

Biotrophe Oomyceten, eine sehr spezielle Gruppe von Pflanzenpathogenen

OTMAR SPRING

Kurzfassung

Oomyceten – zu denen die überwiegend saprobiontischen Wasserschimmel ebenso zählen wie die meist bodenbürtigen Pathogene der Gattungen *Pythium* und *Phytophthora*, die Weißrost- und die Falschen Mehltau- und Eipilze – stellen eine eigenständige Lebensform mit einer außergewöhnlichen phylogenetischen Entwicklung dar. Unter ihnen gibt es zahlreiche Vertreter, die sich auf parasitische Lebensweise an Samenpflanzen spezialisiert haben und damit weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten Schaderregern in der Landwirtschaft zählen. Ihre Biologie ist komplex und weist zahlreiche Anpassungen auf, die bei pathogenen Arten in Koevolution mit ihren Wirten besondere Spezialisierungen erfahren haben. Die biotrophe Lebensweise erschwert die Untersuchung vieler Taxa und stellt eine besondere Herausforderung für die Klärung taxonomischer, physiologischer und ökologischer Fragen dar. Das Fachgebiet *Biodiversität und pflanzliche Interaktion* am Institut für Botanik der Universität Hohenheim beschäftigt sich seit langem mit Erregern des Falschen Mehltaus an wichtigen Kulturpflanzen wie Sonnenblume, Wein oder Tabak. Dabei wurden insbesondere Kultivierungsverfahren entwickelt, die eine detaillierte Untersuchung biologischer Fragestellungen mit Hilfe mikroskopischer, physiologischer und molekular-genetischer Verfahren erst ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden zahlreiche neue Arten identifiziert, unterschiedliche Formen der sexuellen und asexuellen Vermehrung aufgeklärt und Infektions- sowie Resistenzmechanismen analysiert. Die Erkenntnisse dieser Forschungsarbeiten sind die Grundlage für die Klärung evolutiver Zusammenhänge und dienen der Entwicklung von effektiven Maßnahmen im Pflanzenschutz.

Abstract

Biotrophic oomycetes, a very unusual group of plant pathogens

Oomycetes – comprising the mostly saprobic water moulds as well as the parasitic, often soilborne necrotrophic species of *Pythium* and *Phytophthora*, and the biotrophic white rusts and downy mildews – are an independent fungal lineage with an exceptional phylogeny. Numerous taxa of this group are specialized pathogens of higher plants and some of them have become a major threat to important crop plants. The biology of oomycetes is complex and shows many adaptations which had been acquired in co-evolution with specific hosts. The obligate biotrophy (permanently depending on living host cells) of many parasitic spe-

cies hampers their scientific investigation considerably and provides a major challenge for the clarification of seemingly trivial questions in terms of their taxonomy, physiological requirements or ecological relevance. For a long time, research in the section *Biodiversity and Plant Interaction* of the Institute of Botany at the University of Hohenheim is focused on downy mildews of crops such as sunflower, grape vine and tobacco. In the course of these studies we have developed techniques for the cultivation of biotrophic oomycetes which enabled us to tackle scientifically relevant questions by means of microscopy, physiological and molecular genetic approaches. This has led to the identification of several new taxa, unravelled different modes of sexual and asexual reproduction and provided insight in infection and resistance mechanisms. Conclusions from this work are the basis for our understanding of evolutionary relationships in this group and serve for the development of effective measures in plant protection.

Autor

Prof. Dr. OTMAR SPRING, Fachgebiet Biodiversität und pflanzliche Interaktion, Institut für Botanik, Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, 70599 Stuttgart, E-Mail: O.Spring@uni-hohenheim.de

1 Einleitung

Molekulare Arbeitstechniken haben in den letzten Jahrzehnten eine Fülle von neuen Erkenntnissen aus allen Bereichen der Biologie zu Tage gefördert und damit auch unsere Vorstellungen über die Evolution der Organismenwelt grundlegend verändert. Oomycota (Algenpilze, Eipilze), von denen man schon früh wusste, dass sie sich in vielen Eigenschaften von den Chitinpilzen oder Echten Pilzen (Eumycota oder Fungi) unterscheiden, sind heute unzweifelhafter Bestandteil einer ganz eigenständigen Entwicklungslinie, deren vereinendes Merkmal in der einzigartigen heterokonten Begeißelung liegt und damit zum namengebenden Element dieser Gruppe wurde, den Heterokontobionta. Während die autotrophen Vertreter dieser Gruppe mit den Braunalgen eine den Landpflanzen in ihrer Größe und Gestalt kaum nachstehende, konvergente Entwicklung eingeschlagen haben, gab es in mehreren Ab-

stammungslinien den unabhängigen Verlust von Plastiden und damit die Rückkehr zur heterotrophen Lebensweise (Tafel 1, Abb.1). Die Peronosporomycetes (früher Oomycetes) stellen auf diesem Weg die sowohl zahlenmäßig als auch hinsichtlich der Differenzierung erfolgreichste Lebensform dar. Aus den überwiegend saprobiontischen Wasserschimmelpilzen (Saprolegniomycetidae) entstanden mit den Albuginomycetidae und den Peronosporomycetidae hoch spezialisierte Pflanzenpathogene, die durch ihre biotrophe Lebensweise im Wirtsgewebe den Sprung ans Land geschafft haben. Zu den bekanntesten Vertretern zählen *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel, *Plasmopara viticola*, der Falsche Mehltau am Wein, oder *Albugo candida*, der Weißrosterreger an Brassicaceen.

Die Besonderheit vieler pflanzenpathogener Oomyceten besteht in ihrer biotrophen Lebensweise, bei der die lebende Wirtspflanze als dauerhafte Nahrungsquelle dient, in den der Erreger zwar eindringt, sich dann aber vorwiegend in den Zellzwischenräumen des Gewebes ausbreitet. Zellwände werden nur punktuell penetriert, um sich über spezielle „Saugorgane“ (Haustorien) Zugang zu den benötigten Pflanzenstoffen zu verschaffen. Äußerlich ist befallenen Pflanzen zunächst wenig anzumerken. Deutlich sichtbar wird die Infektion erst, wenn das Pathogen genügend Kraft gesammelt hat, um sich massenhaft durch mitotisch erzeugte Sporangien zu vermehren. Die Bildung von Sporangien erfolgt bei Falschen Mehltaupilzen an Trägern, die aus den Spaltöffnungen heraus an die Oberfläche gelangen, bei Weißrosten in Lagern unter der Epidermis. Sporangien werden durch den Wind verbreitet, bei den Weißrosten erst nach Aufreißen der Epidermis (Tafel 1, Abb. 2).

Diese Lebensweise – quasi im Verborgenen – gepaart mit dem Bedarf an spezifischen Pflanzenstoffen (vermutlich Sterole), die eine Kultur vieler dieser Organismen auf künstlichen Medien bisher unmöglich gemacht hat, erschwert die wissenschaftliche Bearbeitung dieser Organismen ungemein. So sind in vielen Fällen bis heute grundlegende Aspekte aus dem Lebenszyklus biotropher Oomyceten noch nicht geklärt. Das schließt Fragen nach dem Modus der sexuellen Reproduktion, der Überdauerung ungünstiger Lebensphasen außerhalb des Wirtes oder der molekularen Mechanismen bei der Infektion ein, die nicht nur von zentraler Bedeutung für die Biologie, sondern ebenso essentiell für die an-

gewandte Forschung sind, um Strategien für die erfolgreiche Kontrolle dieser Organismen in der Landwirtschaft zu entwickeln.

2 Etablierung von Kultursystemen

Ausgehend von *Plasmopara halstedii*, dem Erreger des Falschen Mehltaus an Sonnenblumen, wurden am Institut für Botanik der Universität Hohenheim in den vergangenen Jahren eine ganze Reihe von hauptsächlich an Nutzpflanzen parasitierenden Oomyceten erfolgreich in Kultur genommen. Dabei zeigte sich, dass die artspezifischen Ansprüche eine individuelle Anpassung der Kultursysteme notwendig macht. Arten der Gattung *Peronospora* keimen beispielsweise aus Sporangien mit einem Keimschlauch aus, während *Pseudoperonospora*, *Plasmopara* oder *Pustula* zunächst Zoosporen aus den Sporangien freisetzen, die sich nach einer Phase des Umherschwimmens auf der Wirtsoberfläche niederlassen, encystieren und erst dann eine Keimhyphne ausbilden, die sich mit einem Primärhaustorium in der Wirtszelle verankert. *Bremia lactucae*, der Falsche Mehltau an Salat und anderen Korbblütlern, verfügt gar über beide Keimungsmöglichkeiten, je nach Temperaturbedingungen. Ähnlich unterschiedlich sind die Orte der Infektion und dies selbst innerhalb von Arten derselben Gattung. So bildet *Plasmopara halstedii* nach der Encystierung Keimhyphen aus, die über Appressorien aktiv die Epidermis der jungen Sonnenblume durchdringen und so von der Wurzel bis zum Blatt überall infizieren können. Bei *P. viticola* und bei *Pustula helianthicola* erfolgt die Infektion dagegen über die Stomata, zu denen die Zoosporen vermutlich durch Alkylaldehyde („Nonanale“) geleitet werden, ehe sie in der substomatären Höhle encystieren und dann auskeimen. Die Infektion erfolgt hier also nur an Wirtsorganen mit Spaltöffnungen, was z.B. erklärt, warum junge Fruchtstände am Wein nur solange befallen werden, bis die Wachsschicht der heranwachsenden Beeren die Stomata verschließt. Zugleich stellt sich die Frage, wie bei *Pustula helianthicola* unter natürlichen Bedingungen die Primärinfektion abläuft. Werden die dafür notwendigen Oosporen, die üblicherweise im Boden überwintern, durch Spritzwasser auf die Blätter verfrachtet oder erfolgt der Befall bereits an bodennahen Stomata des Hypokotyls und bleibt asymptomatisch, bis sich erst viel später am Blatt die typischen Pusteln mit Sporangien zeigen? Die Etablierung

spezifischer Infektionstechniken ist also nicht nur Selbstzweck zur Erhaltung der Kultur, sondern gibt Einblicke in die Infektionsbiologie der Pathogene, die sich im Pflanzenschutz als nützlich erweisen können.

3 Pathogenmonitoring

Dies gilt auch für die Erarbeitung vereinfachter Infektionstechniken, mit deren Hilfe zuverlässige und schnelle Aussagen über die Pathogenität und Aggressivität von selektionierten Pathogenstämmen gemacht werden können. Da vielfach noch keine funktionsfähigen molekulargenetischen Typisierungssysteme für Pathogenrassen bei Oomyceten existieren, sind Biotest-abhängige Differenzierungen sogenannter Pathotypen die einzige Möglichkeit, die Verbreitung von resistenzbrechenden Genotypen zu erfassen. Über solche Infektionsstudien an Sonnenblumenlinien mit definierter Resistenz wurde in Hohenheim die Populationszusammensetzung von *Plasmodium halstedii* in Deutschland erfasst.

Einfache Infektionsverfahren waren auch Ausgangspunkt für Studien zur Fungizidresistenz bei biotrophen Oomyceten. So wurde mit Blattscheibentests ein seit 2003 erstmals in Deutschland auftretender Genotyp des Tabakblauschimmels *Peronospora tabacina* identifiziert, der sich mit Metalaxyl, dem bisher einzigen vollsystemischen Fungizid für Oomyceten, nicht mehr kontrollieren ließ. Molekulargenetische Untersuchungen zeigten, dass in Europa bislang wohl nur zwei deutlich unterscheidbare Populationen dieses Erregers existieren und auf Grund fehlender sexueller Fortpflanzung wohl auch genetisch isoliert bleiben, obwohl sie gleichzeitig an derselben Wirtspflanze auftreten können.

4 Genotypisierung für diagnostische und taxonomische Zwecke

Die vorgestellten Beispiele zeigen, wie eng verzahnt die grundlagen- und die anwendungsorientierte Forschung auf dem Gebiet der biotrophen Oomyceten sind. Erst die scheinbar banale Etablierung von geeigneten Kultivierungstechniken erlaubte die Infektion mit Einzelsporangien und Einzelzoosporen, über die aus gemischten Feldisolaten erstmals genotypisch homogene Stammkulturen der Pathogene selektioniert werden konnten. Dies war die Grundlage für gene-

tische Vergleiche, die eine Differenzierung auf der Basis von PCR-Nachweisen erlaubte. Dies ermöglichte nicht nur das schon erwähnte Monitoring von Populationen im Feld, sondern auch den Nachweis überdauernder Pathogenstrukturen in Saatgut oder Böden und lieferte damit wichtige Erkenntnisse zur Ausbreitungsbiologie der Erreger.

Die genetischen Vergleiche dienen darüber hinaus natürlich auch der taxonomischen Differenzierung biotropher Oomyceten, die von Hause aus eher arm an verlässlichen phänotypischen Artmerkmalen sind. Zahlreiche Neubeschreibungen von Arten und systematische Umgruppierungen im Sinne monophyletischer Einheiten wurden auf Grund der Forschungsergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe vorgenommen.

5 Physiologische Aspekte der Wirt-Pathogen-Interaktion

Die zunehmende Erfassung genetischer Sequenzen aus Oomyceten bis hin zur vollständigen Genomsequenzierung wie im Falle von *Phytophthora infestans* oder *Hyaloperonospora arabidopsidis* eröffnet inzwischen ein riesiges Potential zur Klärung bisher kaum zugänglicher biologischer Fragestellungen im Hinblick auf die physiologischen Grundlagen der Infektion durch biotrophe Oomyceten und der Reaktion ihrer Wirte. Hier beschäftigt sich die Arbeitsgruppe *Biodiversität und pflanzliche Interaktion* in Hohenheim besonders mit Fragen der Induktion pflanzlicher Abwehr durch Elicitoren und Effektoren. Aber auch die Signale, die zur Induktion des Infektionsvorganges beitragen, sind Ziel unserer Untersuchungen. Dabei stehen die Oosporen als Überdauerungsform der biotrophen Oomyceten besonders im Mittelpunkt. Ihre Entstehung, Freisetzung und Keimung ist bei den meisten Arten aus dieser Gruppe bisher unerforscht, obwohl die Kenntnis darüber die Grundlage für das Verständnis des gesamten Lebenszyklus dieser Organismen darstellt. Hier zeigt sich erneut, dass vor dem Einsatz hoch technisierter Analyseverfahren zunächst ganz einfache Grundlagen erarbeitet werden müssen. Scheinbar triviale Fragen sind bei vielen Pathogenen offen. So etwa der Ort und Zeitpunkt der Oogamie im Wirtsgewebe. Sind Paarungspartner für die sexuelle Fortpflanzung erforderlich oder erfolgt sie homothallich? Unter welchen Bedingungen keimen die Oosporen und wie lässt sich dieser Vorgang so be-

obachten, dass potentielle Signale mit einem gut handhabbaren Biotest geprüft und identifiziert werden können?

6 Fazit und Schlussfolgerungen

Die vorgestellten Beispiele aus der aktuellen Forschung an biotrophen Oomyceten am Institut für Botanik der Universität Hohenheim sollten einen Einblick in die Besonderheiten dieser phylogenetisch eigenständigen und agronomisch so wichtigen Organismengruppe mit pilzlicher Lebensweise geben. Die Existenz (mit Ausnahme der Verbreitungseinheiten) ausschließlich eingebettet und untrennbar verbunden mit inneren Geweben der Wirtspflanze ermöglichte einen Einblick in die Biologie dieser Organismen oft erst Jahrzehnte später als bei vielen anderen Pilzgruppen. Es ist daher kaum verwunderlich, dass z.B. Umbrüche in der taxonomischen Einteilung, die in anderen Gruppen längst schon „verdaut“ sind und in den festen Bestand der Lehrbücher Einzug gehalten haben, momentan für Verwirrung sorgen oder ignoriert werden (im Weinbau spricht man auch heute noch von der „Reben-Peronospora“, obwohl das Pathogen schon vor 120 Jahren in die Gattung *Plasmopara* aufgenommen wurde). Die Vielfalt in den Lebenszyklen biotropher Oomyceten wird man erst erfassen können, wenn man über die Modellarten hinausschaut und weitere Arten gründlich studiert. Dabei stehen naturgemäß Nutzpflanzenschädlinge im Fokus. Es gibt aber noch viel mehr Vertreter, die auf Wildpflanzen parasitieren und bisher nur von we-

nigen Spezialisten wahrgenommen werden. Sie stellen das genetische Reservoir dar, aus dem sich neue Genotypen entwickeln, auch solche, die den Sprung auf Nutzpflanzen schaffen. Diese Prozesse der Anpassung und der daraus resultierenden Artbildung beginnen wir gerade erst zu untersuchen.

Ausgewählte Publikationen

- SPRING, O. (2004): Potential and limits for the use of new characters in the systematics of biotrophic oomycetes. – In: SPENCER-PHILLIPS, P. & JEGGER, M. (eds.): *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 2.: 211-231; The Netherlands (Kluwer).
- SPRING, O. (2012): Oomycota ARX. – In: FREY, W. (ed.): *Syllabus of Plant Families*, 13th Edition, Part 1/1; 98-105; Stuttgart (Gebr. Bornträger).
- SPRING, O. & THINES, M. (2010): Molecular techniques for classification and diagnosis of plant pathogenic Oomycota. – In: GHERBAWY, Y. & VOIGT, K. (eds.): *Molecular Identification of Fungi*: 35-50; Berlin, Heidelberg (Springer).
- SPRING, O., THINES, M., WOLF, S. & ZIPPER, R. (2011): PCR-based detection of sunflower white blister rust (*Pustula helianthicola* C. ROST & THINES) in soil samples and asymptomatic host tissue. – *European J. Plant Pathology*, **131**: 519-527.
- THINES, M. & SPRING, O. (2005): A revision of *Albugo* (Chromista, Peronosporomycetes). – *Mycotaxon*, **92**: 443-48.
- ZIPPER, R., HAMMER, T. R. & SPRING, O. (2009): PCR-based monitoring of recent isolates of tobacco blue mold from Europe reveals the presence of two genetically distinct phenotypes differing in fungicide sensitivity. – *European J. Plant Pathology*, **123**: 367-375.

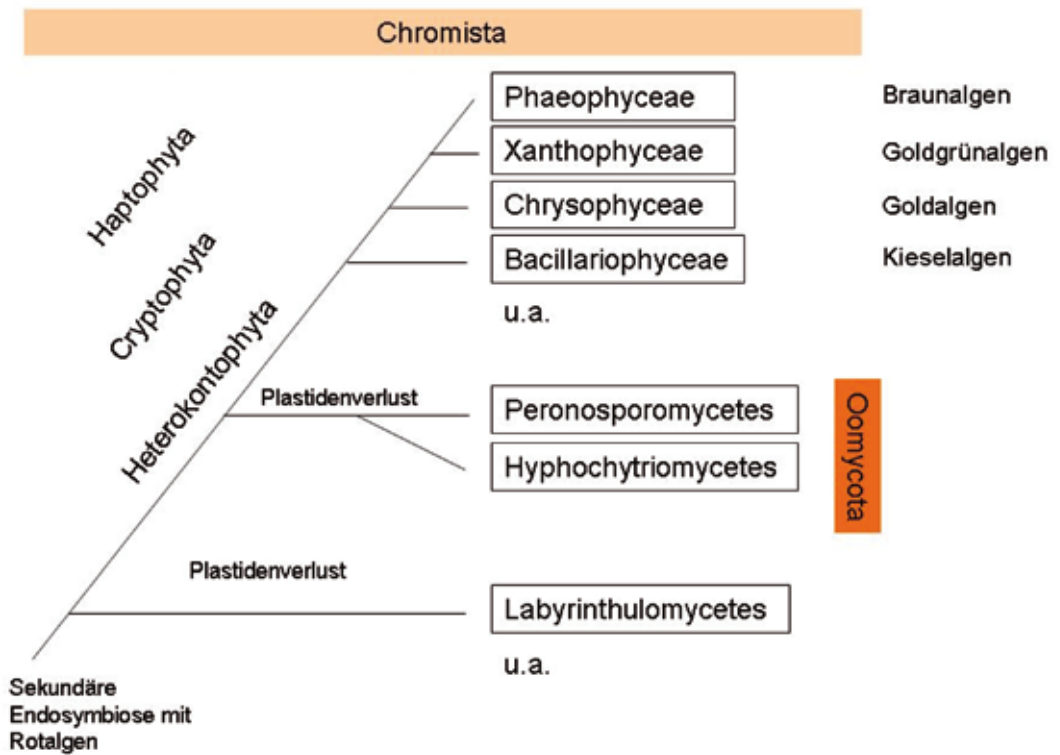


Abbildung 1. Phylogenetische Übersicht über die Heterokontobionta. Manche Autoren trennen zwischen den algenartigen autotrophen Linien (Suffix „-phyta“) und den pilzartigen (Suffix „-mycetes“); zusammen mit Haptophyten und Cryptophyten bilden die Heterokontophyten die Gruppe der Chromista, die ihrerseits mit den Alveolata zu den Chromalveolata vereint werden.



Abbildung 2. Sporulation von Falschen Mehltauipilzen (Beispiel *Plasmopara halstedii*; links) und Weißrosten (Beispiel *Pustula helianthicola*; rechts) an Keimblättern der Sonnenblume. – Fotos: O. SPRING.

