i>Botrytis allii</i>	2,14	1,79
<i>Botrytis cinerea</i>	1,78	1,99
<i>Botrytis squamosa</i>	1,71	1,25

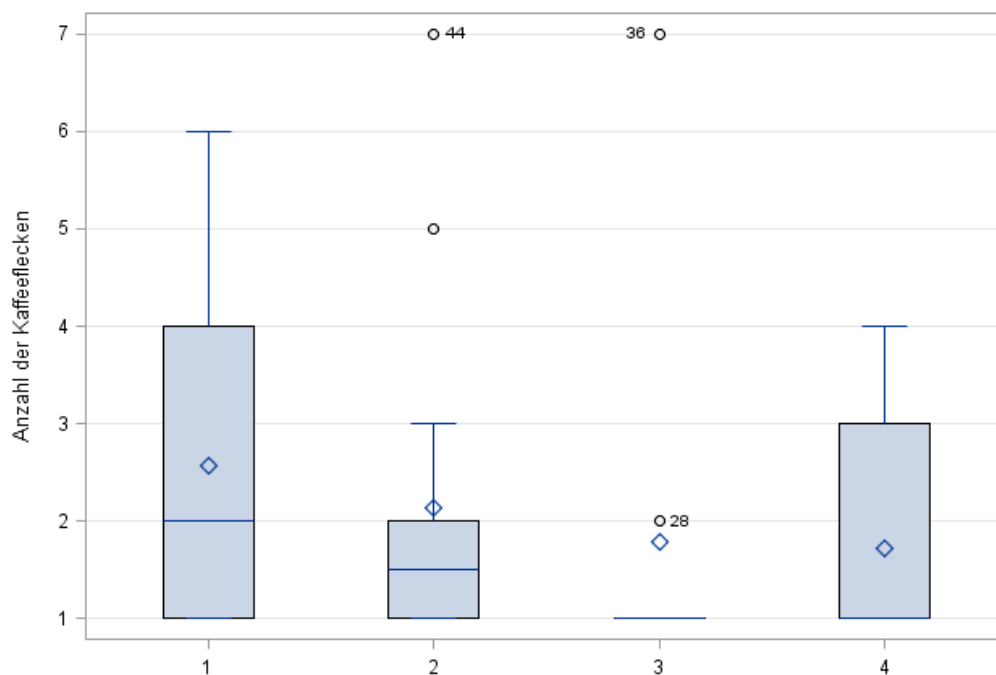


Abb. 43: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Kaffeeflecken pro symptomatischer Bulbe bei den unterschiedlichen *Botrytis*-Arten (1=*Botrytis aclada*, 2=*Botrytis allii*, 3=*Botrytis cinerea* und 4=*Botrytis squamosa*).

Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeefleckenzahl pro symptomatischer Bulbe für die einzelnen Sorten.

Sorte	Kaffeefleckenzahl/ symptomatischer Bulbe	Standardabweichung
Mustang	2,19	1,44
Red Tide	1,18	0,40
Olympic	3,20	3,03
Electric	2,30	2,11
Rawhide	1,75	0,50
Wiro	3,57	1,27

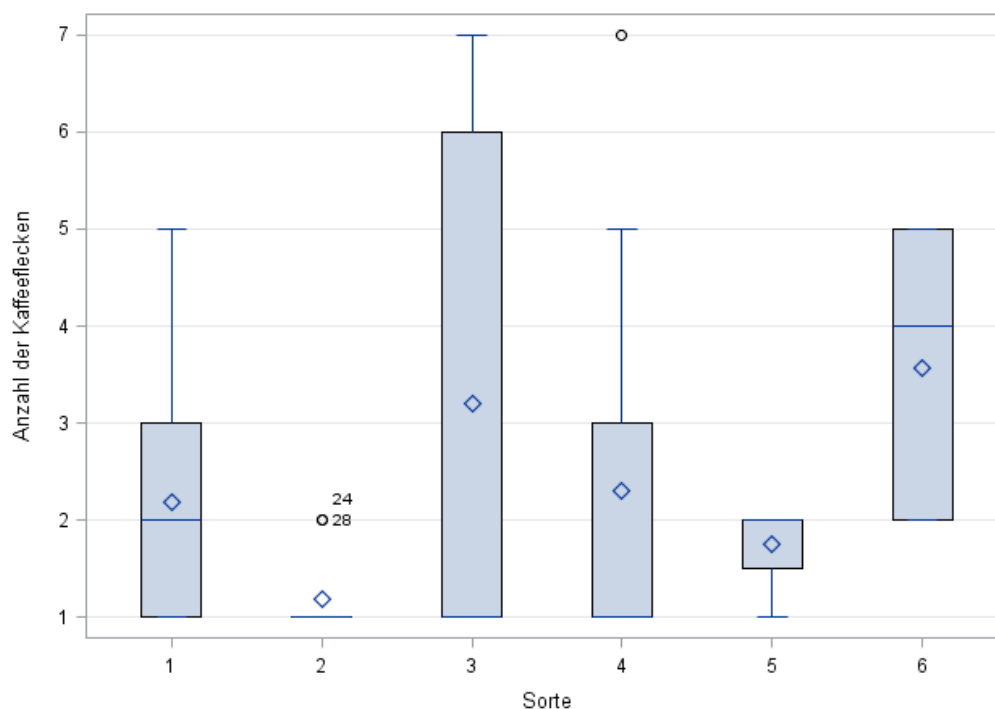


Abb. 44: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Kaffeeflecken pro symptomatischer Bulbe bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).

Tabelle 20: Zweifaktorielle Varianzanalyse für die Größe der Kaffeeflecken ($\alpha=0,05$).

Quelle	DF	Summe der Quadrate	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Modell	16	19.85524302	1.24095269	1.71	0.0831
Error	41	29.70561905	0.72452729		
Korrigierte Summe	57	49.56086207			

R-Quadrat	Koeff.var	Wurzel MSE	Größe der Kaffeeflecken [cm] Mittelwert
0.400623	78.99059	0.851192	1.077586

Quelle	DF	Typ I SS	Mittleres Quadrat	F-Statistik	Pr > F
Pathogen	3	1.29157635	0.43052545	0.59	0.6224
Sorte	5	15.01268949	3.00253790	4.14	0.0039
Pathogen*Sorte	8	3.55097718	0.44387215	0.61	0.7620

Tabelle 21: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeefleckengröße für die einzelnen *Botrytis*-Arten und Sorten.

<i>Botrytis</i>-Art	Sorte	Mittelwert	Standardabweichung
<i>Botrytis aclada</i>	Mustang	1,35	0,91
	Red Tide	2,10	1,12
	Olympic	1,47	1,55
	Electric	1,00	0,57
	Rawhide	0,15	0,07
	Wiro	0,18	0,08
<i>Botrytis allii</i>	Mustang	0,97	0,94
	Red Tide	1,90	1,27
	Olympic	-	-
	Electric	0,50	0,28
	Rawhide	0,20	0,14
	Wiro	0,30	-
<i>Botrytis cinerea</i>	Mustang	1,20	-
	Red Tide	1,27	1,33
	Olympic	0,45	0,35
	Electric	1,53	0,31
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-
<i>Botrytis squamosa</i>	Mustang	1,08	0,79
	Red Tide	2,15	0,78
	Olympic	-	-
	Electric	-	-
	Rawhide	-	-
	Wiro	-	-

Hinsichtlich der Kaffeeleckengröße konnten zwischen den getesteten Pathogenen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Aus der nachfolgenden Tabelle 22 ist ersichtlich, dass die durchschnittlichen Größen der gebildeten Verfärbungen sehr nahe beisammen liegen.

Tabelle 22: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeeleckengröße für die einzelnen *Botrytis*-Arten.

<i>Botrytis</i> -Art	Mittelwert der Kaffeeleckengröße [cm]	Standardabweichung
<i>Botrytis aclada</i>	1,07	1,01
<i>Botrytis allii</i>	0,88	0,91
<i>Botrytis cinerea</i>	1,17	0,82
<i>Botrytis squamosa</i>	1,39	0,89

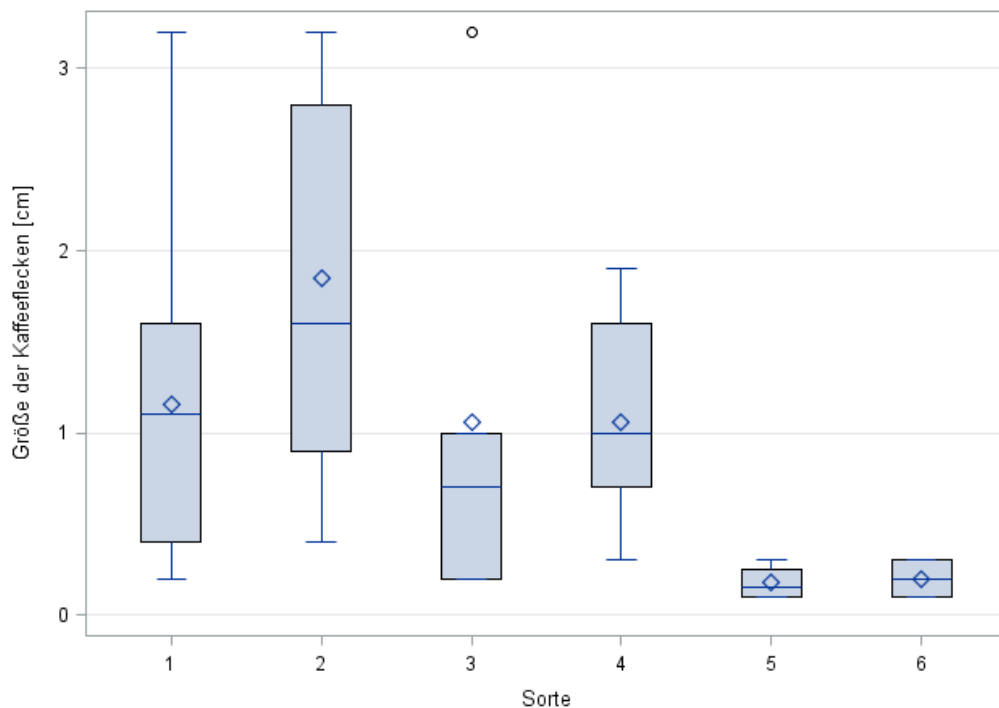


Abb. 45: Boxplot-Diagramm für die Kaffeeleckengröße bei den unterschiedlichen *Botrytis*-Arten (1=*Botrytis aclada*, 2=*Botrytis allii*, 3=*Botrytis cinerea* und 4=*Botrytis squamosa*).

Im Gegensatz zu den Pathogenen konnten zwischen den Zwiebelnorten statistisch gesicherte Unterschiede festgestellt werden: Die Kaffeefleckengröße zwischen den Sorten ‘Red Tide’ und ‘Wiro’ sowie zwischen den Sorten ‘Red Tide’ und ‘Rawhide’ unterscheidet sich signifikant. Die restlichen Zwiebelnorten wiesen allerdings keine signifikanten Unterschiede auf. Die Größe der gebildeten Kaffeeflecken lag durchschnittlich zwischen 0,18 und 1,85 cm, wobei die größten Kaffeeflecken bei der Sorte ‘Red Tide’ und die kleinsten Verfärbungen bei der Sorte ‘Rawhide’ entstanden sind (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeefleckengröße für die einzelnen Sorten.

Sorte	Mittelwert der Kaffeefleckengröße [cm]	Standardabweichung
Mustang	1,15	0,84
Red Tide	1,85	1,05
Olympic	1,06	1,24
Electric	1,06	0,56
Rawhide	0,18	0,10
Wiro	0,20	0,08

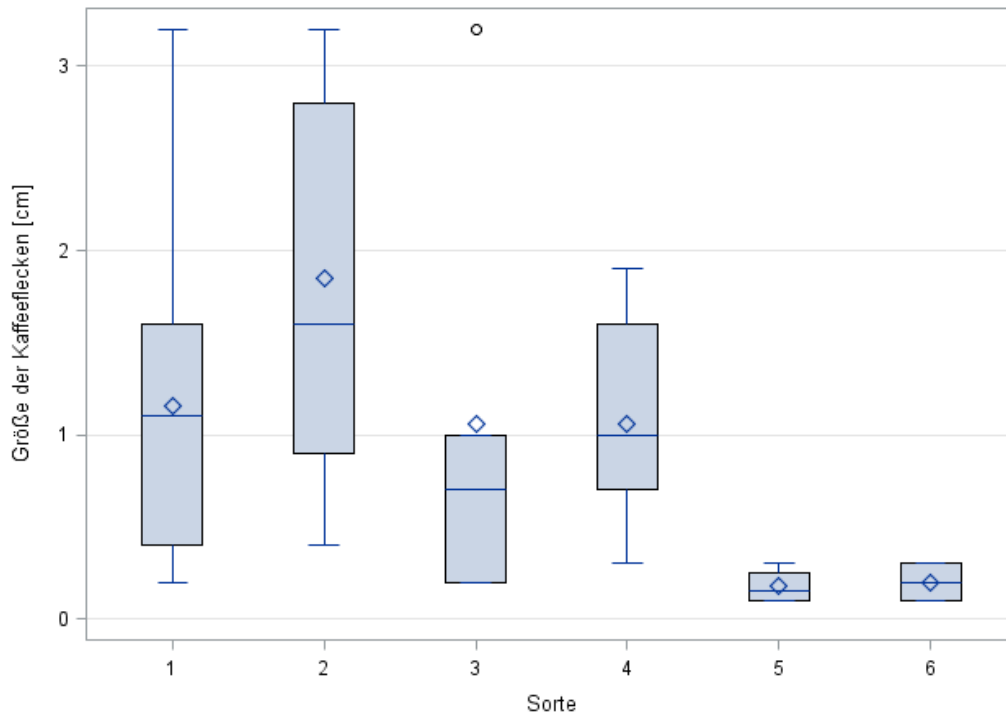


Abb. 46: Boxplot-Diagramm für die Kaffeefleckengröße bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).

Auffällig war, dass die Sorte 'Rawhide' eine rasche und sehr dunkle Ausfärbung der Zwiebel-
schale zeigte, wohingegen bei den Sorten 'Olympic' und 'Electric' die Trocknung und Aus-
färbung der Schale im Vergleich zu den anderen Sorten sehr langsam voran schritt. Weiters
wurde beobachtet, dass bei den Sorten 'Olympic' und 'Electric' bei allen sieben Pathogenen
Gewebedeformationen auf der Verletzungsfläche entstanden sind. Diese waren bei dem Pilz
Botrytis cinerea sehr stark ausgeprägt.



Abb. 47: Gewebedeformationen nach Inokulation mit *Botrytis aclada* (links) beziehungsweise *Botrytis cinerea* (mittig) sowie intensiv ausgefärbte Zwiebelschale der Sorte Rawhide (rechts).

Hinsichtlich des Fremdbefalls, welcher bei der Vorbereitung der Zwiebeln äußerlich nicht zu erkennen war, konnten folgende Pilzgattungen beziehungsweise Pilzarten von den inokulierten Zwiebelbulben isoliert und mikroskopisch bestimmt werden: *Penicillium*, *Fusarium* und *Aspergillus niger*. Auch Bakterien wurden von den Zwiebelproben isoliert. Eine Artbestimmung wurde im Rahmen dieser Masterarbeit nicht durchgeführt.

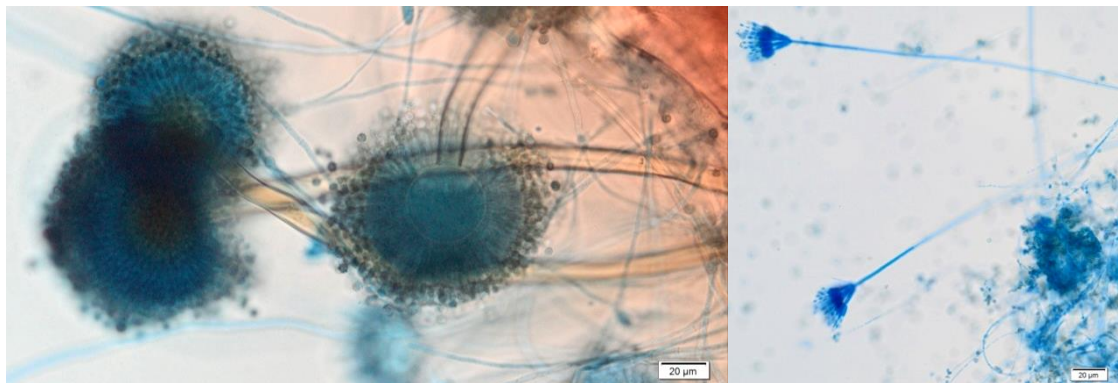


Abb. 48: Konidienträger von *Aspergillus niger* (links) sowie einer *Penicillium*-Art (rechts) unter dem Mikroskop, angefärbt mittels Wittmann's Blau.



Abb. 49 Fremdbefall mit *Aspergillus niger* (links) und Bakterien (rechts).

Bei einem Fremdbefall mit *Fusarium* konnten teilweise Verfärbungen auf der Zwiebelschale beobachtet werden, welche zunächst bräunlich und später rosa gefärbt waren. Im Gegensatz zu den Kaffeeflecken blieb das verfärbte Gewebe aber nicht fest, sondern wurde weich.



Abb. 50: Fusarium-Fremdbefall: Verfärbungen mit leichter oberflächlicher Myzelentwicklung nach drei Wochen Inkubation (links) sowie nach vier Wochen Inkubation (mittig, links).

Bei den beiden Sommerzwiebel-Sorten ‘Mustang’ und ‘Red Tide’ zeigte sich während der Inkubation im Vergleich zu den anderen Sorten ein verstärkter Fremdbefall mit Arten der Gattung *Fusarium* sowie mit Bakterien.

4.3. Isolation aus natürlich infizierten Freilandproben

Im Rahmen der morphologischen Analyse konnte weder bei der Isolation mittels Nährmedium noch bei der Isolation mittels Feuchtkammer eine *Botrytis*-Art aus den entnommenen Gewebestücken der symptomatischen Zwiebelschalen isoliert werden: Die aus den Schalenstücken ausgewachsenen Pilzstrukturen konnten durch mikroskopische Analyse keiner *Botrytis*-Art zugeordnet werden. Des Weiteren waren die Nährmedien und die Zwiebelschalenstücke in der Feuchtkammer nach der Oberflächendesinfektion mit der 0,5-prozentigen Natriumhypochlorit-Lösung sehr schnell mit Bakterien oder anderen Pilzarten, wie zum Beispiel *Aspergillus niger* oder *Penicillium*-Arten, überwachsen. Bei der Oberflächendesinfektion mittels 5-prozentiger Natriumhypochlorit-Lösung ist hingegen kein Myzel aus den Schalenstücken ausgewachsen.

Die molekularbiologische Analyse der Gewebeproben ergab folgendes Ergebnis: Von den 15 analysierten Zwiebelschalen konnte lediglich bei zwei Proben (siehe Abb. 51) mit der Methode nach NIELSEN et al. (2002) eine verwertbare Sequenz erhalten und sequenziert werden. Mit einer Übereinstimmung von 99 % handelt es sich bei beiden Proben um den Pilz *Botrytis cinerea*. Die Methode für den spezifischen und direkten Nachweis von *Botrytis cinerea* lieferte allerdings kein verwertbares Ergebnis. Aus den molekularbiologischen Untersuchungen ist

weitere hervorgegangen, dass nur sehr wenig *Botrytis*-DNA in den Zwiebelschalen vorhanden ist.



Abb. 51: Freilandproben mit zerfließenden Flecken, aus welchen unter anderem Gewebeproben für die molekularbiologische Analyse entnommen wurden.

5. Diskussion

Von den 13 Varianten, welche im Rahmen der Vorversuche getestet wurden, führten nur vier Varianten zu den gewünschten Symptomen der Kaffeefleckenkrankheit. Es hat sich gezeigt, dass eine Verletzung des Zwiebelgewebes für die Entstehung der Kaffeeflecken nötig ist, wobei die Verletzungen mittels Korund und Mikronadel-Stempel nicht zielführend waren. Letztere war vermutlich zu schwach und bei der Verletzung mittels Korund verblieb trotz Spülung mit sterilem Wasser zu viel Pulver auf dem Zwiebelgewebe, wodurch die Entwicklung des Pilzes gehemmt sein könnte. Auch die Inokulation mit infizierten Zwiebelblattstücken war nur bei Variante 4 zielführend, wobei hierbei nur 25 % der inokulierten Bulben die gewünschten Symptome zeigten. Im Gegensatz dazu entstanden bei den Untersuchungen von CLARK und LORBEER (1973 a) bei jeweils etwa 60 % der inokulierten Bulben Symptome, nachdem diese sowohl unverletzt als auch durch Korund verletzt mittels Konidiensuspension des Pilzes *Botrytis cinerea* inokuliert und anschließend inkubiert wurden. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf das verwendete Isolat von *Botrytis cinerea* zurückzuführen sein: Bei den Versuchen von CLARK und LORBEER (1973 a) wurde ein Isolat verwendet, welches direkt von *Allium cepa* L. isoliert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Isolat herangezogen, welches von Brombeeren isoliert wurde und im Vergleich dazu an Zwiebel möglicherweise eine geringere Virulenz aufweist. Dies könnte des Weiteren der Grund dafür sein, dass in dem Betrachtungszeitraum von sechs Wochen an ungeschälten Bulben keine charakteristischen Symptome, sondern lediglich unspezifische, dunkle Verfärbungen entstanden sind. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass sich bei Verlängerung des Inkubationszeitraumes aus den unspezifischen Verfärbungen noch charakteristische Symptome entwickeln.

Die auffälligen, schwarzen Verfärbungen der Zwiebelschalen, welche bei der Variante 4 der Inokulation mittels Sporensuspension entstanden sind, könnten auf eine Reaktion des Materials der Insektennadel (schwarzer Stahl) mit den Säuren und/oder anderen Inhaltsstoffen der fleischigen Zwiebelschalen zurückzuführen sein. Die schwarzen Flecken sind nur entstanden, wenn die Insektennadel längere Zeit direkt in der fleischigen Schale gesteckt ist, was darauf hindeutet, dass eine Einwirkdauer von mehreren Stunden auf die Insektennadel für die Ausbildung der Verfärbungen nötig ist.

Wie erwartet riefen sowohl die Arten *Botrytis aclada* und *Botrytis allii*, welche auf *Allium cepa* L. spezialisiert sind und unter anderem eine sogenannte Halsfäule an den Zwiebelbulben verursachen, als auch die Pilze *Botrytis squamosa* und *Botrytis cinerea*, welcher in der Litera-

tur als Krankheitserreger beschrieben wird, Symptome der Kaffeefleckenkrankheit hervor. Dieses Ergebnis deckt sich mit jenem der Untersuchungen von CLARK und LORBEER (1973 a), bei welchen *Botrytis aclada*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis squamosa* nach künstlicher Inokulation der Zwiebelbulben Kaffeeflecken verursachen konnten. In der Literatur konnte für *Botrytis allii* aber bislang kein Nachweis zur Verursachung von Kaffeeflecken gefunden werden, welcher durch die vorliegende Arbeit erbracht wurde.

Die übrigen getesteten Arten (*Botrytis byssoidea*, *Botrytis porri* und *Botrytis tulipae*) konnten in dem durchgeführten Versuch keine Kaffeeflecken hervorrufen. *Botrytis porri* und *Botrytis tulipae* kommen nur äußerst selten an Zwiebel vor und sind auf andere Wirtspflanzen spezialisiert, wodurch das Ergebnis nicht überraschend ist. Zu *Botrytis byssoidea* liegen in der Literatur bislang keine Untersuchungsergebnisse hinsichtlich des Potenzials zur Verursachung von Kaffeeflecken vor. In weiterführenden Versuchen wäre nötig abzuklären, ob bei einer Inokulation mittels Konidiensuspension an Stelle der Myzelsuspension ein abweichendes Ergebnis auftritt. *Botrytis byssoidea* kann aber generell nur schwer zur Sporulation angeregt werden (DU TOIT, 2015). Desweiteren haben vorangegangene Versuche zum Thema Halsfäule an Zwiebel für die genannte *Botrytis*-Art gezeigt, dass die Verwendung von Myzel als Inokulum für eine künstliche Infektion von verletzten Bulben zu einer Befallsrate von 100 % führte (PRESLY, 1985).

Mit Ausnahme der Sorte 'Wiro' entwickelten sich die Symptome im Mittel zwischen 19 und 25 Tagen. Da bei der genannten Sorte die Trocknung und die damit verbundenen biochemischen Veränderungen der Schale im Gegensatz zu den anderen Sorten schon nach wenigen Tagen einsetzten, waren die braunen Verfärbungen am schnellsten nach durchschnittlich 14 Tagen sichtbar. Es wird daher vermutet, dass die Reaktion, welche zu den braunen Verfärbungen auf der Zwiebelschale führt, von der Akkumulation des Substrates, vermutlich Brenzkatechin, im Zuge der Trocknung der fleischigen Schalen abhängig ist (CLARK und LORBEER, 1973 a). Dies würde auch die Beobachtungen erklären, dass die Kaffeeflecken nur auf jenen fleischigen Schalen entstanden sind, bei welchen die Trocknung bereits eingesetzt hat, und dass die gebildeten Verfärbungen mit fortschreitender Veränderung der Schale intensiver wurden. Die niedrigen Befallsraten der Sorten 'Olympic' und 'Electric' können dadurch ebenfalls erklärt werden, da die Trocknung der Zwiebelschale bei den genannten Sorte einerseits nur sehr langsam voran schritt und andererseits nach dem Ende der sechswöchigen Inkubation noch nicht bei allen Zwiebelproben eingesetzt hat. Dieser Unterschied zu den anderen Zwiebelsorten ergibt sich vermutlich daraus, dass die Sorten 'Olympic' und 'Electric' Winterzwie-

belsorten darstellen, welche nicht für eine lange Lagerung geeignet sind, wohingegen die anderen vier Sorten gut lagerfähige Sommerzwiebelsorten sind.

Bei der Sorte 'Rawhide' war eine intensive und sehr dunkle Färbung der Zwiebelchale zu beobachten. Dadurch ist ein hemmender Effekt auf das Pilzwachstum denkbar, da es im Zuge der Pigmentierung der äußersten Zwiebelchalen zu chemischen Veränderungen der phenolischen Substanzen kommt und im Zuge dessen unter anderem antimikrobielle Substanzen für die Abwehr von Pathogenen entstehen (BREWSTER, 2008). Dieser hemmende Effekt würde sich einerseits in der sehr geringen Befallsrate und andererseits in der niedrigen Anzahl und Größe der entstandenen Kaffeefflecken widerspiegeln.

Aus den Versuchen geht weiters hervor, dass die Lagerdauer der Zwiebeln einen Einfluss auf den Infektionserfolg der Pathogene und die Entwicklung der Symptome hat: Nur bei den Sorten 'Mustang' und 'Red Tide', welche vor der Inokulation mehrere Wochen gelagert wurden, verursachten alle vier Arten (*Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis squamosa*) Symptome der Kaffeeffleckenkrankheit. Diese Sorten zeigten insgesamt auch die beiden höchsten Befallsraten. Im Gegensatz dazu konnten bei den anderen vier Zwiebeln, welche wenige Tage nach der Zwiebelernte inokuliert wurden, Unterschiede im Infektionsverfolg der Pathogene festgestellt werden: Bei *Botrytis aclada* lag die Anzahl der symptomatischen Zwiebeln zwischen 30 und 60% wohingegen die Pathogene *Botrytis allii*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis squamosa* entweder gar keine Symptome verursachten oder deutlich geringere Befallsraten zwischen 10 und 30% hervorriefen. Die genannte Vermutung wird desweiteren dadurch unterstützt, dass sich die Befallsrate der lange gelagerten Sorte 'Mustang' in der Befallsrate signifikant zu den anderen beiden gelbschaligen Sorten unterscheidet. Innerhalb der rotschaligen Sorten konnte hinsichtlich der Befallsrate kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Sorten festgestellt werden, die Befallsrate der Sorte 'Red Tide' war aber deutlich höher als jene der beiden anderen Zwiebeln, welche wenige Tage nach der Ernte inokuliert wurden. Allerdings ist bei den Zwiebelproben der Sorte 'Red Tide' ein erhöhter Fremdbefall mit anderen Pilzarten und Bakterien aufgetreten, wodurch die inokulierten *Botrytis*-Arten vermutlich in ihrer Entwicklung gehemmt wurden.

Hinsichtlich der Unterschiede zwischen gelb- und rotschaligen Zwiebeln können keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Die gelbschalige Sorte 'Mustang' wies im gesamten Versuch zwar die höchste Befallsrate auf, es kann daraus aber nicht geschlussfolgert werden, dass die gelbschaligen Sorten anfälliger waren als die rotschaligen Sorten. Im Gegensatz dazu haben die Untersuchungen von CLARK und LORBEER (1973 b) ergeben, dass die gelbschaligen

Sorten eine signifikant höhere Befallsrate aufweisen. Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die angeführte Publikation auf einer Untersuchung von natürlich infizierten Freilandproben beruht und in der vorliegenden Arbeit ein Laborversuch mit optimalen Bedingungen für die *Botrytis*-Arten durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse deuten weiters darauf hin, dass nicht nur *Botrytis cinerea*, sondern vor allem auch *Botrytis aclada*, aber auch *Botrytis allii*, die Krankheit im praktischen Zwiebelbau hervorrufen. *Botrytis aclada* rief im Vergleich zu den anderen Pilzarten nicht nur eine signifikant höhere Befallsrate hervor, sondern war auch die einzige *Botrytis*-Art, welche an allen getesteten Zwiebelsorten Symptome verursacht hat. Wie auch aus den Vorversuchen hervorging, verursachte der Pilz *Botrytis cinerea*, welcher in der Literatur als Erreger der Krankheit beschrieben wird, auch in der endgültigen Versuchsreihe entweder gar keine Symptome oder nur geringe Befallsraten von maximal 30%. Wie bereits erwähnt, könnte dies mit dem verwendeten *Botrytis*-Isolat zusammenhängen. Um einen etwaigen Einfluss des Isolates auf die Befallsrate und die Entwicklung der Symptome berücksichtigen zu können, müssten weitere Versuche mit einem Isolat von *Botrytis cinerea*, welches von *Allium cepa* L. isoliert wurde, durchgeführt werden. Nach CLARK und LORBEER (1974) ist nicht auszuschließen, dass die Sensitivität hinsichtlich Brenzkatechin einen limitierenden Faktor für die Virulenz eines *Botrytis*-Isolates darstellt. Die Isolate der anderen drei *Botrytis*-Arten, welche Symptome der Kaffeefleckenkrankheit hervorriefen, wurden von *Allium cepa* L. isoliert.

Die durchgeführten Methoden im Rahmen der Erregerisolation aus natürlich infizierten Freilandproben lieferten kein zufriedenstellendes Ergebnis. Bei der morphologischen Analyse hat sich gezeigt, dass die Oberflächendesinfektion der Gewebeproben entweder zu stark oder zu schwach war. Für weitere Analysen müsste also die Oberflächendesinfektion präzisiert werden. Weiters könnte die Verwendung eines Selektivmediums für *Botrytis*-Arten beziehungsweise für eine bestimmte *Botrytis*-Art hilfreich sein. Die durchgeführten Analysen haben desweiteren gezeigt, dass die Auswahl der symptomatischen Schalen für die Isolation eine wichtige Rolle spielt. Bei der molekularbiologischen Analyse konnte nur bei jenen zwei Schalenproben ein verwertbares Ergebnis erhalten werden, welche charakteristische und unregelmäßig zerfließende Flecken aufwiesen. Die Verfärbungen der übrigen Schalenproben waren deutlich kleiner, rundlich und durchgehend gefärbt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass punktförmige dunkelbraune Verfärbungen auf den trockenen Zwiebelschalen durch anderen Pathogene oder abiotische Faktoren verursacht werden und daher keine *Botrytis*-Art isoliert werden konnte.

Für weiterführende Versuche ist es einerseits wichtig, eine zuverlässige Methode zur Isolation der Erreger aus Freilandproben zu erarbeiten. Andererseits müssten die gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Pathogenen und den Zwiebeln durch weitere Versuche ergänzt und abgesichert werden. Hierbei müssten von jeder Sorte Zwiebelproben mit unterschiedlicher Lagerdauer mit einbezogen werden, um einen möglichen Effekt der Lagerdauer und des Zwiebelalters auf den Infektionserfolg der Pathogene berücksichtigen zu können. Des Weiteren sollten *Botrytis*-Isolate, welche von *Allium cepa* L. isoliert wurden, für die Inokulation der Zwiebeln verwendet werden. Es wäre sinnvoll, eine längere Inkubationsdauer einzuplanen, da bei einigen Proben lediglich unspezifische Verfärbungen aufgetreten sind, aus welchen sich möglicherweise noch Kaffeeflecken entwickeln. Durch einen längeren Betrachtungszeitraum würde bei allen Zwiebeln vermutlich auch die Trocknung der äußersten Schale einsetzen, welche für die Entwicklung der Kaffeeflecken essentiell ist, aber innerhalb von sechs Wochen nicht bei allen Proben eingetreten ist.

6. Zusammenfassung

Die Kaffeefleckenkrankheit stellt einen Qualitätsmangel an Speisezwiebel dar und führt bei starkem Befall dazu, dass die Zwiebeln nicht mehr marktfähig sind. In der vorliegenden Arbeit wurden sieben *Botrytis*-Arten (*Botrytis aclada*, *Botrytis allii*, *Botrytis byssoidea*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis porri*, *Botrytis squamosa* und *Botrytis tulipae*), welche mit Krankheiten an Speisezwiebel assoziiert werden, hinsichtlich ihres Potenzials zur Verursachung der Kaffeefleckenkrankheit getestet und geprüft, ob diesbezüglich Unterschiede zwischen den Zwiebelsorten erkennbar sind. Hierfür wurden drei gelbschalige ('Mustang', 'Olympic' und 'Rawhide') und drei rotschalige ('Red Tide', 'Electric' und 'Wiro') Speisezwiebelsorten mit unterschiedlicher Lagerdauer analysiert. Zusätzlich wurde anhand von natürlich infizierten Freilandproben untersucht, welche *Botrytis*-Arten die Kaffeeflecken im Produktionsgebiet Marchfeld hervorrufen.

Die Auswertung hat ergeben, dass insgesamt vier der sieben *Botrytis*-Arten Symptome der Kaffeefleckenkrankheit verursachen: *Botrytis aclada*, *Botrytis squamosa*, *Botrytis cinerea* und *Botrytis allii*. Die Befallsrate gibt die Anzahl an symptomatischen Zwiebeln in Prozent an. Der Pilz *Botrytis aclada* wies im Vergleich zu den anderen Arten eine signifikant höhere Befallsrate (46,67%) auf und konnte als einzige Art an allen getesteten Sorten Symptome hervorrufen. *Botrytis squamosa* verursachte im Mittel die niedrigste Befallsrate (11,67%).

Hinsichtlich der gelbschaligen Zwiebelsorten zeigte die Sorte 'Mustang' die durchschnittlich höchste (52,50%) und die Sorte 'Rawhide' die durchschnittlich niedrigste (10,00%) Befallsrate. Bei den rotschaligen Sorten konnte die im Mittel höchste Befallsrate bei der Sorte 'Red Tide' (27,50%) und die durchschnittlich niedrigste Befallsrate bei der Sorte 'Wiro' (17,50%) ermittelt werden. Die beiden Sorten 'Mustang' und 'Red Tide', welche im Gegensatz zu den anderen vier Zwiebelsorten vor der Inokulation mehrere Wochen gelagert wurden, wiesen insgesamt die durchschnittlich höchsten Befallsraten auf und zeigten als einzige Sorten bei allen vier genannten *Botrytis*-Arten Symptome.

Die Kaffeeflecken entstanden durchschnittlich zwischen 19 und 25 Tagen, mit Ausnahme der Sorte 'Wiro', bei welcher sich die Verfärbungen bereits nach durchschnittlich 14 Tagen entwickelten. Im Mittel wurden 2 bis 4 Kaffeeflecken pro symptomatischer Bulbe gebildet. Die Symptome entstanden nur auf jenen Schalen, bei welchen die Trocknung und damit verbundene biochemische Veränderungen der Schale bereits eingesetzt haben, und beschränkten sich jeweils auf die äußerste Zwiebelschale. Des Weiteren konnte von allen Zwiebeln, welche

Symptome der Kaffeefleckenkrankheit zeigten, die jeweilige *Botrytis*-Art aus dem verfärbten Gewebe wieder reisoliert werden.

Im Zuge der morphologischen Analyse konnte aus den natürlich infizierten Freilandproben keine *Botrytis*-Art isoliert werden. Bei der molekularbiologischen Analyse konnte bei 2 von 15 Schalenproben eine verwertbare Sequenz erhalten werden. Mit einer Übereinstimmung von 99% handelt es sich bei beiden Proben um den Pilz *Botrytis cinerea*. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kaffeeflecken im praktischen Zwiebelbau nicht nur von *Botrytis cinerea*, sondern vor allem von *Botrytis aclada* und auch von *Botrytis allii* verursacht werden.

7. Abstract

Botrytis brown stain on onion normally appears as a superficial, dark-brown discoloration of the dry scales of onion bulbs, which cannot be marketed if they are strongly infested. Seven *Botrytis* species associated with diseases of onion (*B. aclada*, *B. allii*, *B. byssoidea*, *B. cinerea*, *B. porri*, *B. squamosa* and *B. tulipae*) were tested for producing the disorder and differences between six varieties ('Mustang', 'Red Tide', 'Olympic', 'Electric', 'Rawhide' and 'Wiro') were analyzed. *B. aclada*, *B. allii*, *B. cinerea* and *B. squamosa* were capable of causing brown stain. *B. aclada* caused a significantly higher number of symptomatic bulbs than the other pathogens. On average the variety 'Mustang' showed the highest number of symptomatic bulbs (52,50%) and the variety 'Rawhide' the lowest (10,00%). Drying and biochemical changes of the outer scales of the bulbs were essential for the development of brown stain. Furthermore the results indicate that duration of storage and age of bulbs influence the success of infection by the *Botrytis* species and development of symptoms. No *Botrytis* species could be isolated from naturally infected onion scales using traditional methods of isolating fungi followed by morphological and microscopic techniques. In addition two DNA samples of *Botrytis* spp. isolated from symptomatic onion scales were sequenced. Both resulted in *B. cinerea* (99% accordance). Nevertheless the results suggest that under field conditions not only *B. cinerea*, but especially *B. aclada* and also *B. allii* are natural pathogens.

8. Literaturverzeichnis

AGRIOS, G. N. (2005): Plant Pathology. 5. Auflage, Amsterdam: Elsevier.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. und LIPMAN, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215:403-410.

ANONYM (2015): Austrosaat Katalog Gemüse 2015.

BACKHAUS, G. F. (2005): Pflanzenschutz bei Zwiebeln. In: Fachverband Deutsche Speisewiebel e.V. (Hrsg.): Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft. Bergen: Agri-media: 135-182.

BEDLAN, G. (2012): Gemüsekrankheiten. Zentralverband der Kleingärtner und Siedler Österreichs, Wien, 370 S.

BEDLAN, G. (2014): Kaffeeblütenkrankheit: Grauschimmel an Lagerzwiebel. Der Pflanzenarzt 67: 7.

BEDLAN, G. (2016): Persönliche Mitteilung.

BEEVER, R. E. und WEEDS, P. L. (2004): Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. und Nafiz, D. (Hrsg.): *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 29-52.

BREWSTER, J. L. (2008): Onions and other vegetable Alliums. 2. Auflage, Cambridge: CAB International.

BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNGSSICHERHEIT (2016): Verzeichnis der in Österreich zugelassen/genehmigten Pflanzenschutzmittel. Online:

[http://pmg.ages.at/pls/psmlfrz/pmgweb2\\$.Startup](http://pmg.ages.at/pls/psmlfrz/pmgweb2$.Startup) (16.03.2016).

CHILVERS, M. I. und DU TOIT, L. J. (2006): Detection and Identification of *Botrytis* Species Associated with Neck Rot, Scape Blight, and Umbel Blight of Onion. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2006-1127-01-DG.

CLARK, C. A. und LORBEER, J. W. (1973 a): Symptomatology, Etiology, and Histopathology of *Botrytis* Brown Stain of Onion. *Phytopathology* 63: 1231–1235.

CLARK, C. A. und LORBEER, J. W. (1973 b): Reaction of onion cultivars to *Botrytis* brown stain. *Plant Disease Reporter* 57: 210-214.

CLARK, C. A. und LORBEER, J. W. (1975): The Role of Phenols in *Botrytis* Brown Stain of Onion. *Phytopathology* 65: 338-341.

DU TOIT, L. (2015): Persönliche Mitteilung.

DU TOIT, L. J.; DERIE, L. M. und PELTER, G. Q. (2002): *Botrytis porrii* in Onion Seed Crops and Onion Seed. *Plant Disease* 86: 1178.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P. und NAFIZ, D. (2004): *Botrytis spp.* and Diseases They Cause in Agricultural Systems - An Introduction. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P. und NAFIZ, D. (Hrsg.): *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 1-8.

ELLERBROCK, L. A. und LORBEER, J. W. (1976): Etiology and Control of Onion Flower Blight. *Phytopathology* 67: 155-159.

FISCHER, M. A.; OSWALD, K. und ADLER, W. (2008): *Exkursionsflora: Für Österreich, Liechtenstein, Südtirol*. 3., verbesserte Auflage, Linz: Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen.

FRIES, E. M. (1829-32): *Systema mycologicum* vol. III, 259 S., Greifswald

FRIESEN, M.; FRITSCH, R. M. und BLATTNER, F. R. (2005): Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso* 22: 372-395.

FRITSCH, R. (2005): Herkunft, Taxonomie und Geschichte von *Allium*. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): *Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft*. Bergen: Agrimedia: 15-38.

FRITSCH, R. und KRETSCHMER, M. (2005): Morphologie und Anatomie der Küchenzwiebel. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): *Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft*. Bergen: Agrimedia: 63-82.

GOTTSBERGER, R. (2016): Persönliche Mitteilung.

HANCOCK, J. H. und LORBEER, J. W. (1963): Pathogenesis of *Botrytis cinerea*, *B. squamosa* and *B. allii* on Onion Leaves. *Phytopathology* 53: 669-673.

HOLZ, G.; COERTZE, S. und WILLIAMSON, B. (2004): The Ecology of *Botrytis* on Plant Surfaces. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P. und NAFIZ, D. (Hrsg.): *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 9-28.

HONG, S. K.; KIM, W. G.; CHO, W. D. und HONG, G. K. (2002): Occurrence of Tulip Fire Caused by *Botrytis tulipae* in Korea. *Plant Pathology* 18: 106-108.

HUANG, X. und MADAN, A. (1999): CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.

KLEISINGER, S. (2005): Technik im Zwiebelanbau. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): *Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft*. Bergen: Agrimedia: 183-198.

KOHN, L. M. (1979): Delimitation of Economically Important Plant Pathogenic *Sclerotinia* Species. *The American Phytopathological Society* 69: 881-886.

KRETSCHMER, M. (2005 a): Physiologie von Wachstum und Entwicklung. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft. Bergen: Agrimedia: 83-98.

KRETSCHMER, M. (2005 b): Zwiebelanbau. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft. Bergen: Agrimedia: 111-124.

LIND, J. (1913): Danish Fungi as represented in the herbarium of E. Rostrup. Kopenhagen, 667 S.

LINK, K. P. (1933): The isolation of catechol from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. *Journal of Biological Chemistry* 100: 379-383.

LORBEER, J. W.; SEYB, A. M.; DE BOER, M. und VAN DEN ENDE, J. E. (2004): *Botrytis* Species on Bulb Crops. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P. und NAFIZ, D. (Hrsg.): *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 1-8.

MUNN, M. T. (1917): Neck-rot disease of onions. *New York Agricultural Experimental Station Bulletin* 437: 363-455.

MÜLLER, S. (2005): Boden und Düngungen. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft. Bergen: Agrimedia: 125-134

NIELSEN, K. und YOHALEM, D. S. (2001): Origin of polyploid *Botrytis* pathogen through interspecific hybridization between *Botrytis aclada* and *B. byssoidea*. *Mycologia* 93: 1064-1071.

NIELSEN, K.; JUSTESEN, A. F.; JENSEN, D. F. und YOHALEM, D. S. (2001): Universally Primed Polymerase Chain Reaction Alleles and Internal Transcribed Spacer Restriction Fragment Length Polymorphisms Distinguish Two Subgroups in *Botrytis aclada* Distinct from *B. byssoidea*. *Phytopathology* 91: 527-533.

NIELSEN, K.; YOHALEM, D. S. und JENSEN, D. F. (2002): PCR Detection and RFLP Differentiation of *Botrytis* Species Associated with Neck Rot of Onion. *Plant Disease* 86:682-686.

OWEN, J. H.; WALKER, J. C. und STAHMANN, M. A. (1950): Variability in onion neck-rot fungi. *Phytopathology* 40: 749-768.

PRAEGER, U. (2005 a): Physiologie der Dormanz. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): *Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft*. Bergen: Agrimedia: 99-110.

PRAEGER, U. (2005 b): Trocknung und Lagerung. In: Fachverband Deutsche Speisezwiebel e.V. (Hrsg.): *Zwiebelanbau: Handbuch für Praxis und Wissenschaft*. Bergen: Agrimedia: 199-214.

PRESLY, A. H. (1985): Studies on *Botrytis* spp. occurring on onions (*Allium cepa*) and leeks (*Allium porrum*). *Plant Pathology* 34: 422-427.

RAMSEY, G. R. und LORBEER, J. W. (1986): Flower Blight and Scape Girdling of Onion Grown for Seed Production in New York. *Phytopathology* 76: 599-603.

RIGOTTI, S.; VIRET, O. und GINDRO, K. (2006): Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: *Fr. Phytopathologia Mediterranea* 45: 253-260.

SHIRANE, N.; MASUKO, M. und HAYASHI, Y. (1989): Light Microscopic Observation of Nuclei and Mitotic Chromosomes of *Botrytis* Species. *Phytopathology* 79: 728-730.

STATISTIK AUSTRIA (2015): Gartenbau- und Feldgemüseanbauerhebung 2015. Online: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/wirtschaft/land_und_forstwirtschaft/agrarstruktur_fl_aechen_ertraege/gartenbau_feldgemueseanaebau/107930.html (01.06.2016).

STATISTIK AUSTRIA (2016): Versorgungsbilanz für Gemüse 2014/15. Online: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/wirtschaft/land_und_forstwirtschaft/preise_bilanzen/_versorgungsbilanzen/index.html (01.06.2016).

URBASCH, I. (1983): Über Entstehung und Keimung der Chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift* 108: 54-60.

WALKER, J. C. (1925): Two undescribed species of *Botrytis* associated with the neck rot diseases of onion bulbs. *Phytopathology* 15: 708-713.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P. und VAN KAN, J. A. (2007): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561-580.

YOHALEM, D. S.; NIELSEN, K. und NICOLAISEN, M. (2003): Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. *Mycotaxon* 80: 175-182.

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Konidienträger mit darauf sitzenden Konidien von dem Pilz <i>Botrytis cinerea</i> , angefärbt mittels Wittmann's Blau.	13
Abb. 2 Asexueller Entwicklungszyklus von <i>Botrytis</i> spp. (AGRIOS, 2005).	14
Abb. 3: Morphologie der Pilzkulturen von <i>Botrytis aclada</i> , <i>Botrytis allii</i> , <i>Botrytis byssoidea</i> und <i>Botrytis cinerea</i> auf PDA nach 7 (links) und 14 Tagen (rechts) Wachstum bei 20 °C und Schwarzlicht ausgehend von einem mit dem Pilz bewachsenen Agarstück (5 mm im Durchmesser).	17
Abb. 4 Morphologie der Pilzkulturen von <i>Botrytis porri</i> , <i>Botrytis squamosa</i> und <i>Botrytis</i> <i>tulipae</i> auf PDA nach 7 (links) und 14 Tagen (rechts) Wachstum bei 20 °C und Schwarzlicht ausgehend von einem mit dem Pilz bewachsenen Agarstück (5 mm im Durchmesser).	18
Abb. 5: Konidien von <i>Botrytis cinerea</i> (links) und <i>Botrytis allii</i> (rechts), angefärbt mittels Wittmann's Blau.	20
Abb. 6: Konidien von <i>Botrytis aclada</i> , angefärbt mittels Wittmann's Blau.	20
Abb. 7: <i>Botrytis</i> -Blattfleckenkrankheit an Zwiebel, Quelle: J. Kreiselmaier, DLR-Rheinpfalz.	21
Abb. 8: Halsfäule an Speisezwiebel, Quelle: Gerhard Bedlan.	21
Abb. 9: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit an natürlich infizierten Zwiebelschalen.	23
Abb. 10: Zerfließende Flecken auf der äußersten, trockenen Zwiebelschale, Quelle: Gerhard Bedlan.	23
Abb. 11: Vorbereitung der Proben für die Inokulation: Vergleich einer geschälten (links) sowie einer ungeschälten (rechts) Zwiebel.	29
Abb. 12: Inkubation im Labor.	33
Abb. 13: Zwiebelbulbe, welche mit 100 µl Konidien suspension inokuliert wurde.	35

Abb. 14: Leichte Verfärbungen eine Woche nach der Inokulation (links) sowie charakteristische Symptome eine Woche (mittig) und zwei Wochen (rechts) nach der Inokulation mittels Sporensuspension (Variante 3a).	40
Abb. 15: Verfärbungen zwei Wochen nach der Inokulation mittels infizierter Zwiebelblattstücke (Variante 4, links), eine Woche nach der Inokulation mit Myzel bewachsener Agarstücke (mittig) und vier Wochen nach der Inokulation mittels Einwegspritze und Sporensuspension (Variante 5, rechts).	41
Abb. 16: Ausbreitung der Verfärbung über die gesamte äußere Zwiebelschale.	42
Abb. 17: Entstehung von dunklen Verfärbungen sowohl bei der Kontrolle (links) als auch bei den inokulierten Bulben.	42
Abb. 18: Vergleich der Symptome einer geschälten (links) und einer ungeschälten (rechts) Bulbe. Beide Zwiebeln wurden zuvor in gleicher Weise inokuliert und drei Wochen inkubiert.	42
Abb. 19: Kaffeeflecken nach drei- (links) beziehungsweise vierwöchiger (rechts) Inkubation.	43
Abb. 20: Entwicklung der Kaffeeflecken innerhalb von drei Wochen (links oben und unten: drei Wochen nach Inokulation; rechts oben und unten: sechs Wochen nach Inokulation).	44
Abb. 21: Kaffeeflecken nach drei- (links), vier- (mittig) und sechswöchiger (rechts) Inkubation.	44
Abb. 22: Anfängliche Verfärbungen nach dreiwöchiger Inkubation (links oben) sowie Symptome nach vierwöchiger (links unten; mittig oben und unten) und sechswöchiger (rechts oben und unten) Inkubation.	45
Abb. 23: Kaffeeflecken mit oberflächlicher Sporulation nach vier (links) und sechs (rechts) Wochen Inkubation.	46
Abb. 24: Kaffeeflecken (links) sowie starke oberflächliche Sporulation (rechts) nach vier Wochen Inkubation.	46
Abb. 25: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit mit oberflächlicher Myzel- und Konidienbildung nach drei- (links) und sechswöchiger (rechts) Inkubation.	47
Abb. 26: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit nach dreiwöchiger Inkubation.	47

Abb. 27: Ringförmige Verfärbungen nach dreiwöchiger Inkubation.....	48
Abb. 28: Kaffeeflecken (links) und braune Verfärbungen (rechts) nach sechswöchiger Inkubation.....	49
Abb. 29: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit nach drei- (links) und sechswöchiger (rechts) Inkubation.....	49
Abb. 30: Symptome der Kaffeefleckenkrankheit nach dreiwöchiger Inkubation (links) sowie bräunliche Verfärbungen nach sechswöchiger Inkubation (rechts).....	50
Abb. 31: Entwicklung von Kaffeeflecken nach dreiwöchiger Inkubation.....	50
Abb. 32: Kaffeeflecken nach dreiwöchiger (links, mittig) und vierwöchiger (rechts) Inkubation.....	51
Abb. 33: Anfängliche unspezifische Verfärbungen nach dreiwöchiger Inkubation (links) sowie Entwicklung von Kaffeeflecken nach sechswöchiger (mittig, rechts) Inkubation.....	51
Abb. 34: Ringförmig ausgedehnte Kaffeeflecken nach sechs Wochen Inkubation.....	52
Abb. 35: Kaffeeflecken und oberflächliche Myzelbildung nach vierwöchiger Inkubation.....	53
Abb. 36: Verfärbungen der Schale mit mittiger Myzel- und Konidienbildung nach dreiwöchiger Inkubation.....	53
Abb. 37: Reisolation von <i>Botrytis aclada</i> aus symptomatischem Zwiebelgewebe: Konidien (links) und aus dem Zwiebelgewebe auswachsende Konidienträger (rechts).....	54
Abb. 38: Befallsrate der getesteten Zwiebelsorten nach der dritten und sechsten Inkubationswoche.....	57
Abb. 39: Boxplot-Diagramm für die Befallsrate bei den unterschiedlichen <i>Botrytis</i> -Arten (1= <i>Botrytis aclada</i> , 2= <i>Botrytis allii</i> , 3= <i>Botrytis cinerea</i> und 4= <i>Botrytis squamosa</i>).....	59
Abb. 40: Boxplot-Diagramm für die Befallsrate bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).....	61
Abb. 41: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Tage bis zur Entwicklung von Kaffeeflecken bei den unterschiedlichen <i>Botrytis</i> -Arten (1= <i>Botrytis aclada</i> , 2= <i>Botrytis allii</i> , 3= <i>Botrytis cinerea</i> und 4= <i>Botrytis squamosa</i>).....	63

Abb. 42: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Tage bis zur Entwicklung von Kaffeeflecken bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).	65
Abb. 43: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Kaffeeflecken pro symptomatischer Bulbe bei den unterschiedlichen <i>Botrytis</i> -Arten (1= <i>Botrytis aclada</i> , 2= <i>Botrytis allii</i> , 3= <i>Botrytis cinerea</i> und 4= <i>Botrytis squamosa</i>).	68
Abb. 44: Boxplot-Diagramm für die Anzahl der Kaffeeflecken pro symptomatischer Bulbe bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).	69
Abb. 45: Boxplot-Diagramm für die Kaffeefleckengröße bei den unterschiedlichen <i>Botrytis</i> -Arten (1= <i>Botrytis aclada</i> , 2= <i>Botrytis allii</i> , 3= <i>Botrytis cinerea</i> und 4= <i>Botrytis squamosa</i>).	71
Abb. 46: Boxplot-Diagramm für die Kaffeefleckengröße bei den unterschiedlichen Sorten (1=Mustang, 2=Red Tide, 3=Olympic, 4=Electric, 5=Rawhide und 6=Wiro).	73
Abb. 47: Gewebedeformationen nach Inokulation mit <i>Botrytis aclada</i> (links) beziehungsweise <i>Botrytis cinerea</i> (mittig) sowie intensiv ausgefärbte Zwiebelschale der Sorte Rawhide (rechts).	73
Abb. 48: Konidienträger von <i>Aspergillus niger</i> (links) sowie einer <i>Penicillium</i> -Art (rechts) unter dem Mikroskop, angefärbt mittels Wittmann's Blau.	74
Abb. 49 Fremdbefall mit <i>Aspergillus niger</i> (links) und Bakterien (rechts).	74
Abb. 50: Fusarium-Fremdbefall: Verfärbungen mit leichter oberflächlicher Myzelentwicklung nach drei Wochen Inkubation (links) sowie nach vier Wochen Inkubation (mittig, links).	75
Abb. 51: Freilandproben mit zerfließenden Flecken, aus welchen unter anderem Gewebeproben für die molekularbiologische Analyse entnommen wurden.	76

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Gattung <i>Botrytis</i> (WILLIAMSON et al., 2007).	9
Tabelle 2: <i>Botrytis</i> -Arten an Speisezwiebel.	10
Tabelle 3: Morphologische Charakteristika der <i>Botrytis</i> -Arten.	16
Tabelle 4: Konidienlänge und -breite [μm] sowie Chromosomenzahl pro Konidie für die ausgewählten <i>Botrytis</i> -Arten.	19
Tabelle 5: Eigenschaften der getesteten Winterzwiebelsorten, Quelle: Austroaat Katalog Gemüse 2015.	26
Tabelle 6: Eigenschaften der getesteten Sommerzwiebelsorten, Quelle: Austroaat Katalog Gemüse 2015.	26
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien für die Anzucht der Pilzkulturen	27
Tabelle 8: Befallsrate der einzelnen Sorten nach Inokulation mit den unterschiedlichen Pathogenen nach drei- und sechswöchiger Inkubation.	56
Tabelle 9: Zweifaktorielle Varianzanalyse der Befallsrate für die beiden Faktoren Sorte und <i>Botrytis</i> -Art ($\alpha = 0,05$).	58
Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung der Befallsrate für die einzelnen Pathogene.	59
Tabelle 11: Mittelwert und Standardabweichung der Befallsrate nach sechswöchiger Inkubation von den Sorten.	60
Tabelle 12: Zweifaktorielle Varianzanalyse für die Anzahl der Tage bis zum Entstehen der ersten Kaffeeflecken ($\alpha=0,05$).	61
Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung für die Anzahl der Tage bis zum Entstehen der ersten Kaffeeflecken für die einzelnen <i>Botrytis</i> -Arten und Sorten.	62
Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung der Tageszahl bis zur Kaffeefleckenentwicklung.	63

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl an Tagen bis zur Kaffeeffleckenentwicklung für die getesteten Sorten.....	64
Tabelle 16: Zweifaktorielle Varianzanalyse für die Anzahl der Kaffeefflecken pro symptomatischer Zwiebelbulbe ($\alpha=0,05$).....	65
Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeeffleckenanzahl pro symptomatischer Bulbe für die einzelnen <i>Botrytis</i> -Arten und Sorten.....	66
Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichung der Kaffeeffleckenanzahl pro symptomatischer Bulbe für die <i>Botrytis</i> -Arten.....	67
Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeeffleckenanzahl pro symptomatischer Bulbe für die einzelnen Sorten.....	68
Tabelle 20: Zweifaktorielle Varianzanalyse für die Größe der Kaffeefflecken ($\alpha=0,05$).....	69
Tabelle 21: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeeffleckengröße für die einzelnen <i>Botrytis</i> -Arten und Sorten.....	70
Tabelle 22: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeeffleckengröße für die einzelnen <i>Botrytis</i> -Arten.....	71
Tabelle 23: Mittelwert und Standardabweichung der Kaffeeffleckengröße für die einzelnen Sorten.....	72

11. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
g	Gramm
ha	Hektar
l	Liter
L.	Carl von Linné, Autorenkürzel
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
m/s	Meter pro Sekunde
NWREC	Northwestern Washington Research and Extension Center
OLEA	Onion-Leaf-Extract-Agar
O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Potato-Dextrose-Agar
spp.	species pluralis
V	Volt
ZA	Zwiebel-Agar
µl	Mikroliter

12. Autoren der Pilznamen

Berkeley, Miles Joseph (Berk.)

Beyma, J.F.H. van (J. F. H. Beyma)

Buchwald, Niels Fabritius (N. F. Buchwald)

Caspary, Johann Xaver Robert (Casp.)

Cavara, Fridiano (Cavara)

de Bary, Heinrich Anton (de Bary)

Fresenius, Johann Baptist Georg Wolfgang (Fresen.)

Fries, Elias Magnus (Fr.)

Hopkins, Edwin Fraser (E. F. Hopkins)

Kohn, Linda M. (Kohn)

Li, Guo Qing (G. Q. Li)

Libert, Marie-Anne (Lib.)

Lind, Jens Wilhelm August (Lind)

Munn, Mancel Thornton (Munn)

Persoon, Christiaan Hendrik (Pers.)

Sawada, Kaneyoshi (Sawada)

Schleiden, Matthias Jacob (Schleid.)

Unger, Franz (Unger)

Viennot-Bourgin, Georges (Vienn.-Bourg)

Walker, John Charles (J.C. Walker)

Whetzel, Herbert Hice (Whetzel)

Yamamoto, Wataro (W. Yamam.)

Zhang, Jing (J. Zhang)

Zhuang, Wen Ying (Zhuang, W.Y.)