

Diss. Nr. 4626

Variabilität und Kernverhältnisse bei  
*Botrytis cinerea*

Abhandlung  
zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der technischen Wissenschaften  
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von

HANS PETER LAUBER

dipl. Ing.-Agr. ETH  
geboren am 17. November 1938  
von Menznau LU und Luzern

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. R. Hütter, Referent  
Prof. Dr. H. Kern, Korreferent

1971 • Benteli Verlag • 3018 Bern

Zur Differenzierung werden folgende Eigenschaften untersucht: Wachstumsgeschwindigkeit auf Agar, in Erde und in Nährlösungen, Keimung der Konidien auf Agarscheibchen über verschiedenen Erden und auf Agar mit verschiedenen pH-Werten, Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen fungitoxischen Substanzen, Bildung von Glycerin und Zitronensäure und Änderung des pH-Wertes, Konidiengrösse, Anzahl Kerne pro Konidie, serologische Eigenschaften, schwarze Verfärbung von Malzagar sowie makroskopisches Aussehen. Dadurch gelingt es, jeden Stamm einwandfrei zu typisieren und mehrere von ein und demselben Stamm hergeleitete Linien auseinanderzuhalten.

Der Vergleich der Resultate der Messungen des Myzelwachstums auf Agar und in Erde zeigt, dass die Reihenfolge der verschiedenen Stämme nicht gleich ist. Der auf Agar am besten wachsende Stamm zum Beispiel liegt in Erde an zweitletzter Stelle. Auch in Nährlösungen ist die Reihenfolge je nach Zusammensetzung des Mediums verschieden.

Die Resultate der Keimung auf Agar über verschiedenen Erden stimmen im wesentlichen mit denjenigen auf Agar mit verschiedenen pH-Werten überein. Die Unterschiede zwischen den Stämmen sind zum Teil sehr gross. So keimt in einem Versuch über einer Erde mit pH 7,8 Stamm 69 zu 97%, Stamm 10 zu 7%.

Auch in bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber fungitoxischen Substanzen können teilweise grosse Unterschiede festgestellt werden. Besonders die Versuche mit Cycloheximid (Actidion) sind für die Differenzierung wertvoll. Die  $LD_{50}$ -Werte, ausgedrückt in ppm Actidion in Wasseragar, erstrecken sich je nach Stamm über einen Bereich von 3,6 bis 18,5.

Sehr deutlich sind die Unterschiede auch in der Bildung von Zitronensäure. Während bei Stamm 10 nach einem Monat nur um die 40 beziehungsweise 120 mg/l festgestellt werden können, produziert Stamm 69 bis zu 2700 beziehungsweise 3300 mg/l. Auch in bezug auf Glycerinbildung und Änderung des pH-Wertes bestehen Unterschiede zwischen den Stämmen.

Zur Messung der Konidiengrösse wird ein elektronischer Zählapparat (Coulter Counter) verwendet, welcher die Bestimmung der Anzahl und Grösse von in einem Elektrolyten suspendierten Teilchen ermöglicht. Während zwischen verschiedenen Stämmen grosse Unterschiede festgestellt werden, weicht keine der geprüften Linien deutlich von den übrigen des gleichen Stammes ab. Die Extremwerte der mittleren Konidiendurchmesser bezogen auf Kugelformen betragen bei den verschiedenen Stämmen zwischen  $6,2 \mu$  und  $9,1 \mu$ .

Auch der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Konidiengrösse wird gemessen. Als von Bedeutung erweist sich der pH-Wert des Nährbodens, die Kohlenstoff:Stickstoff-Verhältnisse und -Mengen sowie die Feuchtigkeit. Die durchschnittliche Konidiengrösse ist ferner vom Alter der Kulturen abhängig.

Zwischen der Konidiengrösse und der Anzahl Kerne pro Konidie besteht eine enge Korrelation ( $r = 0,95$ ). Bei einheitlichen Wachstumsbedingungen ist das pro Kern beanspruchte Konidienvolumen bei allen Herkünften gleich; unterschiedliche Konidiengrössen der Stämme stehen daher in enger Beziehung zu unterschiedlichen mittleren Kernzahlen pro Konidie.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Wildstämme genetisch heterogen waren. Statistisch gesicherte Unterschiede zwischen verschiedenen Linien des gleichen Stammes können ausser in bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit auf Agar, Zitronensäureproduktion, Konidiengrösse und durchschnittliche Anzahl Kerne pro Konidie bei allen andern bestimmten Eigenschaften festgestellt werden. Auch verschiedene Einsporkulturen über sechs Generationen der gleichen Linie unterscheiden sich bezüglich Empfindlichkeit gegenüber Actidion und Glycerinbildung. Die Aufspaltung mehrerer Stämme weist auf das Vorkommen von Heterokaryose bei *B. cinerea* hin.

## SUMMARY

*Variability and Nuclear Situation in Botrytis cinerea*

With five isolates of *Botrytis cinerea* the extent of variation is determined as to morphological, physiological and cytological qualities.

By continued selection of single spores over six generations the possibly heterokaryotic wild strains are separated into different distinguishable lines.

The following characteristics are examined for differentiation: rate of growth on agar, in soil and in nutrient solutions, germination on agar discs over different soils and on agar with different pH-values, tolerances against various fungitoxic substances, production of citric acid and glycerin and change of pH-value, size of conidia, number of nuclei per conidium, serological characteristics, blackening of malt-agar, and cultural type. This leads to an accurate identification of all strains. Some lines derived from the same strain can also be clearly differentiated from one another.

The various strains are inconsistent in their rate of growth on agar and in soil. The fastest growing strain on agar, for example, grows relatively slowly in soil. In nutrient solutions too the various strains are inconsistent in their rate of growth depending on the composition of the medium.

The results of the germination tests on agar over different soils are in accordance with those on agar with different pH-values. Pronounced differences can be found. Strain 69, for example, germinates on agar over a soil of pH 7,8 to a rate of 97%, whereas strain 10 germinates only to a rate of 7%.

Significant differences in tolerance towards several fungitoxic substances can be confirmed. Tests with Cycloheximide (Actidione) are especially useful for identification. The average LD<sub>50</sub>-values, expressed as ppm Actidione in agar, extend over the range 3,6 to 18,5.

Differences in the production of citric acid exist among all the examined strains. No. 10, for example, after one month produced only about 40 resp. 120 mg/l nutrient solution, whereas No. 69 produced up to 2700 resp. 3300 mg/l. Production of glycerin and change in the pH-value is also dependent upon the strain.

For measuring the size of conidia an electronic counting apparatus is used (Coulter Counter), which enables the counting and sizing of particles suspended in an electrically conductive liquid. While the strains differ considerably from each other in size of conidia, none of the tested lines is found to be distinctly different from the other lines of the same strain. Values for the average conidia diameters in the tested strains, expressed as the diameters of a sphere of the same volume, range from 6.2  $\mu$  to 9.1  $\mu$ .

The influence of several environmental factors on the size of the conidia is measured. pH-value of the substrate, carbon:nitrogen ratios and amounts, as well as humidity are found to be of importance. The conidial size depends also on the age of the cultures.

It exists a direct correlation between conidial size and number of nuclei per conidium ( $r = 0.95$ ). Under equal environmental conditions the average conidial volume per nucleus is shown to be the same with all the strains; in consequence size of conidia is directly correlated with the number of nuclei per conidium.

The examinations show that the wild type strains are genetically heterogeneous. Statistically significant differences among various lines of the same strain can be noted in all the examined characteristics, with the exception of speed of growth on agar, production of citric acid, size of conidia and number of nuclei per conidium. Even some monosporic cultures over six generations of the same line show varying tolerances towards Actidione and are producing different amounts of glycerin. The segregation of various strains indicates the existence of heterokaryosis in *B. cinerea*.

## RÉSUMÉ

*Variabilité et situation nucléaire chez Botrytis cinerea*

Le degré de variabilité de 5 isolats de *Botrytis cinerea* est établi en fonction de leurs propriétés morphologiques, physiologiques et cytologiques.

Par multiplication monospore durant 6 générations, on parvient à séparer les souches sauvages, probablement hétérocaryotiques, en différentes lignées distinctes.

Pour différencier les souches et les lignées, on se base sur les propriétés suivantes: Vitesse de croissance sur agar, dans le sol et en milieux liquides; germination des spores sur des disques d'agar déposées sur divers sols ainsi que sur des géloses à l'agar de pH variables; sensibilité à certaines substances fongitoxiques; production de glycérine et d'acide citrique; modification de la valeur du pH; grosseur des conidies, nombre des noyaux par conidies; propriétés sérologiques; noircissement de la gélose maltée et aspect macroscopique des cultures. Cela permet d'identifier chaque souche et de séparer différentes lignées dérivant d'une même souche.

En comparant les résultats des mesures de la croissance mycélienne sur un milieu à l'agar ou dans le sol, on constate que les différentes souches se comportent de manière irrégulière. La souche qui occupe la première place sur le plan de la croissance en milieu gélosé, n'obtient que l'avant-dernière place pour ce qui est de sa croissance dans le sol.

Les résultats de la germination des conidies sur des disques d'agar déposés sur des sols de pH variables correspondent en général à ceux enregistrés sur de l'agar de pH de valeurs diverses. Les différences entre les souches sont en partie très grandes. Dans un essai sur un sol de pH 7,8 par exemple, le taux de germination de la souche 69 est de 97% alors que celui de la souche 10 n'est que de 7%.

En ce qui concerne la sensibilité envers différentes substances fongitoxiques, on constate, partiellement aussi, de très grandes différences. En particulier, les essais effectués avec la Cycloheximide (actidione) se sont révélés utiles pour la différenciation. Les valeurs  $DL_{50}$  exprimées en ppm d'actidione dans de l'agar à l'eau, se situent, selon les souches, entre 3,6 et 18,5.

On remarque aussi de notables différences dans la production d'acide citrique. La souche 10 en produit mensuellement entre 40 et 120 mg/l, tandis que la souche 69 en synthétise entre 2700 et 3300 mg/l. Les diverses souches se différencient aussi dans la formation de glycérine et dans les changements de la valeur du pH.

En utilisant un appareil électronique (Coulter Counter) on peut déterminer le nombre et le volume des conidies en suspension dans un électrolyte. On note de grandes différences entre les souches. Par contre, il n'y a pas de différences notables entre les lignées dérivées d'une même souche. Les valeurs extrêmes du diamètre moyen des conidies, rapporté à une sphère de même volume, se situent, selon les diverses souches, entre 6,2 et 9,1  $\mu$ .

On étudie aussi l'influence de différents facteurs de l'environnement sur le volume des conidies. Les facteurs suivants se révèlent importants: pH du milieu nutritif, nature et qualité des sources de carbone et d'azote, degré d'humidité. En outre, le volume moyen des conidies dépend de l'âge des cultures.

Entre le volume des conidies et le nombre de leurs noyaux, il y a une étroite corrélation ( $r = 0,95$ ). Le volume conidien moyen propre à chaque noyau est fonction des conditions de l'environnement et constant chez toutes les souches. Par conséquent, les différences de volume des conidies constatées entre les souches sont étroitement dépendantes des variations du nombre moyen des noyaux par conidie.

Les isolats originaux étaient génétiquement hétérogènes. On constate entre les différentes lignées appartenant à la même souche, des différences, statistiquement assurées, pour tous les

caractères examinés, à l'exception de la vitesse de croissance sur agar, de la production d'acide citrique, du volume des conidies et du nombre moyen des noyaux par conidie. Entre différentes générations de certaines lignées, il y a aussi des différences en ce qui concerne leur sensibilité à l'actidione et leur production de glycérine. La ségrégation de plusieurs souches indique l'existence d'hétérocaryose chez *Botrytis cinerea*.

Die Untersuchungen wurden an der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil durchgeführt. Für das Verständnis möchte ich Herrn Direktor Dr. R. Fritzsche bestens danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Schüepp für die vielfältigen Anregungen, die tatkräftige Unterstützung der Arbeit und die Durchsicht des Manuskripts. Ich danke auch den Herren Professoren R. Hütter und H. Kern für die Übernahme des Referates, die wertvollen Ratschläge und die Korrekturen. Ferner möchte ich Fräulein M. Flury für die Reinschrift danken.

#### VI. LITERATURVERZEICHNIS

- AMICI, A.M., SCOTTI, T., SPALLA, C., TOGNOLI, L. (1967): Heterokaryosis and alkaloid production in *Claviceps purpurea*. Appl. Microbiol. 15, 611–615.
- ARX, J.A. von (1967): Pilzkunde. Verlag von J. Cramer, Lehre. 356 S.
- BARASH, I., KLSIEWICZ, J.M., KOSUGE, T. (1964): Biochemical factors affecting pathogenicity of *Botrytis cinerea* on Safflower. Phytopathology 54, 923–927.
- BARNES, B. (1930): Variations in *Botrytis cinerea*, induced by the action of high temperatures. Ann. Bot. 44, 825–858.
- BARNES, M., PARKER, M.S. (1966): The increase in size of mould spores during germination. Trans. Br. mycol. Soc. 49, 487–494.
- BARNES, M., PARKER, M.S. (1968): Automatic sizing of mould spores. Trans. Br. mycol. Soc. 51, 33–39.
- BARRON, G.L. (1963): Distribution of nuclei in a heterocaryon of *Penicillium expansum*. Nature 200, 282–283.
- BATEMAN, D.F., MILLAR, R.L. (1966): Pectic enzymes in tissue degradation. A.Rev.Phytopath. 4, 119–146.
- BEAUVÉRIE, M.J. (1901): Essais d'immunisation des végétaux contre les maladies cryptogamiques. C.r.Acad.sci. Paris 133, 107–110.
- BEHR, L. (1966): Über *Botrytis cinerea* am Lein und sein Verhalten gegenüber Antagonisten im Boden. NachrBl.dt.PflSchutzdienst 2, 41–43.
- BLUMER, S. (1952): Über zwei Schimmelpilze auf den Blütenständen von *Poinsettia pulcherrima*. Phytopath.Z. 19, 417–422.
- BLUMER, S., KUNDERT, J. (1950): Methoden der biologischen Laborprüfung von Kupferpräparaten. Phytopath.Z. 17, 161–199.
- BLUMER, S., KUNDERT, J. (1960): Über den Einfluss der Temperatur auf die Wirkung von Fungiziden. Landw.Jb. Schweiz 9, 465–496.
- BORTELS, H., MASSFELLER, D., WEDLER, E. (1964): Schwankungen der Befallsstärke von *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen im Vergleich mit Änderungen des Luftdrucks. Phytopath.Z. 50, 69–79.