

Quantifizierung des bodenbürtigen Inokulums von *Verticillium dahliae* auf Rapsstandorten in Deutschland

Dr. P. Steinbach, Landespflanzenenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern,
Graf-Lippe-Straße 01, 18059 Rostock

Prof. Dr. A. von Tiedemann; Universität Göttingen, Institut für Pflanzen-
pathologie und Pflanzenschutz, Griesebachstraße 6, 37077 Göttingen

Dipl. Agr. Ing. M. Edner, Nienhäger Chaussee 73, 18209 Bad Doberan

Zusammenfassung

Die Rapswelke, verursacht durch den bodenbürtigen Pilz *Verticillium longisporum* (Synonym: *Verticillium dahliae*), ist in der Bundesrepublik Deutschland stärker verbreitet als allgemein angenommen. Erstmals bundesweit durchgeführte Analysen zur Bestimmung des Bodeninokulums und Befallsbonituren ergaben in allen untersuchten Bundesländern positive Erregernachweise. In traditionsreichen Anbaugebieten mit hoher Rapskonzentration in der Fruchtfolge (z.B.: Schleswig-Holstein, Mecklenburg-Vorpommern) wurden die höchsten Befallswerte nachgewiesen.

Einleitung

Der Erreger der Rapswelke, *Verticillium longisporum*, ist seit ca. 1985 als wirtschaftlich bedeutende Krankheitsursache für den Winterraps in Deutschland bekannt. Hauptsächlich aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern) wurde insbesondere von Spätschäden durch *Verticillium* und *Phoma lingam* in der Abreife des Rapses (Krankhafte Abreife) berichtet (HORNIG 1985, DAEBELER u.a. 1985). Die Rapswelke besitzt aufgrund fehlender direkter Bekämpfungsmöglichkeiten ein hohes Gefährdungspotential für den Rapsanbau. Aktuell stehen weder Fungizide noch tolerante oder resistente Sorten zur Verfügung. Der

Krankheit kann gegenwärtig allein durch eine weite Stellung des Rapses in der Fruchtfolge entgegengewirkt werden. Detaillierte Untersuchungen zur Verbreitung der Krankheit und zur wirtschaftlichen Bedeutung in der Bundesrepublik Deutschland unter heutigen Anbaubedingungen liegen nicht vor. Darüberhinaus bestehen Unsicherheiten in der Diagnostik der erst während der Abreife des Rapses visuell sichtbaren Krankheit, so dass Verwechslungen mit anderen Rapskrankheiten nicht auszuschließen sind. Ein Monitoring zur Verbreitung der Krankheit in Deutschland wird von der DPG-Projektgruppe Raps seit 1999 auch mit dem Ziel der sicheren und frühen Erkennung der Krankheit durchgeführt. Durch die Quantifizierung von *Verticillium longisporum* Inokulum im Boden wird eine Charakterisierung des Gefährdungspotentials angestrebt.

Material und Methoden

Die Ermittlung der aktuellen Bodenverseuchung mit *V. dahliae* bzw. *V. longisporum*, ausgedrückt durch die Anzahl an Vermehrungseinheiten des Pilzes je Gramm Boden (cfu/g Boden), erfolgte in den Jahren 2000 und 2001 auf jährlich ca. 80 ausgewählten Rapsstandorten in der Bundesrepublik Deutschland.

Die Untersuchungen wurden nach ZEISE (mündliche Mitteilung) im einzelnen wie folgt durchgeführt:

- Lufttrocknung der eingesandten Bodenproben für einige Tage im Gewächshaus,
- Sieben des Bodens (2mm Siebung) und Abwiegen von jeweils 3x25g Boden,
- 25g Boden in 250ml 0,1%igem Agar eine Stunde kräftig rühren (Magnetrührer),
- 1ml homogene Bodensuspension je Petrischale mit Selektivmedium* gleichmäßig verteilen (Drigalsky-Spatel), je Wiederholung 10 Petrischalen,
- Petrischalen bis zum Antrocknen der Agaroberfläche offen unter der Impfbox stehen lassen,
- Inkubation der Petrischalen bei 18-20°C und Dunkelheit über 5 Wochen.

* Selektivmedium:

- 1000ml H₂O enthalten:
- 24,0 ml Bodenextrakt ¹⁾
- 5,0 g fertige Czapek-Dox-Mineralsalzmischung ²⁾
- 2,5 g Polygalacturonsäure Na-Salz
- 0,5 ml Tergitol NP 10
- 50,0 mg Chloramphenicol
- 50,0 mg Chlortetracyclin ³⁾
- 50,0 mg Streptomycinsulphat ³⁾

- 1) 1000 g humoser Boden (Gliege II) auf 1000 ml H₂O; schütteln; Boden sedimentieren lassen, Überstand dekantieren und bei 1500 U/min für 10 min. zentrifugieren; Überstand als Bodenextrakt verwenden.
- 2) 3g NaNO₃; 1g K₂HPO₄; 0,5g KCl; 0,5g MgSO₄·7 H₂O; 0,01g FeSO₄·7 H₂O
- 3) wird nach dem Autoklavieren in das auf ca. 45°C abgekühlte Medium gegeben

Zur Probenauswertung wurde die Agaroberfläche vorsichtig mit einem Gummiwischer unter fließendem Wasser gereinigt. Anschließend erfolgte das Zählen der *Verticillium*-Kolonien je Petrischale an der Schalenunterseite unter dem Binokular. Eine Differenzierung in *V. dahliae* und *V. longisporum* wurde hierbei nicht vorgenommen, da dies allein anhand der Mikrosklerotienform schwierig ist. Aus diesem Grund wird bei der Ergebnisdarstellung im folgenden als Sammelbegriff von „*Verticillium spp.*“ gesprochen.

Das Bodeninokulum je Gramm lufttrockenen Boden wurde wie folgt berechnet:.

$$\text{cfu/ g Boden} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times 1\text{g}}{0,1 \text{ g}}$$

Weiterhin wird ein Vergleich der ermittelten Bodeninokulum-Werte mit den parallel dazu erfassten Boniturdaten (BBA Braunschweig) und ELISA-Werten (Universität Göttingen) an Rapspflanzen angestellt.

Ergebnisse

Die Quantifizierung des bodenbürtigen Inokulums von *Verticillium spp.* erfolgte bundesweit in den Jahren 2000 und 2001 auf insgesamt 149 Standorten (Tabelle 1).

Für vergleichende Untersuchungen bezüglich visueller Befallsbonitur und ELISA konnten 130 Standorte (2000: 63 Standorte; 2001: 67 Standorte) herangezogen werden (Tabelle 2). Am Monitoring beteiligten sich bundesweit alle Sortenprüfstellen sowie zahlreiche Pflanzenschutzdienstesstellen der Länder.

Mit Ausnahme weniger Standorte im Jahr 2000 (5 Standorte bzw. 6,4 % inokulumfrei) wurde auf allen untersuchten Standorten der Welkeerreger *Verticillium spp.* im Boden in Form der durch den Pilz produzierten Mikrosklerotien nachgewiesen (Tabelle 1). Auf mehr als 50 % der untersuchten Standorte (Jahr 2000: 66 %, Jahr 2001: 51 %) kann der Gehalt an Mikrosklerotien im Boden nach der hier vorgenommenen Gehaltsklassifizierung als mittel bis hoch quantifiziert werden. Die Maximalwerte für das Bodeninokulum lagen im Untersuchungsjahr 2000 mit bis zu 519 cfu/ g lutro Boden deutlich über denen des Jahres 2001 (bis zu 73 cfu/ g Boden). Demgegenüber wurde im Untersuchungsjahr 2001 eine wesentlich geringere Schwankungsbreite als im Vorjahr festgestellt. Der mittlere Mikrosklerotien-Gehalt (Median-Wert) war in beiden Untersuchungsjahren mit 15 cfu/g Boden (2000) bzw. 11 cfu/g Boden (2001) vergleichbar hoch.

Aus dem Vergleich (Tabelle 2) der Bodeninokulum-Werte mit den Befallsbonituren (BBA Braunschweig) und ELISA-Werten (Universität Göttingen) können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Der Anteil an Schlägen mit nachgewiesenem Bodeninokulum lag deutlich höher als nach visueller Bonitur (2000: Bodeninokulum auf 80 % der Schläge im Vergleich zu 45 % Schlägen mit bonitiertem Befall; 2001: Bodeninokulum 87 %, Bonitur 54 %) Im Gegensatz zum allgemeinen Trend, wurde an Standorten mit häufigem und starkem Befallsvorkommen (z.B. einige Standorte in Mecklenburg-Vorpommern) eine hohe Übereinstimmung zwischen Bodeninokulum und bonitiertem Befall an der Pflanze festgestellt.
2. Bei bonitiertem Befall an der Rapspflanze ist zwischen den Ergebnissen der Bodenanalyse (2000: 90%; 2001: 92%) und der ELISA-Bestimmung (2000: 84%; 2001: 83%) eine hohe Übereinstimmung vorhanden.

3. Auf Standorten ohne bonitierten Befall an der Rapspflanze konnte durch die Bodenanalyse ein dennoch hohes Inokulumpotential im Boden (ca. 80 % der Schläge ohne Befall mit Bodeninokulum) nachgewiesen werden. Auch der ELISA-Test diagnostizierte latenten Befall, obwohl keine Symptome an der Pflanze bonitiert wurden (ca. 20 % der Schläge ohne visuellen Befall mit positiven ELISA-Befunden).

Tab. 2: **Bodeninokulum und visueller Befall von *Verticillium dahliae* bzw. *V. longisporum* in der Bundesrepublik Deutschland in den Jahren 2000 und 2001**

Bundesland	Anzahl Untersuchungsproben		Anteil Proben (%) mit			
	2000	2001	Bodeninokulum		visuellem Befall	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001
Brandenburg	1	2	1	2	0	0
Bayern	7	8	7	7	2	4
Baden-Württemberg	2	3	2	2	1	2
Hessen	1	5	1	4	1	3
Mecklenburg-Vorpommern	4	7	4	7	4	7
Niedersachsen	14	8	9	7	5	3
Nordrhein-Westfalen	8	1	5	1	3	0
Rheinland-Pfalz	3	5	3	4	2	5
Schleswig-Holstein	11	10	9	8	6	6
Saarland	-	1	-	1	-	0
Sachsen	-	2	-	2	-	1
Sachsen-Anhalt	4	5	3	3	1	1
Thüringen	8	10	6	10	3	4
Gesamt absolut:	63	67	50	58	28	34
<i>relativ (%)</i>			<i>80</i>	<i>87</i>	<i>44</i>	<i>50</i>

Tab. 1: **Bodenbürtiges Inokulum von *Verticillium dahliae* bzw. *V. longisporum* auf Winterraps-schlägen in Deutschland in den Jahren 2000 und 2001**

Jahr	Merkmal	Verticillium-Gehalt im Boden nach Gehaltsklassen (cfu je g Boden)						Σ
		0	I	II	III	IV	V	
2000	Anzahl Schläge	5	14	8	20	23	9	79
	rel. %	6,4	17,7	10,1	25,3	29,1	11,4	100
	Schwankung (cfu/g Boden)	0	0,7...4,3	5,3...8,7	10,3...19,3	20,3...50,0	56,6...518,5	0,7...518,5
	Median	0	1,85	6,65	9,8	28,7	143,7	15,0
2001	Anzahl Schläge	0	19	15	15	15	6	70
	rel. %	0	27,2	21,4	21,4	21,4	8,6	100
	Schwankung (cfu/g Boden)	-	0,3...3,7	5,3...10,0	10,7...18,7	20,3...49,3	52,3...72,7	0,3...72,7
	Median	-	2,3	7,7	13,3	35,0	60,15	10,85

Diskussion

Das Bodeninokulum von *Verticillium dahliae* bzw. *V. longisporum* wurde in der hier vorliegenden Untersuchung erstmalig für Rapsanbauregionen in der gesamten Bundesrepublik Deutschland erfaßt. Die gewonnenen Ergebnisse sind wichtige Bestandteile des durch den DPG-Arbeitskreis Integrierter Pflanzenschutz, Projektgruppe Raps ebenso erstmalig bundesweit durchgeführten Monitoring zum Auftreten und zur Verbreitung der durch *Verticillium longisporum* verursachten Rapswelke. Die bisher verfügbaren wenigen Erhebungen und Untersuchungen zum Krankheitsauftreten sind regional geprägt und aufgrund möglicher subjektiv geprägter Unterschiede bei der Symptombonitur für Vergleiche nur bedingt geeignet. Durch die Einbeziehung von Rapsstandorten der Sortenprüfstellen und des Pflanzenschutzdienstes der Länder in die vorliegende Untersuchung wurde ein repräsentativer Überblick für die Krankheitsverbreitung in der Bundesrepublik Deutschland erreicht.

Die nachgewiesene Bodeninokulumdichte lässt auf eine hohe Präsenz des Erregers in der gesamten Bundesrepublik schließen. Bemerkenswert ist, dass hohe Bodeninokulumwerte nicht auf die traditionellen „Verticillium-Befallsgebiete“ Norddeutschlands beschränkt bleiben. Es ist daher bundesweit von einer homogenen Verbreitung des Krankheitserregers als erwartet auszugehen.

Welches Krankheits- und Schadpotential daraus resultiert, kann mit dem vorliegenden Datenmaterial nicht eingeschätzt werden. Offene Fragen ergeben sich bereits aus dem angewandten Testverfahren zur Bestimmung des Inokulums im Boden, da nicht nur die rapspathogene Form *Verticillium dahliae* ssp. *longisporum* (aktuell als *Verticillium longisporum* beschrieben), sondern auch alle anderen auf verschiedenen Wirten pathogene *Verticillium dahliae*-Formen nachgewiesen werden. Diese Tatsache könnte auch eine Erklärung für die deutlich höheren Findungsraten für den Pilz im Boden im Vergleich zu den Befallsbonituren sein. Darüberhinaus beeinflussen unumstritten Infektions- und Befallsverlauf

die Befallsausprägung an der Pflanze. So muß davon ausgegangen werden, dass nicht jedes im Boden nachgewiesene Mikrosklerotium einen bonitierbaren Befall induziert.

Die auf Standorten ohne visuell vorliegenden Pflanzenbefall nachgewiesenen hohen Bodeninokulum-Werte haben vermutlich ähnliche Ursachen (methodisch und das Nichtzustandekommen von Befall). Die ebenfalls festgestellten positiven ELISA-Befunde dokumentieren demgegenüber möglicherweise die Nichtausprägung von bonitierbaren Pilzstrukturen (Mikrosklerotien).

Die Einschätzung des Gefährdungspotentials wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Neben der Bestimmung des Inokulums im Boden und der sicheren sowie frühzeitigen Krankheitsdiagnostik sind Untersuchungen zur Befallsentwicklung und zur Ertragsrelevanz erforderlich.

Basis ist und bleibt jedoch die Kenntnis der Anbaugeschichte des jeweiligen Standortes (Fruchtfolge). Dies könnte zur Filterung von Risikofaktoren für die Anreicherung von *Verticillium dahliae* im Boden und zur Risikobewertung von Standorten beitragen.

Literaturverzeichnis:

- HORNIG, H., 1985: Spätschäden durch *Phoma lingam* und *Verticillium dahliae* ?
Raps 3 (2) 57-58
- DAEBELER, F., AMELUNG, D., SEIDEL, D., 1985: Orientierungswerte zur Schadwirkung von *Phoma lingam* an Winterraps. Nachrichtenblatt Pflanzenschutz DDR 39 (8) 181