

**Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt
für Land- und Forstwirtschaft
Berlin-Dahlem**

Heft 240

März 1988



**Untersuchungen zur Kontamination von
Rohtorfen und gärtnerischen Anzuchterden
mit dem Erreger der Kohlhernie,
*Plasmodiophora brassicae***

Von

Dr. Peter Mattusch, Thomas Botz und
Prof. Dr. Willy Hilgenberg

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau,
Braunschweig
und
Botanisches Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Frankfurt/Main

Berlin 1988

*Herausgegeben
von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Berlin-Dahlem*

Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
Lindenstraße 44-47, D-1000 Berlin 61

ISNN 0067-5849

ISBN 3-489-24000-6

CIP-Titelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Mattusch, Peter:

Untersuchungen zur Kontamination von Rohstoffen und gärtnerischen Anzuchtmedien mit dem Erreger der Kohlhernie, *Plasmodiophora brassicae* / von Peter Mattusch, Thomas Botz u. Willy Hilgenberg. – Hrsg. von d. Biolog. Bundesanst. für Land- u. Forstwirtschaft Berlin-Dahlem. – Berlin; Hamburg: Parey [in Komm.] 1988.

(Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem; H. 240)
ISBN 3-489-24000-6)

NE: Botz, Thomas.; Hilgenberg, Willy.; Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft <Berlin, West; Braunschweig>:
Mitteilungen aus der . . .

Die Arbeiten wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft über die Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen gefördert (AIF-Forschungsvorhaben Nr. 5670).

© Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funkübertragung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Werden einzelne Vervielfältigungsstücke in dem nach § 54 Abs. 1 UrhG zulässigen Umfang für gewerbliche Zwecke hergestellt, ist an den Verlag die nach § 54 Abs. 2 UrhG zu zahlende Vergütung zu entrichten, die für jedes vervielfältigte Blatt 0,40 DM beträgt.

1988 Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, Lindenstraße 44-47, D-1000 Berlin 61.
Printed in Germany by Arno Brynda GmbH, 1000 Berlin 62.

Beilagenhinweis: Dieser Ausgabe liegt der Prospekt "Forstwirtschaft 1988" des Verlages Paul Parey, Berlin und Hamburg, bei.

Inhalt	Seite
Einleitung	5
1. Untersuchung von Rohtorfproben	6
2. Untersuchung von Anzuchterden	10
3. Wege der Verseuchung mit dem Kohlhernieerreger	13
4. Windverfrachtungsuntersuchungen	16
5. Wassertransportuntersuchungen	21
6. Situation nach dem Verfrachten	21
7. Verbesserung der Testmethodik	25
7.1. Steigerung der Aussagekraft des bisherigen Biotests	25
7.2. Nachweisgrenze des Biotests	28
7.3. Entwicklung einer neuartigen Nachweismethode	30
7.4. Kurzbeschreibung des Analyseverfahrens mit Zeitplan	50
8. Zusammenfassung	52
Summary	53
9. Literatur	54
Danksagung	56

Investigations on the infestation of peat and horticultural substrates with the clubroot causing fungus *Plasmodiophora brassicae*

Content	
Introduction	5
1. Testing of peat samples	6
2. Testing of culture substrates	10
3. Ways of infestation	13
4. Wind transport experiments	16
5. Water transport experiments	21
6. Situation after the transport of the pathogen	21
7. Improvement of the test method	25
7.1. Increase of the evidence of the common bioassay	25
7.2. Limitation of the bioassay	28
7.3. Development of a new method for the detection of the pathogen	30
7.4. Short description of the method	50
8. Summary	53
9. Literature	54
Acknowledgement	56

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt, Heft 240,
März 1988

Bitte kleben Sie diese neue S.3 wegen eines Fehlers im Inhalts-
verzeichnis in das Heft 240 ein.

Danke!

Einleitung

Die Kohlhernie, Erreger: *Plasmodiophora brassicae*, muß trotz jahrelanger Bemühungen um geeignete Bekämpfungsmaßnahmen auch heute noch als eine der gefährlichsten Krankheiten der Kreuzblütler wie Kohl (*Brassica oleracea*), Raps (*B. napus*), Stoppelrüben (*B. campestris*) angesehen werden. Vor allem im intensiven Kohlanbau ist der Erreger örtlich zu einem anbaubegrenzenden Faktor geworden, da die Betriebsgrößen keine langfristige Fruchtfolge zulassen, wodurch anfänglich geringe Verseuchungsgrade der Böden zu hohen Befallswerten bei den Kohlarten führen können.

Schon vor vielen Jahren kamen aus der Praxis Meldungen über Kohlherniebefall bereits in der Jungpflanzenanzucht. Recht bald wurde der Verdacht geäußert, der Krankheitserreger sei möglicherweise über die vom Handel vertriebenen Anzuchterden auf Torfbasis in die Betriebe eingeschleppt worden.

Einzelne belegte Fälle konnten seinerzeit aufgrund fehlender Informationen über Herkunft der jeweiligen Anzuchterde nicht im Detail nachvollzogen werden, da Belegproben des strittigen Materials nicht zur Verfügung standen.

Da die Diskussion in der Praxis jedoch anhielt, wurde im Jahre 1982 vom Forschungsinstitut der Deutschen Torfwirtschaft, der Torfforschung GmbH in Bad Zwischenahn, bei der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen (AIF) ein Antrag auf Forschungsmittel gestellt, der im darauffolgenden Jahr bewilligt und zur Durchführung dem seinerzeit noch in Hürth-Fischenich ansässigen Institut für Pflanzenschutz im Gemüsebau der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft übertragen wurde. Der zunächst auf zwei Jahre befristete Forschungsauftrag konnte unter Einhaltung des Kostenansatzes um 6 Monate verlängert werden. Hierdurch bestand die Möglichkeit, Teilbereiche der Arbeiten zu einem gesicherten Abschluß zu bringen.

Nachfolgend soll über die im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Untersuchungen berichtet werden.

1. Untersuchung von Rohtorfproben verschiedener Herkunft

Insgesamt wurden 1007 Rohtorfproben eingetragen und dem in Abschnitt 7 beschriebenen Biotest unterzogen. Die Auswahl der Probenahmegebiete erfolgte in Abstimmung mit dem Zuwendungsempfänger, der Torfforschung GmbH, und konzentrierte sich auf Abtorfgebiete in denen Torf zur Anzuchterdeproduktion gewonnen wird. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die Herkunft der Proben.

Jede Probe setzte sich aus 15-20 Einzelproben zusammen, die sich über eine Strecke von etwa 50 m eines Probenahmeortes (z.B. Schwarztorfwall) verteilten. Das Volumen einer Gesamtprobe betrug 30-35 l.

Mit diesen 1007 Proben wurden insgesamt 1185 Tests durchgeführt, da sich wiederholt die Notwendigkeit ergab, die sogenannten Belegproben (ab 1984 wurde der jeweilige Probenumfang so bemessen, daß zwei Tests damit durchgeführt werden konnten) erneut zu untersuchen. Sofern möglich, wurden Probenahmeareale mit Kohlhernieverdacht aufgrund des ersten Testdurchgangs erneut beprobt. Um die Rohtorfproben als Substrat für den Biotest verwendbar zu machen, wurden sie pro Liter mit 1,5 g PG-Mix (siehe Abschnitt 7) sowie 3 bzw. 6 g CaCO_3 (Weißtorf bzw. Schwarztorf) aufgedüngt und bei Bedarf entsprechend angefeuchtet. Orientierungshalber wurden vor der Verarbeitung sowohl der pH-Wert als auch die Leitfähigkeit als Hinweis auf den Salzgehalt der Probe gemessen. Die nachstehende Tabelle 2 faßt die Ergebnisse nach Probenahmegebieten zusammen. Die Resultate der Kohlhernietests der Einzelproben können auf Anfrage *) zugesandt werden.

Insgesamt war also bei 3,0 % der Rohtorfproben nach dem ersten Durchgang ein Verdacht auf Kohlhernieverseuchung gegeben. Im anschließend durchgeführten zweiten Test der Belegproben bzw. nach erneuter Beprobung der verdächtigen Areale konnte jedoch nur bei 12 Proben (1,2 % aller Rohtorfproben) die Kontamination mit den Dauersporen des Kohlhernieerregers bestätigt werden. Diese 12 Proben stammten wiederum von fünf Flächen, die jedoch durchweg zu den Kleinabtorfern zu rechnen waren, deren Rohware häufig von solchen Substratproduzenten aufgekauft wird, die keine eigenen Abtorfgebiete besitzen.

*) Torfforschung GmbH, Bachstelzenweg 4, 2903 Bad Zwischenahn

Tab. 1: Probenahmegebiete, Probenzahl und Probentypen der Roh-
torfuntersuchungen

Probenahmegebiet	WT	ST	ÜT	WT/Bunk	ST/Bunk	Bunk	WT/ST
Bayern	0	0	188	0	0	10	0
Landkreis Cloppenburg	143	41	0	5	0	11	11
Landkreis Diepholz	18	0	0	32	0	0	0
Landkreis Emsland	75	196	0	29	104	6	5
Landkreis Rotenburg/Wümme	69	12	0	49	1	0	2
Summe	305	249	188	115	105	27	18

WT = Weißtorf

ST = Schwarztorf

ÜT = Übergangstorf

Bunk = Deckschicht vor dem erstmaligen Abtorfen bzw. dem erneuten
Abtorfen, nachdem die Fläche längere Zeit geruht hat

Tab. 2: Kohlhernietestergebnisse der Rohtorfproben

Abtorfgebiet	Kohlhernieverdacht nach 1. Test	Bestätigungen nach 2. Test
Bayern	9	0

Landkreis Cloppenburg	5	0

Landkreis Diepholz	1	0

Landkreis Emsland	15	12

Landkreis Rotenburg/Wümme	0	entfällt

SUMME	30	12

Die Verseuchungsgrade lagen gemessen am Befall der Pflanzen im Biotest bei 3 - 97 %. Die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Befallswerte ist in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Verseuchungsgrade der Rohtorfproben

Prozent Befall der Testpflanzen	Anzahl Proben incl. Wiederholungstests
≦ 5	24
6 - 10	5
11 - 20	7
21 - 30	0
31 - 40	1
41 - 50	0
51 - 60	1
61 - 70	0
71 - 80	2
81 - 90	0
≧ 90	2

Wenn bereits einzelne Proben derart hohe Verseuchungsgrade aufweisen, muß hierin eine erhebliche Gefahr für das daraus hergestellte Substrat gesehen werden.

Aus der Tatsache, daß in den Verdachtsfällen aus den größeren Abtorfbetrieben, die Belegproben bzw. die Wiederholungsproben keine Verseuchung mit den Dauersporen des Kohlhernieerregers aufwiesen, darf nicht geschlossen werden, daß es sich bei den Werten aus den ersten Biotests um 'hausgemachte', d.h. durch unsauberes Arbeiten bei der Versuchsanstellung bedingte Ergebnisse handelt. Wiederholungsprobenahmeaktionen fanden das Probenahmeareal meist in verändertem, durch die Bearbeitung im jeweiligen Torfgewinnungsbetrieb verursachtem Zustand vor. Wälle waren für die Verarbeitung abgefahren, erneutes Fräsen oder Baggern hatte stattgefunden.

Hieraus sollte der Schluß gezogen werden, daß in Verdachtsfällen,

die an den jeweiligen Produzenten aus der Praxis herangetragen werden, aufgrund der Partienummer nachvollzogen werden muß, aus welchem Abtorfgebiet das Rohmaterial stammte. Sofern möglich, sind zur Beweissicherung sofort einige repräsentative Mischproben heranzuziehen.

2. Untersuchung von Anzuchterden

Unter tatkräftiger Unterstützung durch verschiedene Berater des Pflanzenschutzdienstes der Länder konnten 238 Proben verschiedener Anzuchterden gezogen werden, mit denen insgesamt 283 Tests durchgeführt wurden.

Bei dem Untersuchungsmaterial handelte es sich einerseits um industriell hergestellte Fertigsubstrate von verschiedenen Substratproduzenten, andererseits aber auch um Rohtorfe aus bäuerlichem Torfabbau. Letztere werden von den endverbrauchenden Gemüsebaubetrieben von im Gebiet ansässigen Abtorfern, die meist nur sehr kleine Flächen besitzen, gekauft und dann nach betriebseigenen Gesichtspunkten gedüngt und gemischt. Tab. 4 gibt eine Übersicht über die Herkunft der Anzuchterdeproben.

Von diesen 238 Proben zeigten im ersten Biotest 48 Befall (20 %) an den Testpflanzen. 18 dieser Ersttest-Verdachtsfälle (7,6 %) konnten anhand der Testung der Belegproben bzw. nach erneuter Beprobung der entsprechenden Partie im Endverbraucherbetrieb bestätigt werden. Leider war nicht in allen Fällen eine Wiederholungsbeprobung möglich, da die Substrate in den Herkunftsbetrieben bereits verbraucht worden waren.

Die Verseuchungsgrade variierten sehr stark und erreichten im Extremfall 98 % Befall bei den Testpflanzen. Die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Befallswerte als Maßstab für den Verseuchungsgrad ist aus Tab. 5 zu entnehmen.

In allen Fällen wurde der Versuch unternommen, die Herkunft der Verseuchung nachzuvollziehen, wobei deutlich wurde, daß mangelnde Phytohygiene bei der Substratlagerung als Ursache der Verseuchung nicht auszuschließen war. Schlüsselt man alle Proben danach auf, ob im Herkunftsbetrieb (Endverbraucher) der Krankheitserreger bereits vorhanden war oder nicht so ergibt sich nachstehende Verteilung (Tab.6).

Tab. 4: Herkunft der Anzuchterden und Torfe für die betriebseigene Substratherstellung

Gebiet	Anzahl Proben	Anzahl Herkünfte
Landwirtschafts- kammer Rheinland	78	15
LK Westfalen-Lippe	23	8
Gemüsebauberatungsring Papenburg	75	28
Bezirkspflanzen- schutzamt Pfalz	15	4
Fertigsubstrate aus Herstellerbetrieben (Probenahme durch Mitarbeiter der Torfforschung Bad Zwischenahn)	38	17

Tab. 5: Verseuchungsgrade der Fertigsubstrate bzw. Rohmaterialien für die betriebseigene Substratherstellung

Prozent Befall der Testpflanzen	Anzahl Proben
≤ 5	23
6 - 10	7
11 - 20	4
21 - 30	7
31 - 40	0
41 - 50	2
51 - 60	3
61 - 70	0
71 - 80	0
81 - 90	1
≥ 90	1

Tab. 6: Aufschlüsselung der Anzuchterdeproben auf der Basis "Erreger beim Endverbraucher bereits aufgetreten oder nicht"

Herkunftsstatus der Proben	Anzahl Proben	
	Kohlherniebefund	
	positiv %	negativ %
Kohlhernie + / Handelssubstrat	28	72
Kohlhernie - / Handelssubstrat	14	86
Kohlhernie ? / Handelssubstrat	18	82
Kohlhernie o / Abtorfer/Händler	16	84

+ = Erreger beim Substrat-Endverbraucher bereits aufgetreten

- = Erreger beim Substratendverbraucher noch nicht aufgetreten

? = keine Angaben möglich

o = entfällt

Es war also bei der Kategorie "Kohlhernie bereits im Betrieb aufgetreten/Handelssubstrat" ein etwas höherer Prozentanteil kontaminierter Proben feststellbar.

3. Wege der Verseuchung mit dem Kohlhernieerreger

Neben den bereits geschilderten umfangreichen Probenahmeaktionen in verschiedenen Torfabbaugebieten Nord- und Süddeutschlands beinhalteten die Arbeiten auch Untersuchungen zur Frage, wie Pflanzenkrankheitserreger und speziell der Kohlhernieerreger in Torflagerstätten eingetragen werden können und welche weiteren Gefahren der Verseuchung der Rohmaterialien und Verarbeitungsprodukte auf dem Weg vom Hersteller zum Endverbraucher -sprich Gartenbaubetrieb- in Betracht gezogen werden müssen.

Nachfolgend sind einige mögliche oder denkbare Wege der Verseuchung zusammengestellt (Tab. 7)

Tab. 7: Wege der Verseuchung von Torfgewinnungsstätten

(1) Rohrtorf aus zentralen Moorlagen

Windverfrachtung verseuchten Bodenmaterials über große Entfernungen
Extensive Beweidung (Kot von Weidetieren)
Wildwechsel (Losung von Wildtieren)

(2) Rohrtorf aus Randlagen der Moore

Landwirtschaftliche Vornutzung
Beweidung
Grünlandnutzung mit Gülleausbringung
Windverfrachtung aus benachbarten Kohlherniebefallsflächen

(3) Torf während der Gewinnung und Verarbeitung

(a) beim Torfgewinnungsbetrieb

- unsaubere Gewinnung etwa durch Befahren verseuchter Areale vor der Rohmaterialgewinnung
- unsaubere Lagerung
- unsaubere Zuschlagstoffe

(b) beim Endverbraucher

- unsaubere Lagerung im Einflußbereich kontaminierter Betriebsflächen
- Beimischen betriebseigener, unsterilisierte Erde
- Verwendung unsauberer Anzuchtgefäße
- Gießen mit unsauberem Wasser

Zu Tab. 7 (1): Rohtorf aus zentralen Lagen der in Abtorfung befindlichen Moore

Auf den ersten Blick erscheinen diese Areale am wenigsten gefährdet, vor allem wenn ausgeschlossen werden kann, daß die Flächen vom Mensch noch nicht für den extensiven Weidebetrieb verwendet wurden. Der Weg der Ausbreitung der Dauersporen von Plasmodiophora brassicae über den Kot von Rindern oder Schafen, die Befallsmaterial durch die Zufütterung von Herbst- oder Stoppelrüben (*Brassica campestris* var. *rapa*) bzw. Kohlrüben (*Brassica napus* var. *napobrassica*) aufgenommen haben, ist aufgrund der bereits seit längerem bekannten Tatsache möglich, daß die Dauersporen die Passage durch den Verdauungstrakt der Tiere unbeschadet überstehen (Gibbs 1931). Diese Gefahr ist auch dann noch gegeben, wenn die erwähnten Wirtspflanzen vor der Verfütterung siliert werden, da nach eigenen Untersuchungen selbst nach einer sechsmonatigen Silierdauer die Dauersporen des Kohlhernieerregers nicht abgetötet waren (Mattusch und Theune 1978).

Einen weiteren denkbaren Weg stellt für diesen Bereich die Windverfrachtung von Bodenpartikeln mit anhaftenden organischen Materialien einschließlich Dauersporen des Kohlhernieerregers dar, da die Moore ja vielfach in Regionen eiszeitlicher Sandablagerung liegen und in diesen Gebieten durch landwirtschaftliche Nutzung die jahreszeitlich bedingten Brachflächen stark der Winderosion ausgesetzt sind.

Zu Tab 7 (2): Rohtorf aus Randlagen der Moore

Diese Zonen erscheinen am gefährdetsten, da hier vielfach extensive Nutzung durch den Menschen erfolgt ist und u.U. in unmittelbarer Nachbarschaft landwirtschaftlich genutzte Flächen auf verseuchtem Mineralboden liegen. Denkbare Ausbreitungswege sind auch hier die Weide- und Grünlandnutzung mit Ausbringung von Gülle, da letztere natürlich ebenfalls mit den Dauersporen des Erregers verseucht sein kann. Darüber hinaus muß in diesem Fall der Windverfrachtung von Mineralboden von kohlhernieverseuchten Flächen ganz besondere Beachtung geschenkt werden, da die räumliche Entfernung zu den der Winderosion ausgesetzten Befallsflächen wesentlich geringer ist als bei den zentralen Moorlagen.

Zu Tab. 7 (3): Torf während der Gewinnung und Verarbeitung
Im Torfgewinnungsbetrieb muß darauf geachtet werden, daß die Transportfahrzeuge oder andere Gerätschaften vor ihrem Einsatz nicht mit verseuchten Flächen in Berührung kommen. Die Lagerung des Rohmaterials im Verarbeitungswerk hat so zu erfolgen, daß auch hier der Kontakt mit verseuchten Arealen vermieden wird. Die Gewinnung von Zuschlagstoffen wie z.B. Sand hat nur aus absolut befallsfreien Regionen zu erfolgen.

Wird dieses Material zugekauft, sind die Quellen unter diesen Gesichtspunkten auszuwählen wobei auch darauf zu achten ist, daß die Abbauareale nicht im Versickerungsbereich des Oberflächenwassers liegen, das von verseuchten Flächen abfließt, da die Verfrachtung der Dauersporen mit dem Wasser ebenfalls eine Rolle spielt.

Im Endverbraucherbetrieb ist gleichfalls der sauberen Lagerung außerhalb des Einflußbereiches von kohlhernieverseuchten Flächen besondere Beachtung zu schenken. Eine saubere betonierte Lagerfläche in windgeschützter Lage sollte eigentlich zur Grundausstattung der Gartenbaubetriebe mit eigener Anzucht gehören. Gelegentlich wird die vom Substrathersteller erworbene Erde auch nach betriebseigenen Rezepten mit Erde anderer Herkunft oder von eigenen Flächen aufbereitet. Hiervon sollte nur Gebrauch gemacht werden, wenn diese Zuschläge nachweislich befallsfrei sind oder vor ihrer Verwendung gedämpft oder anderweitig sterilisiert wurden.

Ein weiterer Weg der Einschleppung ist durch den Einsatz unsauberer Anzuchtkisten gegeben. Einwegkisten (z.B. sogenannte Pfirsichkisten) sollten nur einmal verwendet werden, sofern sie auf kohlhernieverseuchten Flächen zum Einsatz gekommen sind. Anzuchtkisten aus Kunststoff sind auf geeignete Art und Weise vor der Wiederverwendung zu reinigen.

Von der Verwendung ungereinigten Gieß- oder Beregnungswassers etwa aus Entwässerungsgräben muß dringend abgeraten werden sofern nicht auszuschließen ist, daß über Dränsysteme und zugehörige Vorfluter Kohlhernieerregerdauersporen in diese Gräben gelangen können.

Im Rahmen der Arbeiten zum vorliegenden Forschungsvorhaben konnten einige der oben angeführten Wege der Verseuchung anhand ent-

sprechender Untersuchungen belegt werden. Vorwiegende Untersuchungsobjekte waren zum einen die Windverfrachtung und zum anderen der Transport der Erregersporen mit dem Wasser.

4. Windverfrachtungsuntersuchungen

Die Windausbreitung von bodenbürtigen Pflanzenkrankheitserregern hat bisher zu wenig Beachtung gefunden, obwohl bereits Carruthers (1893) und Colhoun (1958) auf die Möglichkeit der Ausbreitung des Kohlhernieerregers durch den Wind hingewiesen hatten. Auch für Nematoden wurde die Ausbreitung durch den Wind bereits nachgewiesen (Carroll & Viglierchio 1981, Krnjaic & Krnjaic 1973, Orr & Newton 1971).

Wie bereits angedeutet, liegt der überwiegende Teil der Torfabaugebiete in Zonen eiszeitlicher Sandablagerung, in denen bei entsprechend trockener Witterung und beim Fehlen einer geschlossenen Pflanzendecke häufig sandsturmartige Verwehungen auftreten, die ganz erhebliche Mengen an Mineralboden verfrachten können. Es liegt auf der Hand, daß zusammen mit den vom Wind aufgewirbelten Bodenpartikeln sehr wohl auch Dauerorgane von Pflanzenkrankheitserregern wie Dauersporen des Kohlhernieerregers oder Zysten von Nematoden verweht und über große Strecken transportiert werden können.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Fallen gebaut, die in Winderosionsgebieten mit gleichzeitiger Verseuchung durch den Kohlhernieerreger aufgestellt wurden. Bei der Auswahl der Standorte wurden wir durch die örtlichen Pflanzenschutzdienststellen unterstützt. Die Abb. 1-3 zeigen die beiden Fallentypen.

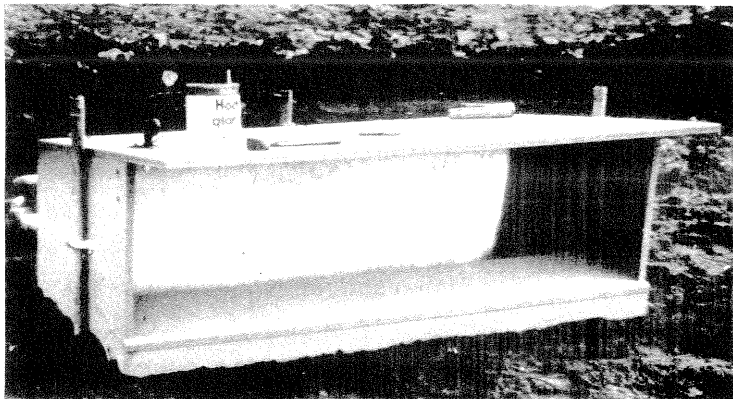


Abb. 1: Kastenfalle für den Fang des Winderosionsmaterials (Breite 120 cm, übrige Maße siehe Abb. 3)

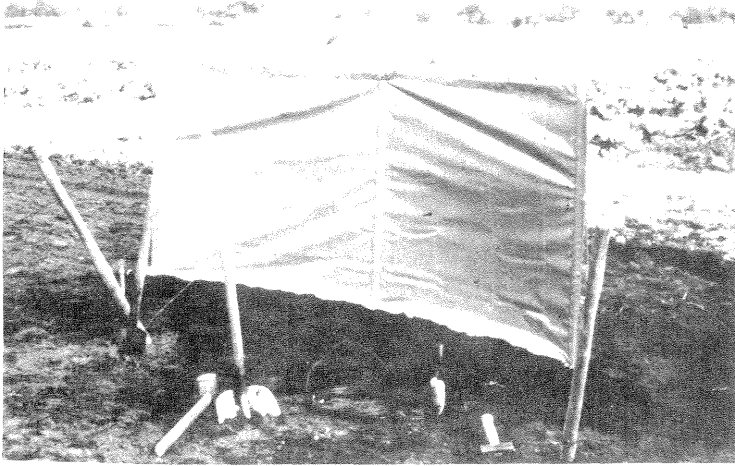


Abb. 2: Segel für den Fang des Winderosionsmaterials (Höhe 150 cm, Breite 300 cm)

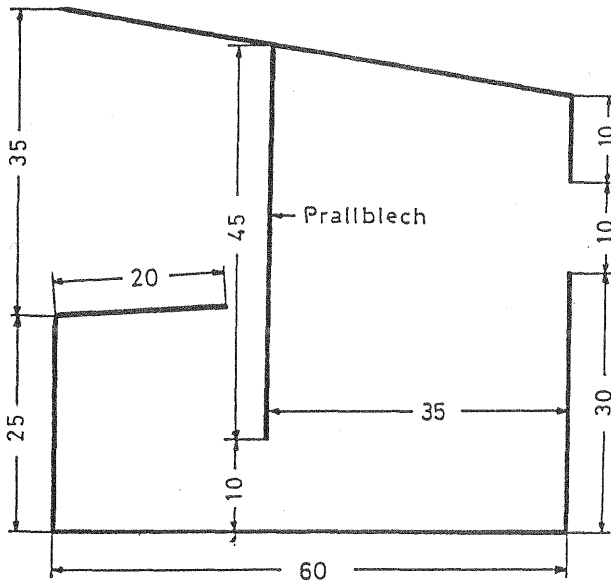


Abb. 3: Seitenansicht der Kastenfalle (Maße in cm)

Die Fallenstandorte wurden in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen kontrolliert und das eingewehte Material entnommen, an der Luft getrocknet, gewogen und anschließend in sterilisierten Weißtorf eingemischt. Die Mischung wurde hierauf dem Biotest unterzogen (s. Abschnitt 7).

Ein Teil verschiedener Proben wurde an die Bezirksstelle Meppen des Pflanzenschutzamtes der Landwirtschaftskammer Weser-Ems weitergegeben, die sie auf Zysten des Kartoffelnematoden untersuchte, da die Frage der Windausbreitung für diesen Schädling auch von erheblicher Bedeutung ist.

Die Tabellen 8 und 9 zeigen, welche Mengen verwehbaren Materials während der Untersuchungszeiträume und im Laufe eines Jahres in die Kastenfallen ein- bzw. an die Kunststoffsegel angeweht wurden und in welchen Fällen der Kohlhernieerreger bzw. der Kartoffelnematode nachgewiesen werden konnte.

Die Werte variieren deutlich von Standort zu Standort. Es muß jedoch bedacht werden, daß die jeweilige freie Windeinfallfläche recht unterschiedlich groß war.

Verdeutlicht man sich, welche Mengen an windverfrachtetem Material zusammenkommen, wenn z.B. die gesamte Breite einer dem Wind frei ausgesetzten Fläche als Fangfläche angesehen wird - etwa in Form eines Schwarztorfschütthaufens - so liegt es auf der Hand, daß der Ausbreitung bodenbürtiger Pflanzenkrankheitserreger durch den Wind besondere Beachtung gebührt.

Was die Verseuchung der verschiedenen Proben anbelangt, so konnte an allen Expositionsorten der Kohlhernieerreger nachgewiesen werden. Der Nachweis der Zysten des Kartoffelnematoden gelang nur an den Standorten an denen er bereits in der landwirtschaftlichen Praxis aufgetreten war.

Für eventuelle zukünftige Untersuchungen mit bodenbürtigen, windverfrachtbaren Krankheitserregern sollte die oben beschriebenen Kastenfalle oder eine ähnlich konzipierte Vorrichtung Verwendung finden, da die Witterungseinflüsse bei dem Kunststoffsegel zu deutlich geringeren Fangraten führten.

Tab. 8: Fallenfangergebnisse der Windverfrachtungsuntersuchungen

Zeitraum	Nordhorn-Klausheide			Papenburg		Geeste		
	Kasten 1 West	Kasten 2 Ost	Segel 1 West	Kasten 3 West	Segel 3 West	Kasten 4 West	Segel 4 West	Segel 5 Ost
Stand- dauer (d)	237	175	210	268	268	296	218	-
1983/84								
11/83-22.2.	-	-	-	-	-	-/100	-/100	-
17.4.- 4.7.	-	-	-	-	-	550/32	-	-
15.5.- 4.7.	96/5 *)	-	508/33	127/13	51/47	-	-	-
4.7.-16.8.	0/-	-	0/-	216/0	0/-	396/0	0/-	-
16.8.-24.8.	-	-	-	-	-	159/0	0/-	-
16.8.- 6.9.	30/0	21/0	212/0	835/0	26/-	-	-	-
24.8.- 6.9.	-	-	-	-	-	56/5	17/0	-
6.9.- 9.10.	17/0	0/-	1270/0	330/0	226/0	175/0	428/0	-
9.10.- 5.11.	113/0	77/0	defekt	84/0	167/0	258/0	96/18	-
5.11.- 6.12.	defekt	0/-	defekt	84/0	0/-	731/71	302/5	-
1985								
6.12.- 7.2.	46/0	42/0	0/-	68/0	71/0	216/11	243/5	0/-
7.2.- 7.3.	0/-	0/-	0/-	0/-	0/-	0/-	0/-	0/-
Summe (g)	302	140	1990	1744	541	2541	1086	
Menge/Tag (g)	1,3	0,8	9,5	6,5	2,0	8,6	5,0	
Menge/m ² Fang- fläche und Tag (g)	3,1	1,9	2,1	15,5	0,4	20,5	1,1	

*) Zahl vor Schrägstrich: Menge in Gramm
 Zahl hinter Schrägstrich: %-Kohlherniebefall im Biotest
 - = entfällt oder Wert nicht erfaßt
 d = Tage

Tab. 9: Mengen der windverfrachteten Bodenpartikel pro Jahr und m² Fangfläche (hochgerechnet) sowie jeweilige Verseuchung mit dem Kohlhernieerreger und dem Kartoffelnematoden

Standort	Falle	Menge kg	Kohl- hernie	Nema- toden	Exposi- tion	Windein- falls- fläche
KLAUSHEIDE Nordhorn	K 1	1,1	ja	nein	West	170-120 m *)
	S 1	0,8	ja	nein	West	dito
KLAUSHEIDE Nordhorn	K 2	0,7	nein	nein	Ost	dito
PAPENBURG	K 3	5,7	ja	nein	West	265-60 m
	S 3	0,2	ja	nein	West	dito
GEESTE/Meppen	K 4	7,5	ja	ja	West	400-200 m
	S 4	0,4	ja	ja	West	dito
LATHEN/Meppen	K 6	-	-	ja	West	-

*) 1. Zahl: Ausdehnung in Hauptwindrichtung
 2. Zahl: Ausdehnung quer zur Hauptwindrichtung

K = Kastenfalle
 S = Segel
 - = nicht erfaßt

5. Wassertransportuntersuchungen

Um der Frage nachzugehen, inwiefern die Dauersporen des Kohlhernieerregers mit dem Wasser übertragen werden können, wie es auch von Datnoff et al. (1984) berichtet wird, wurde eine Anzahl Wasserproben eingetragen und dem Biotest unterzogen (s. Abschnitt 7).

Als Probentypen wählten wir beispielsweise Bewässerungsteiche, Vorfluter von Dränflächen, größere Entwässerungsgräben aus denen teilweise Beregnungs- und Gießwasser entnommen wird sowie die in diese Gräben eingespeisten kleinen Gräben aus. Tab. 10 und 11 zeigen die Ergebnisse der Einzelproben bzw. eine Zusammenfassung der Resultate.

Die Ergebnisse machen deutlich, welche Gefahr der Einschleppung des Kohlhernieerregers in Anzuchterden, Anzucht- sowie Anbauflächen bei Verwendung von Wasser phytohygienisch bedenklicher Qualität und Herkunft besteht.

6. Situation nach dem Verfrachten

Zur Frage, was mit den vom Wind in die Abbauareale verfrachteten Dauersporen geschieht, sei an dieser Stelle nur angemerkt, daß diese Sporen aufgrund ihrer Beschaffenheit mehrere Jahre ohne Wirtspflanzen überdauern können. Örtlich wird von bis zu 20 Jahren berichtet. Der Schaderreger wird umso länger im Boden oder dem Substrat nachzuweisen sein, je höher die Ausgangsverseuchung war. Die in Abschnitt 7 beschriebenen Verdünnungsreihenversuche machen aber klar, bei welcher niedrigen Sporendichten unter günstigen Infektionsbedingungen noch Befallssymptome an den Wirtspflanzen erzeugt werden können. Besonders kritisch wird es dann sein, wenn das Areal der 'Ablagerung' bereits von Wirtspflanzen des Kohlhernieerregers besiedelt ist und die Dauersporen bei geeigneten Bedingungen (Wärme, hohe Bodenfeuchte) Infektionen setzen können.

Tastversuche zur Frage der vertikalen Verlagerung der Dauersporen in Torf erbrachten, daß beispielsweise durch ergiebige Niederschläge die Dauersporen in die unteren Schichten eines Torflagers eingewaschen werden können. Es ist klar, daß die mechanische

Durchmischung der Rohtorflager bei der Gewinnung der Torfe ebenfalls zu einer weiteren Ausbreitung der Kohlhernieerregersporen beitragen können.

Es kann den Torfgewinnungsbetrieben nur angeraten werden, Flächen, die in naher Zukunft zur Abtorfung vorgesehen sind und bei denen eine landwirtschaftliche Vornutzung nachgewiesen bzw. nicht ausgeschlossen werden kann, stichprobenartig zu untersuchen und bei dem geringsten Verdacht von den betreffenden Flächen eine ausreichend mächtige Schicht abzubunkern und den Bunk vollkommen getrennt von der Gewinnungsfläche zu lagern.

Tab. 10: Nachweis des Kohlhernieerregers in Wasserproben
(Einzelergebnisse)

Proben- herkunft	Kohlhernie %-Befall		
	(a)	(b)	(c)
<u>1. Probenahme (August 1983)</u>			
Kanalwasser (Splitting)	0	-	-
Bewässerungsteich	0	-	-
Misthaufensickerwasser	3	0	-
- - - - -			
<u>2. Probenahme (Oktober 1983)</u>			
Kanalwasser	14	-	-
Bewässerungsteich	3	-	-
<u>3. Probenahme (August 1984)</u>			
Einlaufstelle der Rettich- Waschanlage (Splitting)	1	0	-
-Schulz- Bewässerungsteich	1	0	-
Brunnenwasser (23 m tief)	0	0	-
Hauptfluter (Lärchenweg)	0	0	-
Vorfluter (Hochmoor/Lärchenw.)	0	0	-
Vorfluter (am Hof)	0	-	-
Ablaufrinne der Rettich- waschanlage -Vogel- Brunnenwasser	0 5	0 0	- -
Graben (mit Wasser Rettich- waschanlage)	3	0	-
Hauptfluter (Rüsselweg)	0	0	-
Bewässerungsgraben -Range- desgl., 2. Probenahmestelle	0 0	0 0	- -
Zapfstelle (Gewächshaus)	0	0	-

Fortsetzung Tab. 10

Proben- herkunft	Kohlhernie %-Befall		
	(a)	(b)	(c)
Ems-Seitenkanal	0	0	-
Bewässerungsgraben -Schrape- Kolk (Nähe Sportplatz)	0 3	0 0	- -
Entwässerungsgraben -Olberding, Surwold- desgl., 2. Probenahmestelle	0 10	0 10	- -
Splitting rechts (Papenburg) -Einspeisung Entwässerungs- graben Ahaus	0	0	-
-Einleitung Neckermann	0	0	-
-Einleitung Sparkasse	0	0	-
-Einleitung Old.LB/St.Marien	3	0	-
-Einleitung Haus 156	0	0	-
-Einleitung Haus 147/148	0	0	-
<u>Geeste/Meppen</u>			
Graben Nähe Falle /Westkante	0	0	-
Graben Nähe Falle /Nordkante	0	0	-
2. Graben Nähe Falle	0	0	-
<u>4. Probenahme (November 1984)</u>			
Wiederholung Bewässerungs- teich -Schulz-	3	Proben: keine Befall	
Graben am Gewächshaus	49	3	10
Splitting - Einlaufstelle der Rettichwaschanlage	85	100	99
Splitting Old. Landesbank	88	87	25
Entwässerungsgraben-Olberding-	75	78	90
Entwässerung östl.	21	8	0
Entwässerung nordwestl.	73	68	30
desgl. 2. Probenahmestelle	89	89	49

(a) 1. Biotest
(b) 2. Biotest
(c) 3. Biotest

Tab. 11: Nachweis des Kohlhernieerregers in Wasserproben
(Zusammenfassung)

Probennahmezeitpunkt und -ort	Kohlhernie- verseuchung	Verseuchungs- grad
<u>(1) August 1983</u>		
(Papenburg)		
Kanalwasser (Splitting)	nein	-
Bewässerungsteich	nein	-
Misthaufensickerwasser	ja	gering
- - - - -		
<u>(2) Oktober 1983</u>		
(Papenburg)		
Kanalwasser	ja	mittel
Bewässerungsteich	ja	gering
- - - - -		
<u>(3) August 1984</u>		
(Papenburg)		
27 Proben		
aus Splitting	ja	gering
- - - - -		
<u>(4) November 1984</u>		
(Papenburg und Geeste)		
10 Proben	ja	stark
	(7 Proben)	

gering = weniger als 10 % Kohlherniebefall an den Testpflanzen

mittel = 11 - 50 % Kohlherniebefall

stark = mehr als 50 % Kohlherniebefall

7. Verbesserung der Testmethodik

Eines der Ziele des Forschungsvorhabens war die Verbesserung der Untersuchungsmethode für den Nachweis der Kohlhernieerregersporen in Torfen, Torfsubstraten und Anzuchterden.

7.1. Steigerung der Aussagekraft des bisherigen Biotests

Für den Biotest wird das zu untersuchende Material, sofern es sich nicht um Fertigsubstrate handelt, zerkleinert, mit 1,5 g/l PG-Mix-Volldünger *) und CaCO_3 (Merck 2064, 3 g/l bei Weißtorf, 4,5 g/l bei Übergangstorf und 6 g/l bei Schwarztorf) aufgedüngt und in Anzuchtschalen (Favorite bakken, Mauritz & Zonen, Bussum, Niederlande) gefüllt. Nach der Aussaat (20 Horste zu je 4-5 Korn/Schale) des Testwirts Chinakohl 'Granat' (Royal Sluis, Enkhuizen, Niederlande) werden die Schalen im Gewächshaus bei 20 °C (1. Woche) und 25 °C in den darauffolgenden Wochen aufgestellt und nach dem Auflaufen auf zwei Pflanzen pro Aussaathorst vereinzelt. Durch die Installation von Quecksilberdampflampen (400 Watt/m²), die über Zeitschaltuhren gesteuert wurden (15 Stunden Licht/Tag), war es möglich, das Testpflanzenwachstum derart zu fördern, daß makroskopisch erkennbare Kohlherniewucherungen ganzjährig bereits nach 3-4 Wochen gebildet wurden. Da diese Zeitdauer jedoch nur durch den recht hohen Aufwand an Kunstlicht ermöglicht wurde, war zu klären, ob eventuell andere Wirtspflanzen einen rascheren Testablauf möglich machten.

Im Rahmen der Kontakte zu Prof. Williams an der University of Wisconsin in Madison (USA), konnten Zuchtlinien von *Brassica juncea* (Sarepta-Senf) beschafft werden, die innerhalb von 14 Tagen nach der Aussaat bereits zur Blüte kommen, also eine sehr rasche Entwicklung aufweisen. Mit diesem Material wurden daher herkömmliche Kohlhernietests angelegt, wobei die Sarepta-Senf-Handelssorte Vittasso einbezogen wurde.

Es zeigte sich, daß die schnelle generative Entwicklung der amerikanischen *Brassica juncea*-Linien nicht vorteilhaft für die

*) 14 % N, 16 % P, 18 % K, 0,12 % Cu, 0,03 % B, 0,2 % Mo, 0,16 % Mn, 0,04 % Zn, 0,09 % Fe

Kohlherniemassenentwicklung war, da die Assimilate überwiegend für die Blütenbildung verbraucht wurden. Hingegen erwies sich die Sorte Vittasso als sehr gut geeignet, zu einem möglichst frühen Zeitpunkt Kohlherniesymptome zu erzielen. Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen Massenentwicklung und zeitlichen Ablauf der Symptomausprägung.

Tab. 12: Kohlherniebefallsentwicklung bei zwei Sorten von *Brassica juncea*

Testwirt	Kohlherniebefall (%)			
	12	16	19	22
	Tage nach Aussaat			
B. juncea Linie USA C 4	0	93	100	100
Vittasso	0	100	100	100

Auf den ersten Blick scheint kein deutlicher Unterschied erkennbar, es war jedoch festzustellen, daß die Befallssymptomausprägung, also die Größe der Hernien bei der Linie C 4 zwischen dem 19. und 22. Tag nach der Aussaat nicht zunahm, was aber für Vittasso zutraf. Die deutlichere Symptomausprägung ermöglicht es, die Auswertung der Tests früher vorzunehmen.

Aufgrund dieser recht positiven Beobachtung wurde in einem weiteren Versuch ein Vergleich 'Vittasso' / 'Granat' vorgenommen.

Aus den Werten der Tab. 13 wird deutlich, daß 'Vittasso' unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen (10^6 Dauersporen/l Weißturf) gegenüber 'Granat' deutlich früher Symptome zeigte. Diese rasche Kohlherniesymptomausbildung war allerdings unter dem Einfluß geringerer Sporenkonzentrationen nicht so deutlich zu erkennen (siehe 2. Teil der Tabelle).

Für den Biotest sollte daher zukünftig *Brassica juncea* cv. Vittasso oder auch andere Sorten Verwendung finden.

Tab. 13: Vergleich der Kohlherniebefallsentwicklung bei
Brassica juncea 'Vittasso' und Chinakohl 'Granat'

Tage nach Aus- saat	Wirt	Anzahl Pflan- zen in Befalls- klasse				Wurzelgewicht		Befall %
		(0)	(1)	(2)	(3)	gesamt	Einzel- pflanze	
13	'Vittasso'	76	0	0	0	1,2	0,02	0
16		62	14	3	0	2,4	0,03	22
20		17	14	24	22	5,9	0,08	78
22		0	6	14	58	14,2	0,18	100
28		0	0	0	79	56,4	0,71	100
13	'Granat'	80	0	0	0	2,7	0,03	0
16		78	0	0	0	3,1	0,04	0
20		29	19	26	5	7,2	0,09	63
22		7	29	27	15	11,6	0,15	91
28		0	0	4	73	67,8	0,88	100

Test in Weißtorf mit Kohlhernieerreger-Sporenkonz. 10^3 /Liter
Substrat

28	'Vittasso'	113	3	1	2
34	'Vittasso'	71	40	17	30

Befallsklassen

(0) = kein Befall

(2) = 11 - 50 % Befall

(1) = 10 % der Wurzeln befallen (3) = über 50 % Befall

Tab. 14: Ergebnisse der Verdünnungsreihenversuche
(Werte in %-Befall der Testpflanze Chinakohl 'Granat')

Anzahl Dauer- sporen/ l Substrat	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		
	WT	ST	WT	ST	WT	ST	WST
10^9	100	100	98	97	100	100	100
10^8	100	100	94	73	100	99	100
10^7	94	100	64	37	100	99	100
10^6	89	12	46	7	82	64	85
10^5	74	23	6	0	26	41	31
10^4	8	3	1	0	1	11	1
10^3	0	0	1	11	0	0	8
10^2	-	-	0	0	3	5	3
10^1	-	-	0	0	5	3	3
10^0	-	-	0	0	12	0	4

WT=Weißtorf

ST=Schwarztorf

WST=Mischung Weißtorf/Schwarztorf 1:1

7.2. Nachweisgrenze des Biotests

Zur Nachweisgrenze des herkömmlichen Biotests wurden einige Verdünnungsreihenversuche mit abnehmender Sporenkonzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 14 zusammengestellt. Die bei den Sporenkonzentrationen zwischen 10^0 und 10^4 deutlich werdende unbefriedigende Reproduzierbarkeit der Testergebnisse hat ihre Ursache in Unwägbarkeiten in der Versuchsdurchführung. So genügen in der für die Infektion der Testpflanzen entscheidenden Phase zwischen dem 7. und 15. Tag nach der Aussaat kurze Abschnitte mangelhafter Wasserversorgung, um die vom Bodenwasser abhängigen Zoosporen des Kohlhernieeregers zu schädigen, so daß sie nicht in die Wirtspflanzenwurzelhaare eindringen können.

Obwohl die Aussagekraft des oben beschriebenen Biotests bei schwach verseuchten Proben zu wünschen läßt, erscheint er, gemessen an dem relativ geringen apparativen Aufwand dennoch weiterhin geeignet, vor allem in Fällen wo die Pflanzenschutzdienststellen der Praxis mit einem Kohlhernie-Verseuchungstest behilflich sein wollen.

Entsprechend der Zielsetzung des Forschungsvorhabens wurde dennoch der Versuch unternommen, einen vollkommen anders gearteten Dauersporennachweis zu erarbeiten. Für diese Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hilgenberg, Botanisches Institut der Universität Frankfurt/Main gewonnen werden, zu deren Untersuchungsobjekten schon seit Jahren der Kohlhernieerreger *Plasmodiophora brassicae* gehört. Nachfolgend wird das Verfahren vorgestellt.

7.3. Entwicklung einer neuartigen Nachweismethode

Aufgabenstellung

Mit Hilfe des Testverfahrens sollte es möglich sein, den Kohlhernieerreger schnell und sicher nachzuweisen, um eine Aussage über die Verwendbarkeit von Rohtorfen und ähnlichen Materialien für die Anzucherdeherstellung machen zu können.

Der unter Abschnitt 7.1. beschriebene Biotest nutzt zum Nachweis die direkte Wechselwirkung zwischen Wirt und Parasit. Analytisches Merkmal ist die makroskopisch sichtbare Veränderung der Wirtswurzel. Diese Methode ist als recht empfindlich anzusehen, ist jedoch relativ platz- und arbeitsaufwendig.

Im Mittelpunkt der neuen Nachweismethode standen die Dauersporen des Krankheitserregers, die zunächst isoliert und möglichst rein dargestellt werden mußten, wobei eine weitgehend vollständige Erfassung der in der zu untersuchenden Probe vorhandenen Sporen anzustreben war.

Da der Gesamtverlust einer Nachweismethode die Summe einzelner Verlustfaktoren darstellt, sollten Verluste im wichtigen ersten Schritt der Analyse weitgehend vermieden werden. Es waren daher zunächst möglichst viele Differenzierungsmerkmale zu finden, die trotz der heterogenen Struktur des Untersuchungsmaterials eine spezifische Analyse möglich machen.

Während für die Isolierung und Anreicherung der Erregersporen weitgehend physikalische Parameter zu berücksichtigen waren, spielte für den nachfolgenden spezifischen Nachweis die chemische Struktur des Untersuchungsobjektes die entscheidende Rolle.

Mikroskopische Techniken der Differenzierung schieden wegen der nicht abschätzbaren Fehlermöglichkeiten infolge der Heterogenität des Untersuchungsmaterials aus.

Einen Weg der Problemlösung wiesen die Untersuchungen von Moxham et al. (1983) sowie Buczacki et al. (1983), die aufschlußreiche Daten zur morphologischen Struktur der Dauersporen von *Plasmodiophora brassicae* liefern. Insbesondere die Angaben zum Aufbau der Sporenhülle erschienen für die Entwicklung der Testmethode von Bedeutung. Physikalische, chemische und elektronenoptische Untersuchungen belegen einen mehrschichtigen Aufbau: der Zellmembran

direkt aufgelagert ist eine Chitinschicht, die nach außen von einer lipidhaltigen Schicht (Lipoproteine) sowie einer Doppelschicht verschiedener Strukturproteine umgeben ist.

Die Erstellung einer serologischen Technik zum Nachweis spezifischer Sporenhüllproteine konnte wegen des hierfür notwendigen erheblichen Entwicklungsaufwandes aus Zeitgründen nicht in Angriff genommen werden. Die Arbeiten konzentrierten sich deshalb auf den Nachweis des pilzspezifischen polymeren Makromoleküls Chitin.

Methoden auf dieser Grundlage dienten Ride und Drysdale (1971, 1972) zum quantitativen Nachweis des Myzels von *Fusarium oxysporum* an Tomaten. Frankland et al. (1977) nutzten den Chitinnachweis für die Bestimmung der pilzlichen Biomasse in Böden.

Eine direkte Übernahme der in o.a. Arbeiten beschriebenen Methoden war für die vorliegende Fragestellung nicht möglich. Insbesondere mit Blick auf die Anreicherung und den notwendigen Chitinaufschluß war eine spezifische Adaptation der Methodik unumgänglich. Darüber hinaus mußte die Möglichkeit des Vorkommens interferierender chitinhaltiger Bestandteile der Untersuchungsproben (z.B. Sporen und Myzelien anderer Pilze) in Betracht gezogen werden.

Eine ausreichende Spezifität des Nachweises der Plasmodiophora-Dauersporen war infolgedessen nur unter Einbeziehung weiterer Differenzierungsmerkmale möglich.

Als der chemischen Analyse vorgeschaltete Unterscheidungskriterien kamen die Sporenmasse sowie der Sporendurchmesser in Frage. Die Dauersporen von *P. brassicae* sind kugelförmig, haben einen Durchmesser von annähernd 3 µm und eine entsprechend geringe Masse. Damit sind sie erheblich kleiner als mögliche interferierende Sporen der meisten Pilzgattungen.

Das erarbeitete Testverfahren trägt diesen Gegebenheiten Rechnung und ist demnach in zwei Stufen zu gliedern:

- (1) massen- und dichtespezifische Anreicherung der Erreger-sporen
- (2) chemischer Nachweis bzw. Analyse

Bei der Isolierung bzw. Anreicherung waren eventuelle adsorptive

Wechselwirkungen zwischen dem Kontaminanten und dem Substrat (Torf u.a.) zu berücksichtigen.

Zur wirkungsvollen, mechanischen Trennung der Sporen von den verschiedenen Bestandteilen der Untersuchungsproben wurden mechanische Scherkräfte eingesetzt, die durch intensives Verwirbeln einer wässrigen Aufschwemmung der Untersuchungsprobe mittels eines Rührwerkes erzeugt wurden.

Neben der rein mechanischen Adsorption waren auch ionische Bindungen an polyvalent geladene Bodenkolloide zu beachten, da die proteinartige Oberfläche vitaler Sporen derartige Bindungen erleichtert.

Diesbezüglich durchgeführte Versuche ergaben geringfügig positive Wirkungen zugesetzter Austauschionen etwa in Form von NaCl (0,5 % w/v) *). Mögliche ionische Wechselwirkungen können durch einen Salzzusatz somit prophylaktisch zurückgedrängt werden.

Im nächsten Schritt der Analyse erfolgt die Anreicherung der Dauersporen. Diese wurden nach ihrer Größe durch den Einsatz eines entsprechenden Filters und nach ihrer Masse durch differentielle, kontinuierliche Zentrifugation vorgenommen.

Eine weitere Differenzierung nach der Teilchendichte konnte durch Zentrifugation im Dichtegradienten erzielt und hierdurch die Lücke zur nachfolgenden biochemischen Analyse der Sporenhüllsubstanz Chitin geschlossen werden.

*) w/v = weight/volume = Gewichtsprozent

Beschreibung der Testmethode unter Einbeziehung der wichtigen Entwicklungsstationen

Isolierungs- und Anreicherungsverfahren

Der Spül- und Verwirbelungsvorgang wird eingeleitet, indem ein Teil des Untersuchungsmaterials mit vier Teilen einer wässrigen Salzlösung (0,5 % NaCl) versetzt wird. Sofern die Probe vorwiegend aus Weißtorf besteht, beträgt das maximale Probenvolumen zwei Liter. Bei höheren mineralischen Anteilen, z.B. Schwarztorf/Weißtorfgemischen oder Fertigmischungen sollte das Probenvolumen maximal ein Liter umfassen, wobei die Probenverdünnung im Verhältnis 1:8 erfolgen sollte.

Um eine einwandfreie Suspendierung zu erreichen, sind torfhaltige Substrate vor der wässrigen Aufschwemmung ausgiebig zu entgasen. Hierzu wird eine wässrige Suspension der Probe hergestellt und in einer Saugflasche etwa 15 Minuten im Unterdruck (Vakuumpumpe) behandelt.

Um die die Dauersporen enthaltenden Fraktionen quantitativ aus der Probe zu isolieren, wurden zunächst einfache Filtertechniken eingesetzt. Pro Gramm Untersuchungsmaterial waren 200 ml Spülwasser erforderlich, wobei die Wiederfindungsrate vorher zugesetzter Plasmodiophora-Dauersporen nur 30 % betrug. Die weitere Handhabung der hohen Spülwassermengen und die geringe Ausbeute mußten als nicht befriedigend angesehen werden. Es wurde daher ein kombiniertes Verfahren entwickelt, das eine effektive Abtrennung bei gleichzeitiger Anreicherung zuläßt.

Die hierfür entwickelte Anlage kann funktionell in Probenspülkammer, Pumpenteil mit elektronischer Steuerung und Zentrifugenteil (Abb. 4-6) gegliedert werden.

Die Probenspülkammer besteht aus einem PVC-Becken von ca. 10 Liter Fassungsvermögen (max. Füllmenge: 8 Liter). Über ein Wellenrohr ragt 4 cm über dem Beckenboden eine Wasserschraube seitlich in das Gefäß hinein. Der Antrieb der Schraube (60 mm Durchmesser; Graupner Nr. 2308/60) erfolgt durch einen luftgekühlten Spaltemotor, dessen Drehzahl über einen Regeltransformator auf 750 U/min konstant gehalten wird. Die ausreichende Verwirbelung der Aufschwemmung wird visuell kontrolliert.

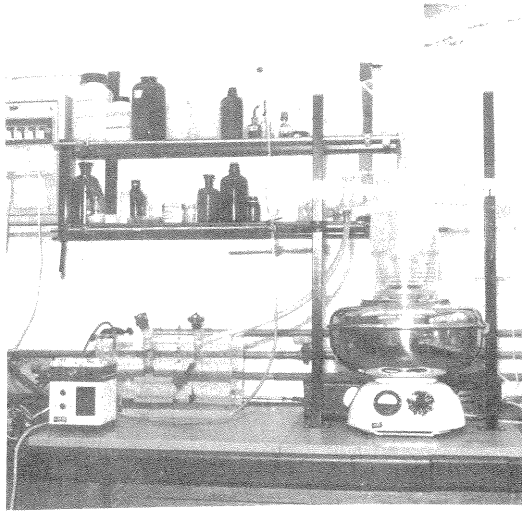


Abb. 4: Gesamtansicht der Apparatur

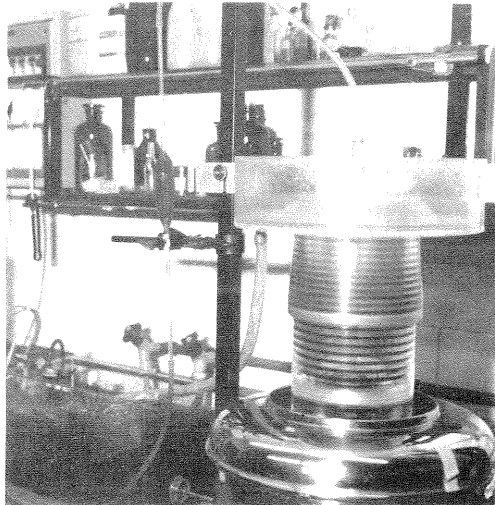


Abb. 5: Ansicht in Funktion

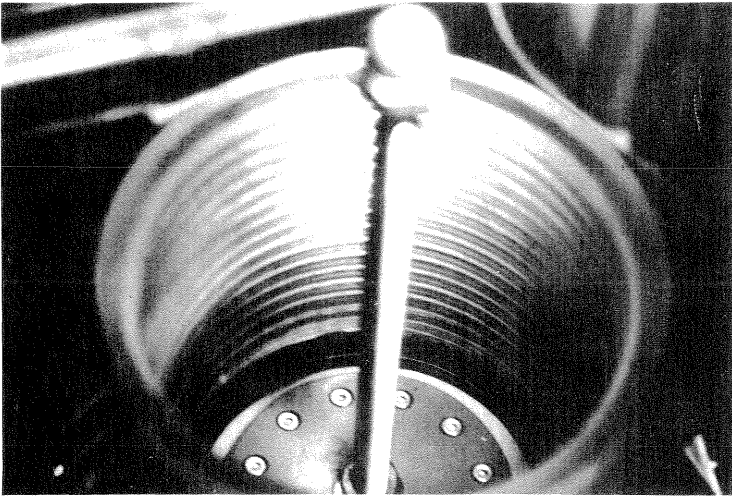


Abb. 6: Stempel mit Dichtleiste

Im anschließenden Schritt wird die Suspension über einen zylinderförmigen Nylonnetzfilter mit 90 µm Maschenweite angesaugt und über eine Pumpe dem Zentrifugenteil der Anlage zugeführt. Als Pumpe kam eine Zahnrادpumpe zum Einsatz, die ebenso wie eine ebenfalls erprobte Kleinstkreiselpumpe befriedigende Ergebnisse lieferte. Als optimal wäre die Verwendung einer leistungsfähigen Peristaltikpumpe anzusehen, die jedoch nicht zur Verfügung stand. Zur Vermeidung eines Zusetzens des Filters wurde die Laufrichtung der aus einer zeitgesteuerten 12 V Gleichstromquelle gespeisten Pumpe zweimal pro Minute für ca. 4 sec umgekehrt. Die für diese Spülung erforderliche Wassermenge wird dabei einem Reservoir entnommen, das sich zwischen Pumpen- und Zentrifugenteil befindet. In der Umkehrphase läuft die Pumpe mit erhöhter Leistung. Bei Verwendung der Kreiselpumpe entfällt die Umkehr der Laufrichtung.

Die Suspension erreicht schließlich den Zentrifugenteil, in welchem die Dauersporen massenspezifisch kontinuierlich abgetrennt und angereichert werden.

In die Wandung eines auf einen Zentrifugenmotor aufgebauten Plexiglaszylinders sind ringförmig Kammern mit rechteckigem Querschnitt eingelassen. Die Suspension wird durch die obere Öffnung in den Zylinder eingegeben und durch ein Plexiglasrohr bis auf den Zylinderboden geleitet. Durch Zentrifugalkräfte steigt die Suspension als Flüssigkeitsfilm abnehmender Schichtdicke an der Innenwand des Zylinders empor. Darin enthaltene Partikel sedimentieren dabei in den Kammern.

Die vertikale Strecke, nach welcher Partikel sedimentieren, ist gegeben durch die Formel

$$y = \frac{v \cdot s}{v'}$$

wobei

v = Geschwindigkeit der vertikalen Strömung

v' = Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel

s = Schichtdicke des Flüssigkeitsfilms

sind.

Die vertikale Strömungsgeschwindigkeit ergibt sich aus:

$$v = (-g + a) \times \sin \alpha \times t$$

wobei die Zentrifugalbeschleunigung a durch die Formel

$$a = \omega^2 \times r$$

und der Winkel α durch die Änderung der Schichtdicke gegeben sind.

ω = Winkelgeschwindigkeit

g = Erdbeschleunigung

r = Radius des Zylinders

Die Sedimentationsgeschwindigkeit von Partikeln hängt nach:

$$v' = \omega^2 \times r \times t$$

oder $v' = a \times t$

grundsätzlich nur von der Zentrifugalbeschleunigung ab. Durch die gegebene Viskosität der Flüssigkeit (in vorliegendem Fall die Aufschwemmung der Untersuchungsprobe) und den sich daraus ergebenden Reibungswiderständen entwickeln jedoch Körper mit größerer Masse entsprechend ihrer höheren kinetischen Energie höhere Sedimentationsgeschwindigkeiten. Teilchen größerer Dichte verhalten sich tendenziell ebenso.

Ziel des Sedimentationsvorganges in vorliegendem Fall ist die Abtrennung von Teilchen größerer Masse (z.B. Torfpartikel) oder Dichte (z.B. mineralische Sedimente) sowie gleichzeitige räumlich differenzierte Retention der interessierenden Bestandteile. Die am oberen Rand des Sedimentationszylinders übertretende Flüssigkeit wird aufgefangen und in die Spülkammer zurückgeleitet.

Zur Optimierung des Sedimentationsvorganges ergaben sich in der Praxis der Erprobung zahlreiche Ansatzpunkte. Besondere Aufmerksamkeit war der Form des Sedimentationszylinders zu schenken, da vor allem die Gestaltung des Innenraumes eine entscheidende Rolle spielt. Versuche mit im Längsschnitt rechteckigen Zylindern erbrachten eine hohe unspezifische Sedimentation im unteren Zylind-

derbereich. Dies ließ sich verhindern, indem der untere Bereich des Sedimentationszylinders mit einem konischen und der obere Teil mit einem rechteckigen Längsschnitt versehen wurden. Die durch diese Form langsam zunehmende Zentrifugalbeschleunigung ermöglicht bei langsam abnehmender Schichtdicke des Flüssigkeitsfilms eine gute Differenzierung von Teilchen verschiedener Massen und Dichten. Teilkonische Formen gestatten zudem relativ hohe Durchflußgeschwindigkeiten. Bei theoretisch gleicher Winkelgeschwindigkeit der rotierenden Teilchen und der Zylinderwandung wirkt bei der vorgegebenen Umdrehungszahl von 3500 U/min im oberen Teil des Zylinders eine Zentrifugalbeschleunigung von ca. $1000 \times g$.

Unter den angegebenen Voraussetzungen sedimentieren innerhalb der Verweilzeit von ca. 4 sec die Dauersporen des Kohlhernieerregers, bei einer unter den vorgegebenen Bedingungen nicht bestimm- baren Schichtdicke des Flüssigkeitsfilms, zu 80 % im oberen Teil des Zylinders, aus welchem sie nach Beendigung des Spülvorganges isoliert werden.

Bei Verwendung von Weißtorf/Schwarztorfgemischen im Verhältnis 4:1 konnten innerhalb von zwei Stunden 87 % (± 6) der in acht Li- ter Aufschwemmung enthaltenen Sporen im Sedimentationszylinder aufgefangen werden. Für Gemische mit einem höheren Schwarztorfan- teil (50 %) wurden geringfügig schlechtere Werte erzielt (80 % ± 10).

Da nur etwa 80 % der sedimentierten Sporen zurückgewonnen werden, der Rest befindet sich zusammen mit groben Torf- und Sediments- partikeln im unteren Teil des Zylinders, reduzieren sich die ab- soluten Wiederfindungsraten um ca. 20 % der jeweiligen Endwerte und liegen damit zwischen 65 und 70 %. Um diese Werte zu errei- chen, ist es erforderlich, daß das Flüssigkeitsvolumen der Spül- kammer etwa achtmal den Sedimentationszylinder passiert. Aus der maximalen Durchflußgeschwindigkeit von 400 ml/min und dem maxima- len Suspensionsvolumen (8 Liter) ergibt sich die bereits erwähnte Dauer des Spülvorganges von zwei Stunden. Längere Spülzeiten er- brachten nur geringfügig höhere Ausbeuten (Abb. 7).

Für die Entnahme der Kammerinhalte aus dem Sedimentationszylinder wird in den langsam rotierenden Zylinder nach Beendigung des Spül- vorganges ein Stempel mit einer Dichtleiste aus Gummi eingeführt,

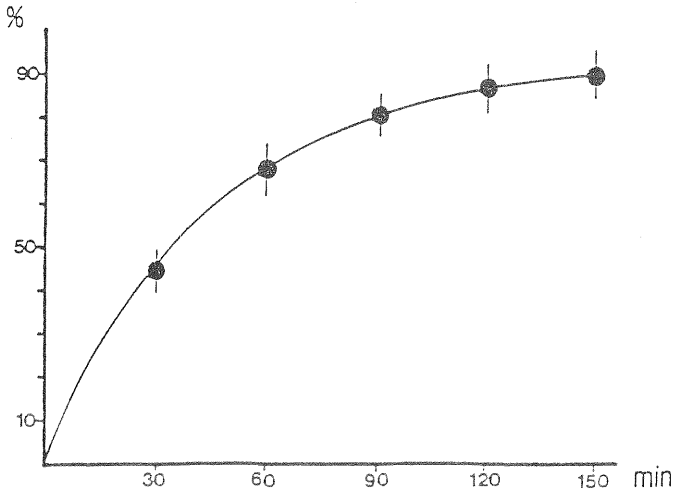


Abb. 7: Abhängigkeit der Gesamtwiederfindungsrate zugesetzter Sporen in wässriger Suspension von der Betriebszeit der Isolierungs- und Anreicherungsanlage

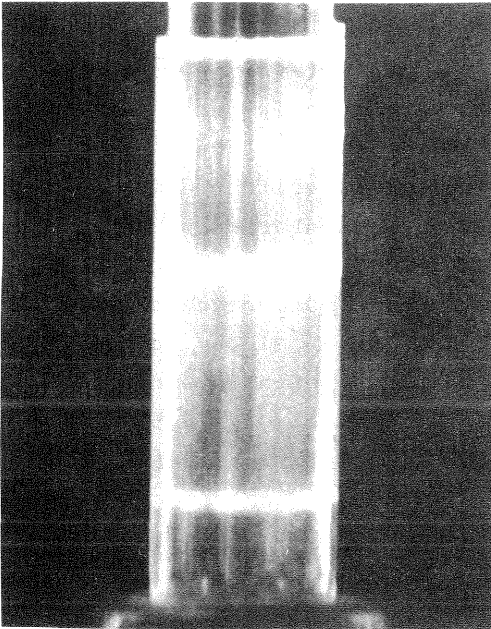


Abb. 8: Aufnahme eines Gradienten

der verhindern soll, daß sich die Kammerinhalte des oberen Zylinderbereichs mit denjenigen des unteren Teils vermischen.

Sowohl die aus den Kammern austretende Suspension als auch die bei der anschließenden zweimaligen Reinigung des demontierten Zylinders mit Hilfe einer Bürste anfallende Suspension werden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min bei 8000 x g abzentrifugiert.

Die Reinigung des Zylinders erfolgt mit Hilfe einer speziellen Spülwanne in zwei Durchgängen mit einer Wassermenge von je 90 ml Wasser. Nach Vereinigung der intensiv resuspendierten Sedimente werden diese durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt.

Dichtegradientenzentrifugation

Die Differenzierung der suspendierten Partikel anhand ihrer spezifischen Dichte erfolgte durch Zentrifugation im Saccharosegradienten. Hierzu mußten vier Gradienten vorbereitet und vor Versuchsbeginn gekühlt bereitstehen.

Die Gradienten werden mit Hilfe eines Standardgradientenmischers für lineare Gradienten in 40 ml Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen gegossen. Die vordere Kammer des Mixers enthält dabei 11 ml einer 55 % (w/v) Saccharoselösung, die hintere 11 ml einer 15 % (w/v) Saccharoselösung. Der kontinuierliche Gradient wird auf ein Kissen aus 5 ml einer 65 % (w/v) Saccharoselösung aufgegossen. Anschließend werden die Gradienten mit 3 ml einer 5 % (w/v) Saccharoselösung abgedeckt, auf 10 °C durchgekühlt und unmittelbar vor der Zentrifugation mit jeweils 10 ml der aufzutrennenden Suspension beschickt. Die beladenen Gradienten werden hierauf in einem Ausschwingrotor (z.B. HB-4 Sorvall) für 1,5 Stunden bei 45000 x g zentrifugiert, wobei darauf zu achten ist, daß sowohl die Rotorbeschleunigung als auch der Bremsvorgang gedämpft erfolgen.

Da entsprechend der Handhabung und der Funktion des für die Erstellung der Gradienten verwendeten Mixers Varianzen nicht auszuschließen sind, somit die genaue Schichtung des Gradienten nicht vorher bestimmbar ist, muß die Zone, in der sich die Sporen des Kohlhernieerregers befinden, individuell ermittelt werden.

Erfahrungsgemäß befindet sie sich unmittelbar unterhalb des Aufgabepuffers in einer Breite von ca. 2 cm (Abb. 8).

Zur Fraktionierung des Gradienten wird eine Kanüle vorsichtig bis auf den Boden des Zentrifugenröhrchens geführt und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe oder einer Spritze vorsichtig 65 % (w/v) Saccharoselösung injiziert. Der Gradient wird auf diese Weise nach oben gedrückt und die entsprechende Fraktion dem schräg gehaltenen Röhrchen entnommen und gesammelt. Die zusammengefaßte Probe (25-30 ml) wird mit der fünffachen Menge deionisierten Wassers versetzt und ohne Kühlung für 15 min bei 45000 x g zentrifugiert.

Enzymatische Hydrolyse

Die nunmehr vorliegenden Sedimente werden hierauf einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Der Abbau der proteinhaltigen Sporenhüllschichten bewirkt eine Freilegung und damit eine verbesserte Präsentation der Chitinschicht, die dem nachfolgenden Analysenschritt als Substrat dient.

Für die Proteolyse von Teilen der Sporenhülle hat sich das Enzym Protease (Sigma Nr. P-0384) bewährt. Die enzymatische Vorbehandlung erhöht die Ausbeute um ca. 200 % gegenüber einer basischen Hydrolyse (KOH 2M). Ohne diese Vorbehandlung konnten nur etwa 10 % Chitinabbau beobachtet werden.

Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: das Sediment wird mit möglichst wenig Puffer aufgenommen (50 mM Tris pH 7), pro ml mit 5 mg Protease versetzt und die Probe anschließend in einem Schüttelwasserbad bei 39 °C für 2,5 Stunden inkubiert. Als Gefäße können 10 ml-Zentrifugenröhrchen dienen in denen nach der Inkubation scharf zentrifugiert (10 min, 45000 x g) wird. Hierauf den Überstand dekantieren und das Sediment zur vollständigen Denaturierung von Proteaseresten mit Wärme behandeln. Hierfür wird das Sediment in wenig Chitinasepuffer (10 mM Natriumcitrat, pH 5,7) resuspendiert, in einen 10 ml-Meßkolben überführt und die verschlossenen Kolben anschließend für etwa 10 min bei 110 °C in einem Tischautoklaven behandelt. Nach dem Abkühlen wird der pH-Wert kontrolliert und die Chitinasepräparation zugesetzt.

Aus einer Anzahl im Laufe der Experimente geprüfter Enzyme erwies sich die Chitinase aus *Serratia marcescens* (Sigma Nr. C-1650) als aktivstes Enzym. Mit dieser Chitinasepräparation ist ein direkter Nachweis des Reaktionsproduktes möglich. Da die *Serratia*-Enzympräparation jedoch erhebliche Mengen des Reaktionsproduktes enthält, zudem ein unlöslicher Farbstoff störend auftritt, war eine vorbehandelnde Reinigung der Substanz notwendig.

Die jeweils benötigte Enzymmenge wird hierzu in einer kleinen Menge Reaktionspuffer gelöst (z.B. 10 mg/ml), auf einem Reagenzglasschüttler ausgiebig geschüttelt, abzentrifugiert (20 Minuten bei 45000 x g) und der Überstand über eine Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25) entsalzt. Um die Verdünnung des Enzyms gering zu halten, sollte das Bettvolumen der Säule maximal dem vierfachen Aufgabevolumen entsprechen.

Beispiel: für die Bearbeitung von drei Proben werden 20 mg Chitinase in 2 ml Puffer gelöst und abzentrifugiert. Das Bettvolumen der Säule beträgt demnach 8 ml. Die Proteinfraction muß zuvor mit einer Dextranblaulösung ermittelt werden, das abgesammelte Volumen sollte jedoch die 1,5-fache Menge des Aufgabevolumens nicht übersteigen. Die sich hierdurch ergebenden 3 ml Enzymlösung werden schließlich für die eigentliche Analyse der wärmebehandelten Sedimente verwendet.

Nach Zugabe des gereinigten Enzyms werden die Meßkolben ca. 15 h bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Begasung der Kolben mit Stickstoff vor deren Verschließen wirkte sich stabilisierend auf das Reaktionsprodukt aus (Abb. 9 und 10).

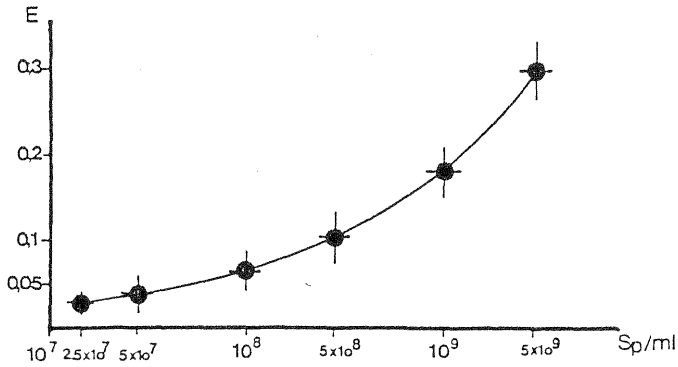


Abb. 9: Freisetzung von N-acetylglucosamin (Nachw.: DMAB) aus vorbehandelten Sporen durch Chitinase, in Abhängigkeit von der Sporenkonzentration nach 24 Std Reaktionsdauer

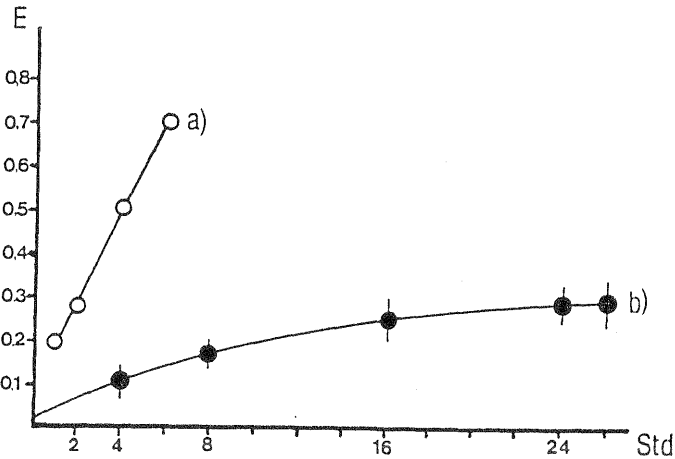


Abb. 10: Freisetzung von N-acetylglucosamin (Nachweis: DMAB) durch Chitinase aus a) Chitin unter substratsättigenden Bedingungen, b) aus vorbehandelten Sporen (5×10^9 /ml), in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer

Kolorimetrischer Test

Die chemische Analyse des durch die o.a. Verdauung freigesetzten N-acetyl-Glucosamins beginnt mit dem Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile (20 min, 45000 x g). Der Überstand wird im Rotationsverdampfer bei 60 °C auf 400 µl einrotiert. Treten hierbei erneut Trübungen auf, ist nochmals zu zentrifugieren. Zur Bestimmung der Hexoseamine erwies sich die Reaktion mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) nach Elson und Morgan als geeignet. Der Test wird nach einer leicht modifizierten Rezeptur von Reissig et al. (1955) durchgeführt. Chemisch entstehen bei der Reaktion im sauren Milieu chromogene Kondensationsprodukte aus DMAB und den entsprechenden Acetylaminozuckern, die vorher durch milde Alkalibehandlung in ihre Furanoseform überführt wurden.

400 µl der Probe werden mit 200 µl Boratpuffer ($K_2B_4O_7$ 0,4 M, pH 9) versetzt, genau 4 min bei 100 °C inkubiert, anschließend sofort abgekühlt und 1 ml der Farbstofflösung zugegeben. Letztere wird zubereitet, indem 16 g DMAB in 100 ml Eisessig, der 12,5 % HCl konz. enthält, gelöst werden. Dieses Gemisch ist kühl und dunkel mehrere Monate haltbar. Vor dem Gebrauch wird die Lösung im Verhältnis 1:4 mit Eisessig verdünnt.

Der Ansatz wird 30 min bei 35 °C inkubiert und hierauf die Farbstoffentwicklung im Photometer bei 585 nm Wellenlänge gegen einen

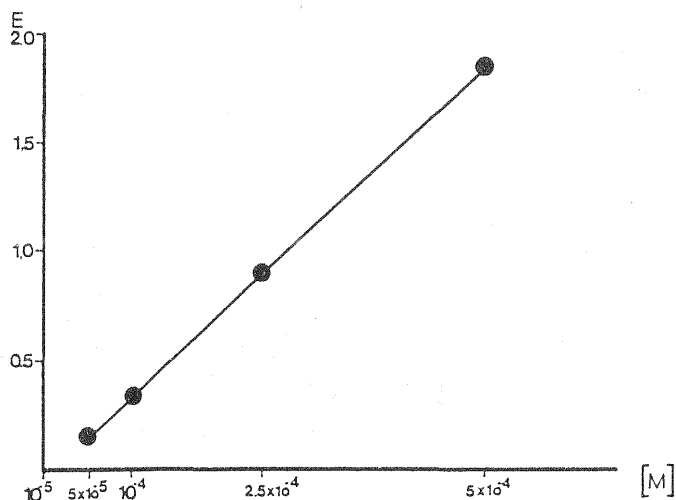


Abb. 11: Eichkurve zur Ermittlung des N-acetylglucosamin-Gehaltes nach der Elson-Morgan-Reaktion unter den angegebenen Bedingungen

Nullwert (Wasser statt Probe) gemessen. Die Meßküvetten wiesen ein Volumen von 1 ml sowie eine Schichtdicke von 1 cm auf. Als Kontrolle muß eine gleichartig behandelte, nicht kontaminierte Torfprobe gleicher Zusammensetzung zur Verfügung stehen. Der Spül- bzw. Isoliervorgang kann jedoch auf eine Siebung durch ein Analysensieb (20 µm Maschenweite) beschränkt werden (Abb. 11).

Biotestverfahren nach Sporenanreicherung

Aufgrund der relativ hohen Wiederfindungsraten bei der Extraktion der Dauersporen des Kohlhernieerregers aus den Substratproben erschienen im weiteren Verlauf der Arbeiten Versuche unter Verwendung des sporenhaltigen Zylindersedimentes als Inokulum für geeignete Wirtspflanzen lohnenswert.

Die dem Sedimentationszylinder entnommene Suspension wurde hierfür sauer gepuffert (pH 5) und in kleinen Volumina mit Keimlingen von *Brassica campestris* var. *rapa* (Chinakohl 'Granat') bei 20 °C in einer Pflanzenwuchskammer oder einem Gewächshaus inkubiert. Die Infektion der Wirtspflanzen (Keimwurzellänge ca. 1 cm) erfolgte in Petrischalen, wobei die Keimlinge durch ein Lochraster gehalten werden und die Wurzeln in das Inokulum eintauchen. Die Umsetzung der Keimlinge in Kleinanzuchtgefäße erfolgte nach 2-3 Tagen. Bis zum Abschluß des Forschungsvorhabens wurden die Versuche zur Entwicklung eines modifizierten Biotests vorwiegend unter qualitativen Gesichtspunkten durchgeführt.

Gewinnung von Sporen als interne Standards

Sporen des Erregers *Plasmodiophora brassicae* wurden aus tiefgekühltem Befallsmaterial von Chinakohl (*Brassica campestris* var. *rapa*) isoliert. Zur Testung aller Einzelschritte des Verfahrens mußten Sporenpräparationen hoher Reinheit in genügender Menge unter Einsatz eines vertretbaren präparativen Aufwands zur Verfügung stehen.

Bei der Isolation erwiesen sich partikuläre Bestandteile der Wirtswurzel in Form zahlreicher Amyloplasten als problematisch. Eine vollständige Abtrennung der Stärkekörner war nicht möglich.

Ausreichend hohe Reinheitsgrade ergaben sich durch kombinierte Anwendung eines differentiellen Zentrifugalschritts bei niedriger g-Zahl mit anschließender Unterdruckfiltration über definierte Celluloseacetatfilter.

Das Befallsmaterial wird hierzu zerkleinert (Labormixer) und in einer 1 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die Suspension wird über ein Sieb mit 250 μm Maschenweite filtriert und anschließend für 3 min bei 200 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird dann portionsweise zunächst über einen 8 μm Filter mit Vorfilter (Millipore) und hierauf über einen Filter mit 5 μm Porenweite gesaugt. Zur Gewinnung der Sporen wird das Filtrat abzentrifugiert (15 min, 8000 x g) und vor der Verwendung resuspendiert. Der erzielbare Reinheitsgrad liegt bei ca. 85 % (\pm 5 %).

Optische Bestimmungen der Sporendichte wurden immer dann angewendet, wenn Sporen ohne Substrat als Standard dienten. Die Zählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung eines Leitzmikroskops mit einer Objektivvergrößerung von 63 x (App.:0.9) und einer Okularvergrößerung von 8 bzw. 10 x.

Übertragbarkeit der Labormethode auf größere Maßstäbe

Die Einzelteile der Isolationsanlage sind in der beschriebenen Form und Größe und im Rahmen der experimentellen Gegebenheiten optimal aufeinander abgestimmt. Eine Anpassung der Pilotanlage an größere Maßstäbe erscheint grundsätzlich möglich.

Besondere Beachtung ist hierbei jedoch vor allem dem Verhältnis zwischen Durchflußgeschwindigkeit und erzielbarer Zentrifugalbeschleunigung zu schenken. Umfangreichere Proben erfordern bei gleichem Zeitaufwand entsprechend höhere Durchflußraten. Für eine ausreichende Verweildauer der umgewälzten Suspension im Sedimentationszylinder ist bei feststehenden Sedimentationskoeffizienten für die einzelnen Bestandteile die Zentrifugalbeschleunigung zu erhöhen. In Praxis kann dies einerseits durch höhere Drehzahlen und andererseits durch einen größeren Zylinderdurchmesser erreicht werden. Die hiervon abhängige Beschleunigung des Durchflusses kann durch eine Anpassung der Zylinderhöhe ausgeglichen werden.

Bewertung des Verfahrens

In der beschriebenen Form erlaubt die Methode den sicheren Nachweis von $2,5 \times 10^7$ Erregersporen pro Liter zu untersuchenden Substrats.

Pro Testdurchgang müssen zwei Liter der vermutlich kontaminierten Probe zur Verfügung stehen. Der Standardfehler beträgt $3,25 \times 10^6$ Sporen. Ein Signifikanzniveau von 95 % wird bei einem Extinktionsunterschied zwischen Probe und Kontrolle von 0,02 erreicht ($n = 16$).

Die Nachweisempfindlichkeit der Methode liegt mit $2,5 \times 10^7$ Sporen/l Substrat erheblich über der Sporenkonzentration, die unter günstigen Bedingungen noch Befallssymptome bei den Wirtspflanzen hervorruft. Zum absoluten Ausschluß der Infektiosität der jeweiligen Untersuchungsprobe ist der Nachweis somit nicht geeignet, kann jedoch für das Grobscreening von neu in Abtorfung zu nehmende Flächen nützlich sein. Dies vor allem deshalb, weil die Gefahr der Einschleppung des Kohlhernieerregers in das von den in Betracht kommenden Flächen gewonnene Substrat vermutlich nur dann gegeben ist, wenn entsprechend hohe Verseuchungsgrade in den Oberschichten vorliegen.

Es ist denkbar, in strittigen Fällen dann konventionelle Biotestverfahren anzuschließen.

Zwei Gründe zeichnen dafür verantwortlich, daß das vorstehend beschriebene Verfahren den zu Beginn der Arbeiten gestellten Anforderungen nicht gerecht werden kann:

- (1) Der Test ermöglicht nicht den Nachweis der Vitalität der aufgefundenen Sporen.
- (2) Es kann nicht davon ausgegangen werden, daß bei der Methodenentwicklung in der Kürze der für die Arbeiten am Botanischen Institut der Universität Frankfurt zur Verfügung stehenden Zeit alle Parameter berücksichtigt werden konnten, die unter natürlichen Bedingungen auf eine Probe einwirken (z.B. Veränderungen der einzelnen Sporen oder Bildung stabiler Sporenkomplexe im Substrat).

In gewissem Umfang wurden einige in Betracht kommende Einflußgrößen in die Arbeiten einbezogen. Die Bestimmung der Wiederfindungsraten der Sporen erfolgte nicht nur mit frischen Sporenpräparationen als internem Standard sondern auch mit Material, das vorher mehrere Wochen an Torf adsorbiert wurde, wobei die Proben hierfür mehrmals getrocknet und wieder befeuchtet wurden. Durch diese Behandlungen war in keinem Fall eine signifikant negative Auswirkung feststellbar.

Teile des Verfahrens eignen sich sehr gut, die bisher üblichen Biotestmethoden in ihrer Effizienz zu steigern und ihre Aussagekraft zu erhöhen. Bei gleichgroßem Zeitaufwand reduziert eine vorgeschaltete Sporenanreicherung über Probenspülkammer und Sedimentationszylinder den Material- und Stellflächenaufwand des Biotests und führt durch die drastische Erhöhung der Inokulumdichte zu einer Steigerung der Empfindlichkeit.

Zusammenstellung der für die Labortestmethode benötigten Gegenstände und Materialien

Kühlzentrifuge z.B. RC-5B (Sorvall, Bad Nauheim)

mit Ausschwingrotor (HB-4) Festwinkelrotor (SS-34)

und Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat 10 und 40 ml

Tischzentrifuge

Spektralphotometer mit VIS-Bereich (im sichtbaren Bereich messend)

mit 1 ml Küvetten mit 1 cm Schichtdicke

Rotationsverdampfer mit 10 ml Spitzkolben

Filterapparat zur Unterdruckfiltration:

Filterhalter 70 mm mit Metallfritte

Filter 8 μ m (Millipore SCWP 04700) und 5 μ m (Millipore SWMP 04700)

sowie 70 mm Vorfilter (Millipore AP 200 4700)

Vakuumpumpe

Schüttelwasserbad-temperierbar

Analysenwaage mit 0,1 mg Teilung

pH-Meter mit Mikroelektrode

Reagenzglasschüttler

Magnetrührer

Gradientenmischer für lineare Gradienten 50 ml

Kurzsäule zur Gelfiltration mit Fritte D-2

Eppendorfpipetten variabel 1 ml und 200 μ l

Das im Rahmen der Arbeiten konstruierte Gerät steht auf Anfrage zur Verfügung.

Spezielle Chemikalien

Natriumcitrat reinst

Natrium-Tetraborat reinst

Saccharose reinst

DMAB (4-Dimethylamino-benzaldehyd)

Protease Sigma Nr. P-0384

Chitinase aus *Serratia marcescens* Sigma Nr. C-1650

Für die Durchführung des kombinierten Biotestverfahrens sind für die standardisierte Anzucht Kulturgefäße sowie beleuchtete Stellflächen in ausreichend (22-25 °C) temperierbaren Räumen notwendig.

7.4. Kurzbeschreibung des Analyseverfahrens mit Zeitplan

- | | |
|--|--------|
| (1) Volumenbestimmung und Entgasung der Untersuchungsprobe | 15 min |
| (2) Versetzen mit einer entsprechenden Menge 0.5 % NaCl | |
| (3) Anlage montieren und in Gang setzen | 2 h |
| (4) Kammern reinigen, Suspension abzentrifugieren (8000xg) Überstand verwerfen | 30 min |
| (5) Gradienten gießen und auf 10 °C kühlen während Stufe (3) | |
| (6) Gradienten beladen und zentrifugieren (45000xg) | 1,5 h |
| (7) Gradienten fraktionieren und abzentrifugieren (20 min 45000xg, ohne Kühlung), Überstand verwerfen | 1 h |
| (8) Proteaseverdauung vorbereiten, Probe in Puffer aufnehmen und bei 39 °C inkubieren | 3 h |
| (9) währenddessen Chitinase in Puffer aufnehmen, abzentrifugieren (45000xg), Sediment verwerfen und anschließend entsalzen | |
| (10) Probe abzentrifugieren (45000xg), Überstand verwerfen, in Puffer aufnehmen und autoklavieren; dann mit Chitinasepräparation versetzen, mit Stickstoff begasen | 45 min |
| (11) Inkubation der in (10) vorbereiteten Probe bei 37 °C | 15 h |

Am darauffolgenden Tag:

- | | |
|---|--------|
| (12) Abzentrifugieren (45000xg), Sediment verwerfen | 20 min |
| (13) Einrotieren (60 °C) | 10 min |
| (14) Trübungsfreie Probe mit Boratpuffer versetzen und 4 min bei 100 °C inkubieren, sofort abkühlen und mit 1 ml verdünnter Farbstofflösung versetzen; Blindproben ansetzen | 5 min |
| (15) Lösung bei 35 °C inkubieren | 30 min |
| (16) Bestimmung der optischen Dichte von Probe, Blindwert und Kontrolle bei 585 nm Wellenlänge | 15 min |

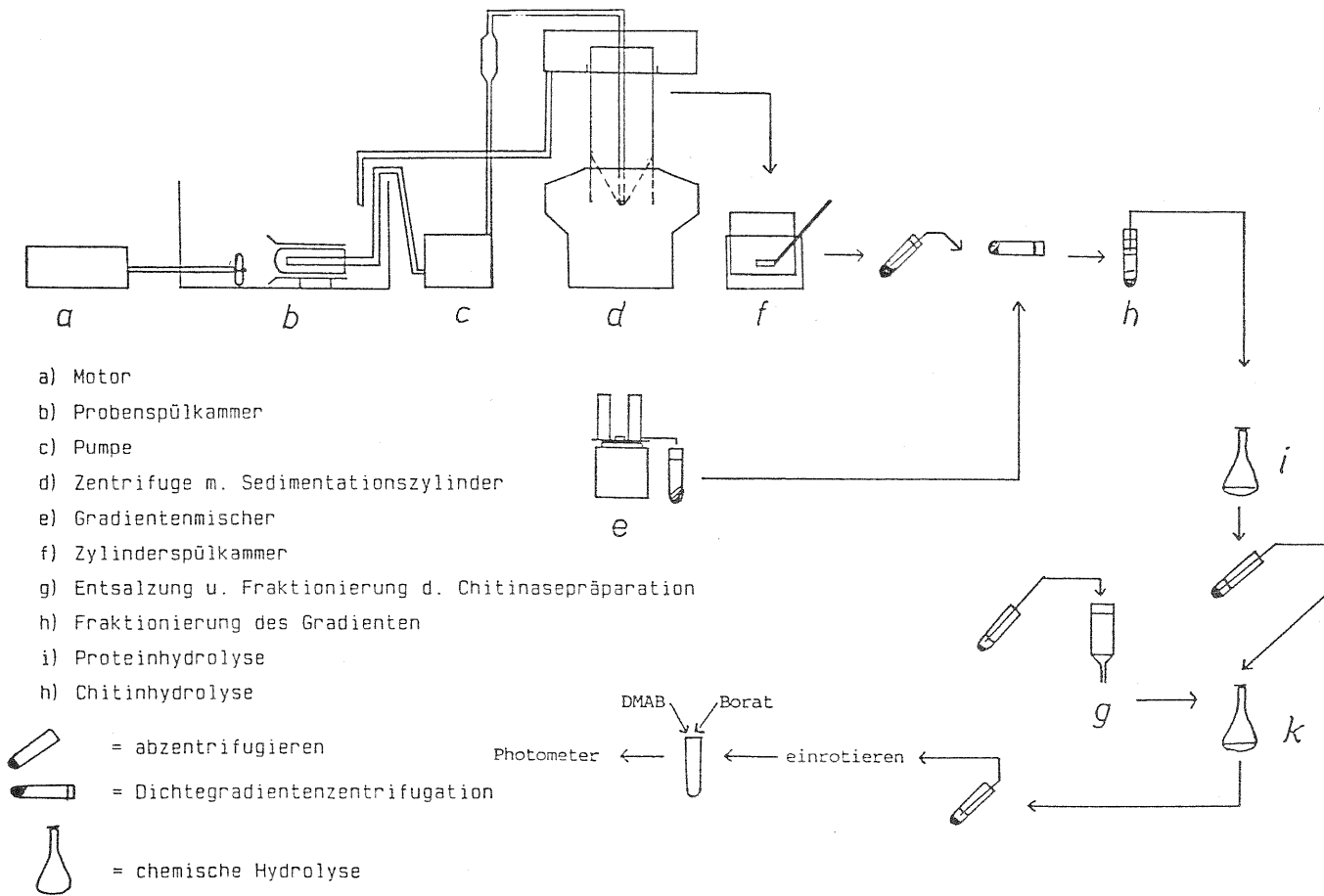


Abb. 12: Schema der Dauersporennachweismethode

8. Zusammenfassung

1. Von 1007 im Rahmen der Arbeiten eingetragenen Rohtorfproben unter schiechlicher Provenienz wiesen 30 (= 3,0 % aller Proben) nach dem ersten Biotest eine Kohlhernieverseuchung auf. Bei 12 Proben (1,2 %) gelang es, den Verdacht in Wiederholungstests bzw. nach Wiederholungsbeprobung zu bestätigen. Alle bestätigten Verseuchungsfälle stammten aus Kleinabtorf-flächen im Randbereich der in Abtorfung befindlichen Moore.
2. Die Untersuchung der 238 Anzuchterden aus Handels-, Produktions- und Gartenbaubetrieben ergab bei 48 Proben (20 %) nach dem ersten Biotest Verdacht auf Kohlhernieverseuchung. 18 Fälle (7,6 %) konnten im Wiederholungstest bestätigt werden. In einigen Fällen war eine durch den Endverbraucher verursachte Einschleppung des Kohlhernieerregers in das Anzuchtsubstrat nicht auszuschließen.
3. Von den verschiedenen Möglichkeiten der Verseuchung der Torflagerstätten und der daraus gewonnenen Materialien sind vor allem die Windverfrachtung und die Verwendung kontaminierten Wassers zu beachten. Auf dem gesamten Weg vom Produzenten bis zum Endverbraucher sollten alle sinnvollen Vorkehrungen getroffen werden, den Krankheitserreger fernzuhalten.
4. Der bisher angewandte Biotest zum Nachweis einer Kohlhernieverseuchung kann durch den Einsatz der Kohlhernietestpflanze Sarepta-Senf (*Brassica juncea* 'Vittasso') erheblich abgekürzt werden.
5. Der neu entwickelte Dauersporennachweis verbessert die Nachweisgrenze des Biotests nicht. Er erscheint jedoch geeignet, massive Verseuchungsgrade bei neu in Abtorfung zu nehmenden Arealen in kürzerer Zeit als es mit dem bisher angewandten Biotest möglich ist zu erfassen und stellt eine Möglichkeit dar, bei geringen Sporendichten die Dauersporen aus den Proben zu extrahieren und sie als Inokulum für einen modifizierten Biotest zu verwenden.

Summary

1. Out of 1007 peat samples 30 (i.e. 3.0 % of the total number of samples) showed an infestation with the clubroot causing fungus after the first experiment. In 12 cases this could be stated after repeated tests of remaining parts of the original samples or after collecting new samples from the same peat producing area.
All 12 infested samples came from minor peat producing companies without own factories for culture substrates.
2. 48 samples (20 %) of the 238 different samples of culture substrates were infested with the clubroot fungus. 18 of these could be stated in repeated tests.
3. Wind and water transport seem to be the main ways of infestation besides agricultural use.
4. The time needed for the common bioassay so far used for testing soil for infestation with the clubroot fungus was decreased from 4.5 weeks to 3 weeks using *Brassica juncea* cv. Vittasso as a test host.
5. The new developed assay for the resting spores doesn't decrease the inoculum density which can be stated.

10. Literatur

- Ashwell, G., Brown, N. & W.A. Volk: A colorimetric procedure for the determination of N-acetylated-3-amino hexoses. Arch. Biochem. Biophys. 112. 1965, 648-652.
- Bartnicki-Garcia, S.: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol. 22. 1968, 87-108.
- Buczacki, S.T. & S.E. Cadd: Size distribution of resting spores of Plasmodiophora brassicae. Trans. Brit. Mycol. Soc. 67. 1976, 133-136.
- Buczacki, S.T. & J.G. Ockendon: A method for the extraction and enumeration of resting spores of Plasmodiophora brassicae from infested soil. Ann. Appl. Biol. 88. 1976, 363-367.
- Buczacki, S.T. & S.E. Moxham: Structure of the resting spore wall of Plasmodiophora brassicae revealed by electron microscopy and chemical digestion. Trans. Brit. Mycol. Soc. 80. 1983, 221-231.
- Carroll, J.J. & D.R. Viglierchio: On the transport of nematodes by the wind. J. of Nematology 13. 1981, 476-482.
- Carruthers, W.: Anbury, club-root, or finger and toe. J. Roy. Agric. Soc. of England 4. 1893, 334-339.
- Colhoun, J.: Clubroot disease of crucifers caused by Plasmodiophora brassicae Woron. Commonwealth Mycol. Institute, Phytopathological paper No. 3. 1958, 108 S.
- Crute, I.R., Buczacki, S.T. & K. Stevenson: A solution culture method for observing the development of clubroot symptoms on brassica plants. Ann. Appl. Biol. 99. 1981, 241-245.
- Datnoff, L.E., Lacy, G.H. & J.A. Fox: Occurrence and populations of Plasmodiophora brassicae in sediments of irrigation water sources. Plant Disease 68. 1984, 200-203.
- Deutsche Normen: Baugrund: Untersuchung von Bodenproben, Korngrößenverteilung. DK 624. 131. 2. DIN 18123 , 1967.
- Frankland, J.L. & D.K. Lindley: A comparison of two methods for the estimation of mycelial biomass in leaf litter. Soil Biol. Biochem. 10. 1977, 323-333.
- Gibbs, J.G.: Dissemination of clubroot in the dung of farm stock. New Zealand J. Agr. 57. 1931, 193-198.
- Göttlich, K.: Moor- und Torfkunde. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele und Obermiller) Stuttgart 1980.

- Hepper, C.M.: A colorimetric method for estimating vesicular mycorrhizal infection in roots.
Soil Biol. Biochem. 9. 1976, 15-18.
- Krnjaic, D. & S. Krnjaic: Dispersion of nematodes by wind.
Boll. Lab. Entomol. Agrar. "Filippo Silvestri" 30. 1972-73, 66-70.
- Levy, G.A. & A. McAllan: The N-acetylation and estimation of hexosamines.
Biochem. J. 73. 1959, 127-132.
- Mattusch, P. & H.-H. Theune: Untersuchungen zum Einfluß des Sili-
lierprozesses bei Herbstrüben auf die Lebensfähigkeit der Dauer-
sporen von Plasmodiophora brassicae.
Jahresbericht Biol. Bundesanstalt für Land- und Forstw. 1978, 27.
- Moxham, S.E. & S.T. Buczacki: Chemical composition of the resting
spore wall of Plasmodiophora brassicae.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 80. 1983, 297-304.
- Moxham, S.E., Fraser, S.S. & S.T. Buczacki: Spore wall proteins
of Plasmodiophora brassicae.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 80. 1983, 497-506.
- Nicolas, D.P. & D. Parkinson: A comparison of methods for asses-
sing the amount of fungal mycelium in soil samples.
Pedobiologia 7. 1967, 23-41.
- Orr, C.C. & O.H. Newton: Distribution of nematodes by wind.
Plant Disease Reporter 55. 1971, 61-63.
- Pacousky, R.S. & G.J. Bethlenfalvay: Measurement of the mycelium
of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil by chitin de-
termination.
Plant and Soil 68. 1982, 143-147.
- Reissig, J.L., Strominger, J.L. & L.F. Leloir: A modified colori-
metric method for the estimation of N-acetyl amino sugars.
J. Biol. Chem. 217. 1955, 959-966.
- Ride, J.P. & R.B. Drysdale: A chemical method for estimation Fu-
sarium oxysporum f. lycopersici in infected tomato plants.
Physiol. Plant Pathol. 1. 1971, 409-420.
- Dieselben: A rapid method for the chemical estimation of filamen-
tous fungi in plant tissue.
Physiol. Plant Pathol. 2. 1972, 7-15.
- Sigma Chemical Company: Enzymatic assay of chitinase.
Saint Louis, Miss., USA (EC 3.2.14)
- Skujins, J.J., Potgieter, H.J. & M. Alexander: Dissolution of
fungal cell walls by a streptomycete chitinase and (1,3) glucanase.
Arch. Biochem. Biophys. 111. 1965, 358-364.
- Swift, M.J.: The estimation of mycelial biomass by determination
of the hexosamine content of wood tissue.
Soil Biol. Biochem. 5, 1973, 321-332.

Tsuij, A., Kinoshita, T. & M. Hoshino: Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Chemical and Pharmaceutical Bull. 17. 1969, 1505-1510.

Wolf, G. & F. Fric: A rapid method for staining Erysiphe graminis f. hordei in and on barley leaves with a protein specific dye. Phytopathology 71. 1981. 596-598.

Danksagung

Der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen sei an dieser Stelle für die finanzielle Förderung der Arbeiten gedankt. Dank sei auch gesagt den verschiedenen Torfgewinnungsbetrieben und den Pflanzenschutzberatern sowie den vielen Betriebsinhabern, die uns bei unseren Probenahmeaktionen und sonstigen Arbeiten unterstützt haben.