

Kurzbericht

Auf dem Weg zu einem quantitativen *Chalara*-Nachweis

Werner E. Heller und Cornelia Zoller, Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW, CH-8820 Wädenswil

Auskunft: Werner E. Heller, E-Mail: werner.heller@acw.admin.ch, Tel. + 41 44 786 63 68

Zusammenfassung

Der traditionelle qualitative Nachweis von Yarwood für die bodenbürtigen Schadpilze *Chalara elegans* (synanamorph: *Thielaviopsis basicola*) und *C. thielavioides* (synanamorph: *Chalaropsis thielavioides*) in Böden und Substraten wurde modifiziert, um quantitative Aussagen zur Populationsdichte der Pilze in Böden zu ermöglichen. Erste Ergebnisse unabhängig wiederholter Untersuchungen verschiedener Böden zeigen eine gute Wiederholbarkeit über die Zeit mit akzeptablen Streuwerten für eine bodenbiologische Untersuchungsmethode. Die neue Methode wird weiter validiert.

In der Agrarforschung wurde schon vor einigen Jahren auf des Problem der Schwarzfleckenpilze *Chalara elegans* (synanamorph: *Thielaviopsis basicola*) und *C. thielavioides* (synanamorph: *Chalaropsis thielavioides*) für die Schweizer Karottenproduktion aufmerksam gemacht. In den vergangenen Jahren wurden die von diesen Pilzen verursachten Qualitätsprobleme an der Verkaufsfront so akut, dass sich die Gemüseproduzenten (VSGP), der Verband der Lagerhalter (Swisscofel), der Kanton Zürich und der Bund veranlasst sahen, das Projekt «Qualitätssicherung in der Karottenproduktionskette» zu finanzieren. Ziel dieses Projektes der Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW war eine drastische Reduktion der Qualitätsbeeinträchtigungen durch *Chalara*-Pilze am point of sale durch technische Massnahmen entlang der Produktionskette. Das Projekt wurde 2005 in Angriff genommen und Ende 2007 erfolgreich abgeschlossen.

Abb. 1. Yarwood-Test: Karottenscheiben zum qualitativen Nachweis von *Chalara*-Pilzen in Böden und Substraten. (Photo W.E. Heller, ACW)

Die Ergebnisse der Arbeiten und der Projektbericht sind auf der Projekt-Website abrufbar (www.qs-karotten.ch). Das Projekt befasste sich allerdings nur mit den Nachernte-Aspekten der *Chalara*-Problematik. Die eigentliche Ursache der Probleme, die Verseuchung der Böden mit den beiden Pilzen wurde nicht bearbeitet. Im Rahmen des Projektes «Nachhaltige Bekämpfung bodenbürtiger Pilzkrankheiten im Gemüsebau» sollen nun die Intensität der Kontamination von Böden, der Einfluss unterschiedlicher Fruchtfolgen auf die Verseuchung und die Entwicklung von Bekämpfungsmaßnahmen an die Hand genommen werden. Eine notwendige Voraussetzung für solche Arbeiten ist eine quantitative Nachweismethode für *Chalara*-Pilze in Böden, die bisher nicht existiert. Ohne einen quantitativen *Chalara* Test (QCT) können Veränderungen in der Populationsdichte der Pilze durch unterschiedliche Fruchtfolgen oder Bewirtschaftungsmassnahmen nicht festgestellt werden.

Bereits 1946 zeigte Yarwood, dass die Anwesenheit von *Chalara*-Pilzen in Böden mit Hilfe von aufgelegten Karottenscheiben qualitativ nachgewiesen werden kann. Seither wurden verschiedene künstliche antibiotika- und fungizidhaltige Nährmedien vorgeschlagen, mit deren Hilfe *Chalara*-Pilze in Böden nach Aussagen der Autoren quantitativ nachgewiesen werden können (Holtz *et al.* 1994). Die hohe Selektivität der Karottenscheiben für *Chalara*-Pilze an sich wurde aber von den Autoren nicht in Frage gestellt. Da Yarwoods *Chalara*-Nachweis in unserem Labor eine lange Tradition hat, nahmen wir eine Weiterentwicklung des Karottenscheiben-Tests in Richtung einer quantitativen Aussage in Angriff.

Bodenproben und Inkubation

Die Bodenproben für den QCT wurden in verschiedenen Flächen des Mittellandes mit einer nachgewiesenen *Chalara*-Kontamination entnommen.



Die Bodenproben werden gezogen wie von den Referenzmethoden der Forschungsanstalten vorgeschrieben. Zur Mischung und Entfernung von Steinen wurden die Bodenproben mit einem autoklavierbaren Chromstahlsieb gesiebt (4 mm Maschenweite).

Als Selektivmedium wurden unter *Chalara*-freien Bedingungen kultivierte Karotten verwendet, unter hygienischen Bedingungen in 4 mm dicken Scheiben geschnitten.

In einem ersten Ansatz wurde Yarwood's Test im eigentlichen Sinne umgedreht: Anstatt die Karottenscheiben mit einer undefinierten Menge Boden in Kontakt zu bringen, wurde eine definierte Menge in verdünntem Wasser-Agar suspendierter Boden in 20 µl-Tropfen auf die Karottenscheiben inokuliert. Pro Probe wurden 50 Karottenscheiben in Kunststoffboxen in einer Feuchtkammer bei 20°C. während zehn Tagen im Dunklen inkubiert.

Nach zehn Tagen wurden die inokulierten Scheiben mit der Binokularlupe auf *Chalara*-Infektionen untersucht und im positiven Fall die Art des Pilzes festgestellt.

Im Laufe der Validierung der QCT-Methode wurde jede Bodenprobe mehrmals von verschiedenen Mitarbeitenden untersucht. Die Verdünnung der Bodenproben wurde mit 1/10 konstant gehalten.

Aufgrund der definierten Bodenmasse pro 20 µl-Tropfen kann aus der Anzahl *Chalara*-positiven Inokulationspunkte die Anzahl kolonienbildender Einheiten (CFU) pro kg Boden berechnet werden.

Vielversprechende Ergebnisse

Die Anzahl der *Chalara*-positiven Inokulationspunkte pro 1 ml Bodensuspension (50 x 20 µl Tropfen) wurde unter der Binokularlupe ausgewertet. In der Graphik 2 sind die Ergebnisse unabhängig wiederholter Untersuchungen verschiedener Bodenproben in der 1/10 Verdünnung zusammengestellt.

Die Validierung des QCT in Bezug auf Auflösung, Wiederholbarkeit und die optimalen Verdünnungsverhältnisse bei unterschiedlichen Böden ist noch nicht abgeschlossen. Wir können deshalb hier noch nicht eine definitive Nachweisme-

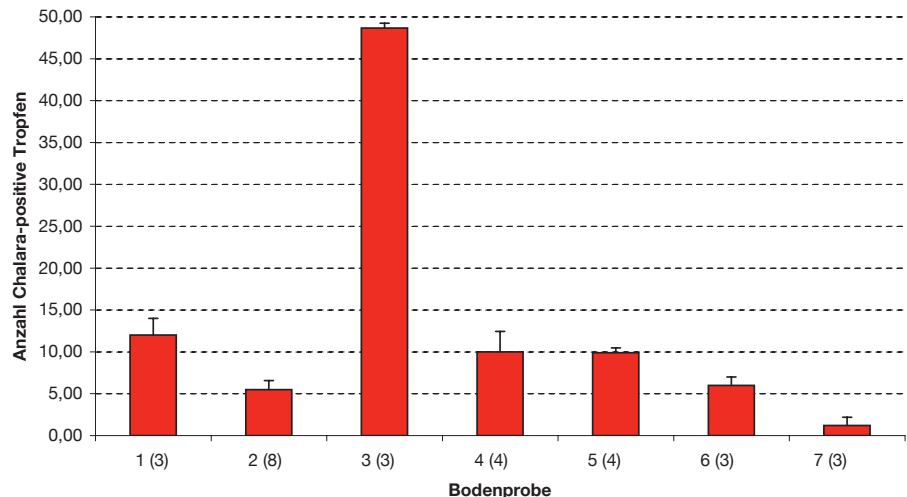


Abb. 2. Erste Ergebnisse des quantitativen *Chalara*-Tests unterschiedlicher Bodenproben in mehrfacher Wiederholung der Ansätze. Die Anzahl Wiederholungen ist in Klammern gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Streuungen der *Chalara*-positiven Inokulationstropfen, die sich nach Inkubation entwickelt haben.

thode wiedergeben. Die ersten Ergebnisse zeigen aber, dass es sich lohnt, die Untersuchungen weiter zu verfolgen. Es kann immerhin gezeigt werden, dass der mehrfach wiederholte qualitative *Chalara* Test bei konstant gehaltener Verdünnung für eine bodenbiologische Untersuchungsmethode erfreulich geringe Streuungen aufweist. Wir werden die Validierungsarbeiten weiterführen.

Literatur

Heller W.E., 2000. Schwarzfleckenpilze: unterschätzte Krankheitserreger der Karotte? *Agrarforschung* 7(09), 420-423.

Yarwood C.E., 1946. Isolation of *Thielaviopsis basicola* from Soil by Means of Carrot Disks. *Mycologia* 38, 346-348.

Eidg. Forschungsanstalten FAL, RAC, FAW. 1996. Schweizerische Referenzmethoden der Eidgenössischen landwirtschaftlichen Forschungsanstalten, Band 2: Bodenuntersuchung zur Standort-Charakterisierung.

Holtz B.A. & Weinhold A.R., 1994. *Thielaviopsis basicola* in San Joaquin Valley Soils and the Relationship Between Inoculum Density and Disease Severity of Cotton Seedlings. *Plant Disease* 78, 986-990.



Abb. 3. Probe eines extrem stark mit *Chalara elegans* verseuchten Bodens nach Inkubation. Die Schwarzen Flecken sind von den Chlamydosporen von *Chalara elegans* verursacht. (Foto W.E. Heller, ACW)