

der Gesamt-N-Menge) und weil DCD noch nach 60 Tagen im Boden vorhanden war.

Inwieweit Guanlylharnstoff, der sich bei der  $\text{CaCN}_2$ -Umsetzung bildet, ebenfalls toxisch ist, kann noch nicht beantwortet werden.

## Literatur

AMBERGER, A. und VILSMEIER, K.: Anorganisch katalytische Umsetzung von Cyanamid und dessen Metaboliten in Quarzsand. I. Mechanismus des Cyanamidabbaues unter dem Einfluß von Eisenoxiden und Feuchtigkeit. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* **141**, 665-676, 1978.  
 AMBERGER, K. und VILSMEIER, K.: Umsetzung von Kalkstickstoff in Quarzsand und in verschiedenen Böden. *Z. Acker- u. Pflanzenbau* **148**, 1-12, 1979.  
 BÖNING, K.: Zur Biologie und Bekämpfung der Sklerotienkrankheit des Tabaks (*Sclerotinia sclerotiorum* [Lib.] Masee). *Phytopathol. Z.* **6**, 113-175, 1933.  
 BROOKS, A. N.: Rep. Fla. agric. Exp. Sta. 1939-40.-RAM 20, 562-563, 1941.  
 ERNST, D.: Die Umsetzung des Cyanamids in Kulturböden. *Z. Pflanzenern. Düng. Bodenkd.* **116**, 34-44, 1066/67.  
 GAUDINEAU, M. et R. LAFON: Sur le maladié à sclérotés du Topinambour. *C. R. Acad. Agric. France* **44**, 177-178, 1958 – RAM **37**, 623, 1958.  
 GROSSMANN, F.: Einfluß von Cyanamid bzw. Kalkstickstoff auf verschiedene Stadien von *Sclerotinia trifoliorum*. Symp. Inst. Phytopath. Aschersleben der Biol. Zentralanst. 83-89, 1961.  
 KNÖSEL, D. und KIEWNICK, L.: Beitrag zur Wirkung von „Cyanamidflüssig“ auf Bodenmikroorganismen. *Zentralbl. f. Bakt. II.* **118**, 387-396, 1964.  
 KRÜGER, W.: Maßnahmen zur Bekämpfung des Rapskrebesses, verur-

sacht durch *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Phytopathol. Z.* **77**, 125-137, 1973.

KRÜGER, W.: Über die Wirkung der Witterung auf den Befall des Rapses durch *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)* **27**, 1-6, 1975a.

KRÜGER, A.: Untersuchungen zur Beeinflussung der Apothezien-Entwicklung von *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)* **27**, 129-135, 1975b.

KRÜGER, W.: Die Beeinflussung der Apothezien- und Ascosporen-Entwicklung des Rapskrebserregers *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary durch Umweltfaktoren. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.* **82**, 101-108, 1975c.

MÜLLER, HANNELORE: Über die Wirkung des Cyanamids im Kalkstickstoff auf die verschiedenen Mikroorganismengruppen, insbesondere auf Schadpilze im Boden. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem* **74**, 73-26, 1951.

MÜLLER, HANNELORE: Untersuchungen über die Wirkung des Cyanamids im Kalkstickstoff auf pathogene und nicht pathogene Mikroorganismen des Bodens. *Arch. Mikrobiol.* **22**, 285-306, 1955.

RADEMACHER, B.: Untersuchungen über die fungistatische und fungizide Wirkung des Cyanamids am Beispiel des Weizensteinbrandes (*Tilletia tritici* [Bjerk.] Winter). *Phytopathol. Z.* **17**, 353-373, 1951.

RATHSACK, K.: Über Umsetzungsprodukte des Cyanamids im Boden. *Landw. Forsch.* **7**, 6. Sh. 116-123, 1955.

VENTER, F.: Methoden zur Ermittlung der Fungitoxizität von Kalkstickstoff in vitro. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.* **77**, 494-497, 1970.

VILSMEIER, K. und AMBERGER, K.: Modellversuche zum Umsatz von gemahlenem Kalkstickstoff und Perlkalkstickstoff in Abhängigkeit von Bodenfeuchtigkeit und Applikationsform. *Z. Acker- und Pflanzenbau* **147**, 68-77, 1978 a.

VILSMEIER, K. und AMBERGER, K.: Anorganisch-katalytische Umsetzung von Cyanamid und dessen Metaboliten in Quarzsand II. Cyanamidabbau unter dem Einfluß von Metalloxiden und Temperatur. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* **141**, 677-685, 1978 b.

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., **32** (2), S. 21-24, 1980, ISSN 0027-7479.  
 © Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Nematologie, Münster

# Ein verbessertes Extraktionsverfahren für *Heterodera schachtii*

## An improved method for the extraction of *Heterodera schachtii*

Von J. Müller

### Zusammenfassung

Zysten von *Heterodera schachtii* können aus Boden mit Hilfe verschiedener Verfahren extrahiert werden, von denen das Schlämmverfahren nach FENWICK in Europa die größte Verbreitung gefunden hat. Es erlaubt keine vollständige Trennung von Zysten und Boden, was ein Aussuchen der Zysten per Hand erforderlich macht. Dieser Arbeitsgang ist zeitraubend und kann zu Fehlern führen. – Die hier beschriebene Methode kombiniert einen Siebgang mit anschließender Zentrifugation in einer Zuckerlösung. Die Zysten können dabei soweit von Bodenpartikeln getrennt werden, daß sie sich anschließend direkt in einem Zystenzertrümmerer weiter verarbeiten lassen. Die Verseuchung wird als Zahl der Eier und Larven pro

Bodeneinheit angegeben, auf die nur bedingt aussagekräftige Zystenanzahl wird verzichtet. Im Vergleich zu den Schlämmverfahren nach FENWICK oder SEINHORST erzielte die Methode gleich gute oder bessere Ergebnisse, wobei das manuelle Ausschauen der Zysten nicht erforderlich ist.

### Abstract

For the extraction of *Heterodera schachtii* cysts from soil several methods are used, among which the FENWICK-can is most widely applied in Europe. It does not separate cysts and soil completely, the cysts must be picked out by hand from remaining soil particles. This is time-consuming and may involve errors. – The described new method combines sieving and the centrifugal-flotation technique. It allows the extraction of cysts almost free from soil particles. The cysts can then be

homogenized in a cyst-squashing device. The infestation level is determined by the number of eggs and larvae per soil unit. Cyst counts are omitted as they give little information. The efficiency of the method is superior to the FENWICK- or SEINHORST-can for the extraction of old cysts. Handpicking of cysts is not necessary.

Der Rüben nematode *Heterodera schachtii* überlebt in seinem Dauerstadium, der mit Eiern bzw. Larven gefüllten Zyste, viele Jahre ohne Wirtspflanze. Um vor dem Anbau von Zuckerrüben über die Verseuchung des Bodens mit diesem Nematoden eine Aussage machen zu können, müssen die Zysten extrahiert und quantitativ erfaßt werden. Dazu sind einfache Verfahren wie die Siebmethode (BAUNACKE, 1922) und das Papierstreifenverfahren (BUHR, 1954) beschrieben worden. Effektiver ist das Schlammverfahren nach FENWICK (1940), bei dem der Boden vorher getrocknet werden muß. Die Fenwickkanne war schon 1955 in Europa die am häufigsten eingesetzte Apparatur zur Extraktion von Zysten (JONES, 1955), und sie ist es auch heute noch (SOUTHEY, 1974). Inzwischen wurden weitere Methoden entwickelt, die im allgemeinen nach dem Gegenstromprinzip arbeiten. In der Kanne nach SEINHORST (1964) kann auch feuchter Boden verarbeitet werden; in der Aufschwemmsäule (TRUDGILL et al., 1972, KERRY, 1975) ist die Ausbeute neuer, gefüllter Zysten verbessert und im Elutriator von VALLOTTON und PERRIER (1977) können wesentlich größere Bodenmengen verarbeitet werden.

Ein Nachteil der meisten Verfahren ist die Verunreinigung der extrahierten Zysten mit einer beachtlichen Menge an Bodenbestandteilen, die ein Aussuchen und Sarneln der Zysten per Hand erforderlich macht. Je nach Verseuchungsgrad der Probe ist damit ein hoher Zeitaufwand verbunden, und an die Geduld der untersuchenden Person werden große Anforderungen gestellt. Die Entscheidung, wann alle Zysten einer Probe gefunden sind, hängt von der Ausdauer des Untersuchers ab und unterliegt damit einem persönlichen Fehler. Auf diese Tatsache hat schon GOFFART (1958) hingewiesen.

Die einfache Bestimmung der Zystenanzahl gibt kein brauchbares Bild von der tatsächlichen Verseuchung des Bodens. Da jedes Jahr auch ohne Kultur von Wirtspflanzen ein Teil der Larven ausschlüpft, ist der Zysteninhalt variabel und u. a. von der Fruchtfolge abhängig. Deshalb fand JONES (1955) nur eine

Beziehung zwischen der Anzahl Zysten mit lebendem Inhalt und der Zahl der Eier und Larven, während die Gesamtzahl der Zysten damit nicht korrelierte. Um den lebenden Inhalt zu erkennen, müssen die Zysten einzeln aufgequetscht werden, wobei sich zeigt, daß ihr Inhalt zwischen 0 und ca. 300 Eiern und Larven schwankt. Abgesehen von der damit verbundenen Arbeit ist dieses Verfahren auch hinsichtlich seiner Aussagekraft unbefriedigend.

Bei der Suche nach einer besseren Methode standen deshalb zwei Ziele im Vordergrund: 1. Die Zysten sollten nicht mehr per Hand ausgesucht werden; 2. Die Zahl der Eier und Larven sollte quantitativ erfaßbar sein.

GOORIS und D'HERDE (1972) beschreiben ein Verfahren, welches nach ihren Angaben beide Anforderungen erfüllt. Es basiert auf dem schon von CAVENESS und JENSEN (1955) beschriebenen Prinzip der Zentrifugation von Nematoden in einer Zuckerlösung. Die Zysten werden dabei zusammen mit Bodenbestandteilen in einem Mixer zerschlagen, anschließend sollen die freigesetzten Eier und Larven durch Zentrifugation isoliert werden. In zahlreichen eigenen Versuchen befriedigte diese Methode nicht. Es gelang wohl ein qualitativer Nachweis, die quantitative Bestimmung der Eier und Larven war aber wegen der unzureichenden Zertrümmerung der Zysten mangelhaft. Die im folgenden beschriebene Technik basiert auf dem gleichen Prinzip der Isolierung in einer Zuckerlösung, die einzelnen Arbeitsgänge sind aber abgeändert worden.

**Material und Methode**

Im Arbeitsgang 1 (s. Abb. 1) werden über ein Sieb mit einer Maschenweite von 100 µm alle feinen Bodenbestandteile abgetrennt. Bewährt hat sich dabei ein 5-l-Eimer aus Kunststoff, dessen Boden herausgeschnitten und durch ein Sieb ersetzt wird. Die Erde wird mit Hilfe einer Düse so lange gespült, bis nur noch Zysten und Bodenpartikel über 100 µm Durchmesser im Eimer zurückbleiben. Anschließend wird der Inhalt des Eimers in einen Zentrifugenbecher gespült (2), mit ca. 6 g Kaolin versetzt und mit einem Vibrationsmischer gut durchmischt (3). Dann wird bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von 1800 g für 5 min zentrifugiert (4). Dabei sedimentieren zuerst Bodenbestandteile und Zysten,

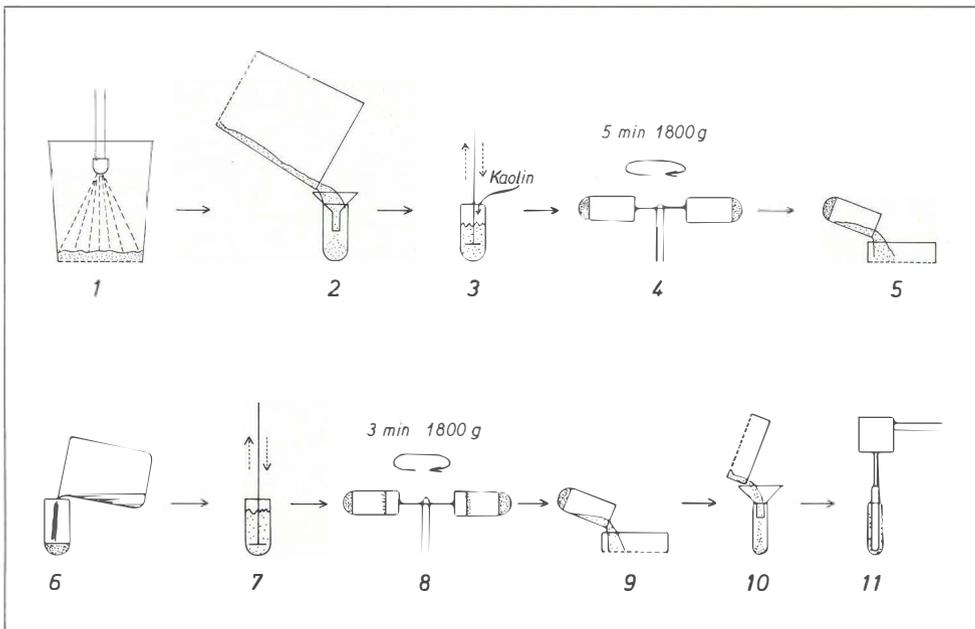


Abb. 1. Arbeitsgang beim verbesserten Extraktionsverfahren für *Heterodera schachtii*.

zuletzt das Kaolin. Es deckt dadurch den Bodensatz gut ab und verhindert sein Wegschwimmen beim anschließenden Ausgießen des überstehenden Wassers. Da ein Teil der Zysten nicht absinkt, sondern am Rand des Bechers festhaftet, wird das überstehende Wasser nicht weggeschüttet. Der Becher wird vielmehr mit einer drehenden Bewegung auf ein 50 µm-Sieb entleert (5), welches bei einem späteren Arbeitsgang (9) weiter zu verwenden ist. Nun wird eine Zuckerlösung der Dichte 1,2 in den Zentrifugenbecher gefüllt (6) und mit Hilfe des Vibromischers gut mit dem Bodensatz verrührt (7). Anschließend wird für 3 min bei 1800 g zentrifugiert (8), wobei Bodenbestandteile und Zysten getrennt werden. Die auf der Zuckerlösung schwimmenden Zysten lassen sich dann auf das 50 µm-Sieb gießen (9) und mit einem feinen Wasserstrahl von der Zuckerlösung reinigen. Schließlich werden sie in ein 20 ml fassendes Reagenzglas aus Kunststoff überführt (10), in welches die Walze eines Zystenzertrümmers hineinpaßt (GOFFART, 1955). Die rotierende Walze zerstört die Zysten (11), Eier und Larven werden frei und können gezählt werden.

Bei Routineuntersuchungen wird eine aus zahlreichen Einstichen bestehende Sammelprobe extrahiert, deren Menge durch die Größe der Zentrifugenbecher begrenzt ist. Bei den hier dargestellten, vergleichenden Untersuchungen wurde von einer Mischprobe ausgegangen. Die Böden A, B und C wurden verseuchten Ackerflächen entnommen, sehr gründlich gemischt und dann in 20 bzw. 30 Proben von je 150 g aufgeteilt. Alle Ergebnisse sind auf 100 g Boden umgerechnet.

**Ergebnisse**

*Boden A*

Die Tab. 1 und 2 geben den Vergleich zwischen Zentrifugation, Fenwickkanne und Seinhorstkanne wieder. Hierbei wurde abweichend von der empfohlenen Methodik der nach dem Zentrifugieren in Zuckerlösung vorliegende Bodensatz noch auf Zysten untersucht. Dieser wie bei der Fenwick- bzw. Seinhorstkanne per Hand durchgeführte Arbeitsgang wird in den Tabellen als „mit Nachsuchen“ bezeichnet. Es zeigte sich, daß im Bodensatz im allgemeinen weniger als 5% der „ohne Nachsuchen“ gefundenen Zysten vorhanden sind.

Tabelle 1. Aus Boden A extrahierte Zysten

	Zentrifugation mit Nachsuchen	Fenwickkanne	Seinhorstkanne
Mittelwert der Anzahl Zysten in 100 g Boden*)	59,1	54,0	39,6
Minimum/Maximum an Zysten	45/76	43/71	29/55
Standardabweichung	8,5	6,8	7,9
Variationskoeffizient	14	13	20
Zahl der Wiederholungen	20	20	20

\*) GD 5% = 4,8; 1% = 6,4.

Die Tab. 1 zeigt für die Zentrifugation signifikant höhere Zystenzahlen als die beiden Schlämmverfahren. Der gefundene Wert kann annähernd als die tatsächlich vorhandene Verseuchung mit Zysten angesehen werden, da sich mit dieser

Tabelle 2. Aus Boden A extrahierte Eier und Larven.

	Zentrifugation mit Nachsuchen	Fenwickkanne	Seinhorstkanne
Mittelwert der Anzahl Eier + Larven in 100 g Boden*)	9290	7060	7245
Minimum/Maximum der Eier + Larven	6600/12 800	5100/9800	5100/9900
Standardabweichung	1904	1397	1786
Variationskoeffizient	20	20	25
Zahl der Wiederholungen	20	20	20

\*) GD 5% = 1080; 1% = 1436.

Methode unter Einschluß des Nachsuchens wahrscheinlich alle Zysten erfassen lassen. Das ist mit der Fenwick- bzw. Seinhorstkanne offensichtlich nicht möglich. Offen bleibt dabei, ob Zysten bereits in der Kanne beim Ausschlämmen verloren gehen oder erst beim anschließenden Aussuchen nicht gefunden werden.

Die Zahlen der Eier und Larven in Tab. 2 korrelieren nicht gut mit den Zystenzahlen der Tab. 1. Wahrscheinlich erfaßt die Fenwickkanne zwar viele leere Zysten, einige gut gefüllte Exemplare gehen aber verloren.

*Boden B*

Der in Tab. 3 dargestellte Vergleich gibt Aufschluß über den Teil des Infektionspotentials, der bei der Zentrifugation im Bodensatz verbleibt. Die deutlich höhere Ausbeute in der Spalte „mit Nachsuchen“ zeigt, daß auch hier einige junge, gut gefüllte Zysten verloren gehen. Der ohne Nachsuchen extrahierte Anteil erreicht aber trotzdem den mit der Seinhorstkanne erzielten Wert.

*Boden C*

Die Böden A und B wurden direkt nach einer Rübenkultur entnommen und enthielten zahlreiche gut gefüllte Zysten. Boden C wurde dagegen zwei Jahre nach dem letzten Rübenanbau genommen, als bereits zweimal Getreide in der Fruchtfolge stand. Dies ist der in der Praxis übliche Zeitpunkt, wenn es um die Entscheidung geht, ob ein erneuter Rübenanbau möglich ist. Aus den Zysten solcher Böden ist ein Teil der

Tabelle 3. Aus Boden B extrahierte Eier und Larven.

	Zentrifugation m. Nachsuchen	Zentrifugation o. Nachsuchen	Seinhorstkanne
Mittelwert der Anzahl Eier + Larven in 100 g Boden*)	7589	5945	5678
Minimum/Maximum der Eier + Larven	5490/10 431	2880/10 553	2580/9300
Standardabweichung	1271	1782	1422
Variationskoeffizient	17	30	25
Zahl der Wiederholungen	30	30	30

\*) GD 5% = 770; 1% = 1023.

Tabelle 4. Aus Boden C extrahierte Eier und Larven

	Zentrifugation m. Nachsuchen	Zentrifugation o. Nachsuchen	Seinhorst- kanne
Mittelwert der Anzahl Eier + Larven in 100 g Boden*)	9019	9218	7596
Minimum/Maximum der Eier + Larven	7626/10 860	7680/12 000	5180/9954
Standard- abweichungen	1095	1696	1283
Variations- koeffizient	12	18	17
Zahl der Wiederholungen	20	16	20

\*) GD 5% = 760; 1% = 992.

Larven bereits geschlüpft. Aus Tab. 4 geht hervor, daß die Ausbeute hier durch Nachsuchen nicht mehr erhöht werden kann.

## Diskussion

Die Ergebnisse der Extraktion des Bodens A lassen erkennen, daß die Zystenanzahl kein geeignetes Maß für die Verseuchung eines Feldes mit *H. schachtii* ist. Mit der Fenwickkanne wurden deutlich mehr Zysten gefunden als mit der Seinhorstkanne, die Zahl der Eier und Larven war aber nicht höher. Wesentlich krasser wird das Mißverhältnis bei den in den Tabellen nicht wiedergegebenen Einzelwerten. So waren z. B. in 43 Zysten 9900 Eier und Larven, in 67 Zysten aber nur 6100. Dieser Befund bekräftigt die schon mehrfach erhobene Forderung, die Verseuchung nur als Zahl der Eier und Larven anzugeben.

Überraschend sind die bei mehrfacher Extraktion einer sehr gut gemischten Probe auftretenden Schwankungen der Einzelwerte. Sie weichen bei 20 bzw. 30 Wiederholungen um 100% und mehr voneinander ab, und dies bei allen drei geprüften Methoden! Verschiedene Fehler könnten zu dieser Variabilität führen: 1. Die Verteilung der Nematoden in der Mischprobe ist unvollkommen, die Einzelproben sind also von vornherein ungleich verseucht; 2. Das Extraktionsverfahren arbeitet ungleichmäßig; 3. Beim Auszählen der Larvensuspension treten Fehler auf. Wahrscheinlich sind alle drei Ursachen am Gesamtfehler beteiligt, wobei über die Punkte 1 und 2 quantitativ wenig ausgesagt werden kann. Beim Zählen der Larvensuspension müßten die Werte wiederholter Auszählungen derselben Probe der Poisson-Verteilung entsprechen. Werden in einem Aliquot 100 Tiere gezählt, so ist ein Fehler von 10% zu erwarten (SOUTHEY, 1974). Da die Larvensuspensionen so eingestellt wurden, daß sich in dem Aliquot von 1 ml etwa 100

Eier und Larven befanden, kann für diese Untersuchungen ein Fehler von 10% für das Auszählen angenommen werden. Der ausschließlich durch die Extraktion bedingte Fehler verringert sich also mindestens um diesen Prozentsatz.

Der Variationskoeffizient bei der Extraktion in der Zentrifuge lag im Mittel bei 20 und damit etwa im Bereich der Vergleichsverfahren. Mit der beschriebenen Methode „ohne Nachsuchen“ kann zumindest die Effektivität der Fenwick- bzw. Seinhorstkanne erreicht werden. Dabei wird bewußt in Kauf genommen, daß einige Zysten verloren gehen, wenn die Untersuchung direkt nach der Kultur von Wirtspflanzen des Rübennematoden erfolgt. In der Praxis werden Bodenuntersuchungen erst vor dem Rübenanbau durchgeführt, die letzte Rübenkultur liegt dann drei oder mehr Jahre zurück. Da in dieser Situation aus allen Zysten bereits ein Teil der Larven geschlüpft ist, können in der Zentrifuge dann praktisch alle Zysten erfaßt werden. Die Effektivität übertrifft dann auch „ohne Nachsuchen“ deutlich die der beiden Vergleichsverfahren. Als größter Vorteil ist hervorzuheben, daß das zeitraubende, mit einem subjektiven Fehler behaftete Aussuchen der Zysten entfällt.

## Literatur

- BAUNACKE, W., 1922: Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung des Rübennematoden *Heterodera schachtii* Schmidt. Arb. Biol. Reichsanstalt **11**, 185-288.
- BUHR, H., 1954: Untersuchungen über den Kartoffelnematoden. 1. Die „Papierstreifen-Methode“, ein vereinfachtes Verfahren zur Untersuchung von Bodenproben auf ihren Besatz mit Nematodenzysten. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Berlin) **8**, 45-48.
- CAVENESE, F. E. and H. J. JENSEN, 1955: Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. Proc. Helminth. soc. Wash. **2**, 87-89.
- FENWICK, D. W., 1940: Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. Journ. Helm. **18**, 155-172.
- GOFFART, H., 1958: Methoden zur Bodenuntersuchung auf zystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **10**, 50-53.
- GOORIS, J. and C. J. D'HERDE, 1972: A method for the quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. from soil. State Nematology and Entomology Research Station, 9220 Merlebeke, Belgium.
- JONES, F. G. W., 1955: Quantitative methods in nematology. Ann. appl. Biol. **42**, 372-381.
- KERRY, B. R., 1975: The extraction of cysts of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, from soil. Nematologica **21**, 163-168.
- SEINHORST, J. W., 1964: Methods for the extraction of *Heterodera* cysts from not previously dried soil samples. Nematologica **10**, 87-94.
- SOUTHEY, J. F., 1974: Methods for detection of potato cyst nematodes. Eppo Bull. **4**, 463-473.
- TRUDGILL, D. L., K. EVANS and G. FAULKNER, 1972: A fluidising column for extracting nematodes from soil. Nematologica **18**, 469-475.
- VALLOTTON, R. et J.-J. PERRIER, 1977: Extraction des kystes et des nématodes libres par un décanteur à contre-courant. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. **9**, 261-266.