

Christian Neubauer, Benedikt Heitmann

Quantitativer Nachweis von *Verticillium dahliae* im Boden als Grundlage der Flächenauswahl im Gartenbau

Quantitative detection of *Verticillium dahliae* in soil as a basis for selection of planting sites in horticulture

1

Zusammenfassung

Verticillium dahliae verursacht im Gartenbau, insbesondere bei Erdbeeren und Alleebäumen, große wirtschaftliche Schäden, die vielfach auf verseuchte Standorte zurückzuführen sind. Es wird ein Nachweisverfahren beschrieben, mit dem die Mikrosklerotien des Erregers im Boden quantitativ geschätzt werden können. Auf diese Weise kann der Verseuchungsgrad einer Fläche ermittelt und daraus das Befallsrisiko für eine anfällige Kultur abgeleitet werden. Die Genauigkeit der Nachweismethode und die Grenzen ihrer Anwendung werden anhand ausgewählter Versuchsergebnisse dargestellt. Sie zeigen, dass schon geringfügige methodische Abweichungen einen signifikanten Einfluss auf die Nachweisrate ausüben können. Darüber hinaus hat die ungleichmäßige Verteilung der Mikrosklerotien im Boden einen unvermeidbaren Untersuchungsfehler zur Folge, der mit abnehmender Verseuchung größer wird. Schließlich lassen sich mit der Methode die beiden unterschiedlich virulenten Genotypen *V. dahliae* und *V. longisporum* nicht differenzieren. Aufgrund der Ungenauigkeit des Verfahrens und des Einflusses zahlreicher, noch unbekannter standortspezifischer Bodenfaktoren auf das Infektionsgeschehen, ist eine exakte Befallsprognose kaum möglich. Vor diesem Hintergrund wird die Ermittlung und Anwendung von Schadschwellen in der Praxis kritisch beurteilt. Dennoch bieten die Bodenuntersuchungen den Anbauern die Möglichkeit, eine gezielte Flächenauswahl vornehmen und Schäden vorbeugend verhindern zu können.

Stichwörter: *Verticillium dahliae*, *Verticillium longisporum*, Bodenuntersuchungen, Erdbeeren, Acer

Abstract

Verticillium dahliae causes in horticultural production, especially in strawberries and in tree nurseries, high economic damages, which arise from infested planting sites. A detection method is described, which allows the quantification of microsclerotia of the fungus in soil. So it is possible to determine the verticillium infestation level of a planting site and to estimate the disease risk for susceptible crops. Some original results are presented to illustrate the quality of performance of the method. They give evidence that small variations of the quantification procedure have an influence on the detection percentage. In addition the nonrandomly distribution of microsclerotia in soil causes a sample and analysis error, which increases with declining infestation levels. Moreover it is not possible to distinguish the two genotypes *V. dahliae* and *V. longisporum*, which show differences in their pathogenicity. Therefore an exact pre-planting disease prediction is difficult, because of the inaccuracy of the detection method and the influence of many unknown soil factors on the infection process. This is the reason why the determination and use of thresholds in practice is critical judged. Nevertheless the quantification of the soil infestation provides growers an opportunity to select verticillium-free sites and to avoid damages.

Institut

Hochschule Osnabrück, Fakultät für Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur, Fachgebiet Phytomedizin

Kontaktanschrift

Prof. Dr. Christian Neubauer, Hochschule Osnabrück, Fakultät für Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur, Fachgebiet Phytomedizin, Oldenburger Landstraße 24, 49090 Osnabrück, Germany, E-Mail: c.neubauer@fh-osnabrueck.de

Zur Veröffentlichung angenommen

Juli 2010

Key words: *Verticillium dahliae*, *Verticillium longisporum*, soil test, strawberry, *Acer*

Einleitung

Verticillium dahliae ist ein weltweit verbreiteter Schad-erreger mit einem großen Wirtspflanzenkreis, welchem sowohl landwirtschaftliche (z.B. Kartoffel) als auch zahlreiche gartenbauliche Kulturen angehören. In Deutschland und den Nachbarländern nehmen die durch *Verticillium* verursachten Schäden insbesondere im Erdbeeranbau und den Baumschulen (z.B. *Acer*) seit Mitte der 90er Jahre kontinuierlich zu (HARRIS und YANG, 1996; GOUD, 2003; NEUBAUER, 2000; NEUBAUER et al., 2007). Vielfach wird der Erreger durch latent befallenes Anbaumaterial zwischen den Betrieben verschleppt. Bei Ziergehölzen machen sich die Probleme in der Produktion häufig auch am Endstandort bemerkbar, wenn dort ein latenter *Verticillium*-Befall schließlich zum Ausbruch kommt. Nicht zuletzt werden Schäden bei Alleebaumpflanzungen häufig auf diesen Erreger zurückgeführt (SCHNEIDEWIND, 2005).

Der bodenbürtige Pilz dringt über das Wurzelsystem in die Wirtspflanze ein und breitet sich anschließend im Gefäßsystem aus. In der Folge treten irreversible Welkesymptome auf, die zum Absterben einzelner Pflanzenteile und nicht selten zum Tod der Pflanze führen. *Verticillium* bildet im abgestorbenen Gewebe befallener Pflanzen Mikrosklerotien aus, die nach Abbau der Pflanzenreste im Boden freigesetzt werden und viele Jahre überdauern können. Über Wurzelauausscheidungen wird die Keimung der Mikrosklerotien induziert, was Neuinfektionen zur Folge hat. *V. dahliae* vermag sich in anfälligen Wirtspflanzen sehr intensiv zu vermehren. Verbleiben gleichzeitig große Mengen an Ernteresten auf der Fläche führt dies zu einer massiven Anreicherung von Mikrosklerotien im Boden. Als problematisch in dieser Hinsicht gilt u.a. die Kartoffel, deren Anbau nicht nur zu einer Verschleppung des Erregers, sondern auch zu einer zunehmenden Verseuchung der Flächen führt. So sind die zunehmenden *Verticillium*-Schäden im Erdbeeranbau und in der Baumschulproduktion einiger Regionen letztendlich darauf zurückzuführen, dass in jüngster Vergangenheit die Produktionsflächen auf Standorte ausgeweitet wurden, die durch landwirtschaftliche Fruchtfolgen, u.a. Kartoffelanbau, geprägt sind (HARRIS und YANG, 1996; HIEMSTRA und RATAJ-GURANOWSKA, 2003).

Mit dem Verbot der Anwendung chemischer Bodenentseuchungsmittel hat sich die *Verticillium*-Problematik in den letzten Jahren nochmals verschärft. Da der Praxis keine direkten Gegenmaßnahmen zur Verfügung stehen, kommt der Reduzierung des Inokulums im Boden durch ein gezieltes Fruchtfolgemanagement sowie der Auswahl befallsfreier Anbauflächen auf der Grundlage von Bodenuntersuchungen im Rahmen einer vorbeugenden Bekämpfungsstrategie eine zentrale Bedeutung zu (HARRIS und YANG, 1996; GOUD, 2003; NEUBAUER, 2000; NEUBAUER et al., 2007).

In den letzten Jahrzehnten wurden weltweit verschiedene Verfahren des quantitativen Nachweises von *Verticillium* im Boden entwickelt, mit dem Ziel den Verseuchungsgrad eines Standortes zu schätzen (GOUD und TEMORSHUIZEN, 2003). Die Methoden basieren weitgehend auf der Ausbringung von Bodenproben auf Selektivnährmedien, um die Inokulumdichte in 'colony forming units'/g Boden zu bestimmen. Mit dem Andersen Air Sampler können bestimmte Bodenmengen trocken auf einer Nährbodenfläche ausgebracht werden ('dry plating'). Häufiger werden Bodensuspensionen hergestellt und ausgeplattet ('wet plating'), wobei meistens eine Nasssiebung vorgeschaltet wird. Hierbei werden Bodenaggregate zerkleinert und die ca. 10-125 µm großen Mikrosklerotien von größeren und kleineren Bodenteilchen und -organismen abgetrennt ('wet sieving technique'). Versuche, die Mikrosklerotien durch Sedimentation oder Zentrifugation vom Boden abzutrennen, brachten keine Vorteile und wurden nicht weiter verfolgt. Verschiedene Autoren haben die einzelnen methodischen Vorgehensweisen hinsichtlich ihrer Nachweisgenauigkeit vergleichend untersucht (BUTTERFIELD und DEVAY, 1977; NICOT und ROUSE, 1987; HARRIS et al., 1993; TEMORSHUIZEN et al., 1998). Hierbei erwies sich ein Ausplattieren von Bodensuspensionen in Kombination mit einer Nasssiebung den anderen Verfahren überlegen. Schließlich konnte in weiterführenden Studien für verschiedene Kulturen eine signifikante Korrelation zwischen der auf diese Weise ermittelten Inokulumdichte im Boden und dem tatsächlichen Befallsauftreten nachgewiesen werden (NICOT und ROUSE, 1987; HARRIS und YANG, 1996; NEUBAUER, 2000; GOUD, 2003).

In Deutschland wurde vor 10 Jahren ein *Verticillium*-Nachweisverfahren in die Praxis eingeführt, welches auf der 'wet sieving technique' basiert, d.h. eine Nasssiebung der Bodenprobe mit anschließender Ausbringung auf einem Nährboden beinhaltet. Vorher waren bereits über Infektionsversuche und Praxiserhebungen Verseuchungs-Verlust-Relationen ermittelt worden. Auf deren Grundlage sowie in Anlehnung an HARRIS und YANG (1996) wurde eine Befallsklasseneinteilung eingeführt (Tab. 1), um die Ergebnisse von Bodenuntersuchungen bewerten zu können (NEUBAUER, 2000). Hierbei werden die Proben bzw. Flächen je nach ermitteltem Verseuchungsgrad 1-5 Klassen zugeordnet und das jeweilige Befallsrisiko für eine anfällige Kultur geschätzt. Seitdem ist zunächst im Erdbeeranbau die Nachfrage nach entspre-

Tab. 1. Einteilung von Befallsklassen auf Grundlage des ermittelten Verseuchungsgrades mit *Verticillium*

Befalls- klasse	cfu/g Boden	Verseuchungsgrad	Befallsrisiko
1	< 0,4	nicht nachweisbar	gering
2	0,4 – 2,0	gering	gering
3	> 2,0 – 5,0	mäßig-mittel	mittel
4	> 5,0 – 15,0	stark	groß
5	> 15,0	sehr stark	sehr groß

chenden Untersuchungen bei Laboren stetig gewachsen. Im Rahmen eines Forschungsprojektes zum Auftreten von *Verticillium* bei Ziergehölzen konnte eine sinnvolle Anwendung des Nachweisverfahrens auch in der Baumschulproduktion aufgezeigt werden (NEUBAUER et al., 2007, 2009). In Zusammenhang mit aktuellen Diskussionen hinsichtlich der Klärung von Haftungsfragen zwischen Auftraggeber, GalaBau und Baumschulen bei *Verticillium*-Schäden an Alleebäumen ist zukünftig eine noch stärkere Nutzung des Nachweisverfahrens in diesem Bereich zu erwarten. Vor diesem Hintergrund verfolgt dieser Beitrag zunächst das Ziel, die derzeit in den Laboren angewandte Nachweismethode vorzustellen. Darüber hinaus sollen die Anwendungsmöglichkeiten sowie Grenzen des Verfahrens in der Praxis auf der Grundlage von ausgewählten Versuchsergebnissen dargestellt und bewertet werden.

Methode und Ergebnisse

Das Nachweisverfahren

Der quantitative Nachweis von *Verticillium* im Boden erfolgt nach HARRIS et al. (1993) mittels eines Plattengussverfahrens mit vorgeschalteter Nasssiebung der Bodenprobe unter Nutzung eines speziellen Selektivnährmediums. Hierbei hat sich in vergleichenden Untersuchungen ein Pektat-Medium nach HUISMAN (1988) als am geeignetsten herausgestellt, da es bei der Auswertung der Platten eine sichere Unterscheidung der *Verticillium*-Kolonien von den Kolonien anderer Pilze möglich macht (HEPPNER, 1995). Das streng standardisierte Nachweisverfahren wurde zwischen 1999 und 2004 in verschiedenen Laboren etabliert und setzt sich aus den folgenden Arbeitsschritten zusammen:

1 Probenvorbereitung. Zur Vorbereitung der Analyse wird die zu untersuchende Bodenprobe (ca. 500 cm³) bei ca. 20°C in einer Plastikschaale luftgetrocknet. Anschließend ist die getrocknete Bodenprobe durch ein 2 mm Sieb zu sieben und somit von größeren Bestandteilen (Steine, Pflanzenreste) zu befreien. Erdklumpen werden auf der Sieboberfläche zerkleinert, so dass die Probe homogenisiert (< 2 mm) wird. Die gesiebte Probe wird anschließend bis zur weiteren Verarbeitung in einen verschließbaren Probenbecher abgefüllt. Vor der Siebung der Bodenprobe ist das Sieb mit Druckluft von eventuell anhaftenden Bodenteilchen zu reinigen, um eine Verschleppung von Mikrosklerotien zwischen einzelnen Proben zu vermeiden. Bei stärkeren Verschmutzungen wird das 2 mm Sieb mit Wasser oder gegebenenfalls im Ultraschallbad gereinigt.

2 Herstellung des Selektivnährbodens. Als Selektivnährmedium wird ein Pektat-Medium (PEM) verwendet. Es setzt sich wie folgt zusammen: 0,5 ml 2 Mol MgSO₄, 5,0 ml 2 Mol KNO₃, 10,0 ml 1 Mol KH₂PO₄, 1,0 ml Tergitol Type NP-10 (Fa. Sigma), 250,0 mg Chloramphenicol (Fa. Fluka), 200,0 mg Streptomycinsulfat, 1,0 mg Biotin,

5,0 g Polygalacturonic Acid (Fa. MP-Biomedicals), 15,0 g Agar-Agar (Fa. Merck). Der pH-Wert ist vor dem Autoklavieren mit 1 Mol NaOH auf einen Wert von 6,85 einzustellen. Streptomycin, gelöst in 15 ml sterilem Aqua dest., sowie Biotin, gelöst in 10 ml steriler 0,1 Mol NaOH, werden nach dem Autoklavieren in das auf ca. 50°C abgekühlte Medium gegeben. Anschließend erfolgt das Abfüllen des Nährmediums von jeweils 20 ml in Petrischalen (Ø 9 cm).

3 Nasssieveverfahren. 50,0 g der zu untersuchenden luftgetrockneten Bodenprobe werden in einem Erlenmeyerkolben mit Aqua dest. auf eine Bodensuspension von 100 ml aufgefüllt, die anschließend für 30 Minuten bei 200 U/min auf einem Horizontalschüttler bewegt wird, um ein Zerfallen kleinerer Bodenklumpen zu erreichen. Die Nasssiebung der Bodensuspension erfolgt mit der Vibrationssiebmaschine Analysette 3 (Fa. Fritsch) unter Verwendung dreier Siebgrößen (1 mm, 125 µm, 20 µm). Hierzu wird die Bodensuspension mittels einer Spritzflasche vollständig auf das oberste Sieb (1 mm) des Siebturmes gespült. Die Dauer des Siebvorganges unter kontinuierlicher Wasserzufuhr beträgt 2 Minuten mit einem Siebintervall von 10 Sekunden und einer Schwingungsamplitude von 3 mm. Zur Abtrennung der Bodenfraktion '20-125 µm' wird nach Beendigung des Siebvorganges das auf dem 20 µm-Sieb liegende Siebgut mit Hilfe einer Spritzflasche und Aqua dest. über einen Glastrichter in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die gesiebte Bodensuspension wird anschließend mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Die Siebe sind nach jedem Siebvorgang unter fließendem Leitungswasser zu spülen und für 3 Minuten im Ultraschallbad mit einer 3%-igen Reinigungslösung (Tickopur[®]R33) zu reinigen, um eine Verschleppung von Mikrosklerotien auszuschließen. Anschließend ist die Reinigungslösung mit Leitungswasser von den Sieben abzuspülen.

4 Ausbringung der gesiebten Bodensuspension. Beim Ausplattieren ist die Bodensuspension auf einem Magnetrührer kontinuierlich in Bewegung zu halten, um ein Absinken der Mikrosklerotien zu verhindern. Mittels einer Pipette erfolgt aus der Mitte des halben Radius des Erlenmeyerkolbens die Entnahme von 500 µl-Aliquoten, die jeweils auf einem Selektivnährboden ausgebracht und anschließend mit kreisenden Bewegungen der Petrischale auf der gesamten Agar-Oberfläche gleichmäßig verteilt werden. Nach dem Antrocknen der Bodensuspension unter einer sterilen Werkbank werden die Platten ohne Parafilm verschlossen und bei Dunkelheit und 20°C für 14 Tage im Klimaschrank inkubiert. Für jede zu untersuchende Bodenprobe werden 10 Platten angelegt.

5 Auswertung. Vor der Auswertung der Platten werden Bodenpartikel und Luftmyzel auf der Nährbodenoberfläche unter einem langsam fließenden Wasserstrahl mit Hilfe eines weichen Pinsels entfernt. Anschließend werden unter einer Stereolupe die typischen *Verticillium dahliae*

liae-Kolonien gezählt. Sie sind erkennbar anhand ihres sternenförmigen Aussehens und der im Nährboden gebildeten, meist perlenschnurartig aufgereihten Mikrosklerotien (Abb. 1). Das verwendete Selektivnährmedium erlaubt eine relativ sichere Unterscheidung zu den Kolonien des überwiegend apathogenen Pilzes *Verticillium tricorpus*, dessen Kolonien größere und unregelmäßig verteilte Mikrosklerotien sowie bisweilen eine gelbe Pigmentfarbe aufweisen (Abb. 2). Auf der Basis der durchschnittlichen Kolonienanzahl pro Platte wird die Anzahl colony forming units (cfu)/g trockener Boden ermittelt. Dieser Wert wird mit Anzahl Mikrosklerotien/g trockener Boden gleichgesetzt und spiegelt den Verseuchungsgrad einer Bodenprobe wieder.

Proben und Laborfehler

In verschiedenen Versuchen wurde die Genauigkeit der Nachweismethode bzw. die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht. Hierbei ist davon auszugehen, dass eine ungleichmäßige Verteilung der Mikrosklerotien im Boden das Verfahren in hohem Maße beeinflusst und sowohl bei der Beprobung als auch bei der Analyse einen Fehler verursacht (Proben- und Laborfehler).

Abb. 3 zeigt die Ergebnisse der Beprobung einer verseuchten Fläche von 2500 m², die mit 50, in einem versetzten Raster angeordneten, Einstichen beprobt worden ist. Die Bodenmenge eines jeden Einstichs wurde nach dem beschriebenen Verfahren auf ihren Verseuchungsgrad hin untersucht. Die zwischen 0,4 und 33,5 cfu/g Boden schwankenden Werte machen deutlich, dass die Mikrosklerotien nicht gleichmäßig im Boden verteilt sind.

Nach FOWLER (1988) kann der Dispersionsindex (DI) als Kennzahl für die Verteilung mit $DI = s^2/x$ ermittelt werden, wobei s^2 die Varianz und x den Mittelwert darstellt. Dabei gilt: $DI < 1$ = regelmäßige Verteilung, $DI = 1$ = zufällige und $DI > 1$ clusterförmige Verteilung. Der auf der Basis der Einzelwerte errechnete DI von 7,5 zeigt an, dass *V. dahliae* auf der beprobten Fläche clusterförmig, d.h. geklumpt verteilt vorlag. Mit den ermittelten Werten wurde nach SOUTHWOOD (1978) mit verschiedenen Einstichanzahlen der sich ergebende Standardfehler errechnet und in Prozent des Mittelwertes als sog. Probenfehler angegeben (Abb. 3). In diesem Fallbeispiel wird deutlich, dass sich mit abnehmender Anzahl von Einstichen der Probenfehler erwartungsgemäß vergrößert.

Zur Überprüfung der Genauigkeit der Labormethode wurden 15 unterschiedlich verseuchte Bodenproben jeweils vierfach wiederholt in voneinander getrennt durchgeführten Einwaagen untersucht und die Variationskoeffizienten als Streuungsmaß errechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass mit abnehmender Verseuchung der Bodenproben die Streuung der Ergebnisse bzw. der Laborfehler größer wird (Tab. 2).

Einfluss methodischer Parameter

Die dargestellte Nachweismethode wird in den Laboren bisweilen in leicht veränderter Form angewendet. Gleichzeitig haben Ringversuche gezeigt, dass sich die in verschiedenen Laboren ermittelten Ergebnisse zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Vor diesem Hintergrund wurde in Versuchsreihen der Einfluss verschiedener Veränderungen im methodischen Ablauf auf den

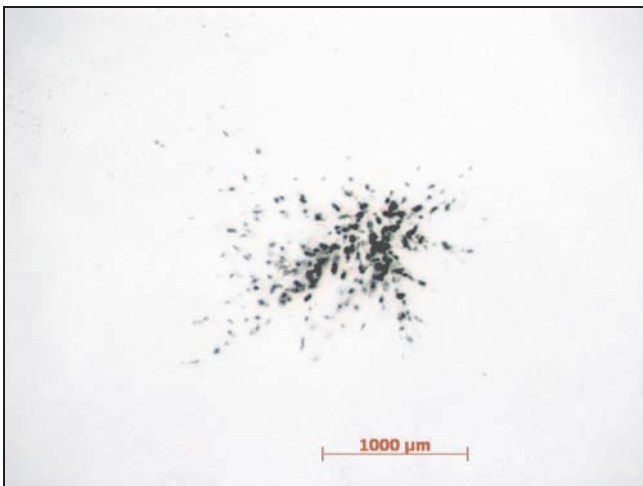


Abb. 1. Typische Kolonie von *V. dahliae* auf Selektivnährboden.

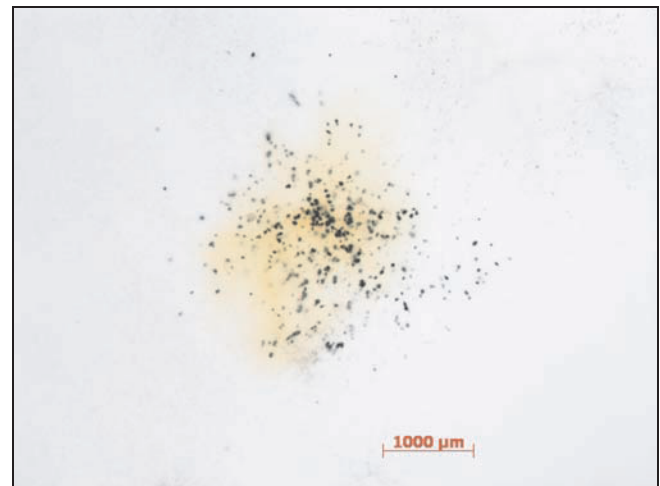


Abb. 2. Kolonie von *V. tricorpus* mit Bildung eines gelblichen Pigmentes.

Tab. 2. Untersuchung unterschiedlich verseuchter Bodenproben auf *V. dahliae*. Mittelwerte und errechnete Variationskoeffizienten auf der Grundlage von jeweils vier getrennten Laboranalysen

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Mittelwert (cfu/g Boden)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	1,2	1,9	2,1	5,0	11,7	12,0	17,3	22,4	29,9
VK (%)	0,0	0,0	173,2	173,2	110,6	100,0	55,2	32,1	13,5	18,2	11,2	17,2	6,5	7,5	7,9

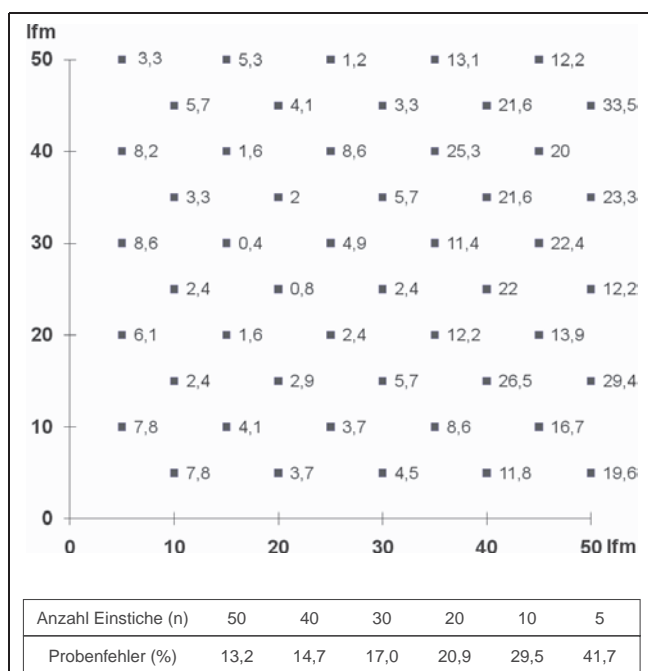


Abb. 3. Beprobung einer natürlich mit *V. dahliae* verseuchten Fläche von 2500 m² mit 50 Einstichen. Ermittelte cfu/g Boden für jeden Beprobungspunkt (oben) und Berechnung des Probenfehlers in Abhängigkeit von der Einstichanzahl (unten).

Nachweis des Erregers erfasst. Hierzu wurden unterschiedlich natürlich verseuchte Bodenproben mit dem oben beschriebenen Standardverfahren untersucht, wobei einzelne methodische Parameter verändert wurden (Tab. 3).

Im Standardverfahren werden jeweils Aliquote von 500 µl/Platte ausgebracht, was bei Verwendung von 10 Platten eine Nachweisbarkeitsgrenze von 0,4 cfu/g Boden zur Folge hat. In dem Bestreben die Sensitivität des Verfahrens zu erhöhen kann neben der Bodeneinwaage, die Anzahl der Platten oder die Ausbringmenge vergrößert werden. Letzteres, in Form der Ausbringung des doppelten Aliquotes von 1000 µl/Platte, hatte in Versuchen aber einen um ca. 50% verringerten Nachweis an cfu/g Boden zur Folge (Tab. 3).

Die auszuplattierende gesiebte Bodensuspension ist im standardisierten Verfahren in einem Erlenmeyerkolben auf einem Magnetrührer in Bewegung zu halten, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikrosklerotien zu gewährleisten und die Entnahme repräsentativer Aliquote sicherzustellen. Wurde die Suspension dagegen nur unregelmäßig per Hand bewegt, hatte dies einen signifikanten, um ca. 50% verringerten Nachweis zur Folge (Tab. 3). Einen noch größeren Einfluss auf das Untersuchungsergebnis hatte das Antrocknen der ausplattierten Aliquote vor der Inkubation der Platten. Lässt man die ausgebrachte Bodensuspension auf der Agaroberfläche nicht antrocknen, sondern verschließt die Petrischalen unmittelbar nach dem Ausplattieren in feuchtem Zustand mit Parafilm, werden deutlich weniger cfu/g Boden ermittelt. Wie Tab. 3 zu entnehmen ist, kann sich die

Tab. 3. Einfluss verschiedener methodischer Veränderungen beim Ausplattieren der Bodensuspension auf den Nachweis von *V. dahliae*: Mittelwerte und Standardabweichung in cfu/g Boden (n = 4)

Bodenprobe	Standardverfahren	Variiertes Verfahren
	Aliquot 500 µm pro Platte	Aliquot 1000 µm pro Platte
1	0,0 ± 0,0 a*	0,2 ± 0,2 a
2	4,0 ± 0,6 a	1,5 ± 0,9 b
3	30,5 ± 5,6 a	14,6 ± 2,8 b
4	mit Magnetrührer 8,8 ± 1,1 a	ohne Magnetrührer 4,3 ± 1,2 b
5	mit Antrocknen 13,5 ± 0,8 a	ohne Antrocknen 4,1 ± 1,3 b

* unterschiedliche Buchstaben in einer Reihe markieren Signifikanzen ($p \leq 0,05$).

Nachweisrate im Vergleich zum Standardverfahren um über 70% verringern.

Diskussion

Proben- und Laborfehler

Werden Anbauflächen bzw. Bodenproben mit dem beschriebenen Verfahren auf *Verticillium* untersucht, dann unterliegt das Ergebnis einem Gesamtfehler, der sich aus Proben- und Laborfehler zusammensetzt und in beiden Fällen durch die ungleichmäßige Verteilung der Mikrosklerotien im Boden bedingt ist. In diesem Zusammenhang muss zunächst berücksichtigt werden, dass bodenbürtige Pathogene in der Regel nicht gleichmäßig oder randomisiert im Boden verteilt sind. Die Untersuchung eines verseuchten Standortes zeigt anhand des ermittelten Dispersionsindex von 7,5, dass die Mikrosklerotien von *Verticillium* clusterförmig verteilt sind. SMITH und ROWE (1984) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis, als sie ein stark verseuchtes Kartoffelfeld mit 202 Einstichen beprobten und einen Dispersionsindex von 12,7 ermittelten. Deshalb ist es notwendig, eine Fläche mit möglichst vielen Einstichen zu beproben, um anschließend aus der Mischprobe einen für die Fläche repräsentativen Durchschnittswert zu ermitteln. Die notwendige Anzahl an Einzelproben bzw. Einstichen hängt vom gewünschten Grad der Genauigkeit ab. Nach SOUTHWOOD (1978) kann dieser in Form des Standardfehlers des Mittelwertes vorgegeben werden, der eine bestimmte Größe nicht überschreiten soll. Für viele Zwecke wird ein Probenfehler, d.h. Standardfehler von 5% des Mittelwertes, als ausreichend angesehen. Im Falle bodenbürtiger Erreger, wie z.B. *Verticillium*, wäre aber ein unzumutbarer Aufwand notwendig, um diese Vorgabe zu erreichen. SMITH und ROWE

(1984) ermittelten in ihren Untersuchungen für 20 Einstiche einen Probenfehler von 22%. Bei der gegebenen Varianz der Einzelwerte wären 107 Einstiche notwendig gewesen, um den Fehler auf 10% zu reduzieren. In den eigenen Untersuchungen konnte bei der vorhandenen Varianz der Einzelwerte für 20 Einstiche ein Probenfehler von 21% ermittelt werden (Abb. 3). Eine Verdoppelung auf 40 würde den Fehler nur geringfügig auf 14,7% sinken lassen, jedoch einen erheblich größeren Aufwand bedeuten. Eine Verringerung der Einstichanzahl auf 10, würde den Fehler dagegen deutlich ansteigen lassen. Bei diesen Überlegungen ist zu beachten, dass mit abnehmender Verseuchung die clusterförmige Verteilung des Erregers im Boden tendenziell eher zunimmt und der Probenfehler mit sinkender Einstichanzahl noch stärker ansteigen kann als im dargestellten Beispiel. Letztendlich ist aber in der Praxis ein Kompromiss zwischen ausreichender Genauigkeit und zumutbarem Aufwand zu schließen. Vor diesem Hintergrund empfehlen die Labore derzeit die Beprobung von ca. 1 ha großen Parzellen mit mindestens 20-25 rasterförmig auf der Fläche zu verteilenden Einstichen. Die mittels eines Bohrstockes durchzuführenden, ca. 20-30 cm tiefen Einstiche sind sorgfältig zu einer Mischprobe zu vereinigen, die schließlich auf eine Laborprobe von 500 cm³ einzuengen ist.

Auch bei einer solchen Probe muss angenommen werden, dass die Mikrosklerotien, trotz sorgfältigster Durchmischung, nicht gleichmäßig verteilt sind. Gleichzeitig wird nur eine sehr geringe Teilmenge zur Analyse verwendet. Lediglich 5,0 ml der gesiebten Bodensuspension werden ausgeplattet. Bezogen auf die zu Beginn eingewogenen 50 g Boden entspricht dies einem Äquivalent von nur 2,5 g Boden. Dies führt zu einem unvermeidbaren Laborfehler, der mit abnehmendem Verseuchungsgrad größer wird, wie die dargestellten Ergebnisse deutlich machen (Tab. 2). Je geringer belastet eine Probe ist, umso mehr streuen die Ergebnisse einzelner Wiederholungen. Dies ist naturgemäß in der Nähe der Nachweisbarkeitsgrenze von 0,4 cfu/g Boden am stärksten der Fall. Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Verseuchungsgrad einer Bodenprobe und Nachweisgenauigkeit konnten auch NICOT und ROWE (1987), HUISMANN et al. (1988) und HEPPNER (1995) ermitteln.

Vor diesem dargestellten Hintergrund muss bei der Interpretation von Untersuchungsergebnissen immer berücksichtigt werden, dass das Nachweisverfahren insbesondere bei gering verseuchten Flächen eine gewisse Ungenauigkeit aufweist. Allerdings zeichnet sich die Methode im Vergleich zu anderen Bodenuntersuchungsverfahren durch eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf das derzeitige Hauptziel der Untersuchungen: Böden verschiedenen Befallsklassen zuordnen und eine Schätzung des Befallsrisikos vornehmen zu wollen. Deshalb kann die Nachweisgenauigkeit derzeit als vollkommen ausreichend angesehen werden.

Methodische Einflussfaktoren

In einer vergleichenden großen Laborstudie konnten TER-MORSHUIZEN et al. (1998) feststellen, dass die Methodik

des *Verticillium*-Nachweises einen erheblichen Einfluss auf das Untersuchungsergebnis hat. Dies betrifft zunächst die grundsätzliche Verfahrensweise ('dry plating', 'wet plating'), aber in der Folge auch die Wahl zentraler Einflussfaktoren, wie z.B. der eingesetzten Siebgrößen oder des verwendeten Selektivnährmediums. In letzterem Fall können schon kleinste Veränderungen die Nachweisrate beeinflussen. SORENSEN et al. (1991) und KABIR et al. (2004) wiesen für das verwendete Pektatmedium nach, dass die Herkunft der Polygalacturonsäure und der eingestellte pH-Wert des Nährmediums das Ergebnis signifikant verändern können. Aber auch Abweichungen im methodischen Ablauf können einen Einfluss auf das Ergebnis ausüben. In eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass insbesondere beim Ausbringen der Bodensuspension verschiedene Verfahrensweisen, wie z.B. Bodenmenge oder Technik des Ausplattierens, das Ergebnis signifikant verändern können (Tab. 3). So hatte die Verdoppelung der Ausbringmenge von 500 µl auf 1000 µl pro Platte in dem Bestreben die Nachweisbarkeitsgrenze abzusenken auch gleichzeitig einen um 50% verringerten Nachweis zur Folge. HARRIS et al. (1993) konnten einen ähnlichen Effekt beobachten und führten die Abnahme der Findungsrate mit zunehmender Bodenmenge auf die antagonistische Wirkung bodenbürtiger Mikroorganismen zurück. Zwar kann die Verringerung der Nachweisbarkeitsgrenze auch durch eine Erhöhung der Plattenanzahl erreicht werden, jedoch ist letztendlich ein Kompromiss zwischen ausreichender Sensitivität und Aufwand zu schließen. Dieser wird bei 10 Platten und je 500 µl/Platte gesehen, zumal diese Ausbringmenge sich problemlos gleichmäßig ausplattieren lässt.

Vielfach kommen in den Laboren ähnliche Verfahren oder scheinbar gleiche Methoden zur Anwendung, die aber bei genauerer Betrachtung in methodischen Details geringfügig voneinander abweichen. Dies mag ein Grund dafür sein, dass sich die Ergebnisse der Untersuchungen von gleichen Bodenproben in verschiedenen Laboren zum Teil erheblich voneinander unterscheiden. Vor diesem Hintergrund ist eine strenge Standardisierung der Nachweismethode zu fordern, um die Qualität der Untersuchungen und ihre Vergleichbarkeit in der Praxis zu gewährleisten.

Genetische Variabilität von *Verticillium*

Die genetische Variabilität eines Erregers im Hinblick auf seine Virulenzeigenschaften kann die Genauigkeit und Aussagekraft eines Nachweisverfahrens erheblich beeinflussen. Im Umkehrschluss stellt sich die Frage, ob seine Sensitivität diesbezüglich ausreichend ist. Innerhalb der Art *Verticillium dahliae* werden derzeit 6 verschiedene vegetative Kompatibilitätsgruppen (VCGs) unterschieden (KATAN, 2000). Da die Isolate einer Gruppe über einen gemeinsamen Genpool verfügen, wurde in der Vergangenheit von der Hypothese ausgegangen, dass sich die Isolate unterschiedlicher VCGs in ihren Virulenzeigenschaften unterscheiden. Allerdings konnten nur in wenigen Studien Korrelationen zwischen VCGs und dem Wirtspflanzenkreis nachgewiesen werden. Untersuchun-

gen der letzten Jahre haben gezeigt, dass auf den landwirtschaftlich und gartenbaulich genutzten Anbauflächen in Mitteleuropa Isolate der VCGs 2A und 4B vorherrschend auftreten (ZEISE und TIEDEMANN, 2001; CHANDELIER et al., 2003; GOUD, 2003; NEUBAUER et al., 2009). Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass die Isolate beider Gruppen hoch aggressiv für Erdbeere, Kartoffel und verschiedene Ziergehölze sind. Signifikante Virulenzunterschiede zwischen diesen beiden VCGs gegenüber diesen Wirtspflanzen wurden nicht ermittelt, so dass eine Unterscheidung der VCGs im Rahmen der *Verticillium*-Bodenuntersuchungen als nicht notwendig angesehen wird. Allerdings ist noch auf die Untersuchungen von SCHUBERT et al. (2009) zu verweisen, die aus Erdbeerpflanzen nicht-pathogene Isolate von *V. dahliae* gewinnen konnten. Über ihren Anteil an natürlich im Boden auftretenden *Verticillium*-Populationen liegen keine Daten vor. An einzelnen Standorten könnte aber dieser Faktor die Aussagegenauigkeit des Nachweisverfahrens beeinflussen.

Von noch erheblich größerer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist ein seit Jahrzehnten an kreuzblütigen Wirtspflanzen auftretender *Verticillium*-Genotyp, der sich morphologisch durch deutlich längere Sporen auszeichnet. Er wurde schon von STARK (1961) als *V. dahliae* var. *longisporum* bezeichnet und weist eine Konidienlänge von ca. 8,0 µm auf im Vergleich zu den durchschnittlich 4,0 µm langen Sporen der *V. dahliae*-Isolate. KARAPAPA et al. (1998) beschrieben die Varietät als neue Species *Verticillium longisporum*, während COLLIN et al. (2003) dies aber aufgrund neuer molekularbiologischer Kenntnisse mittlerweile nicht mehr als gerechtfertigt ansehen.

Unabhängig davon muss *Verticillium longisporum* in Deutschland und Nachbarländern als der an Kreuzblütlern, wie Raps oder Kohl, vorherrschend auftretende *Verticillium*-Genotyp angesehen werden (STEINBACH, 2004; LAUN et al., 2005). In Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Arten *V. dahliae* und *V. longisporum* nicht nur morphologisch sondern auch hinsichtlich ihrer Pathogenitätseigenschaften klar unterscheiden. *Verticillium dahliae* befällt primär nicht kreuzblütige Wirtspflanzen, während *V. longisporum* in seinem Auftreten ausschließlich auf Kreuzblütler beschränkt ist und im Hinblick auf Erdbeere sowie Ziergehölzen als apathogen einzustufen ist (ZEISE und VON TIEDEMANN, 2002; NEUBAUER, unveröffentlichte Daten). Dies macht eine Unterscheidung der beiden Genotypen bei Bodenuntersuchungen notwendig bzw. wünschenswert. Eine Differenzierung ist allerdings derzeit nicht möglich, da sich die Kolonien der beiden Typen auf dem Selektivnährboden nicht unterscheiden lassen. Das Nachweisverfahren stößt hier an seine Grenzen, was die Gefahr eines falsch „positiven“ Ergebnisses für einen Erdbeeranbauer oder eine Alleebaumschule zur Folge haben kann. Aus diesem Grund sollten von den Laboren Angaben zur Fruchtfolge verlangt werden, um das Untersuchungsergebnis hinsichtlich der Zusammensetzung der *Verticillium*-Population besser interpretieren bzw. eine Bewertung des Befallsrisikos vornehmen zu können. In der Praxis wird das Problem auch dadurch verringert,

dass vorrangig jene Betriebe Proben untersuchen lassen, die in der Vergangenheit aufgrund entsprechender Fruchtfolgen (Kartoffel) *Verticillium*-Ausfälle zu beklagen hatten. Hier kann bei den Analysen von *V. dahliae*-Populationen ausgegangen werden. Gleichwohl wäre die Möglichkeit einer Differenzierung der beiden unterschiedlichen Genotypen sehr wünschenswert, da dies die Genauigkeit des Verfahrens erheblich verbessern würde. Entsprechende neue Methoden, wie z.B. eine real-time PCR, müssen allerdings noch entwickelt werden.

Schadensschwellen

Beratung und Praxis wünschen Schadensschwellen für einzelne Kulturen, um eine bessere Bewertung der Ergebnisse vornehmen zu können. So fordert die Baumschulpraxis in Zusammenhang mit der Zertifizierung von Alleebaumflächen Grenzwerte für eine *Verticillium*-Verseuchung, in der Hoffnung jenseits der Nulltoleranz einen gewissen Spielraum zu erhalten. HARRIS und YANG (1996) sowie GOUD (2003) ermittelten eine 5%-Schadensschwelle für Erdbeeren und Ahorn bei jeweils 1-2 Mikrosklerotien/g Boden. Der gleiche Wert konnte für Erdbeeren der Sorte 'Elsanta' auf der Grundlage von Infektionsversuchen mit unterschiedlich künstlich verseuchten Inokulumstufen errechnet werden (NEUBAUER, unveröffentlichte Daten). Damit liegt der Verseuchungsgrad, ab welchem erste Schäden zu erwarten sind, im Bereich der Nachweisbarkeitsgrenze des vorgestellten Verfahrens. Gleichzeitig weisen die Bodenuntersuchungen gerade bei niedrigen Verseuchungsgraden eine relativ hohe Ungenauigkeit auf. Schließlich ist auf das Problem der nicht zu differenzierenden, unterschiedlich virulenten Genotypen zu verweisen, so dass sowohl die Ermittlung von Schwellenwerte als auch ihre spätere Anwendung in der Praxis als schwierig angesehen werden müssen. Nicht zuletzt stellen die zahlreichen standortspezifischen Faktoren, die das Befallsauftreten beeinflussen, die Nutzung von Schwellen infrage. Neben den Pflanzen selbst, dürften zahlreiche Bodenfaktoren, wie Feuchtigkeit und Temperatur sowie die komplexe Mikroflora und -fauna, einen Einfluss auf die Keimung der Mikrosklerotien bzw. nachfolgende Infektionen ausüben. Zahlreiche Studien belegen, dass z.B. wandernde Wurzelnematoden der Gattung *Pratylenchus* den *Verticillium*-Befall fördern (BACK et al., 2002) und somit Schadensschwellen verringern können (GOUD, 2003). Allerdings sind die sonstigen Einflussfaktoren weitgehend unbekannt. Sie stehen darüber hinaus in wechselseitiger Beziehung zueinander, so dass sich ein schwer überschaubares komplexes Wirkungsgefüge ergibt. Vor diesem Hintergrund wird es in absehbarer Zeit kaum möglich sein, auf der Basis einer Bodenuntersuchung den Befall exakt zu prognostizieren. Die bisherigen Erfahrungen zeigen aber, dass das Befallsrisiko ausreichend genau geschätzt werden kann. Ohnehin ist aus Sicht der Praxis im Vorfeld einer Flächennutzung in den meisten Fällen nur die Frage zu klären, ob der Standort befallsfrei bzw. gering oder stärker mit *Verticillium* verseucht ist. Dieses Ziel kann durch Anwendung des beschriebenen Nachweisverfahrens zweifelsohne er-

reicht werden. Beratung und Praxis steht somit ein Instrument zur Verfügung, das als ein wichtiger Baustein einer vorbeugenden Bekämpfungsstrategie anzusehen ist.

Literatur

- BACK, M.A., P.P.J. HAYDOCK, P. JENKINSON, 2002: Disease complexes involving plant nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathology* **51**, 683-697.
- BUTTERFIELD, E.J., J.E. DEVAY, 1977: Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **67**, 1073-1078.
- CHANDELIER, A., F. LAURENT, D. DANTINNE, L. MARIAGE, M. ETIENNE, M. CAVELIER, 2003: Genetic and molecular characterization of *Verticillium dahliae* isolates from woody ornamentals in Belgian nurseries. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 943-952.
- COLLINS, A., C.A.N. OKOLI, A. MORTON, D. PARRY, S.G EDWARDS, D.J. BARBARA, 2003: Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology* **93**, 364-376.
- GOUD, J.C., 2003: *Verticillium* wilt in trees. Detection, prediction and disease managment. Dissertation, Wageningen Universiteit, Wageningen, The Netherlands.
- GOUD, J.C., A.J. TERMORSHUIZEN, 2003: Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 523-534.
- HARRIS, D.C., J.R. YANG, M.S. RIDOUT, 1993: The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil. *Plant Pathology* **42**, 238-250.
- HARRIS, D.C., J.R. YANG, 1996: The relationship between the amount of *Verticillium dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction. *Plant Pathology* **45**, 106-114.
- HEPPNER, C., 1996: Nachweis von *Verticillium dahliae* im Boden mit Plattengussverfahren und ELISA sowie Untersuchungen zur Auswirkung des Inokulums auf den Befall von Winterraps (*Brassica napus*). Dissertation Georg-August Universität Göttingen. Göttingen, Cuvillier Verlag.
- HIEMSTRA, J.A., M. RATAJ-GURANOWSKA, 2003: Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from the Netherlands as compared to VCG diversity in Europe and in the USA. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 827-839.
- HUISMAN, O.C., 1988: Seasonal colonization of roots of field-grown cotton by *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus*. *Phytopathology* **78**, 708-717.
- KABIR, Z., R.G. BHAT, K.V. SUBBARAO, 2004: Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. *Plant Disease* **88**, 49-55.
- KARAPAPA, V.K., B.W. BAINBRIDGE, J.B. HEALE, 1997: Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. Nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research* **101**, 1281-1293.
- KATAN, T., 2000: Vegetative compatibility in populations of *Verticillium* – an overview. In: TJAMOS, E.C., R.C. ROWE, J.B. HEALE, D.R. FRAVEL (eds): *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press, 69-86.
- LAUN, N., J. SCHLAGHECKEN, C. NEUBAUER, 2005: *Verticillium longisporum* schädigt Blumenkohl. *Gemüse* **3**, 10-13.
- NEUBAUER, C., 2000: Quantitativer Nachweis von *Verticillium dahliae* im Boden als Grundlage für die gezielte Flächenauswahl im Erdbeeranbau. 52. Deutsche Pflanzenschutztagung. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft., Heft 376, 279.
- NEUBAUER, C., B. HEITMANN, H. SCHACHT, 2007: *Verticillium* in Baumschulen. *Deutsche Baumschule* **11**, 38-41.
- NEUBAUER, C., C. VOGEL, B. HEITMANN, 2009: Morphology, Vegetative Compatibility and Pathogenicity of *Verticillium dahliae* Isolates from Woody Ornamentals in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **116**, 109-114.
- NICOT, P.C., D.I. ROUSE, 1987: Relationship between soil inoculum density of *Verticillium dahliae* and systemic colonization of potato stems in commercial fields over time. *Phytopathology* **77**, 1346-1355.
- SCHNEIDEWIND, A., 2005: Untersuchungen zur Standorteignung von *Acer pseudoplatanus* L. als Straßenbaum in Mitteldeutschland unter besonderer Berücksichtigung abiotischer und biotischer Stressfaktoren. Humboldt-Universität Berlin, Dissertation 2004.
- SCHUBERT, P., J. GOLLDACK, H. SCHWÄRZEL, P. LENTZSCH, 2009: Temperature dependent pathogenicity of *Verticillium dahliae* kleb. populations in strawberry plants of the cultivar 'Elsanta'. *Acta Hort.* (ISHS) **842**, 203-206.
- SMITH, V.L., R.C. ROWE, 1984: Characteristics and distribution of propagules of *Verticillium dahliae* in Ohio potato field soils and assessment of two assay methods. *Phytopathology* **74**, 553-556.
- SORENSEN, L.H., A.T. SCHNEIDER, J.R. DAVIS, 1991: Influence of sodium polygalacturonate sources and improved recovery of *Verticillium spp.* from soil. *Phytopathology* **81**, 1347.
- STARK, C., 1961: Das Auftreten der *Verticillium*-Tracheomykosen in Hamburger Gartenbaukulturen. *Gartenbauwissenschaft* **26**, 493-528.
- STEINBACH, P., 2004: Standortbezogene Risikobewertung für den Erreger der „Rapswelke“ *Verticillium longisporum* auf der Grundlage des Quantifizierung des Bodeninokulums. www.ufop.de.
- TERMORSHUIZEN, A.J., J.R. DAVIS, D.C. HARRIS, G. HUISMAN, G. LAZAROVITS, T. LOCKE, J.M. MELERO VARA, L. MOL, E.J. PAPLOMATAS, H.W. PLATT, M. POWELSON, D.I. ROUSE, R.C. ROWE, L. TSOR, 1998: Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3846-3853.
- ZEISE, K., A. VON TIEDEMANN, 2001: Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. *Journal of Phytopathology* **149**, 469-475.
- ZEISE, K., A. VON TIEDEMANN, 2002: Host Specialization among Vegetative Compatibility Groups of *Verticillium dahliae* in Relation of *Verticillium longisporum*. *Journal of Phytopathology* **150**, 112-119.