

März 2004

Abschlussbericht für das Forschungsprojekt Nr. 1230:

„Biologie, Verbreitung und Charakterisierung von *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes, dem Erreger der Schwarzen Wurzelfäule der Tomaten und mögliche Vorbeugungs- und Bekämpfungsmaßnahmen“

Projektleiter: K. Pieber

Berichterstatter: U.S. Flad, G. Bedlan

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| bp | Basenpaare |
| CMA | corn meal agar |
| CRM | corky root medium |
| DC-Stadium | Dezimalcode für Wachstums- und Entwicklungsstadien |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| EC | electrical conductivity, elektrische Leitfähigkeit |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| endo-PL | Endopektinlyase |
| ETS | extern transkribierter Spacer |
| FM | Frischmasse |
| ITS | intern transkribierter Spacer |
| NH ₄ NO ₃ | Ammoniumnitrat |
| nrDNA | nukleär ribosomale DNA |
| NTS | nicht transkribierter Spacer |
| PCA | potato carrot agar |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDA | potato dextrose agar |
| rpm | rounds per minute |
| s.str. | sensu stricto |
| SNA | synthetic low-nutrient agar, spezieller nährstoffarmer Agar |
| SPSS | Statistical Product and Service Solutions, Programmsystem für statistische Auswertungen |
| Tab. | Tabelle |
| TM | Trockenmasse |
| v.l.n.r. | von links nach rechts |
| V8-Agar | Gemüsesaftagar |
| WA | Wasseragar |

Allgemeine Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird eine in Europa bisher wenig beachtete Tomatenkrankheit vorgestellt. *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes ist der Erreger der Schwarzen Wurzelfäule und der Fruchtfäule an Tomaten.

Die Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gehört zur Familie der *Solanaceae* und der Gattung *Lycopersicon*. Die Heimat der Tomate sind die peruanischen Anden. Von den Ureinwohnern Mexikos und Perus wurden sie bereits als Nahrungsmittel genutzt und mit dem aztekischen Namen „tomatle“ („tomana“ für mexikanisch wachsen, anschwellen) benannt. Die Wildtomaten haben Früchte von der Größe der Johannisbeeren. Die heutige Kulturfrucht ist eine Beere und entstand durch Fasziation (Verwachsen der Fruchtblätter). Der Fruchtstand ist eine Traube, wird umgangssprachlich und im Folgenden aber als Rispe bezeichnet. Columbus brachte die Tomate von seiner zweiten Amerikareise 1498, ebenso wie die Kartoffel, nach Europa, wo sie anfänglich als giftige Zierpflanze galt. Um 1800 wurde sie dann als Gemüse kultiviert und von dort, nicht von Mittelamerika direkt, gelangte die Tomate wieder nach Nordamerika (1812). Allgemeines Volksnahrungsmittel wurde sie im ersten Weltkrieg und ist seither eine der wichtigsten Gemüsearten.

Im Jahr 2000 wurden laut FAO weltweit 102 Mio. Tonnen Tomaten produziert (Abb. 1). Die EU produziert davon ungefähr 15 Prozent, wobei Italien und Spanien zusammen schon über die Hälfte produzieren (Abb. 2).

Vom Keimen der Tomatenpflanzen an gibt es zahlreiche Krankheitserreger (Pilze, Bakterien und Viren) und Schädlinge, die den Ertrag stark reduzieren oder vollständig vernichten können. Für einen erfolgreichen Anbau ist somit nicht nur eine gute Kulturführung (Sortenwahl, Bodenbearbeitung, Düngung, Bewässerung etc.) sondern auch eine fundierte Kenntnis der möglicherweise auftretenden Erkrankungen und deren frühe und korrekte Bekämpfung unerlässlich.

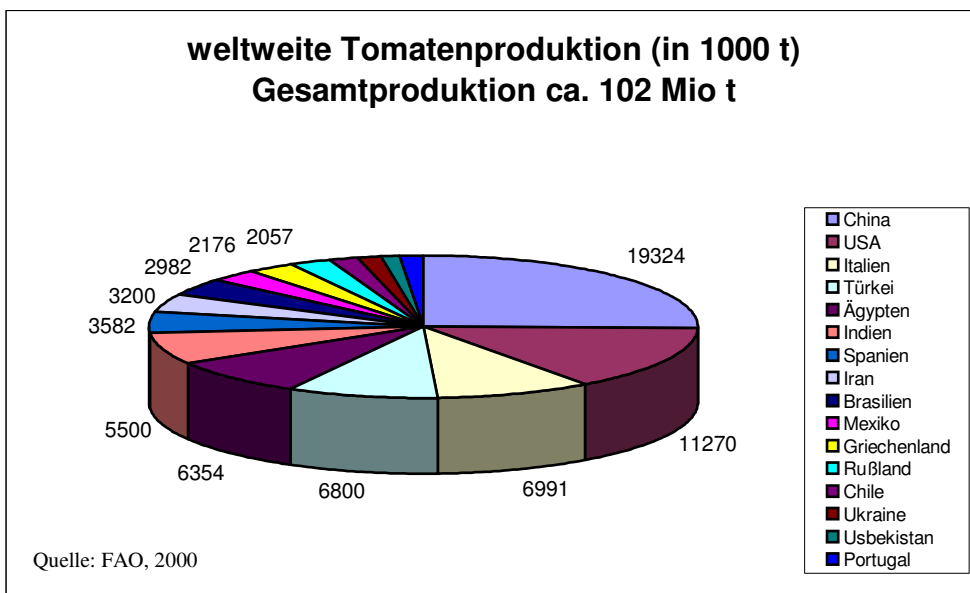


Abb. 1. Weltweite Tomatenproduktion

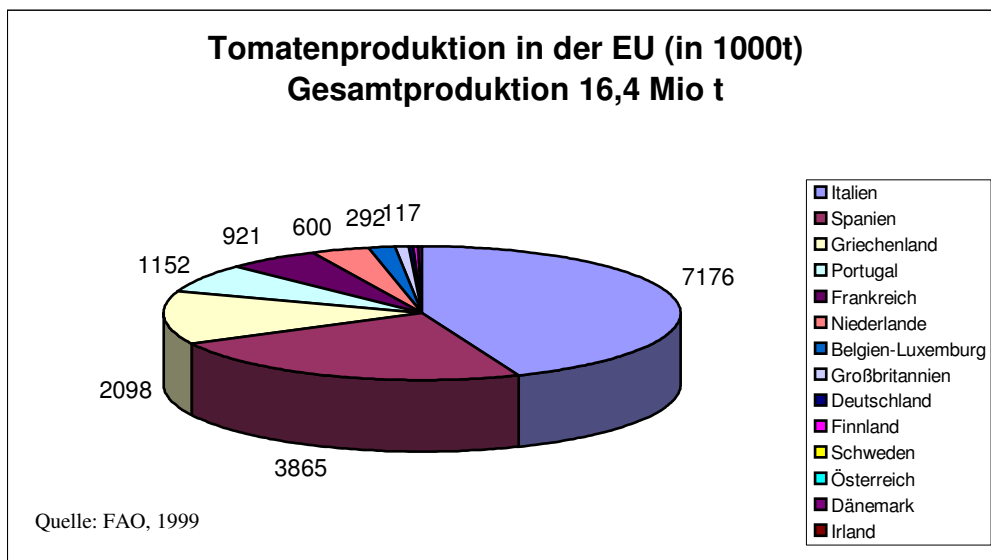


Abb. 2. Tomatenproduktion in der EU

Ziel der Arbeit

Der Erreger *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes gewinnt nicht nur an Kartoffeln an Bedeutung [Lees und Hilton 2003, Prusky et al. 2000], sondern auch an Tomaten, wie zahlreiche Berichte aus der Praxis und die vorliegende Arbeit zeigen. Es wurde die Verbreitung des Erregers *C. coccodes* in sechs Bundesländern Österreichs und die Häufigkeit des Auftretens in Betrieben mit Tomatenkulturen, sowohl in Erde als auch in erdelosen Kulturen, untersucht. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt bei der Quantifizierung des tatsächlichen Ernteausfalls durch das Auftreten der Schwarzen Wurzelfäule. Dies ist wichtig, um die Bedeutung der Krankheit für die Praxis abzuschätzen und zu beurteilen, ob eine chemische Bekämpfung wirtschaftlich sinnvoll und ökologisch zu vertreten ist. Hierfür wurden Versuche zum Thema der chemischen Bekämpfung durchgeführt. Der diagnostische Nachweis des Erregers ist ebenfalls von zunehmender Wichtigkeit und wurde mittels PCR etabliert.

Systematik der Gattung *Colletotrichum*

Colletotrichum coccodes (Wallr.) S. Hughes ist nach dem Wissenschaftler Stanley John Hughes benannt und nimmt in der Systematik der Pilze folgende Stellung ein:

| | |
|----------------|---|
| Unterabteilung | <i>Deuteromycotina</i> (Fungi imperfecti) |
| Klasse | <i>Coelomycetes</i> |
| Ordnung | <i>Melanconiales</i> |
| Familie | <i>Melanconiaceae</i> |
| Gattung | <i>Colletotrichum</i> |

Einen aktuellen Überblick über die Kontroverse um die Systematik der Gattung *Colletotrichum* gibt Cannon et al. [2000]. Die relevanten Punkte, insbesondere in Hinblick auf *C. coccodes* sollen im Folgenden nochmals dargestellt und mit neuen Forschungsergebnissen ergänzt werden.

Das erste systematische Konzept der Gattung *Colletotrichum* wurde von Corda 1837 entwickelt. Die letzte umfassende Revision erfolgte im Jahr 1992 durch Sutton [1992], der viele Arten zu Artenkomplexen zusammenfasste und 39 „akzeptierte“ Arten zur Diskussion stellte. Diese systematische Einteilung basierend auf morphologischen Kriterien (Form und Größe der Konidien, der Setae und Apressorien) in Kombination mit Wirtspflanzenspezifität konnte in den letzten Jahren durch molekulare Daten ergänzt und verifiziert werden [Johnston und Jones 1997, Martinez-Culebras et al. 2003, Sherriff et al. 1994, Sreenivasaprasad et al. 1996].

Im Gegensatz zu vielen anderen Vertretern dieser Gattung repräsentiert *C. coccodes* eine genetisch gut abgegrenzte Art [Sreenivasaprasad et al. 1996]. Die anderen Vertreter der Gattung, die ebenfalls als Erreger an Tomatenpflanzen vorkommen können, gehören zu so genannten Artenkomplexen, die allerdings einer laufenden Revision unterliegen. Für den *C. gloeosporioides*-Komplex könnte beispielsweise auch ein Unterartensystem sinnvoll erscheinen.

Erschwert wird eine gute Systematik durch die widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen, so ist z.B. *C. capsici* bei Sreenivasaprasad et al. [1992] ganz

klar eine genetisch differenzierte Art, in einer neueren japanischen Arbeit von Moriwak et al. [2002] wird der Pilz dem *C. dematium*-Komplex zugeordnet. Diese Aussage bedarf sicher noch einer genaueren Prüfung und wird in der Aufstellung im Folgenden mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Solche Widersprüche lassen sich oftmals durch falsche morphologische Identifizierungen der untersuchten Belege erklären, so auch bei Proben, die von Johnston et al. [1997] als *Glomerella miyabeana* aus Neuseeland identifiziert wurden, später aber in der Arbeit von Martinez-Culebras et al. [2003] als *C. acutatum*. Dieser letzte Punkt, die morphologischen Fehlbestimmungen, scheint ein zentrales Problem in der aktuellen Diskussion um eine gute systematische Einteilung der Gattung *Colletotrichum* zu sein. Hinzu kommt, dass durch neue molekulare Methoden immer wieder neue Arten, innerhalb bereits bekannter Artenkomplexe, beschrieben werden [Afanador-Kafuri et al. 2003, Martinez-Culebras et al. 2003]. Trotz dieser vielfältigen Problematik wird im Folgenden ein kurzer Überblick über die an Tomate relevanten Arten bzw. Artenkomplexe der Gattung *Colletotrichum* gegeben:

C. coccodes

C. acutatum-Komplex

C. acutatum s.str.

C. acutatum

Glomerella acutata

C. gloeosporioides- Komplex

C. gloeosporioides

Glomerella cingulata

C. kahawae

C. musae

C. fragariae

C. fuscum

C. sp. 'novum'

C. dematium-Komplex

C. dematium

C. sp. 'novum'

C. capsici ?

C. capsici

Neben der dargestellten Einteilung auf genetischer Grundlage existiert parallel dazu das System der klassischen Systematik mit der Einteilung nach Wirtspflanzen. Die bekanntesten Arten sind wirtsspezifische Arten, z.B. *C. kahawae* an Kaffee, *C. musae* an Banane, *C. lindemutianum* an Bohnen, *C. trifolii* an Luzerne, *C. lini* an Flachs, *C. graminicola* an Mais oder *C. falcatum* an Zuckerrohr. *C. coccodes* stellt wie auch *C. gloeosporioides* eine polyphage Art dar (Tab. 1), die an einem großen Wirtspflanzenkreis Fruchtfäule oder Symptome an Stängeln, Ästen, Blättern oder Wurzeln verursacht.

An Tomate kann es zum Befall durch folgende *Colletotrichum*-Arten kommen:

C. phomoides [Pantidou und Schroeder 1955] als Synonym für *C. coccodes*, *C. capsici* [McLean und Roy 1991], *C. dematium* [DalBello 2000], *C. gloeosporioides* [Batson und Roy 1982] und *Glomerella miyabeana* [Johnston und Jones 1997] möglicherweise fehlbestimmt und eigentlich *C. acutatum*.

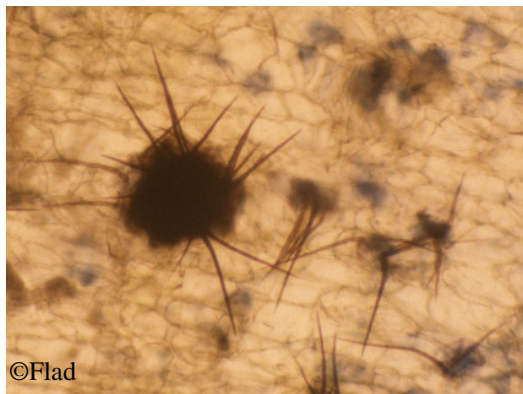
Teleomorph

Für einige *Colletotrichum*-Arten wurde das Teleomorph (Hauptfruchtform) gefunden und als Gattung *Glomerella* (Stoneman) v. Schrenk et Spauld. (zu den *Ascomycota* zählend) beschrieben. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das Teleomorph *Glomerella cingulata* mit dem Anamorph (Nebenfruchtform) *Colletotrichum gloeosporioides* [Cisar 1996]. Für *C. coccodes* wurde die Hauptfruchtform bisher noch nicht gefunden [Delon 1975].

Biologie von *Colletotrichum coccodes*

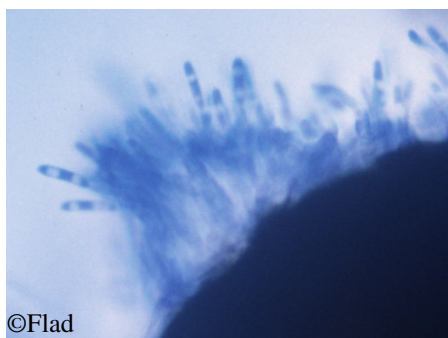
Sklerotien

Sklerotien variieren sehr stark in der Größe zwischen 100-3000 μm [Delon 1975]. Sie entstehen aus hyalinen Hyphen mit Lipidtröpfchen und färben sich später braun bis schwarz. Sie enthalten Bereiche mit Schleim, die melanisierte Stoffe enthalten, diese dienen als Abbauschutz durch die Umwelt. Für eine Sklerotienproduktion eignet sich V8 im Dunkeln oder PDA im Dunkeln oder bei Licht [Barksdale 1967].



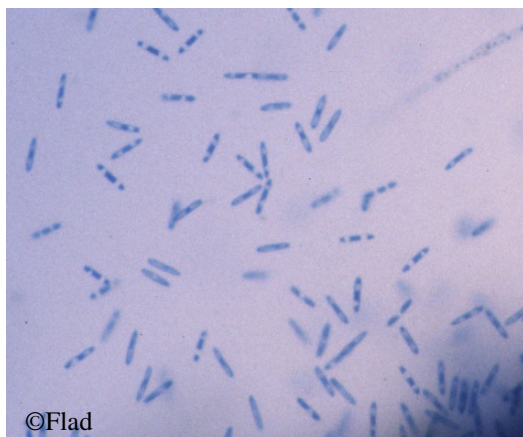
Acervulus

Wenn ein Sklerotium einen Acervulus ausbildet, entsteht eine Art Palisadengewebe, das später hyaline Konidiophoren bildet, auf denen die charakteristischen dünnwandigen, zylinderförmigen, hyalinen Konidien entstehen. Oft durchstößt der Acervulus die Wurzelepidermis, die Sklerotien werden subepidermal gebildet [Delon 1975]. Acervuli bilden sich meist nicht in nährstoffreichen Medien und die Sklerotien bleiben setenlos [Blakeman und Hornby 1966].

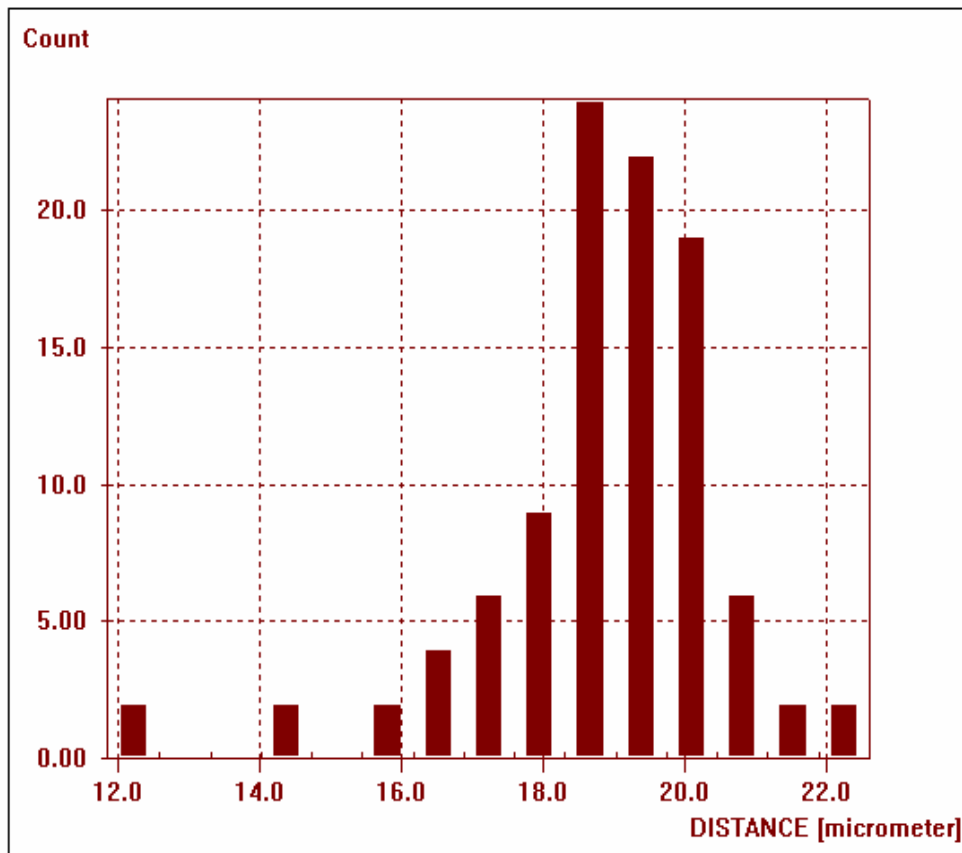


Konidien

Die Konidien sind einzellig mit eingeschlossenen Öltröpfchen und werden bei der Keimung kurz nach Appressorienbildung oftmals zweizellig [Blakeman und Hornby 1966]. Sie messen 3,2-6,8 μm breit und 16,4- 25,0 μm lang 10-30 μm und werden nicht kettenförmig, sondern einzeln an den Konidiophoren gebildet [Delon 1975]. Um größere Mengen an Sporen zu produzieren, eignet sich eine Kultur auf V8 im Licht [Barksdale 1967]. In Reinkultur wurde auch eine „freie Konidienbildung“ direkt am Myzel und nicht in Acervuli beobachtet [Delon 1975].

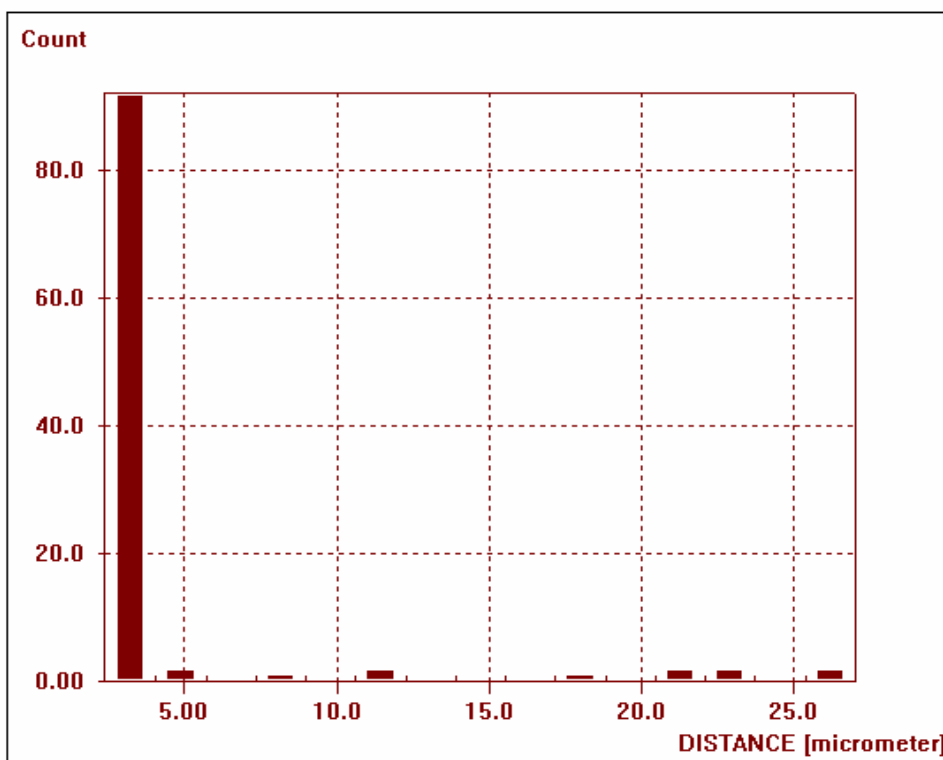


Sporenlänge:



| Statistics | |
|-------------|---------------|
| file | cc_laenge_04 |
| parameter | DISTANCE |
| counts | 100 |
| lower bound | 11.872492 |
| upper bound | 22.604285 |
| underflow | 0 |
| in range | 100 |
| overflow | 0 |
| classes | 15 |
| modul | 0.715453 |
| min.count | 0.000000 |
| max.count | 24.000000 |
| Statistics | |
| minimum | 11.872492 |
| maximum | 22.504285 |
| sum | 1885.691796 |
| medianvalue | 19.059541 |
| mean | 18.856918 |
| variance | 2.863531 |
| std.dev. | 1.692197 |
| skewness | -1.477792 |
| kurtosis | 553208.713371 |

Sporenbreite:



| Statistics | |
|-------------|---------------|
| file | cc_laenge_01 |
| parameter | DISTANCE |
| counts | 104 |
| lower bound | 2.443280 |
| upper bound | 26.996471 |
| underflow | 0 |
| in range | 104 |
| overflow | 0 |
| classes | 15 |
| modul | 1.636879 |
| min.count | 0.000000 |
| max.count | 92.000000 |
| Statistics | |
| minimum | 2.443280 |
| maximum | 26.896471 |
| sum | 492.317200 |
| medianvalue | 3.368473 |
| mean | 4.733819 |
| variance | 25.230241 |
| std.dev. | 5.022971 |
| skewness | 3.284804 |
| kurtosis | 861044.127222 |

Keimung und Appressorienbildung

Die Keimung erfolgt uni- oder bipolar bei 20-22°C; nach 2 h wurden bereits Keimschläuche gebildet, nach 10-12 h sind 80% der Sporen gekeimt [Byrne et al. 1997 a]. Nur 50% der gekeimten Sporen bilden Appressorien aus [Delon 1975] und nur bei 2,7% der Sporen mit melanisierten Appressorien waren nach 22 h Infektionsvesikel zu sehen, der eindeutige Beweis für eine erfolgreiche Infektion [Byrne et al. 1997 a].

Veränderte Eigenschaften durch längeres Kultivieren

Durch längeres Kultivieren auf Agar verändern sich die Eigenschaften der Isolate, häufig kommt es zur Sektorbildung (d.h. Myzel bildet keine Sklerotien) und manchmal zur rötlichen Farbbildung durch eine Blockade der Adeninbiosynthese [Chesters und Hornby 1965 a].

Bildung toxischer Substanzen

C. coccodes bildet je nach Agar und Alter der Kultur toxische Substanzen, die die Keimung von Tomatensamen hemmen, bei Keimlingen Welke hervorrufen und das Mesophyll in den Blättern zerstören [Cuany et al. 1974].

Infektionsverlauf und Pathogenese

Infektionsverlauf

Obwohl eine direkte Penetration der Zellwand festgestellt wurde [Byrne et al. 1997 a], gibt es viele Arbeiten, die eine Verletzung als notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion beschreiben [Manning 1980]. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Infektion sind 20°C und 16 h Blattfeuchtigkeit oder 25°C und 12 h [Byrne et al. 1998]. Die optimale Temperatur zur Fruchtkontamination liegt bei 25°C, für Myzelwachstum bei 28°C und für Keimung bei 22°C [Dillard 1988 + 1989].

Es ist keine Verletzung der Tomatenfrüchte zur erfolgreichen Infektion notwendig [Barksdale 1967]. Werden unverletzte grüne Tomaten infiziert, kommt es erst zur Reife zum Ausbruch

der latenten Infektion [Doken 1984]. Läsionen werden bei geeigneten Temperaturen 5-6 Tage nach Infektion der reifen Früchte sichtbar [Dillard 1989].

In einem natürlich befallenen Feld konnte der Erreger erstmals nach 30 bzw. 37 Tagen von den Wurzeln isoliert werden, dies entspricht dem Zeitpunkt der Blüte der ersten Rispe. Die Infektionsstärke nimmt dann vom Ansatz der grünen Früchte bis zu deren Reife weiter stark zu [Dillard und Cobb 1997].

Mit zunehmendem Alter der Tomatenblätter steigt die Anfälligkeit für eine Infektion durch *C. coccodes* [Byrne et al. 1998].

Pathogenese

Durch die erfolgte Fruchtinfection steigt der pH-Wert in der Frucht innerhalb von 13 Tagen von 4,3 auf 5,2 an [Sapers et al. 1978]. Der erhöhte pH-Wert der Tomatenfrüchte stellt für die Industrie ein Problem für die Verarbeitung dar, unabhängig von der sich entwickelnden Fruchtfäule.

Von befallenem Tomatenfruchtgewebe konnten pektolytische Enzyme gewonnen werden; *C. coccodes* produziert in vitro und in vivo endo-PL (Endopektinlyase), welches für die Mazeration des Fruchtgewebes mitverantwortlich ist. Die Zellwandproteine der nicht infizierten Tomate hemmen zu 70% die Protease, die von *Botrytis cinerea* produziert wird, nicht oder nur kaum die endo-PL von *C. coccodes* [Brown und Adikaram 1983].

Tomatenwurzeln produzieren Substanzen (u.a. phenolische Verbindungen und Phytoalexine), um bei geringem Befall durch *C. coccodes* oder *P. lycopersici* die physiologischen Prozesse, das Wachstum und die Enzymaktivität der Pilze zu unterdrücken [Davet und Ravise 1976].

Wirtsspektrum von *Colletotrichum coccodes*

Es sind eine Fülle von Spezies in 19 Familien als Wirte bekannt [Jones et al. 1991], wovon einige in Tab. 1 zusammengestellt sind. Aus der Literatur kennt man auch einige Pflanzen, für die zwar keine natürliche Infektionen beschrieben wurde, die aber erfolgreich künstlich infiziert werden können, so z.B. Erdbeere [Mass und Howard 1985] oder Chrysanthemen [Chesters und Hornby 1965 b].

Es wurden folgende Pflanzen angebaut: Physalis, Gurke, Aubergine, Paprika und Zucchini. Jeweils fünf Pflanzen wurden mit einer Sporenlösung von *C. coccodes* mit je 12×10^6 Sporen/Pflanze (Isolat K 4, Kärnten) infiziert. 10 Wurzelstücke pro Pflanze wurden nach zwei Monaten auf SNA aufgelegt und nach mehreren Wochen mikroskopiert.

An Gurke und Aubergine konnte eine erfolgreiche Infektion der Wurzeln durch *C. coccodes* nachgewiesen werden.

Tab. 1. Wirtsspektrum von *C. coccodes* [Batson und Roy 1982, Johnson et al. 2002, Johnston und Jones 1997, Chesters und Hornby 1965 a + b, McPartland und Hosoya 1998, Moore 1959, O'Gara 1917, Raid und Pennypacker 1987, Riccioni und Conca 1998, Tu und Poysa 1997, Wilhelm 1956]

| Familie | Name | Deutsche Bezeichnung |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | |
| <i>Amaranthaceae</i> | <i>Amaranthus albus</i> | Weißer Fuchsschwanz |
| <i>Amaranthaceae</i> | <i>Amaranthus retroflexus</i> | Zurückgekrümmter Fuchsschwanz |
| <i>Araliaceae</i> | <i>Panax quinquefolius.</i> | Amerikanischer Ginseng |
| <i>Asteraceae</i> | <i>Cirsium arvense</i> | Acker-Kratzdistel |
| <i>Asteraceae</i> | <i>Lactuca sativa</i> | Salat |
| <i>Brassicaceae</i> | <i>Brassica oleracea</i> | Kohl |
| <i>Brassicaceae</i> | <i>Brassica alba</i> | Senf |
| <i>Brassicaceae</i> | <i>Lepidium sativum</i> | Kresse |
| <i>Brassicaceae</i> | <i>Capsella bursa-pastoria</i> | Hirtentäschelkraut |
| <i>Caryophyllaceae</i> | <i>Stellaria media</i> | Vogelmiere |
| <i>Chenopodiaceae</i> | <i>Chenopodium album</i> | Weißer Gänsefuß |
| <i>Convolvulaceae</i> | <i>Convolvulus arvensis</i> | Ackerwinde |
| <i>Curcurbitaceae</i> | <i>Citrullus lanatus</i> | Wassermelone |
| <i>Curcurbitaceae</i> | <i>Cucurbita pepo</i> | Kürbis |
| <i>Fabaceae</i> | <i>Glycine max</i> | Sojabohne |
| <i>Lamiaceae</i> | <i>Mentha spp.</i> | Minze |
| <i>Malvaceae</i> | <i>Abutilon theophrasti</i> | Samtpappel |
| <i>Oxalidaceae</i> | <i>Oxalis stricta</i> | Aufrechter Sauerklee |
| <i>Poaceae</i> | <i>Lolium multiflorum</i> | Weidelgras |
| <i>Poaceae</i> | <i>Agropyron repens</i> | Quecke |
| <i>Poaceae</i> | <i>Digitaria sanguinalis</i> | Blutfingerhirse |
| <i>Poaceae</i> | <i>Panicum dichotomiflorum</i> | Gabelästige Hirse |
| <i>Poaceae</i> | <i>Setaria lutescens</i> | Borstenhirse |
| <i>Polygonaceae</i> | <i>Polygonum pennsylvanicum</i> | Pennsylvanischer Knöterich |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Cyphomandra betacea</i> | Tamarillo, Baumtomate |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Capsicum annum</i> | Paprika/Pfefferoni |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Solanum capsicastrum</i> | Korallenbäumchen, Zimmerpflanze |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Solanum melongena</i> | Aubergine |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Solanum nigrum</i> | Schwarzer Nachtschatten |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Solanum dulcamara</i> | Bittersüßer Nachtschatten |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Solanum sarachoides</i> | Saracho-Nachtschatten |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Kartoffel |
| <i>Solanaceae</i> | <i>Lycopersicon esculentum</i> | Tomate |

Kreuzinfektion

Erstmalig im Jahr 1908 und mehrfach danach wurde die Kreuzinfektion der *C. coccodes*-Isolate von Kartoffel und Tomate festgestellt [Chesters und Hornby 1965 b, Doken 1984, Ducomet 1908, Illman et al. 1959]. Es ist bekannt, dass *C. coccodes*-Isolate von Minze an Kartoffel infektiös sind [Johnson et al. 2002]. Künstliche Infektionen u.a. mit *C. trichellum* von Bambus, *C. graminicola* und *C. destructivum* von Luzerne sind an Tomatenfrüchten erfolgreich [Batson und Roy 1982]. Ebenso gelingt eine Übertragung von *C. coccodes* von Auberginenwurzeln auf Tomatenwurzeln [Daughtrey und Schippers 1980].

Auch bei *Pyrenochaeta lycopersici* kennt man eine Kreuzinfektion, so sind Isolate von Spinat und *Carthamus tinctorius* (Färberdistel) an Tomatenkeimlingen pathogen [Grove und Campell 1987].

Samenübertragbarkeit

Es wurden sechs Tomatenpflanzen (Sorte Mercedes) in Erde angezogen und drei Pflanzen davon im DC-Stadium 24 und 28 mit einer Sporenlösung (Isolat S7, Steiermark) gegossen (10^7 Sporen/Pflanze). Die Pflanzen wurden ausreichend gedüngt und gegossen. Von jeder Pflanze wurden drei Früchte vollreif geerntet. Die Samen wurden auf Papier ausgestrichen und luftgetrocknet.

Die Wurzeln der Pflanzen wurden am Ende der Saison gewaschen, desinfiziert und in einer Feuchten Kammer bebrütet. Bei den infizierten Pflanzen konnte eine erfolgreiche Infektion bestätigt werden, bei den Kontrollpflanzen ausgeschlossen werden.

In Mikrotitterplatten mit 24 Vertiefungen wurde in jede Vertiefung 1,5 ml Agar (Malzagar mit 2 g Hefeextrakt /Liter mit Antibiotika-Supplement) gefüllt. Die getrockneten Tomatensamen wurden 15 sek. in 1%iger Natriumhypochlorid-Lösung geschwenkt, sofort mit dest. Wasser zweifach abgespült und kurz luftgetrocknet. Von jeder Tomatenfrucht wurden 12 Samen jeweils einzeln in eine Vertiefung gelegt und die Mikrotitterplatte mit Parafilm verschlossen. Diese wurden bei Raumtemperatur und Dunkelheit aufbewahrt und regelmäßig kontrolliert.

Trotz durchgeführter Vorversuch in denen die Desinfektionszeit optimiert wurde und eine deutlich höhere Keimfähigkeit erreicht wurde, konnten im dartgestellten Versuch nur ca. 60%

der Samen zur Keimung gebracht werden. Es konnten auf den Keimlingen diverse Pilze mikroskopiert werden, ein Befall mit *Colletotrichum coccodes* konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Dass Versuche zu diesem Thema erfolglos blieben, kann möglicherweise an der geringen Stichprobenanzahl gelegen haben, sodass eine erfolgte Sameninfektion in geringem Umfang nicht detektiert werden konnte.

Aus der Literatur geht jedoch eindeutig hervor, dass eine Samenübertragbarkeit von *C. coccodes* bekannt und nachgewiesen ist. *C. coccodes* wurde in Samen von *Capsicum annuum* [Anonym 1997, Hong und Hwang 1998] gefunden sowie in 8-14% der Samen infizierter Sojapflanzen [Riccioni und Conca 1998]. *C. coccodes* wurde an Tomaten- [Kendrick und Walker 1948] und Auberginensamen gefunden [Porta-Puglia und Montorsi 1982].

Da das in Österreich eingesetzte Pflanzgut zum größten Teil von Anzuchtbetrieben gekauft wird und diese im Rahmen dieses Projekts zahlreich auf einen Befall von *C. coccodes* erfolglos getestet wurden, kann die Bedeutung der Samenübertragbarkeit für ein Auftreten in Österreich ausgeschlossen werden.

Überdauerung

Der Erreger überdauert in Form von Sklerotien im Boden. Die Konidien sind kurzlebig, besonders bei trockenen Bedingungen. In trockener Erde (1,5% Feuchtigkeit) sind nach einer Woche 89-96% der Sklerotien abgestorben, in feuchter Erde (15% Feuchtigkeit) sind es 28-45% [Farley 1976]. Besonders Unkräuter spielen bei der Überwinterung eine große Rolle [Raid und Pennypacker 1987, Tu und Poysa 1997].

In zahlreichen Versuchen wurde die Lebensfähigkeit der Sklerotien im Boden untersucht [Blakeman und Hornby 1966, Dillard und Cobb 1998, Farley 1976]. Freie Sklerotien waren noch nach 8 Jahren im Boden vorhanden (0% an der Bodenoberfläche, 90% in 10 und 88% in 20 cm Tiefe, nach 4 Jahren in allen Tiefen noch 50%). Frei im Boden vorliegende Sklerotien haben eine höhere Überlebensdauer im Vergleich zu Sklerotien an Tomatenschalen.

Schadbild an Früchten

In unseren Klimaten eher selten, aber in Amerika ein großes Problem ist die Fruchtfäule. Bei Versuchen in den USA führte ein natürlicher Befall durch *C. coccodes* in unbehandelten Varianten zu einer Fruchtfäule bei 30-91% der Früchte [Byrne et al. 1997 b]. Es bilden sich eingesunkene, helle, wasserdurchzogene, runde Flecken, die sich später dunkel bis schwarz färben und z.T., je nach Wetter, mit rosalachsfarbenen Sporenmassen bedeckt sind [Bedlan 1999, Snowdon 1991].



Komplexes Schadbild an Wurzeln

Die Wurzelinfektion beginnt mit hellbraunen Läsionen, die sich zu größeren braunen bis grauen Stellen ausdehnen, die mit schwarzen Sklerotien bedeckt sind. Das Parenchym, das die Sklerotien enthält, kann sich vom Zentralzylinder ablösen [Dillard und Cobb 1998]. Bei Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Menge an Appressorien von der Wurzelspitze zum Wurzelansatz zunimmt [Davet 1972] und somit auch dort mit einem verstärkten Auftreten von Sklerotien zu rechnen ist.



Schadbild an Blättern

Im Gegensatz zum häufigen Auftreten an Kartoffelblättern [Dehorter 1998, Johnson 1994, Mohan et al. 1992] gibt es kaum Veröffentlichungen über das natürliche Auftreten von *C. coccodes* an Tomatenblättern. *C. coccodes* verursacht keine Braunfäule der Blätter [Younkin und Dimock 1944], eine Infektion der Blätter ist aber möglich, und die kleinen nekrotischen Flecken dienen als bedeutendes Inokulumspotential für weitere Blatt- und Fruchtinfectionen [Pantidou und Schroeder 1955]. Nur selten wird beschrieben, dass bei künstlicher Infektion der Wurzeln die Blätter zum Zeitpunkt der Fruchtreife chlorotisch und welk werden [Schneider et al. 1978].

Korkwurzelkrankheit an Tomate

Unter zahlreichen wichtigen pilzlichen Erkrankungen wird im Weiteren nur auf die Korkwurzelkrankheit *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider & Gerlach eingegangen [Schneider und Gerlach 1966], da diese der Schwarzen Wurzelfäule von der Symptomatik sehr ähnlich ist und im Weiteren oft genannt werden wird.

Der Pilz ist schwer mit herkömmlichen Methoden zu isolieren, da häufig saprophytische Pilze auf dem Material auftreten. Er wurde oft als „grauer steriler Pilz“ beschrieben, da er in vitro nur selten sporuliert. *P. lycopersici* hat einen großen Wirtspflanzenkreis, der sich mit dem von *C. coccodes* stark überschneidet [Grove und Campell 1987]. Die Isolierung und Identifikation des Erregers von Pflanzenmaterial dauert 40 Tage. Andere, oft schnellere Methoden erfordern eine UV-Licht Bestrahlung, die nach 3-12 Tagen alle Isolate zur Bildung von Pyknidien anregt. Es gibt ein semiselektives Medium (corky root medium – CRM), das eine doppelt so gute Nachweishäufigkeit ermöglicht als herkömmliche Medien. Kolonien von *P. lycopersici* sind auf CRM hellgrau bis graugrün und auf der Unterseite schwarz mit roten Zentren. Zur Identifikation wird der Pilz durch einen Transfer von Wasseragar auf V8-Agar zur Sporulation angeregt [Grove und Campell 1987]. Der Erreger kann auf Pflanzenmaterial nach 33 Monaten in der Erde noch isoliert werden [Shishkoff und Campbell 1990]. Mikrosklerotien überdauern 2 Jahre im Boden [White und Scott 1973]. Die Wurzelinfektion von Keimlingen wird durch niedrige Temperaturen in den ersten Wochen nach der Keimung extrem begünstigt, für die Befallsentwicklung sind 16 oder 21°C besser als 27°C [Shishkoff und Campbell 1990]. Es werden Ertragsausfälle von 8-20% bei einem Befall von 10-15% (8 Wochen nach dem Auspflanzen) angegeben [Smith et al. 1988].

Mit dem Schadbild der Korkwurzelkrankheit werden außer *Pyrenochaeta lycopersici* noch weitere Pathogene in Verbindung gebracht (Tab. 2).

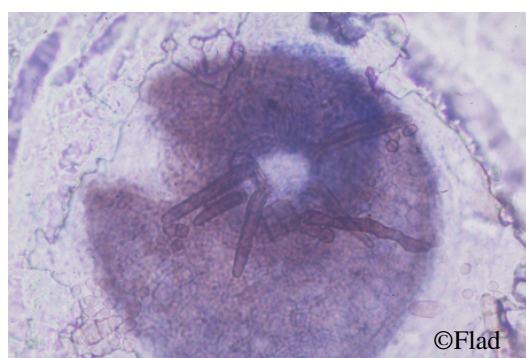
Tab. 2. Einstufung der mit der Korkwurzelkrankheit assoziierten Pathogene nach Befalls- und Verdrängungsvermögen bei unterschiedlichen Temperaturen [Davet 1976 a]

| Erreger | Befalls- und Verdrängungsvermögen | Temperaturbereich des Befalls |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Stark | bei allen Temperaturen |
| <i>Fusarium solani</i> | Stark | nur nicht bei niedrigen Temperaturen |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | Mittel | bei allen Temperaturen |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | Mittel | nur nicht bei hohen Temperaturen |
| <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> | Schwach | bei allen Temperaturen |

In nichtsteriler Erde genügte ein geringeres Infektionspotenzial von *Colletotrichum coccodes* als von *Pyrenochaeta lycopersici*, um Pflanzen zu befallen [Davet 1976 a + c]. *R. solani* wird oft schon am Anfang der Wurzelerkrankung isoliert, wobei *C. coccodes* erst gegen Ende, und dann immer häufiger, auftritt [Manning 1980].

Das Schadbild an den oberirdischen Pflanzenteilen beider Krankheiten kann auch sehr leicht mit anderen Welkekrankheiten wie z.B. der *Fusarium*-Welke oder *Verticillium*-Welke verwechselt werden. Durch eine genauere Untersuchung des Stängels und der Wurzeln ist meist eine Identifikation möglich.

An den Wurzeln zeigt sich ein Absterben der feinen Seitenwurzeln, die verbleibenden Wurzeln sind korkig, längs aufgerissen und verdickt, die Rindenschicht zerfällt stückweise und es bleibt nur der Zentralzylinder bestehen [Bedlan 1999].



Pyknidium von *Pyrenochaeta lycopersici* mit Ostiole und Seten

Verbreitung von *Colletotrichum coccodes* in Österreich und Beschreibung der Isolatesammlung

Einleitung

Der Erreger ist weltweit verbreitet [Anonym 1985]. In Europa ist der Erreger erstmals an Tomate 1878 beschrieben [Bedlan 1988]. Berichte über das Auftreten an Tomate liegen aus den USA [Thomas et al. 1981, Batson und Roy 1982] und Kanada [Poysa et al. 1993], Russland [Valid 1974], Korea [Kim et al. 1998] und Europa, u.a. Frankreich [Delon 1975], Portugal [Santa-Marta 1986], Italien [Abruzzetti und Ruggini 1993, Gullino et al. 1995], Türkei [Doken 1984], Griechenland [Malathrakis et al. 1983] und Polen [Slusarski 1989] vor.

Lange Zeit galt der Erreger als Sekundärbefall der Korkwurzelkrankheit, kann aber nachgewiesener Maßen als alleiniger Befall großen Schaden an Tomatenkulturen hervorrufen [Delon 1975]. In einer zweijährigen Studie zur Erfassung der Erreger von Fruchtfäule an Tomaten wurde *C. coccodes* als der häufigste Erreger isoliert [Thomas et al. 1981]. Das Auftreten von *C. coccodes* im Boden wird durch hohe Wasser- und Salzgehalte begünstigt [Crüger 1983].

Colletotrichum verursacht weltweit großen Schaden an einem sehr breiten Spektrum an Wirtspflanzen. Die Schäden betragen oft über 50% und treten als Vorernteschäden und Nachernteschäden, d.h. Lagerschäden auf. Der Erreger *C. coccodes* gewinnt zunehmend an Bedeutung, so z.B. an Kartoffeln [Lees und Hilton 2003, Prusky et al. 2000] und auch an Tomaten, wie die vorliegende Arbeit zeigt.

C. coccodes verursacht die bedeutendste Fruchtfäule an Tomatenfrüchten und stellt für die verarbeitende Tomatenindustrie vor allem in den USA ein gravierendes Problem dar [Barksdale und Stoner 1981]. Wenig ist jedoch über die Schwarze Wurzelfäule bekannt. Die Untersuchungen zum Auftreten von *C. coccodes* wurden in Österreich durchgeführt. Im Bericht der Bundesanstalt für Pflanzenschutz 1970 wird das Auftreten und die Ausbreitung von *C. coccodes* an Tomate wie folgt eingestuft: „Auftreten: stark. Ausbreitung: lokal begrenzt in Wien und Niederösterreich“ [Glaeser 1971].

In Österreich wurden im Jahr 2002 auf einer Fläche von 169 ha Tomaten angebaut. Die Hauptanbauggebiete sind die folgenden Bundesländer: Wien (57 ha), Burgenland (53 ha), Steiermark (38 ha) und Oberösterreich (10 ha).

In Europa nimmt Österreich mit einer Gesamtproduktion von 20 000 t Tomaten pro Jahr (1999) den 12. Platz ein, Deutschland liegt auf Platz 9 (Abb. 2).

Material und Methoden

Das Auftreten des Wurzelpathogens *C. coccodes* an Tomaten in Erdkulturen wurde im Jahr 2001 und 2002 in den folgenden Bundesländern untersucht: Niederösterreich, Oberösterreich, Steiermark, Burgenland und Kärnten. Dazu wurden in zehn Betrieben pro Bundesland am Ende der Saison je zwei Pflanzen entnommen, abgewaschen, in Feuchten Kammern einige Tage bebrütet und dann mikroskopiert.

Bei den Befallsuntersuchungen 2001 wurden zusätzlich 10 hydroponisch geführte Betriebe im Großraum Wien untersucht. Gegen Ende der Saison wurden Wurzelstücke aus den Steinwollewürfeln im Labor oberflächendesinfiziert und auf PDA mit Antibiotika aufgelegt.

Der Erreger wurde auf PDA mit Antibiotika und SNA kultiviert und ständig überimpft, bis eine Reinkultur entstand. Von jedem Isolat wurde ein Teil regelmäßig auf PDA-Schalen überimpft und bei Raumtemperatur gelagert, ein Teil wurde auf Schrägagar bei 10°C gelagert, um das Wachstum zu verzögern.

Isolate, die für Versuche eingesetzt wurden, durchliefen zuvor nach künstlicher Infektion eine Reisolation von der Tomatenfrucht, um die Pathogenität zu überprüfen. Die Tomate wurde mit einer Sporenlösung betropft und mit einer sterilen Nadel unter dem Tropfen angestochen [Robbins und Angell 1968]. Nach ungefähr einer Woche entwickeln sich eingesunkene Läsionen, in denen sich zahlreiche Sklerotien bilden.

Ergebnisse und Diskussion

Es kam in beiden Jahren zu einem starken Auftreten von *C. coccodes* in allen untersuchten Anbauflächen. Es konnte kein Unterschied abhängig von der Region festgestellt werden. Ebenso waren veredelte und unveredelte Sorten gleichermaßen anfällig. Auf den folgenden Sorten konnte ein Befall festgestellt werden: Mercedes, Impulse, Tocredo, Sorte 5201,

Pannovy, Carlin, Culina, Durinta, Rondelle, Halifax, Styria, Laguna, Thomas und die Unterlagssorte Beaufort. *C. coccodes* wurde auf fast allen Proben eindeutig identifiziert und isoliert (Tab. 3).

Es handelt sich bei *C. coccodes* um einen bodenbürtigen Erreger, der auf Grund seiner langen Überlebensfähigkeit [Blakeman und Hornby 1966, Farley 1976] und seines großen Wirtspflanzenspektrums (Tab. 1) in nahezu jedem Boden mit Tomatenkulturen anzutreffen ist. Bei vielen sklerotienbildenden Pilzen wie *C. coccodes*, aber auch bei *Phymatotrichum omnivorum*, *Sclerotinia trifoliorum* oder *Verticillium dahliae* ist eine Überdauerung der Sklerotien von über acht Jahren bekannt [Dillard und Cobb 1998], wodurch sich ein hohes Inokulumspotenzial im Boden aufbauen kann. Das legt die Frage nach seiner Bedeutung für den Ertrag der Kulturpflanzen nahe und ob eine Bekämpfung sinnvoll erscheint und wie diese gegebenenfalls auszusehen hat.

In den USA verursacht *C. coccodes* an Tomaten eine bedeutende Fruchtfäule [Illman et al. 1959], die Ertragsverluste sind hoch und ein Anbau ohne chemische Bekämpfung ist dort nicht denkbar [Byrne et al. 1997 b]. Im Unterschied zu Österreich werden die Tomaten dort für die verarbeitende Industrie vollreif im Feld geerntet. Der Erreger ist ein weniger bedeutendes Problem in der Frischgemüseproduktion [Byrne et al. 1998]. Neben dem späteren Erntezeitpunkt und dem Anbau im Freiland ist auch das unterschiedliche Klima in den USA eine Erklärung, warum die Fruchtfäule in Österreich kein Problem darstellt. In den USA fördern die hohe Luftfeuchtigkeit, hoher Niederschlag und hohe Temperaturen einen Befall im Freiland [Precheur et al. 1992], eine Fruchtfäule tritt bei 20-30°C auf [Sanogo 1995].

Ein Wurzelbefall kommt hauptsächlich in Glashäusern vor, da dort hohe Inokulumkonzentrationen und geeignete Wetterbedingungen für eine Infektion anzutreffen sind [Jones et al. 1991]. Wichtig für eine Einschätzung der Bedeutung der Krankheit ist, ob ein Befall an den Wurzeln indirekt den Ertrag und das Wachstum der Tomatenpflanzen beeinträchtigt.

Tab. 3. Betriebe bzw. Pflanzen mit eindeutig identifiziertem Auftreten von *C. coccodes* in den Jahren 2001 und 2002

| | 2001 (% der Betriebe) | 2001 (% der Pflanzen) | 2002 (% der Betriebe) | 2002 (% der Pflanzen) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Niederösterreich | 90 | 80 | 100 | 100 |
| Oberösterreich | 90 | 80 | 100 | 100 |
| Burgenland | 100 | 95 | 90 | 90 |
| Steiermark | 100 | 100 | 90 | 90 |
| Kärnten | -* | -* | 90 | 90 |

* nicht beprobt im Jahr 2001

Bei 50% der hydroponisch geführten Betriebe und 40% der Pflanzenproben wurde ein Befall mit *C. coccodes* festgestellt. Symptome an den oberirdischen Teilen der Pflanzen konnten der Krankheit nicht zugeordnet werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es auch in Österreich ein Auftreten der Schwarzen Wurzelfäule in erdelosen Kulturen gibt, obwohl ein wichtiges Argument für diese Kulturführung der Wegfall bodenbürtiger Pflanzenkrankheiten und Schädlinge ist [Andreas 1990].

Über drei Jahre wurden Isolate in den folgenden Bundesländern gesammelt: Burgenland, Steiermark, Kärnten, Oberösterreich, Niederösterreich und Wien. Die Sammlung wird ergänzt durch einige Isolate aus Deutschland, Holland und Italien und umfasst 94 Isolate.

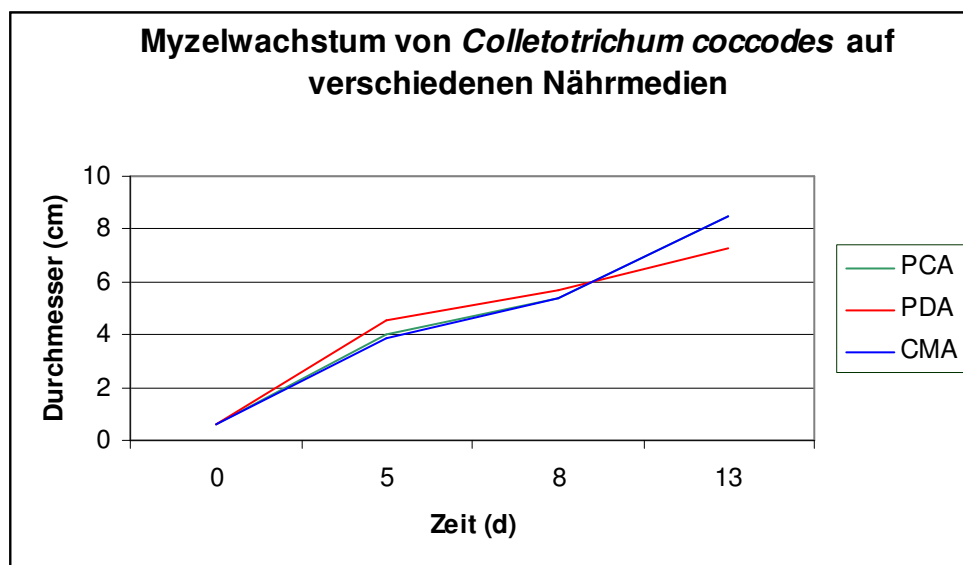
Die Isolate können optisch in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden [Chesters und Hornby 1965 a]: mit großen (ca. 240-340 μ) und mit kleinen (<240 μ) Skerotien. Eine deutlich unterschiedliche Verteilung der beiden Gruppen je nach Bundesland konnte nicht festgestellt werden. Es traten mehrfach auch gleich nach der Isolierung von der Wurzel Segmentbildungen von Myzel ohne Sklerotien auf, die als Folge von häufigem Überimpfen und alten Kulturen bekannt sind [Chesters und Hornby 1965 a].

Produktion von Infektionsmaterial für die Versuche

Ein wichtiger und zeitaufwendiger Punkt ist die Wahl und Produktion des Infektionsmaterials. Es wurde entweder von Sklerotien oder von einer Sporenlösung ausgegangen. Meist wurden in Erde angezogene Tomatenpflanzen damit infiziert und der Befall der Wurzeln kontrolliert. Es ist sehr schwer, eine ausbleibende Infektion einem bestimmten Faktor zuzuordnen. Mögliche kritische Punkte sind das Alter des Isolates, das Isolat an sich, da nicht alle gleich infektiös sind, das Alter der Tomatenwurzeln, die Jahreszeit und die damit verbundene unterschiedlich starke Ausprägung des Wurzelsystems und der Pflanzen, äußere Parameter wie Licht und Temperatur, die in der Gewächshauskabine nicht wie in der Klimakammer konstant gehalten werden können, ...

Medium

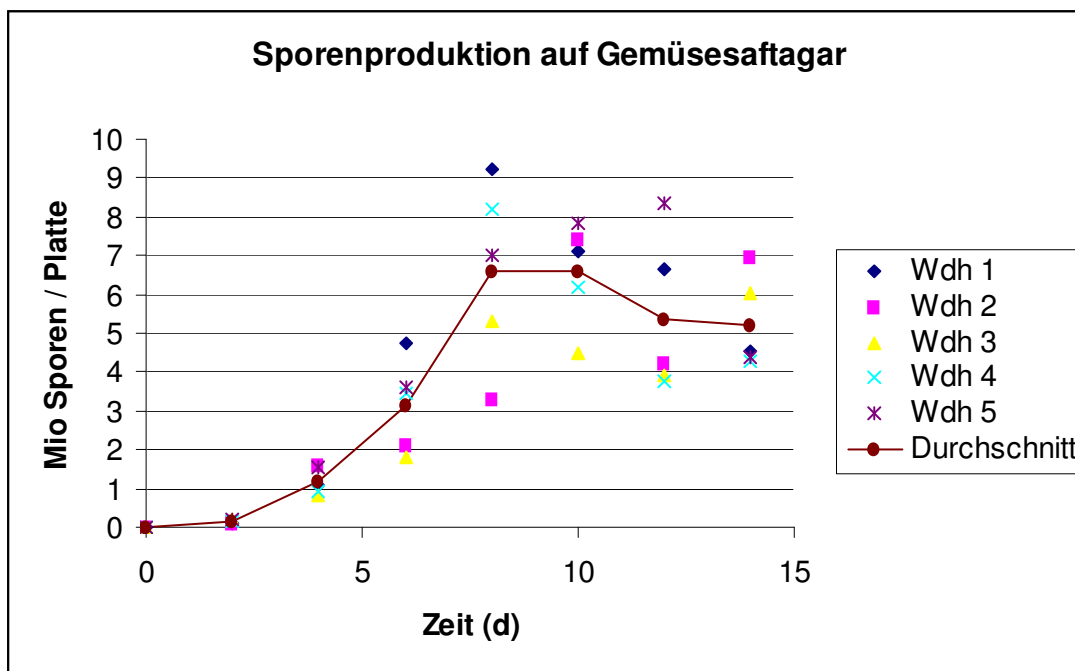
Untersucht wurden handelsüblicher PDA (potato dextrose agar) und CMA (corn meal agar) sowie selbst gemachter PCA (potato carrot agar).



Das Wachstum auf PCA und CMA ist fast identisch, die Unterschiede zu PDA nicht wesentlich. Da die Herstellung von PCA aufwendig ist, wird für die Versuche und zum Erhalten der Isolate meist PDA oder seltener CMA verwendet.

Sporenproduktion

Werden für die Infektion hauptsächlich Sporen gebraucht und nicht Sklerotien, dann wird der Pilz auf Gemüsesaftagar gezogen, der das Myzelwachstum und die Sporenproduktion fördert. Es kommt zu einem grauen Myzel mit Sporen (bis zu 8 Mio. Sporen und mehr, s. Grafik) und erst nach über zwei Wochen zur typischen Bildung von schwarzen Sklerotien auf dem Myzel.



In der gezeigten Grafik ist der geeignete Zeitpunkt um die Sporen für Versuche vom Agar abzuwaschen nach 8-10 Tagen erreicht. Jedoch zeigte es sich, dass der Kurvenverlauf extrem vom verwendeten *Colletotrichum coccodes* Isolat abhängig ist, und eine allgemein gültige Aussage für den Zeitpunkt der maximalen Sporenproduktion auf Gemüsesaftagar nicht getroffen werden kann. Das Maximum liegt meist zwischen 6-10 Tagen, nur in Ausnahmefällen bei 15 Tagen.

Sklerotienproduktion auf Agar

Für die Gewinnung von Sklerotien wurden verschiedene Methoden ausprobiert. Die Sklerotien können direkt vom Agar mit einem Spatel abgeschabt werden und dann bei Raumtemperatur getrocknet werden. Dabei ist der Anteil von Agar aber sehr hoch, was eine Einwaage für Versuche sehr ungenau werden lässt. Eine weitere getestete Variante ist es, Folien zur Konfitürenherstellung zuzuschneiden und auf den kalten Agar zu legen. Darauf wird mit einigen wenigen Sklerotien infiziert. Das Myzel wächst hauptsächlich in den Agar, während die Sklerotien auf der Folie gebildet werden. Nun können die Sklerotien leicht vom Agar gekratzt werden, ohne dass sie daran anheften.

Eine weitere Infektionsmethode, die angewandt wurde, besteht darin, die Sklerotien mitsamt dem Agar zu pürieren und mit Wasser verdünnt in den Boden nahe dem Wurzelballen zu spritzen. Der Agar simuliert, ebenso wie die Anzucht auf Körnern (s.u.), die Pflanzenrückstände an denen die Sklerotien normalerweise im Boden überdauern, bis der geeignete Wirt zur Verfügung steht.

Sklerotienproduktion auf Körnern

Es wurde des Weiteren eine Produktion auf Körnern getestet. Reis, Mais und Gerste werden im Erlenmeyerkolben mit Wasser autoklaviert und steril mit Sporenlösung von *C. coccodes* infiziert. Die Flaschen werden regelmäßig geschüttelt und die überwachsenen Körner werden dann getrocknet und gemahlen, bevor sie als Infektionsmaterial in die Erde gemischt werden können.

Es zeigte sich, dass Mais wegen der glatten Oberfläche weniger geeignet ist. Die Sklerotien sind auf den getrockneten und gemahlenen Körnern viele Monate lebensfähig und es ist somit eine geeignete Möglichkeit auf Vorrat Infektionsmaterial zu produzieren. Leider ist der Anteil an Verunreinigungen durch Bakterien und andere Pilze sehr hoch und eventuelle Wirkungen im Versuch können somit nicht eindeutig *C. coccodes* zugeschrieben werden. Außerdem benötigt man für die Anzucht sehr viel mehr Platz für die Flaschen, als für die entsprechende Menge Petrischalen nötig wären.

Klimatische Ansprüche des Erregers

In Klimakammerversuchen bei erhöhter Luftfeuchtigkeit und Infektion mit Sporenlösung kommt es bei 15 °C zu keiner Infektion, bei 20 °C nahm die Anzahl der keimenden Sporen zu, bei 25 °C sind nach 2 h 17,9% der Sporen gekeimt und nach 24 h 68,3% und es kommt zu einer Blattinfektion. Die Anfälligkeit nimmt mit zunehmendem Alter der Blätter zu [Byrne et al. 1998]. Die optimale Temperatur für die Sporenkeimung auf Wasseragar liegt bei 22°C.

Optimale Temperaturen:

Für Fruchtbefall: 25°C

Myzelwachstum auf Gemüsesaftagar: 28°C

Konidienkeimung auf Wasseragar: 22°C

Myzelwachstum von Sklerotien: 28°C

Konidien- und Sklerotienkeimung: optimal bei pH 6

Sklerotien in Petrischalen wurden untersucht. Die Sporulation war etwa 4-mal höher in Schalen, die nicht zugeklebt waren im Vergleich zu Schalen, die mit Parafilm zugeklebt waren. Die Anzahl war unter Licht größer als im Dunklen. In zugeklebten Schalen kam es zu Myzelwachstum, in nicht zugeklebten, keimten die Sklerotien über Sporenmassen.

Ab 10°C produzierten die Sklerotien in nicht zugeklebten Schalen orangefarbene Sporenmassen und Seten, jedoch kaum Myzel. Im Dunkeln wurden hyaline Sporenmassen mit wenig Seten gebildet.

Überträgt man diese Ergebnisse ins Freiland, so heißt das: Die Konidienproduktion ist höher bei Sklerotien, die an der Oberfläche liegen als bei solchen, die in der Erde sind. Die Konidienproduktion im Licht ist höher als im Schatten dichter Pflanzenbestände.

Die Produktion von Konidien und Myzel aus Sklerotien scheint auf Luftzufuhr (zugeklebt oder nicht) und Licht stärker zu reagieren als auf Temperatur.

Sortenunterschiede und Resistenzen

Einleitung

In zahlreichen Versuchen der Tomatenzüchtung mit unterschiedlichen Linien wurden signifikante Unterschiede in der Anfälligkeit für *C. coccodes* auf Blättern und Früchten gefunden und auch tolerante und resistente handelsübliche Sorten [Costache und Poncu 1998, Hodosyne-Kiss und Hodosy 1984, Simon 1979, Stevenson et al. 1978].

Es können mehrere Parameter bestimmt werden, um die Ausprägung der Resistenz zu messen: die natürliche Infektion im Freiland, die latente Infektion, eine punktuelle künstliche Infektion der Frucht und Infektion nach Besprühen mit einer Sporensuspension [Barksdale und Koch 1969]. Da verschiedene Parameter nicht auf gleiche Weise bei resistenten Züchtungen ansprechen, werden mindestens zwei Resistenzmechanismen angenommen [Barksdale 1975]. Um verschiedene Tomatensorten auf ihre Anfälligkeit zu testen, ist es deshalb wichtig, nicht nur mindestens zwei Infektionsmethoden anzuwenden, sondern auch verschiedene Isolate einzusetzen, da die größte Variabilität der Pathogenität innerhalb einer Art verzeichnet wurde [Batson und Roy 1982, Tu und Poysa 1997]. Die Anfälligkeit einer Sorte variiert im Saisonverlauf, je nach physiologischem Zustand der Pflanze und nicht jede Sorte ist zum gleichen Zeitpunkt der Saison gleich anfällig. Dies erschwert Sortentests. Wird ein Erntezeitpunkt für die untersuchten Früchte genommen, kommt es zu einer Überlagerung von physiologischen und genetischen Ursachen [Robbins und Angell 1970].

Eine weitere Möglichkeit auf Toleranz zu testen, ist die Messung der Pektintranseliminase-Aktivität, die 24 h nach Tauchen in Sporenlösung gemessen werden kann und bei toleranten Sorten geringer ist [Davet 1976 b].

Resistente Linien bieten einen äquivalenten Schutz wie drei bis sieben Anwendungen mit Chlorothalonil bei anfälligen Sorten [Barksdale und Stoner 1981]. *C. coccodes*-resistente Linien zeigten gleichfalls Resistenzen gegen *C. dematium*, *C. gloeosporioides* (beide von Tomaten isoliert), *C. fragariae* (von Stachelbeere), *C. destructivum* (von Tabak) und *Glomerella cingulata* (von Apfel) [Barksdale 1972]. Wobei eine resistente Linie unterschiedlich stark auf den Befall durch *C. coccodes* und *C. dematium* reagierte [Miller et al. 1884].

Bei den beprobten Betrieben in den untersuchten fünf Bundesländern wurden folgende Sorten durch *Colletotrichum coccodes* befallen:

Mercedes, Impulse, Tocredo, Sorte 5201, Pannovy, Carlin, Culina , Rondelle, Halifax, Styria, Laguna, Thomas und die Unterlagssorte Beaufort.

Material und Methoden

Es wurden von jeder Sorte (Tocredo, Union, Mercedes, Grand Prix, Cindel, Halifax, Vanessa, Supersweet, Unterlagssorte Beaufort) fünf Pflanzen angebaut, ausreichend gedüngt und bewässert und die Früchte in reifem Zustand geerntet. Die gerade reifen Früchte (10 Früchte je Sorte) wurden 1 min. in 1%ige Natriumhypochlorid-Lösung getaucht, zweifach mit dest. Wasser abgespült und nach dem Lufttrocknen infiziert. Es wurde ein Tropfen Sporenlösung (10^6 Sporen/ml; Isolat NÖ5, Niederösterreich und in der Wiederholung Isolat B8, Burgenland) auf die Frucht gesetzt und diese mit einer sterilen Nadel darunter angestochen.

Die Früchte wurden bei 21-24°C im Labor gelagert, ohne die Notwendigkeit von hoher Luftfeuchtigkeit [Robbins und Angell 1968]. Nach 7 Tagen wurden die Durchmesser der Läsionen gemessen und der Anteil der befallenen Früchte notiert. Von den Läsionen wurden im Zweifelsfall Reisolationen gewonnen, wenn Zweifel an der Art des Pilzbefalls bestand und diese nicht durch Mikroskopieren geklärt werden konnten. Der Versuch wurde in zweifacher Wiederholung durchgeführt.

Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS 8,0. Als Allgemeines lineares Model wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Scheffe-Test durchgeführt ($\alpha=0,05$).

Von jeder der oben angeführten Sorten wurden fünf weitere Pflanzen angezogen, ausreichend gedüngt und bewässert und im DC-Stadium 27 mit einer Sporenlösung (Isolat NÖ5, Niederösterreich) mit je 12×10^6 Sporen/Pflanze infiziert.

Nach der Tomatenernte wurden die Wurzeln untersucht. Es wurde die gesamte Befallsstärke auf den Wurzeln bonitiert. Zusätzlich wurden von drei Pflanzen je Sorte jeweils 10 Wurzelstücke oberflächendesinfiziert, auf Schalen mit PDA aufgelegt und mit Parafilm verschlossen. Nach 2-3 Wochen wurden die Wurzeln auf Befall durch *Colletotrichum coccodes* untersucht. Es wurde der Anteil der befallenen Wurzelstücke notiert und die Befallsstärke geschätzt.

Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS 8,0. Als Allgemeines lineares Model wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Scheffe-Test durchgeführt ($\alpha=0,05$).

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der beiden eingesetzten Isolate B8 und NÖ5 unterschieden sich nicht signifikant und so werden im Weiteren die Durchschnittswerte der beiden Wiederholungen angegeben. Die Läsionsdurchmesser bei den verschiedenen eingesetzten Sorten unterschieden sich nicht signifikant, nur die Sorte Supersweet, die keinen Fruchtbefall zeigte, unterschied sich signifikant. In allen Fällen handelte es sich eindeutig um einen Befall durch *Colletotrichum coccodes*. Die Tomaten der Sorte ‚Supersweet‘ zeigte auch nach 7 Tagen noch keinerlei Zeichen einer Fruchtfäule und dies trotz des Nadelstichs und der nicht sterilen Umgebung im Labor. Mit Ausnahme der Cockailtomate ‚Supersweet‘ waren bei den unterschiedlichen Sorten durchschnittlich 73% der Früchte befallen, die Sorten unterschieden sich nicht signifikant im Anteil der befallenen Früchte.

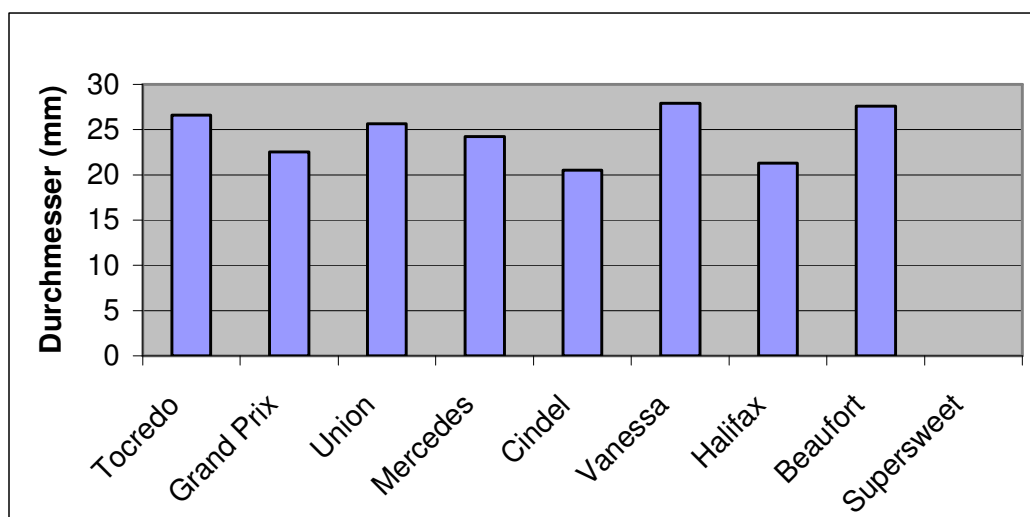


Abb.: Läsionsdurchmesser nach künstlicher Infektion der Frucht mit *C. coccodes*, Durchschnittswerte der beiden Wiederholungen

Es wurden keine Unterschiede in der Befallsstärke auf den Wurzeln festgestellt. Durchschnittlich waren 56-60% der ausgewählten Wurzeln befallen. Die Wurzeln aller Sorten wurden durch *Colletotrichum coccodes* befallen. Es war kein Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Isolaten B8 und NÖ5 feststellbar. Möglicherweise war der Befallsdruck zu hoch, da sich Sortenunterschiede stärker bei geringem Befallsdruck zeigen [Slusarski 1989].

Von den getesteten Sorten erwies sich die Sorte Supersweet als resistent gegen einen Fruchtbefall durch *C. coccodes*. Eine Abstufung der anderen Sorten in Bezug auf ihre Anfälligkeit konnte nicht getroffen werden. Es traten keine Sortenunterschiede bei einem Wurzelbefall durch *C. coccodes* auf.

Ertragsausfall

Allgemeine Einleitung

Es ist von großer Bedeutung, den durch *C. coccodes* verursachten Ertragsausfall in Tomatenkulturen quantifizieren zu können. Erst dadurch wird eine Bewertung der Bedeutung der Krankheit für die Praxis möglich. Ebenfalls davon abhängig ist die Beurteilung, ob eine chemische Bekämpfung wirtschaftlich sinnvoll und ökologisch zu vertreten ist. Bisher gibt es zwar zahlreiche Arbeiten zum Ertragsausfall durch die Fruchtfäule, jedoch keine Zahlen zum Ertragsausfall durch die Schwarze Wurzelfäule.

Die Datenerhebung in Praxisbetrieben ist bei natürlichem Befall schwer durchführbar und schlecht auszuwerten. Dort spielen viele Faktoren zusammen und der direkte Vergleich mit einer nicht infizierten Kontrolle ist kaum möglich, da der Erreger auf fast allen Standorten vorkommt (Tab. 3). So kann der Ertragsausfall nur geschätzt werden, ohne wirklich den Einfluss von Klima, Sortenwahl, Düngung etc. zu kennen. Bei Krankheiten, die zu Fruchtfäule oder Blattbefall führen, kann leichter geschätzt und gemessen werden, wie viel Prozent des Ertrages bzw. der Blätter befallen sind. Durch die Schwarze Wurzelfäule kommt es zu einem oberirdisch nur schwer erkennbaren Schadbild. Die Wurzeln verholzen und verbräunen, die Feinwurzeln sterben ab. Dadurch kommt es in der Folge zu einer verminderten Wasser- und Nährstoffaufnahme, die Pflanzen sind im Wuchs gehemmt und somit sind auch die Größe und Anzahl der Tomaten und die gesamte Frischmasseproduktion vermindert. Es bedarf eines geübten Blickes, diese Verschlechterung von einem Jahr auf das andere festzustellen und vor allem quantitativ abzuschätzen.

In den durchgeführten Versuchen wurde deshalb künstlich mit Sporenlösung von *C. coccodes* infiziert und mit der unbehandelten Kontrollvariante verglichen.

Alle drei im Folgenden vorgestellten Versuche zur Ermittlung des Ertragsausfalls wurden in der Saison 2002 und 2003 durchgeführt.

Versuch in hydroponischer Kultur

Einleitung

1978 wird erstmalig vom Auftreten in hydroponischen Tomatenkulturen in Kalifornien berichtet. Zu einem frühen Zeitpunkt werden die Wurzeln befallen, durch das Wassersystem verbreiten sich die Sporen, und es kommt zur Blattwelke zum Zeitpunkt der Fruchtreife [Schneider et al. 1978]. Wird eine kranke Pflanze in ein geschlossenes System gepflanzt, treten bereits nach 12 Tagen Symptome auf (untere Blätter werden chlorotisch) und die Pflanzen sterben nach fünf bis sechs Wochen ab [Jenkins und Averre 1983]. Es wird von bedeutenden Verlusten durch eine Infektion mit *C. coccodes* berichtet [Schneider et al. 1978].

Im Rahmen der Kartierungsuntersuchungen konnte auch in hydroponisch geführten Betrieben ein natürliches Auftreten von *C. coccodes* festgestellt werden, was bereits aus den USA bekannt ist [Schneider et al. 1978]. Da ein solches Auftreten bisher in Österreich oder Deutschland wenig Beachtung fand und keine Erhebungen zum verursachten Ertragsaufall vorliegen, wurden in drei Betrieben mit erdelosem Tomatenanbau Versuche angelegt. Die Tomatenpflanzen wurden dort in Steinwollewürfeln auf Schaumstoffmatten gezogen. Einige Pflanzen in Steinwollewürfeln wurden mit einer Sporensuspension von *C. coccodes* infiziert und der Ertrag mit dem der nicht infizierten Kontrollvarianten verglichen.

Material und Methoden

Der Versuch wurde in beiden Jahren in den gleichen drei Betrieben in Wien durchgeführt. Dabei standen die Steinwollewürfel auf einer in Folie eingepackten Schaumstoffmatte. Im Betrieb 1 und 2 wurden 2002 pro Matte von 5 Trieben geerntet, im Betrieb 3 von vier Trieben pro Matte. 2003 hatten Betrieb 1 und 2 je vier Triebe pro Matte, Betrieb 3 hingegen sechs Triebe pro Matte.

In beiden Versuchsjahren arbeitete der Betrieb 1 mit Pflanzen der Sorte Mercedes, Betrieb 2 und 3 mit Pflanzen der Sorte Durinta. Die in den Würfeln gezogenen Jungpflanzen wurden von der Firma Vreugdenhil B.V., Holland bezogen.

Die Matten lagen entweder auf Betonböden oder aber auf verdichtetem Erdboden, der mit Folien abgedeckt wurde. Bei allen Systemen handelt es sich um offene Systeme, in denen die Nährlösung nicht wieder aufbereitet wird und die Matten nicht durch ein geschlossenes System miteinander verbunden sind. Der so genannte Überlauf, d.h. Wasser mit Düngelösung, wird auf der Boden abdeckenden Folie gesammelt und verdunstet. Die verbleibenden Düngersalze werden mit den Folien entsorgt. Zur optimalen Düngerzusammenstellung gibt es eine Vielzahl an Untersuchungen [Andreas 1990, Ismail et al. 1997, Zekki et al. 1996]. Die Düngung der Versuche erfolgte nach einem in der Praxis üblichen Düngeplan gemäß den Angaben der Berater und wurde mit der Wasserversorgung zugeführt. Das Wasser wurde aus eigenen Brunnen entnommen.

Die einzelne Pflanze wird bis Saisonende ungefähr acht Meter lang, sodass die Fruchtstände weit von dem Wurzelballen entfernt sind. Selbst nach einer Kennzeichnung der Pflanzen mit farbigen Bändern, ist eine Zuordnung der Früchte zu den Matten sehr zeitaufwendig und kann schnell zu Fehlern führen. Der Ertrag konnte aus arbeitstechnischen Gründen nur pro Matte und nicht pro Pflanze oder Trieb erfasst werden.

Ungefähr zum Zeitpunkt der blühenden, fünften Rispe wurden die Pflanzen auf drei Matten mit jeweils 40×10^6 Sporen pro Pflanze durch Gießen infiziert (Isolat OÖ6, Oberösterreich); die Pflanzen auf drei Matten dienten als Kontrolle. Die Sporenlösung wurde im Labor auf PDA auf ihre Keimfähigkeit untersucht. Diese lag in beiden Jahren bei 95%. Nach Saisonende wurden von jeder Variante von den Pflanzen 20 Wurzelstücke oberflächendesinfiziert, auf SNA und PDA aufgelegt und nach einigen Tagen mikroskopiert.

Im Jahr 2003 wurde das Brunnenwasser, das zum Gießen eingesetzt wird, auf Sporen verschiedener Pathogene untersucht, da auch dieser Infektionsweg von Bedeutung sein kann. Aus jeder Wasserprobe wurden auf zehn Petrischalen mit PDA mit Antibiotika jeweils 500µl Wasser ausgestrichen und über eine Woche beobachtet und mikroskopiert.

Die Datenanalyse erfolgte mittels SPSS 8,0. Es wurde ein F-Test mit Levene's Test durchgeführt, so wie für jede Versuchsanlage ein gepoolter 2-Stichproben T-Test ($\alpha=0,05$).

Ergebnisse

Nach der mikroskopischen Untersuchung der Wurzelproben in beiden Jahren konnte in allen Betrieben eine erfolgreiche Infektion festgestellt werden und ebenso in den Kontrollen eine Infektion ausgeschlossen werden.

Alle Versuche in hydroponischen Anbausystemen haben gezeigt, dass eine künstliche Infektion mit *Colletotrichum coccodes* den Ertrag nicht signifikant reduzierte (Tab. 4 und 5).

Die Erträge der einzelnen Betriebe waren sehr unterschiedlich und nicht miteinander zu vergleichen. Bei der Untersuchung des Brunnenwassers wurden keine Sporen von *C. coccodes* identifiziert, dieser Übertragungsweg kann für diese Betriebe ausgeschlossen werden.

Tab. 4. Kummulierter durchschnittlicher Ertrag (kg pro Matte) im Jahr 2002

| | April | Mai | Juni | Juli | August | September | Oktober | November |
|------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|---------|----------|
| Betrieb 1 | | | | | | | | |
| Infiziert | | 6,43 | 18,52 | 27,41 | 30,60 | 34,98 | 36,95 | |
| Nicht infiziert | | 4,97 | 17,24 | 24,70 | 28,58 | 32,69 | 34,30 | |
| p=0,733 | | | | | | | | |
| Betrieb 2 | | | | | | | | |
| Infiziert | 7,31 | 20,61 | 35,02 | 46,54 | 54,75 | 60,86 | 66,13 | 68,57 |
| Nicht infiziert | 7,19 | 20,88 | 35,45 | 47,42 | 55,69 | 61,44 | 66,35 | 68,74 |
| p=0,349 | | | | | | | | |
| Betrieb 3 | | | | | | | | |
| Infiziert | 5,27 | 11,55 | 19,82 | 25,58 | 29,10 | 32,37 | 36,45 | |
| Nicht infiziert | 6,28 | 11,75 | 19,90 | 25,78 | 29,25 | 32,43 | 36,65 | |
| p=0,962 | | | | | | | | |

Tab. 5. Kummulierter durchschnittlicher Ertrag (kg pro Matte) im Jahr 2003

| | April | Mai | Juni | Juli | August | September | Oktober | November |
|------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|---------|----------|
| Betrieb 1 | | | | | | | | |
| Infiziert | | 2,07 | 13,81 | 21,49 | 25,62 | 26,16 | | |
| Nicht infiziert | | 2,54 | 14,65 | 21,62 | 26,89 | 28,03 | | |
| p=0,295 | | | | | | | | |
| Betrieb 2 | | | | | | | | |
| Infiziert | 4,16 | 14,89 | 29,44 | 39,62 | 48,76 | 51,62 | 52,46 | |
| Nicht infiziert | 4,55 | 14,12 | 27,49 | 37,44 | 47,03 | 50,47 | 51,77 | |
| p=0,838 | | | | | | | | |
| Betrieb 3 | | | | | | | | |
| Infiziert | | 8,22 | 17,07 | 23,18 | 31,22 | 35,17 | 42,87 | |
| Nicht infiziert | | 9,05 | 16,95 | 23,47 | 30,55 | 34,47 | 41,70 | |
| p=0,500 | | | | | | | | |

Diskussion

Die Erträge der einzelnen Betriebe sind auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an Pflanzentrieben pro Matte, der unterschiedlichen Sortenwahl und der allgemeinen Kulturführungen nicht miteinander zu vergleichen. Die Erfahrungswerte der Düngepläne wurden von jedem Betrieb beibehalten und nicht einheitlich eingestellt. Eine zu hohe Konzentration der Nährlösung führt zu einem reduzierten Ertrag [Ismail et al. 1997]. Die Rispen werden jeweils auf 5-6 Tomatenfrüchte beschränkt, um eine möglichst zeitgleiche Reife aller Früchte zu erreichen. Die Anzahl der Tomatenfrüchte pro Rispe war nicht in allen Betrieben einheitlich. Zu unterschiedlichen Ergebnissen bei einem Befall durch *C. coccodes* kann es auch auf Grund der eingesetzten Sorten kommen [MacNab et al. 1989]. Auch Daughtrey und Schippers [1980] weisen darauf hin, dass es eine Variabilität innerhalb einer und zwischen Tomatensorten in Bezug auf die Anfälligkeit der Pflanzen auf Wurzelkrankheiten gibt.

Der Erreger verursacht ein Absterben der Feinwurzeln und ein Verholzen der Wurzeln, von welchen sich bei starkem Befall das Parenchym abschält. Das Fehlen der Feinwurzeln ist im Boden gravierender. In hydroponisch geführten Kulturen sind die Versorgung mit Wasser und

Nährstoffen, sowie der mechanische Halt optimal und eine erhöhte Wurzeffizienz gleicht den Schaden durch die fehlenden Feinwurzeln aus [Bar-Tal und Rengel 1999]. Da Pflanzen in hydroponischen Kulturen zudem ein stärker ausgeprägtes Wurzelsystem haben als in Erde [Portela et al. 1997, Rumpel et al. 1997], fällt eine Reduktion der Wurzelmasse möglicherweise weniger ins Gewicht.

Im Gegensatz zu Erdkulturen kann sich in hydroponischen Systemen kein Infektionsdruck mit den Jahren aufbauen, wie bei *C. coccodes* in Erdkultur [Jones et al. 1991] oder z.B. bei *Kabatiella zae* in Maisfeldern [Pronczuk et al. 1996].

Im Gegensatz zu anderen Anbaumethoden kam es hier durch eine Infektion zu keinem Ertragsausfall, obwohl die Bedingungen der Monokultur und der damit verbundenen relativ leichten Ausbreitung dies vermuten lassen.

Ein Befall von *C. coccodes* in hydroponischem Tomatenanbau in den USA, wo es zu Wurzelfäule und welken, chlorotischen und in Folge abgestorbenen Blättern kommt, ist bekannt [Schneider et al. 1978]. In einem weiteren Versuch in den USA konnte die Bedeutung des Befalls in hydroponischen Systemen gezeigt werden, indem eine infizierte Pflanze in ein geschlossenes System gepflanzt wurde [Jenkins und Averre 1983]. Obwohl der Erreger in Erdkulturen oft als Schwächeparasit und als unbedeutend beschrieben wird [Crüger 1991], traten im genannten Versuch innerhalb einer Woche bei allen Pflanzenwurzeln erste Symptome auf, nach fünf bis sechs Wochen waren die Pflanzen abgestorben.

Meist werden auf großen Produktionsflächen wie in Holland oder den USA geschlossene Systeme eingesetzt und somit eine Verbreitung des Pathogenes im System erleichtert. Es ist denkbar, dass in den genannten Versuchen [Jenkins und Averre 1983, Schneider et al. 1978] ein aggressiveres Isolat verwendet wurde oder auch anfälliger Tomatensorten. Entscheidend ist auch die Befallsstärke, die wiederum von der Infektionsquelle und dem Klima abhängt.

Diese Argumente könnten die Unterschiede zwischen dem Totalausfall der Pflanzen im oben beschriebenen Versuch [Jenkins und Averre 1983] und den eigenen Versuchen in Wien und Niederösterreich, bei denen kein signifikanter Einfluss auf den Ertrag festgestellt werden konnte, erklären.

Mögliche Infektionsquellen könnten die gekauften Jungpflanzen oder die ungenügend gedämpften Matten sein. Wasser eines hydroponischen Systems kann als Quelle für Erreger wie *Pythium*, *Phytophthora* und *Fusarium* dienen [Bliss 1997]. Da im Brunnenwasser der Betriebe 1-3 keine Sporen von *C. coccodes* identifiziert werden konnten, ist dieser Weg hier

auszuschließen. Die möglicherweise bedeutendste Infektionsquelle stellt der Anbau von Tomaten oder Kartoffeln in der Nachbarschaft dar und somit eine Sporenfektion durch die Luft, wie dies von zahlreichen Erregern z.B. von *Venturia inaequalis*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* [Stensvand et al. 1997, Gottwald et al. 1997, Park et al. 1999] bekannt ist. In eigenen Vorversuchen konnte eine Sporenübertragung mit der Luft nachgewiesen werden.

Zur Vermeidung der Krankheit muss Wert auf Hygienemaßnahmen in der Kulturführung gelegt werden. Wichtig ist vor allem die Desinfektion aller verwendeten Materialien. Regelmäßige Untersuchungen des Brunnenwassers auf Erreger ist zu empfehlen. Im Vergleich zu Erdkulturen kann es durch fehlende Antagonisten oder konkurrierende andere Pathogene zu einem stärkeren Auftreten und einem größeren Ertragsausfall in hydroponischen Kulturen kommen. So wird gerade in chemisch behandelten Kartoffelschlägen von einem starken Auftreten von *C. coccodes* berichtet [Tsrar et al. 1994].

Die bisherigen Ergebnisse in hydroponischen Kulturen legen eine chemische Bekämpfung nicht nahe. Das Absterben der Pflanzen nach einem Wurzelbefall [Jenkins und Averre 1983] zeigt jedoch das Potenzial dieses Wurzelpathogens. Der Ertragsausfall sollte zukünftig beobachtet werden, um eine Veränderung in der Bedeutung sofort zu erkennen, gleichzeitig sollte eine mögliche Bekämpfung evaluiert werden, da die in den USA eingesetzten Wirkstoffe und Anwendungen in Europa nicht zugelassen sind.

Die Wirkstoffe sind meist als Blattapplikation zugelassen und gelangen so nur an die Wurzeln, wenn es sich um systemische Präparate handelt. Ausführlich wird auf die chemische Bekämpfung im Weiteren eingegangen. Bei Untersuchungen zum Einsatz von Chlor zur Bekämpfung von Wurzelpathogenen in hydroponischen Systemen [Cook und Devine 1979] konnte eine Reduktion des Wurzelbefalls mit *C. coccodes* erreicht werden; keine negative Auswirkung auf das Wurzelwachstum oder den Ertrag wurden festgestellt.

Denkbar ist auch ein Einsatz von Antagonisten, wie dies bei der Bekämpfung von *Rhizoctonia cerealis* mit *Bacillus* sp. vielversprechend scheint [JianRong et al. 1996]. Untersucht wurde der Einsatz von *Penicillium brevicompactum* isolierten β -Ketoamiden, die hochwirksam gegen *C. coccodes* und *C. gloeosporoides* mit ED₅₀-Werten von jeweils 11,7 bzw. 2,04 μ g/ml sind [Moya et al. 1999].



Abb. 3. Steinwollewürfel mit infizierten (rechts) und nicht infizierten (links) Wurzeln am Saisonende

Gefäßversuch mit Erde

Einleitung

In Betrieben mit Erdkultur war eine künstliche Infektion der Pflanzen im Boden nicht möglich, da die Verbreitung von *C. coccodes* in den Bundesländern bei über 90% liegt. Somit ist keine Kontrollvariante möglich, da der Pilz fast überall im Boden zu finden ist. Es wurde deshalb ein Versuch in Erde durchgeführt, bei dem die Einzelpflanzen in Gefäßen in einem Glashaus gezogen wurden.

Material und Methode

Es wurden Tomatenpflanzen (Sorte Mercedes) angezogen und dann einzeln in 10 Liter-Gefäßen gepflanzt. Verwendet wurde gedämpfte Erde. Zu Versuchsbeginn wurde eine Bodenuntersuchung durchgeführt. Der Gesamtgehalt an mineralischem Stickstoff betrug 6,0 mg N/100g, dies entspricht 270 kg N/ha. Weitere Messergebnisse für Calcium, Magnesium, Kalium, Eisen etc. sind Tab. 9 zu entnehmen. Alle Gefäße wurden ausreichend mit Hakaphos Rot (NPK-Dünger mit MgO 8+12+24 (+4) mit Bor, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän und Zink) gedüngt, besonders auf eine ausreichende Ca-Düngung (alle 2-3 Wochen 10g kohlensaurer Magnesium-Kalk/Pflanze) und eine ausreichende Bewässerung durch Tropfschläuche wurde geachtet, um die häufig auftretende Blütenendfäule zu vermeiden. Der Versuch umfasste zwei verschiedene Dünge­stufen. Die halbe Anzahl der Pflanzen wurde nicht mit Stickstoff nachgedüngt, die anderen bekam zum Zeitpunkt der Blüte, des Fruchtansatzes und der Fruchtbildung jeweils eine weitere Stickstoffgabe von 240 ml NH_4NO_3 (Konzentration 94,4 g/l). Am Ende des Versuchs wurde eine Mischprobe der Erde von jeweils jeder Düngevariante untersucht (Tab. 10 und 11).

Die halbe Anzahl der Pflanzen jeder Variante wurden mit je $20,4 \times 10^6$ Sporen/Pflanze infiziert (Isolat S7, Steiermark), die eine Keimfähigkeit von 98% auf PDA aufwiesen.

Es wurde der Ertrag der Pflanzen sowie die Frisch- und Trockenmasse der Pflanzen nach der Ernte bestimmt. Um die Infektion zu kontrollieren und eine Übertragung der Sporen mit der Luft auszuschließen, wurden am Ende des Versuchs Stichproben der Wurzeln beider Varianten im Labor gewaschen und auf einen Befall von *C. coccodes* untersucht.

Die Datenanalyse erfolgte mittels SPSS 8,0. Als Allgemeines lineares Model wurde eine 2-faktorielle Varianzanalyse durchgeführt ($\alpha=0,05$).

Ergebnisse

Die erfolgreiche Infektion konnte in beiden Versuchsjahren bestätigt werden, und es konnte kein Befall an nicht infizierten Pflanzen festgestellt werden. Die infizierten Wurzeln waren stark verbräunt, die nicht infizierten Wurzeln deutlich heller (Abb. 4).

Es konnten durch Düngung erfolgreich zwei verschiedene Stickstoffvarianten eingestellt werden. Zu Versuchsende wies die ungedüngte Stickstoffvariante einen Gesamtgehalt an mineralischem Stickstoff von 0,6 mg N/100g auf, dies entspricht 27 kg N/ha. Die stickstoffgedüngte Variante wies einen Gesamtgehalt von 2,5 mg N/100g auf, dies entspricht 113 kg N/ha.

Der Versuch 2002 konnte auf Grund von Problemen in der Pflanzenanzucht erst sehr spät ausgepflanzt werden. Dies hatte zur Folge, dass die Früchte zum Zeitpunkt der Ernte sehr klein und grün waren. Als Parameter wurde die oberirdische Gesamtfrisch- und Trockenmasse mit Rispen, aber ohne Früchte ausgewertet. 2003 wurde der Ertrag der Früchte bestimmt und die Frisch- und Trockenmasse der Pflanzen nach der Ernte.



Abb. 4.: Mit *C. coccodes* infizierte Tomatenwurzel (links) und Kontrolle (rechts)

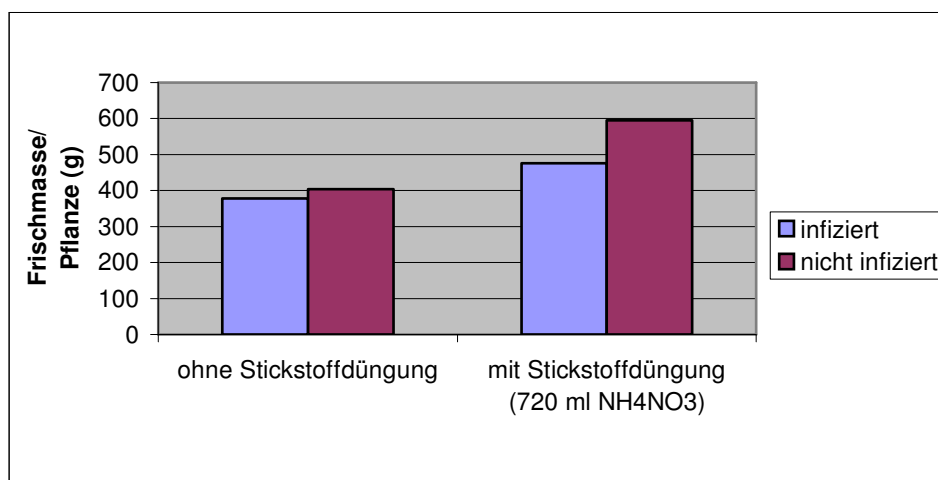


Abb. 5. Einfluss einer *C. coccodes*-Infektion und Stickstoffdüngung auf die oberirdische Gesamtfrischmasse von Tomatenpflanzen 2002

Im Jahr 2002 war sowohl der Einfluss der Infektion mit *C. coccodes* als auch der Einfluss der Stickstoffdüngung auf die Frisch- und Trockenmasseproduktion hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

Die infizierten Pflanzen hatten durchschnittlich 15% weniger oberirdische Frischmasse (427 g/Pflanze) im Gegensatz zu nicht infizierten Pflanzen (499 g/Pflanze). 2002 bestand außerdem eine signifikante Wechselwirkung zwischen *C. coccodes*-Infektion und Stickstoffdüngung in Bezug auf die Frischmasse ($p=0,003$).

Im Jahr 2003 ist der Einfluss der Infektion mit *C. coccodes* auf den Ertrag hoch signifikant ($p \leq 0,001$). Die infizierten Pflanzen (790 g/Pflanze) hatten einen durchschnittlichen Ertragsverlust von mehr als 36% im Gegensatz zu nicht infizierten Pflanzen (1250 g/Pflanze). Der Einfluss der Stickstoffdüngung ist ebenfalls signifikant in Bezug auf den Ertrag ($p=0,017$), ebenso auf die Frisch- und Trockenmasse ($p \leq 0,001$). Im Jahr 2003 trat keine Wechselwirkung zwischen Infektion und Stickstoffdüngung auf.

Tab. 6. Einfluss der *C. coccodes*-Infektion und Stickstoffdüngung auf die durchschnittliche Frisch- und Trockenmassebildung 2002

| Jahr 2002 | Frischmasse (g/Pflanze) | Trockenmasse (g/Pflanze) |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| ohne N-Düngung, Infektion | 378 | 59 |
| ohne N-Düngung, Kontrolle | 404 | 64 |
| mit N-Düngung, Infektion | 476 | 75 |
| mit N-Düngung, Kontrolle | 594 | 81 |

Tab. 7. Einfluss der *C. coccodes*-Infektion und Stickstoffdüngung auf die durchschnittliche Frisch- und Trockenmassebildung, sowie den Ertrag 2003

| Jahr 2003 | Frischmasse (g/Pflanze) | Trockenmasse (g/Pflanze) | Ertrag (g/Pflanze) |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| ohne N-Düngung, Infektion | 550 | 62 | 907 |
| ohne N-Düngung, Kontrolle | 559 | 57 | 1272 |
| mit N-Düngung, Infektion | 844 | 109 | 674 |
| mit N-Düngung, Kontrolle | 754 | 94 | 1228 |

Tab. 8. Einfluss der *C. coccodes*-Infektion auf die durchschnittliche Frischmasseproduktion 2002 bzw. den Ertrag 2003, wenn die nicht infizierte Variante mit viel Stickstoff 100% entspricht.

| | Frischmasse 2002 (%) | Ertrag 2003 (%) |
|---------------------------|----------------------|-----------------|
| ohne N-Düngung, Infektion | 63 | 73 |
| ohne N-Düngung, Kontrolle | 68 | 103 |
| mit N-Düngung, Infektion | 80 | 54 |
| mit N-Düngung, Kontrolle | 100 | 100 |

Diskussion

In beiden Versuchsjahren zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ernteparameter durch eine künstliche Infektion mit *C. coccodes*. Im ersten Versuchsjahr kann nur auf Grund der Reduktion der Frischmasse um 15% auf eine mögliche Reduktion des Ertrages rückgeschlossen werden. Im zweiten Versuchsjahr zeigte sich durch eine Infektion mit dem Erreger ein um 36% deutlich reduzierter Ertrag.

In Kulturen können für pilzliche Erreger, Unkraut oder Schädlinge jeweils Schadschwellen ermittelt werden. Wird diese überschritten, ist eine Bekämpfung ökonomisch sinnvoll. Beispiele sind *Rhizoctonia solani* an Reis [Tao et al. 1994], Raps und Glatthafer in Erbsen [Diaz et al. 1994] und ein Larvenbefall von *Euscepes postfasciatus* an Süßkartoffeln [Yasuda 1997]. Für *C. coccodes* als Erreger der Fruchtfäule ist eine Bekämpfung ab 3-5% Fruchtbefall

ökonomisch notwendig [Dillard et al. 1997]. Für *C. coccodes* als Erreger der Schwarzen Wurzelfäule gibt es bislang keine Schadschwelle, da Untersuchungen zum Ertragsausfall fehlen.

Im Jahr 2003 wurde durch eine erhöhte Stickstoffdüngung kein Mehrertrag erzielt, ebenso zeigte sich die Ertragsreduktion bzw. die Frischmassereduktion durch *C. coccodes* in der Variante mit Stickstoffdüngung wesentlich stärker als in der nicht nachgedüngten Variante (Tab. 8). Eine Erklärung für diese Zusammenhänge ist ein nicht optimaler Düngungszeitpunkt. Eine zu späte Stickstoffdüngung könnte dazu führen, dass hauptsächlich Blattmasse produziert wurde und keine Fruchtmasse. Es ist allgemein bekannt, dass stark stickstoffversorgte Pflanzen wesentlich anfälliger auf pilzliche Infektionen reagieren [Colbach und Saur 1998], es kann sogar allein durch eine Stickstoffüberdüngung zu einer Reduktion der Feinwurzeln kommen [Koss und Murach 1996]. Auch im vorgestellten Versuch führte die Infektion in der stickstoffgedüngten Variante zu einem größeren Schaden als in der ungedüngten Variante. Wird in der Praxis auf Grund eines geringeren Ertrages im folgenden Jahr vermehrt gedüngt, tritt das Problem verstärkter auf. Dieser Zusammenhang bestätigte sich in den Versuchen und es muss in der Praxis, auch unter ökologischen Gesichtspunkten, auf eine Vermeidung der Überdüngung geachtet werden. Bodenproben und Bestimmungen des vorhandenen Stickstoffgehaltes im Boden sind hier sehr wichtig. Die Feststellung des Minderertrags ist entscheidend und wird nur bei guter Information über die Problematik mit der Krankheit in Verbindung gebracht werden.

Da ein Befall durch *C. coccodes* keine Symptome an oberirdischen Pflanzenteilen in Deutschland und Österreich hervorruft und die indirekten Folgen, wie z.B. verminderter Pflanzenwuchs und welche Pflanzen nicht eindeutig der Schwarzen Wurzelfäule zuzuordnen sind, ist eine Aufklärung über das Auftreten des Erregers und den verursachten Minderertrag, besonders unter dem Gesichtspunkt der erhöhten Stickstoffdüngung, die den Ertrag noch weiter reduziert, notwendig.

Tab. 9. Dauereigenschaften und pflanzenverfügbare Nährstoffe der Erde zu Versuchsbeginn

| | | |
|--|---------|-----------------|
| pH in CaCl₂ (Methode: SAA-41N-01) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 7.7 |
| Kationen-Austauschkapazität (KAK) (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 21.4cmol+/kg |
| austauschbares Calcium (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 19.2cmol+/kg |
| austauschbares Calcium in % KAK (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 89.5% KAK |
| austauschbares Magnesium (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 1.8cmol+/kg |
| austauschbares Magnesium in % KAK (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 8.4% KAK |
| austauschbares Kalium (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 0.4cmol+/kg |
| austauschbares Kalium in % KAK (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 1.7% KAK |
| austauschbares Natrium (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0,15 cmol+/kg |
| austauschbares Natrium in % KAK (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0.1 % KAK |
| austauschbares Eisen (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0,08 cmol+/kg |
| austauschbares Eisen in % KAK (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0.1 % KAK |
| austauschbares Mangan (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0,02 cmol+/kg |
| austauschbares Mangan in % KAK (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0.1 % KAK |
| austauschbares Aluminium (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0,55 cmol+/kg |
| austauschbares Aluminium in % KAK (Methode: SAA-41N-13) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0.1 % KAK |
| austauschbare Protonen (Methode: SAA-41N-15) | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | < 0,02 cmol+/kg |

Pflanzenverfügbare Nährstoffe

| | | | |
|---|---------|---------------------|------------------------|
| Phosphor im CAL - Extrakt (Methode: SAA-41N-03,-04) | | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 90 mg/1000g | C (ausreichend) |
| Kalium im CAL - Extrakt (Methode: SAA-41N-03,-04) | | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 111 mg/1000g | B (niedrig) |
| Mg im CaCl₂ - Extrakt (Methode: SAA-41N-11) | | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 151 mg/1000g | D (hoch) |
| Eisen im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 30 mg/1000g | C (mittel) |
| Mangan im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 48 mg/1000g | C (mittel) |
| Kupfer im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 4 mg/1000g | C (mittel) |
| Zink im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/355 | 0-30 cm | 4 mg/1000g | C (mittel) |

Tab. 10. Dauereigenschaften und pflanzenverfügbare Nährstoffe der Variante mit Stickstoff-Düngung nach Versuchsende

Dauereigenschaften

| |
|---|
| pH in CaCl₂ (Methode: SAA-41N-01) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm 7.7 |

Pflanzenverfügbare Nährstoffe

| |
|--|
| Phosphor im CAL - Extrakt (Methode: SAA-41N-03, -04) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm 70 mg/1000g C (ausreichend) |
| Kalium im CAL - Extrakt (Methode: SAA-41N-03, -04) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm < 40 mg/1000g A (sehr niedrig) |
| Mg im CaCl₂ - Extrakt (Methode: SAA-41N-11) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm 310 mg/1000g E (sehr hoch) |
| Eisen im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm 30 mg/1000g C (mittel) |
| Mangan im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm 44 mg/1000g C (mittel) |
| Kupfer im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm 3 mg/1000g C (mittel) |
| Zink im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) |
| Analysennummer: 8/494 0-25 cm 3 mg/1000g C (mittel) |

Tab. 11. Dauereigenschaften und pflanzenverfügbare Nährstoffe der Variante ohne Stickstoff-Düngung nach Versuchsende

Dauereigenschaften

| | | |
|---|---------|-----|
| pH in CaCl₂ (Methode: SAA-41N-01) | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | 7.7 |

Pflanzenverfügbare Nährstoffe

| | | | |
|---|---------|---------------|------------------|
| Phosphor im CAL - Extrakt (Methode: SAA-41N-03, -04) | | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | 78 mg/1000g | C (ausreichend) |
| Kalium im CAL - Extrakt (Methode: SAA-41N-03, -04) | | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | < 40 mg/1000g | A (sehr niedrig) |
| Mg im CaCl₂ - Extrakt (Methode: SAA-41N-11) | | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | 258 mg/1000g | E (sehr hoch) |
| Eisen im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | 31 mg/1000g | C (mittel) |
| Mangan im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | 34 mg/1000g | C (mittel) |
| Kupfer im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | 4 mg/1000g | C (mittel) |
| Zink im EDTA - Extrakt (Methode: SAA-41M-02) | | | |
| Analysennummer: 8/495 | 0-25 cm | 4 mg/1000g | C (mittel) |

Gefäßversuch mit Blähton

Einleitung

Um in einem weiteren Versuch den Ertragsausfall zu bestimmen und praxisnahe Bedingungen zu erhalten, wurden die Pflanzen einzeln in Gefäße in Lecaton[®], einer Blähtonmarke, gezogen. Eine Kulturführung in Lecaton[®] erleichterte die Untersuchung der Wurzeln, da nicht die Erde abgespült werden musste, wobei die Feinwurzeln sonst abbrechen. Die Seitenwände und Decke der Freiluftstation schlossen bei Regen automatisch und wurden auch bei sehr starkem Wind und anfangs zu niedrigen Nachttemperaturen geschlossen. Sonst jedoch wuchsen die Pflanzen unter Freilandbedingungen und hatten ausreichend Platz zur Verfügung.

Material und Methode

In einer Gefäßstation wurden 124 (2002) bzw. 84 (2003) Tomatenpflanzen (Sorte Mercedes) in Lecaton[®] gezogen und in einzelnen Gefäßen aufgestellt. Die halbe Anzahl der Pflanzen wurde mit einer Sporenlösung mit 6×10^6 Sporen/Pflanze (Juni 2002, Isolat B3, Burgenland) bzw. 95×10^6 Sporen/Pflanze (Mai 2003, Isolat S7, Steiermark) infiziert, die eine Keimfähigkeit von 97% bzw. 96% auf PDA aufwiesen. Aus labortechnischen Gründen stand 2003 das Isolat B3 nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, so wurde mit S7 infiziert. Die Oberfläche der Töpfe wurde mit schwarzer Folie abgedeckt, um ein Eindringen der Sporen durch die Luft zu verhindern.

Die Düngung der Pflanzen enthielt folgende Komponenten: Hakaphos rot und Calzinit, wobei zu Anfang Hakaphos rot, ein wasserlösliches, phosphat- und kalibetontes Nährsalz mit hohem Magnesiumgehalt (NPK-Dünger mit MgO 8+12+24 (+4) mit Bor, Kupfer, Eisen, Mangan, Molybdän und Zink) und zur Fruchtreife Calzinit überwog. Der EC-Wert lag im Durchschnitt bei 3,5. Die Nährlösung der Pflanzen wurde einmal wöchentlich ausgewechselt. Um ein Faulen der Wurzeln zu verhindern, wurde durch Schläuche in jedes Gefäß Luft geblasen, sowie die Gefäße nur bis maximal zur Hälfte mit der Nährlösung befüllt.

Die Pflanzen wurden in gleicher Höhe gestutzt und es wurden pro Pflanze zwei (2002) bzw. vier (2003) Rispen zugelassen. Die Tomaten wurden pro Pflanze geerntet und gewogen. Am

Ende der Kultur wurden auch die noch unreifen Tomaten abgeerntet und mitgewogen. Es wurden nur Tomaten mit mehr als 20g gewogen.

Bei Bedarf wurde in praxisüblichen Konzentrationen mit Plenum[®], Confidor[®] und Masai[®] gegen ein Auftreten von Weißer Fliege und Spinnmilben behandelt. Gegen einen leichten Mehltaubefall am Ende der Saison wurden keine Fungizide angewandt, da die chemische Bekämpfung von *C. coccodes* noch nicht ausreichend untersucht wurde, um eine Wechselwirkung der Präparate auf *C. coccodes* ausschließen zu können.

Eine Quantifizierung des Befalls auf den Wurzeln wurde mittels Bildanalyse mit Kamera (SONY, 3 CCD, DXC- 930 P mit einer Auflösung von 760 x 568) und Software (KS 400, Version 3.0 von Zeiss) ausgewertet. Auch mit dem Auswertungssystem WinRhizo[®] wurde eine Quantifizierung des Befalls durch *Colletotrichum coccodes* bestimmt.

Die Datenanalyse erfolgte mittels SPSS 8,0. Es wurde ein F-Test mit Levene's Test durchgeführt. Für beide Versuchsjahre wurde ein gepoolter 2-Stichproben T-Test durchgeführt ($\alpha=0,05$).

Ergebnisse

Die erfolgreiche Infektion konnte in beiden Versuchsjahren bestätigt werden, und es konnte kein Befall an nicht infizierten Pflanzenwurzeln festgestellt werden.

2002 betrug der durchschnittliche Ertrag pro Pflanze für die Kontrolle 1333g und für die infizierten Pflanzen 1040g, das entspricht einer Reduktion des Tomatenertrags um 21%. Diese Reduktion ist hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

2003 ergab für die Kontrolle ein durchschnittliches Gewicht von 1617g pro Pflanze und für die infizierte Variante ein Durchschnittsgewicht von 1690g pro Pflanze. Hier war der Einfluss der Infektion nicht signifikant ($p=0,187$).

Die Pflanzen wurden in Lecaton[®] angebaut, um eine Quantifizierung des Befalls auf den Wurzeln nicht unnötig durch anhaftende Erdpartikel zu erschweren. Die Sklerotien bedeckten 0-5% der Wurzeloberfläche, die Befallsstärke 2002 und 2003 war durch optische Bonitur nicht zu differenzieren.

Der Erreger verursacht ein Absterben der Feinwurzeln und einen starken Befall mit Sklerotien gerade an den Hauptwurzeln. Durch deren Krümmung ergab sich bei der Bildanalyse das

Problem der Tiefenschärfe am Wurzelrand. Die sehr großen Wurzelsysteme, von denen immer nur wenige cm betrachtet werden konnten, stellten ein weiteres Problem dar. Zahlreiche Stichproben der Wurzeln zu untersuchen ist sehr zeitaufwendig und auch die repräsentative Stichprobenauswahl ist nicht einfach. Die Auflösung der Kamera war für die teilweise sehr feinen Sklerotien nicht ausreichend. Mit dem Auswertungssystem WinRhizo® war eine Quantifizierung des Befalls durch *Colletotrichum coccodes* aus den genannten Gründen ebenfalls nicht möglich.

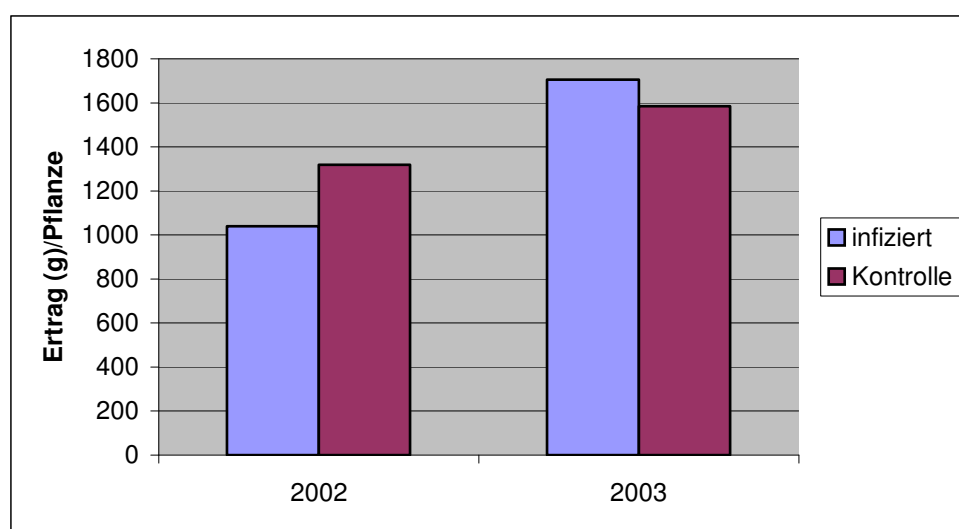


Abb. 6. Einfluss einer *C. coccodes*-Infektion auf den Tomatenertrag in Lecaton®

Diskussion

Der scheinbar geringere Ertrag im Jahr 2002 erklärt sich dadurch, dass nur zwei Rispen geerntet wurden im Vergleich zu vier Rispen pro Pflanze im Jahr 2003. Dies ergibt für 2002 umgerechnet pro Ripse sogar einen besseren Ertrag.

Bemerkenswert ist, dass im Jahr 2003 mit der 15-fachen Menge an Sporen pro Pflanze infiziert wurde, es jedoch nur im Jahr 2002 zu einer signifikanten Ertragsreduktion kam. Die Menge an Inokulum kann also nicht in Bezug gesetzt werden zur Befallsstärke und der damit verbundenen Ertragsreduktion, wie dies bei anderen Erregern der Fall ist. So ist z.B. bei *Verticillium dahliae* eine genaue Korrelation zwischen der Anzahl der Microsklerotien pro g Boden und der verursachten Welke in Prozent möglich [Xiao und Subbarao 1998].

Wichtig für die Ausbreitung des Erregers scheinen die Klimabedingungen unmittelbar nach der Infektion zu sein. Beginn und Dauer einer natürlichen Infektion im Feld hängen stark von Umweltbedingungen ab; Regen bzw. Tau scheinen hierfür notwendig [Sanogo et al. 1997]. Die Sporen, mit denen in diesem Versuch infiziert wurde, haben zur Keimung einen optimalen Temperaturbereich von 20-22°C [Delon 1975] und Appressorien werden zwischen 16-28°C gebildet [Sanogo 1995]. Optimale Temperaturen zur Keimung wurden im Jahr 2003 zum Zeitpunkt der Infektion Anfang Mai möglicherweise noch nicht erreicht. Im Jahr 2002 wurde aus technischen Gründen erst sehr spät, Anfang Juni, infiziert als höhere Temperaturen herrschten.

Ein weiterer Grund kann die unterschiedliche Pathogenität der Isolate sein [Tu und Poysa 1997]. In den beiden Versuchsjahren wurde mit unterschiedlichen Isolaten gearbeitet, die jedoch beide eine Reisolation von der infizierten Tomatenfrucht durchliefen (Kapitel 3).

Auch das Alter der Pflanzen bzw. Wurzeln spielt eine große Rolle für die Anfälligkeit. Die Literatur liefert hierzu sehr gegensätzliche Ergebnisse. So ist von jungen Tomatenpflanzen eine sehr hohe Anfälligkeit auf *C. coccodes* bekannt, die z.T. zum Absterben der Pflanze führt [Davet 1972, Jenkins und Averre 1983]. An *Capsicum annuum* kommt es nur im 1- und 2-Blattstadium der Keimlinge zu einer Infektion über die Wurzeln, auch die Anfälligkeit für einen Blattbefall nimmt im Alter ab [Hong und Hwang 1998]. Weitere Arbeiten belegen jedoch, dass mit zunehmendem Alter der Tomatenblätter die Anfälligkeit für einen *C. coccodes*-Befall steigt [Byrne et al. 1998]. Auch getestete Unkrautpflanzen werden mit zunehmendem Alter anfälliger auf Wurzel- und Blattinfektionen durch *C. coccodes* [Raid und Pennypacker 1987].

Die Bedingungen und Kulturführung in Lecaton® in der Gefäßstation können nicht denen der Praxis in Folienhäusern gleichgesetzt werden. Dennoch erreichte der Ertrag pro Pflanze die Größenordnung aus manchen Betrieben, wenn bedacht wird, dass der Ertrag im dargestellten Versuch künstlich verringert wurde, in dem auf vier bzw. zwei Rispen reduziert wurde. In Vorversuchen im Jahr 2001 stellte die Blütenendfäule ein großes Problem dar, dies konnte jedoch erfolgreich verhindert werden, und es kam in den Jahren 2002 und 2003 zu einem sehr geringen Befall. Es kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Düngung als auch die Wasserversorgung gut waren und man aus diesen Versuchen Schlüsse für die Praxis ziehen kann.

Bekämpfung von *Colletotrichum coccodes*

Fruchtwechsel und andere Kulturmaßnahmen

Die Kultur des Vorjahres beeinflusst das Auftreten von *F. oxysporum f.sp. lycopersici* und *C. coccodes*. Tomaten wuchsen nach Weizen besser als nach Kartoffeln [Dorenda 1974], da auf Kartoffel als Wirtspflanze der Erreger in größerer Anzahl überdauern kann.

Die Möglichkeit eines Fruchtwechsels ist in der Praxis sehr eingeschränkt. Aus wirtschaftlichen Gründen verbleiben die Folienhäuser mehrere Jahre auf der gleichen Fläche. Da ein Fruchtwechsel zwischen *Solanaceen* wie z.B. Paprika, Tomate oder Aubergine nicht zielführend ist, ist die Auswahl an Kulturen in einem Folienhaus sehr eingeschränkt. Meist ist der Absatz der Tomaten längerfristig durch Verträge gebunden. Aus betriebstechnischen Gründen ist ein häufiger Fruchtwechsel oft nicht möglich. Da die Sklerotien nachgewiesenermaßen 8 Jahre im Boden überdauern [Dillard und Cobb 1998] und Unkräuter eine große Rolle bei der Überwinterung [Raid und Pennypacker 1987] und so auch bei der Überdauerung über Jahre hinweg spielen, ist ein Fruchtwechsel kein Bekämpfungsansatz.

Kontrolle bei Lagerung

Latente Infektionen grüner Früchte können am Ausbruch der Krankheit gehindert werden, indem die Früchte kühl gelagert werden. Weitere Möglichkeiten, um Nachernteschäden vor allem bei tropischen Kulturen bei der Lagerung und dem Transport zu vermeiden, sind je nach Kultur Tauchen in heißes Wasser, Fungizide, Gamma-Bestrahlung, Natriumhypochlorid-Behandlung, Folienverschweißung oder eine kombinierte Anwendung von Fungiziden und Wachs [Hindorf 2000].

Bodenentseuchung

Die Bodenentseuchung kann grundsätzlich auf physikalischem, chemischem oder biologischem Wege erfolgen, wobei letzterer nur eine untergeordnete Rolle spielt. Neben der Beseitigung des Infektionsmaterials ist aber besonders auf die übrige Biozönose und die Erhaltung eines optimalen physikalischen und chemischen Bodenzustands zu achten.

Zur **chemischen** Bodenentseuchung als Fungizid, Herbizid und Nematizid ist nur der Wirkstoff Dazomet (Basamid-Granulat[®] und Fongosan[®]) registriert. Wobei wegen nicht auszuschließender Gefährdung des Grundwassers sowie phytotoxischer Wirkung der Einsatz stark eingeschränkt wird. Eine Bodenbehandlung mit Methylbromid (80g/m²) steigerte den Ertrag um bis zu 52% je nach Tomatensorte, ist aber in Deutschland oder Österreich nicht zugelassen [Slusarski 1989]. Außerdem wird in Israel von einem starken Auftreten von *C. coccodes* gerade in chemisch behandelten Kartoffelschlägen berichtet [Tsrer et al. 1994].

Unter **physikalischen** Verfahren versteht man den Bodenaustausch, die Verwendung elektrischer Geräte zur Erzeugung trockener Hitze, sowie die Bodendämpfung durch Einleitung von Wasserdampf in den Boden.

Für flach wurzelnde Pflanzen können gute Erfolge mit Bodendämpfung erzielt werden. Nach 8 h Dampfbehandlung bei 0,3-0,7 atm wurden alle untersuchten Pilze (u.a. *C. coccodes*) in Tiefen von 10-50 cm bei Folienabdeckung abgetötet [Lalev und Bakhariev 1975].

Es ist jedoch anzunehmen, dass die Dämpfung nicht in ausreichende Tiefen gelangt. Die Pfahlwurzel der Tomatenpflanzen vermag in einen tiefgründigen Boden bis über 2 Meter tief einzudringen [Krug 1986]. Auch wenn 70% der Wurzelmasse im Krumbereich verbleiben, reichen einige infizierte Wurzeln in tieferen Bodenschichten aus, um erneut einen Befall auszulösen.

Kosten und Aufwand legen es ferner nahe, das Dämpfen nur auf begrenzten Flächen einzusetzen. Dies geschieht zum Beispiel in hydroponisch geführten Tomatenkulturen.

Dämpfen der Schaumstoffmatten

Einleitung

Die verwendeten Schaumstoffmatten für den hydroponischen Anbau von Tomaten werden in den Betrieben bei 90-100°C mindestens 3 h gedämpft, um über mehrere Jahre hinweg verwendet werden zu können. Im dargestellten Versuch wurde der Temperatureinfluss auf das Wachstum von *C. coccodes*-Sklerotien und z.T. auf das Myzel untersucht. Es sollte überprüft werden, ob durch diese Behandlung die Sklerotien abgetötet werden oder ob die gedämpften Matten des Vorjahres als Infektionsquelle in Frage kommen.

Material und Methoden

Es wurden die folgenden 6 Isolate auf PDA-Schalen angezogen: S7 (Halbenrain, Steiermark), B8 (St. Andrä, Burgenland), NÖ5 (Zwölfaxing, Niederösterreich), OÖ 31, 33, 34 (drei Betriebe aus dem Raum Eferding, Oberösterreich). Das Ausgangsmaterial waren hauptsächlich Sklerotien, bei drei Versuchswiederholungen mit den Isolaten OÖ 31, 33, 34 wurde hauptsächlich Myzel eingesetzt, das noch kaum Sklerotien gebildet hatte.

Jeweils drei Schalen eines Isolates wurden für 3 h bei folgenden Temperaturen gelagert:

-20°C im Tiefkühlschrank, 4°C im Kühlschrank, 24°C in der Klimakammer, 40, 60, 80 und 100°C im Trockenschrank (Ecocell 55, MMM Medcenter). Es wurden 5 Agarstücke (Ø 6 mm) von jeder der drei Schalen einer Temperaturvariante ausgestochen und einzeln in die Mitte einer Schale mit PDA gesetzt. Die Schalen wurden mit Parafilm[®] verschlossen und bei Raumtemperatur von 24°C und Tageslicht gelagert. Das Wachstum wurde nach 6 Tagen gemessen. Die Ergebnisse werden als Myzelzuwachs in cm angegeben, d.h., es wurden vom Gesamtdurchmesser die eingesetzten 6 mm abgezogen. Es werden in Tab. 9 die Durchschnittswerte von je 15 Schalen pro Temperatur angegeben.

Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS 8,0. Als Allgemeines lineares Model wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-HSD-Test durchgeführt ($\alpha=0,05$).

Ergebnisse und Diskussion

Für alle Isolate trat im Vergleich zur Kontrolle bei 24°C eine hoch signifikante Reduktion des Myzelwachstums bei 60, 80 und 100°C ein ($p\leq 0,001$). Die Isolate reagierten unabhängig vom eingesetzten Ausgangsmaterial. Wie der Tab. 12 zu entnehmen ist, gab es jedoch bei einigen Isolaten auch noch bei 60, 80 und sogar 100°C ein Wachstum.

Tab. 12. Durchschnittlicher Myzelzuwachs (cm) nach 6 Tagen

| Pilzstruktur | Sklerotien | Sklerotien | Sklerotien | Sklerotien | Myzel | Myzel | Myzel |
|--------------|------------|------------|------------|------------|-------|-------|-------|
| Isolat | S7 | B8 | NÖ5 | OÖ34 | OÖ31 | OÖ33 | OÖ34 |
| Temperatur | | | | | | | |
| -20°C | 3,5 | 4,1 | 4,5 | 3,4 | 3,2 | 3,0 | 3,0 |
| 4°C | 4,0 | 4,0 | 4,6 | 3,6 | 3,2 | 3,2 | 3,0 |
| 24°C | 4,0 | 4,0 | 4,6 | 3,7 | 3,3 | 3,1 | 2,8 |
| 40°C | 4,1 | 4,1 | 4,6 | 3,5 | 3,3 | 3,1 | 2,9 |
| 60°C | 0,7 | 1,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 80°C | 1,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100°C | 0 | 2,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

In diesem Versuch unterschieden sich die sechs eingesetzten Isolate in ihrer Reaktion auf verschiedene Temperaturen. Diese Unterschiede ließen sich jedoch nicht morphologisch bestätigen. Das Alter der Isolate war identisch und auch die Pathogenität wurde für alle Isolate getestet.

Auch wenn bei Temperaturen ab 60°C auf Grund der genetischen Vielfalt der *C. coccodes*-Isolate nur wenige Sklerotien wachsen, ist dies ausreichend, um eine neue Infektion auszulösen. Eine solche genetische Vielfalt kann zu einem erhöhten Infektionsdruck durch Temperaturtoleranz einzelner Sklerotien führen. Diese genetische Vielfalt der *C. coccodes*-Isolate ist von der Resistenzbildung gegenüber Wirkstoffen bekannt [Uribe und Loria 1994].

Versuche und Untersuchungen vor Ort in den Betrieben scheinen sinnvoll, da die durchgeführten Versuche nicht ohne Einschränkung auf die Praxis übertragbar sind. Die Versuchsbedingungen in den eingesetzten Trockenschränken entsprechen nicht der hohen Luftfeuchtigkeit bei der Dämpfung in der Praxis. Verschiedene Untersuchungen zur Lebensfähigkeit der *C. coccodes*-Sklerotien in Erde zeigen, dass in trockener Erde deutlich mehr Sklerotien abgestorben sind als in feuchter Erde [Blakeman und Hornby 1966, Farley 1976]. Die höhere Lebensfähigkeit der *C. coccodes*-Sklerotien unter feuchten Bedingungen bestätigte sich in Gartenerde, Sand und steriler Gartenerde, kann aber nicht für andere Sklerotien verallgemeinert werden. Sklerotien von *Mycosphaerella ligulicola* zeigen in vitro

eine wesentlich kürzere Lebensdauer als *C. coccodes*-Sklerotien. *M. ligulicola*-Sklerotien überleben ebenfalls besser in feuchtem Sand oder feuchter steriler Gartenerde, jedoch besser in trockener Gartenerde [Blakeman und Hornby 1966].

Trockene Bedingungen reduzieren die Überlebensfähigkeit der *C. coccodes*-Sklerotien in Erde stärker als feuchte Bedingungen. Wenn diese Erkenntnis auch auf hohe Temperaturen übertragen werden kann, wird beim praxisnahen Dämpfen bei hoher Luftfeuchtigkeit und 100°C ein noch stärkeres Wachstum als im dargestellten Versuch zu erwarten sein.

Es ist daher in der Praxis darauf zu achten, dass eine Temperatur von 100°C und eine Dämpfungszeit von drei Stunden auf keinen Fall unterschritten wird.

Praxiserfahrungen zeigten, dass die Frostwirkung auf die im Freien lagernden Matten zu hoch eingeschätzt wird. Die Matten liegen im Winter im Freien und werden erst im Frühjahr vor einem neuen Einsatz gedämpft. Es ist in der Praxis vermehrt darauf hinzuweisen, dass selbst Temperaturen von -20°C das Überdauern des Pilzes nicht beeinträchtigen.

Eine mögliche Alternative zum zeitaufwendigen und letztendlich unsicheren Dämpfen der Matten stellen Fichtenholz- oder Kokosfasermatten dar, die nur einmal verwendbar sind. Versuche der Wiener Landwirtschaftskammer zeigten, dass der Ertrag auf beiden Mattenarten gleich hoch und im Vergleich zu den Schaumstoffmatten sogar um 1,5-2 kg/m² höher ist [Anonym 2001]. Es wäre möglich, dass der Mehrertrag die relativ hohen Kosten der Fichtenholzfaserplatten (1,09 €/Matte) oder Kokosfasermatten (1,82 €/Matte) im Vergleich zu den Schaumstoffmatten (2,03 €/Matte), die 8-10 Jahre zu verwenden sind, ausgleicht. Zumal wenn es, wie bei diesem Versuch, bei einem Einsatz von Nützlingen zu Beginn der Kultur, keinerlei Pflanzenschutzprobleme gibt.

Kontrolle durch alternative Ansätze

Durch den Zusatz von Nematoden (*Aphelenchus avenae*) zur Erde konnte die Inokulumsmenge von *C. coccodes* in einem Versuch *in vitro* deutlich reduziert werden [Roy 1973]. *Trichoderma viride* zeigt Potenzial zur Bekämpfung von *C. coccodes* an Kartoffel [Okhovat et al. 1994]. β -Ketoamide von *Penicillium brevicompactum* wurden von Moya et al. [1999] isoliert und auf ihre Wirksamkeit gegen verschiedene Pilze untersucht. N-[2-(3-Phenoxyphenyl)propionyl]-2-pyrroline zeigte sich hochwirksam gegen *C. coccodes* und *C. gloesporoides* mit ED₅₀-Werten von jeweils 11,7 bzw. 2,04 $\mu\text{g/ml}$. Dies sind mögliche Ansätze zur biologischen Bekämpfung von *C. coccodes*.

Es konnten vier Erreger isoliert werden, die auf *C. coccodes* eine Hemmwirkung *in vitro* haben (Abb. 7). Es handelt sich bei allen Erregern um Streptomyceten oder Actinomyceten. Eine genaue Bestimmung war weder durch das Centraalbureau voor Schimmelcultures, AG Utrecht, Niederlande noch durch CABI Bioscience, Egham, UK möglich. Ein gezielter Einsatz dieser Isolate zur Bekämpfung von *C. coccodes* wurde nicht untersucht, ist jedoch auf begrenzten Flächen denkbar.

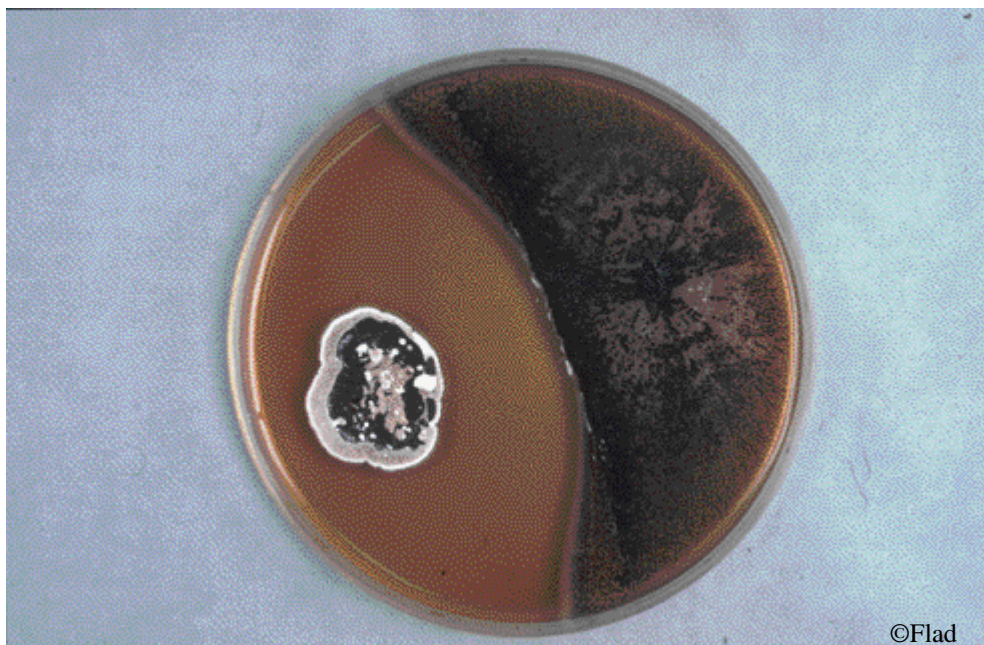


Abb. 7. Streptomycet oder Actinomycet mit Hemmwirkung auf *C. coccodes* *in vitro*.

Chemische Bekämpfung

Einleitung

Die Mehrzahl der im Feld durchgeführten Versuche beschäftigen sich ausschließlich mit der Bekämpfung der Fruchtfäule. In den USA ist es selbst beim Einsatz von resistenten Sorten nicht möglich, Tomaten wirtschaftlich anzubauen, ohne Chlorothalonil mithilfe des Frühwarnsystems Tom-Cast als Blattapplikation einzusetzen [Byrne et al. 1997 b]. Beim Einsatz von resistenten Sorten im Vergleich zu anfälligen Sorten werden drei bis vier Mal weniger Fungizidanwendungen benötigt, um den gleichen Erfolg zu erzielen [Fulling et al. 1995].

Fungizidbehandlungen führen zu einer reduzierten Befallsstärke, jedoch ist der Anteil der befallenen Pflanzen gleich hoch [Dillard und Cobb 1997], der Ertrag konnte erhöht werden und ergibt sich aus einer Reduzierung der Fruchtfäule; die Reduktion des Blattbefalls ist von keiner großen Bedeutung [Dillard et al. 1997]. Zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen Poysa et al. [1993], die durch Fungizid-Anwendungen keinen Einfluss auf den Ertrag, wohl aber 50% weniger befallene Früchte feststellen. Obwohl es für den Ertrag keinen nachgewiesenen Einfluss gibt, kann die Blattinfektion von 60 auf 10% reduziert werden [Poysa et al. 1993]. Ältere Untersuchungen geben sogar eine Verdreifachung des Ertrages durch einen Fungizideinsatz an [Cuany et al. 1974].

Uribe et al. [1994] untersuchten *in vitro* den Einfluss von herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln auf die folgenden Parameter: radiales Wachstum, Sklerotien- und Sporenkeimung. Es bestanden Unterschiede in der Empfindlichkeit je nach Isolat. Ein Isolat war gegen alle getesteten Wirkstoffe resistent. Die Wirksamkeit der in den USA zugelassenen und eingesetzten Präparate wird sehr unterschiedlich bewertet. Die Einschätzung der Mittel geht von „keinem Einfluss auf den Ertrag“ bis hin zu einer Verdreifachung des Ertrages.

Da sich die chemische Bekämpfung bislang, bedingt durch ihre Bedeutung in den USA, auf die Fruchtfäule konzentrierte, wurden nun Versuche zur chemischen Bekämpfung der Wurzelfäule durchgeführt, die für Österreich relevant ist.

Material und Methoden

Test auf Agar:

In vitro wurden formulierte Fungizide mit den Wirkstoffen Azoxystrobin und Iprodion getestet. Azoxystrobin ist mit einer Konzentration je nach Wasseraufwandmenge und Höhe der Kultur von 0,12-0,48% und mit einer Wartefrist von 3 Tagen an Tomaten zugelassen. Iprodion ist für Tomate nicht zugelassen, jedoch z.B. für Erdbeere mit 0,2% mit einer Wartefrist von 10 Tagen oder im Weinbau mit 0,1% mit 28 Tagen Wartefrist. Die Formulierungen von Azoxystrobin und Iprodion wurden 0,1%ig getestet. Die Pflanzenschutzmittel wurden dem Agar nach dem Autoklavieren zugesetzt und dieser am nächsten Tag mit einem Agarstück mit Sklerotien (\varnothing 4 mm) von *C. coccodes* (Isolat B3, Burgenland) beimpft. Der Versuch wurde auf PDA und auf SNA jeweils in zweifacher Wiederholung durchgeführt. Der Durchmesser des Myzelwachstums der Sklerotien wurde nach 7 Tagen gemessen.

Die Datenauswertung erfolgte mit SPSS 8,0. Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-HSD-Test durchgeführt ($\alpha=0,05$).

Test in Flüssigkultur:

Die Wirkstoffe wurden aus verschiedenen Wirkstoffgruppen ausgewählt. Die Wirkstoffe stehen in Klammern nach der Wirkstoffgruppe: Pyrimidinderivate (Cyprodinil), Phenylpyrrole (Fludioxonil), Strobilurine (Azoxystrobin), Imidazolderivate (Iprodion) und Anilide (Fenhexamid). Die Strukturformeln der gewählten Wirkstoffe sind in Abb. 8 dargestellt. Die formulierten Wirkstoffe und dest. Wasser als Kontrolle wurden 0,1%ig jeweils 250 ml einer Czapek-Dox-Flüssigkultur zugesetzt. Den Erlenmeyerkolben wurden je $0,5 \times 10^6$ Sporen des Isolats B3 zugesetzt. Die Kolben wurden mit steriler Watte und Aluminiumfolie verschlossen und bei 100 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Das gewachsene Myzel wurde nach 7, 14 und 21 Tagen mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Trockenmasse bestimmt. Der Versuch wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt.

Die Datenauswertung erfolgte mit SPSS 8,0. Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und eine Regression berechnet.

Test im Folientunnel:

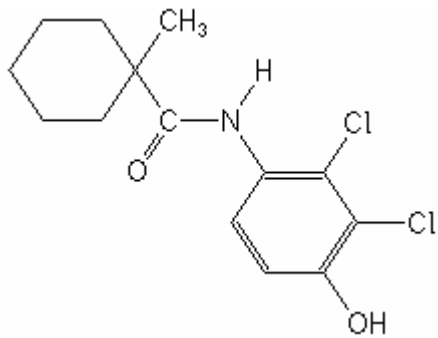
In einer bestehenden Tomatenkultur (Sorte Mercedes) in Erde (Folientunnel in Oberösterreich) wurde 2002 und 2003 zu Beginn der Saison (Mai) eine Sporensuspension von *C. coccodes* (Isolat S7, Steiermark) mit $2,6 \times 10^6$ Sporen/Pflanze im Gießverfahren appliziert. Es waren zusätzlich zahlreiche Sklerotien enthalten, die sich auf Grund ihrer Größe nicht mit der Thoma-Kammer zählen ließen. Die Sporen wiesen eine Keimfähigkeit von 96% auf PDA auf.

Die Pflanzen wurden im Abstand von vier Wochen drei Mal in der Saison (Juni bis August) mit 0,1%igen formulierten Präparaten der Wirkstoffe Azoxystrobin, Cyprodinil/Fludioxonil, Fenhexamid und Mancozeb gegossen (5l/10 Pflanzen), ferner Azoxystrobin 0,1%ig drei Mal als Blattapplikation eingesetzt. Jede Variante umfasste 10 Pflanzen und wurde drei Mal wiederholt. Am Ende der Kulturführung (Anfang Oktober) wurden die Wurzeln der Pflanzen untersucht.

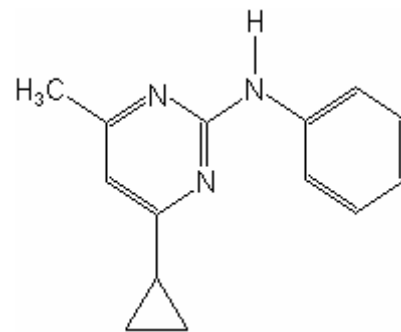
Konzentrationsreihen:

Die Wirkstoffe Fenhexamid, Azoxystrobin, Mancozeb, Cyprodinil, Fludioxonil und Chlorothalonil wurden als Formulierung dem Agar (PDA) zugesetzt und zwar in den drei Konzentrationsstufen 1, 10 und 100 ppm ($\mu\text{g a.i./ml}$). Auf jede Schale wurden einige Sklerotien (Isolat NÖ5, Niederösterreich, Isolat OÖ4, Oberösterreich, Isolat S7, Steiermark) gesetzt, mit Parafilm verschlossen und im Dunkeln bei Zimmertemperatur gelagert. Nach 14 Tagen wurde der Durchmesser des Sklerotienwachstums bestimmt. Pro Wirkstoffe wurden 10 Schalen beimpft, es wurde mit drei Wiederholungen gearbeitet.

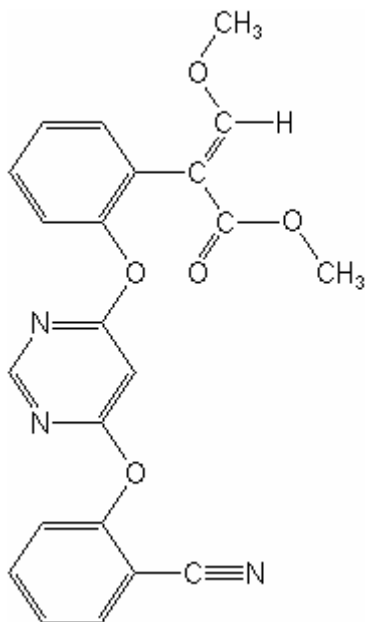
Fenhexamid



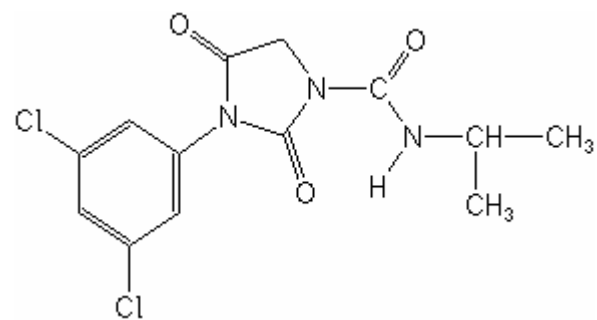
Cyprodinil



Azoxystrobin



Iprodion



Fludioxonil

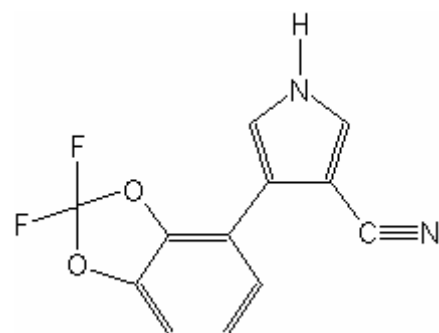


Abb. 8. Strukturformeln der in vitro getesteten Wirkstoffe

Ergebnisse

Test im Agar:

Beide Wiederholungen lieferten jeweils statistisch identische Ergebnisse, so werden im Folgenden die Mittelwerte der Wiederholungen für PDA und SNA dargestellt.

Das Myzelwachstum auf PDA wurde durch den Zusatz von Azoxystrobin signifikant um 86% gehemmt ($p=0,009$). Iprodion hemmt das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle auf PDA nicht signifikant ($p=0,620$).

Das Myzelwachstum auf WA wurde durch den Zusatz von Azoxystrobin komplett gehemmt, es kam zu keinem Myzelwachstum ($p=0,001$). Auch die Hemmung durch Iprodion ist signifikant ($p=0,023$) und beträgt 68%.

Das Wachstum auf SNA ist grundsätzlich geringer im Vergleich zu dem Wachstum auf PDA (Abb. 9, 10). Es zeigte sich auch, dass Iprodion nur auf WA das Wachstum von *C. coccodes* signifikant hemmt.

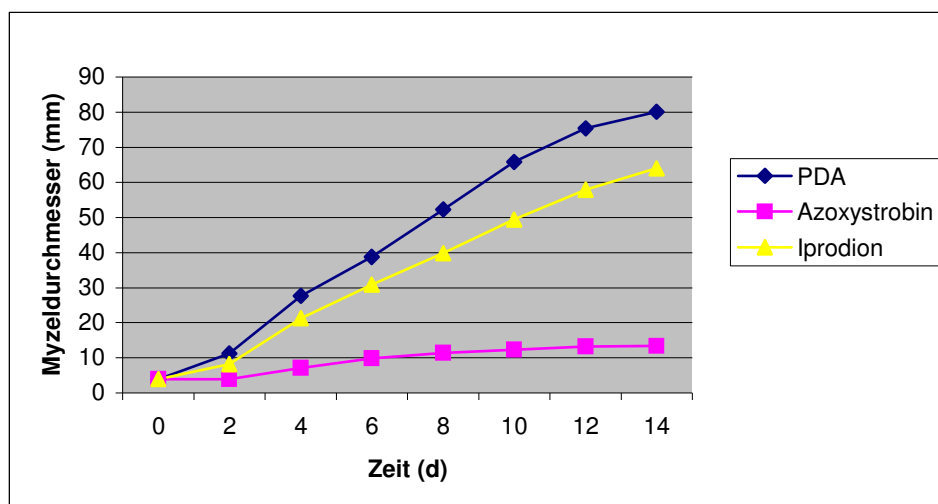


Abb. 9. Wirkung von Azoxystrobin und Iprodion auf das Wachstum von *C. coccodes* mit PDA als Kontrolle

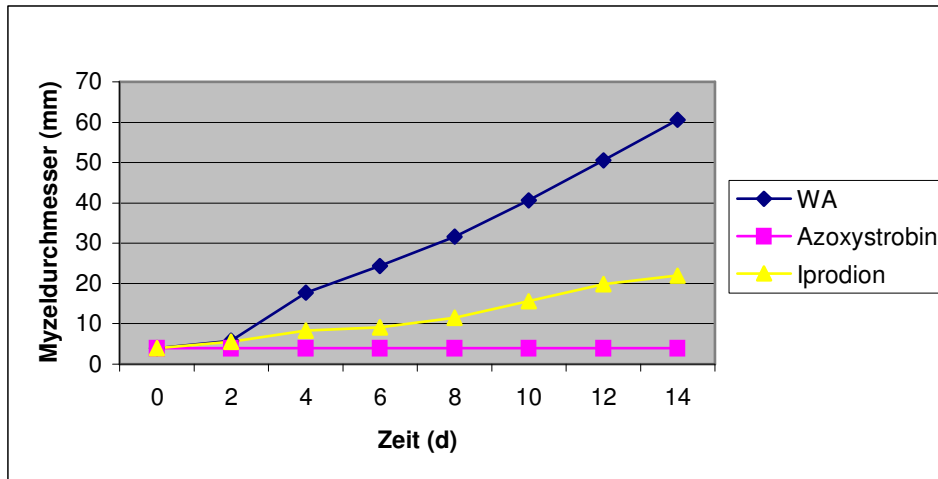


Abb. 10. Wirkung von Azoxystrobin und Iprodion auf das Wachstum von *C. coccodes* mit WA als Kontrolle

Test in Flüssigkultur:

Die absoluten Werte der beiden Wiederholungen variierten stark. Da der Versuchsaufbau durch zwei Schüttler begrenzt war, konnten nicht mehr Messwerte pro Wiederholung und Messtermin erhoben werden. Deshalb wurde für beide Wiederholungen eine gemeinsame Regressionsgerade berechnet. Der Einfluss aller Wirkstoffe auf das Myzelwachstum im Vergleich zur Kontrolle ist signifikant ($p=0,049$). Die vier getesteten Wirkstoffe unterschieden sich von einander nicht signifikant. Es ist jedoch zu erkennen, dass tendenziell Azoxystrobin und Cyprodinil mit Fludioxonil in beiden Wiederholungen das Wachstum stärker hemmen als Iprodion oder Fenhexamid.

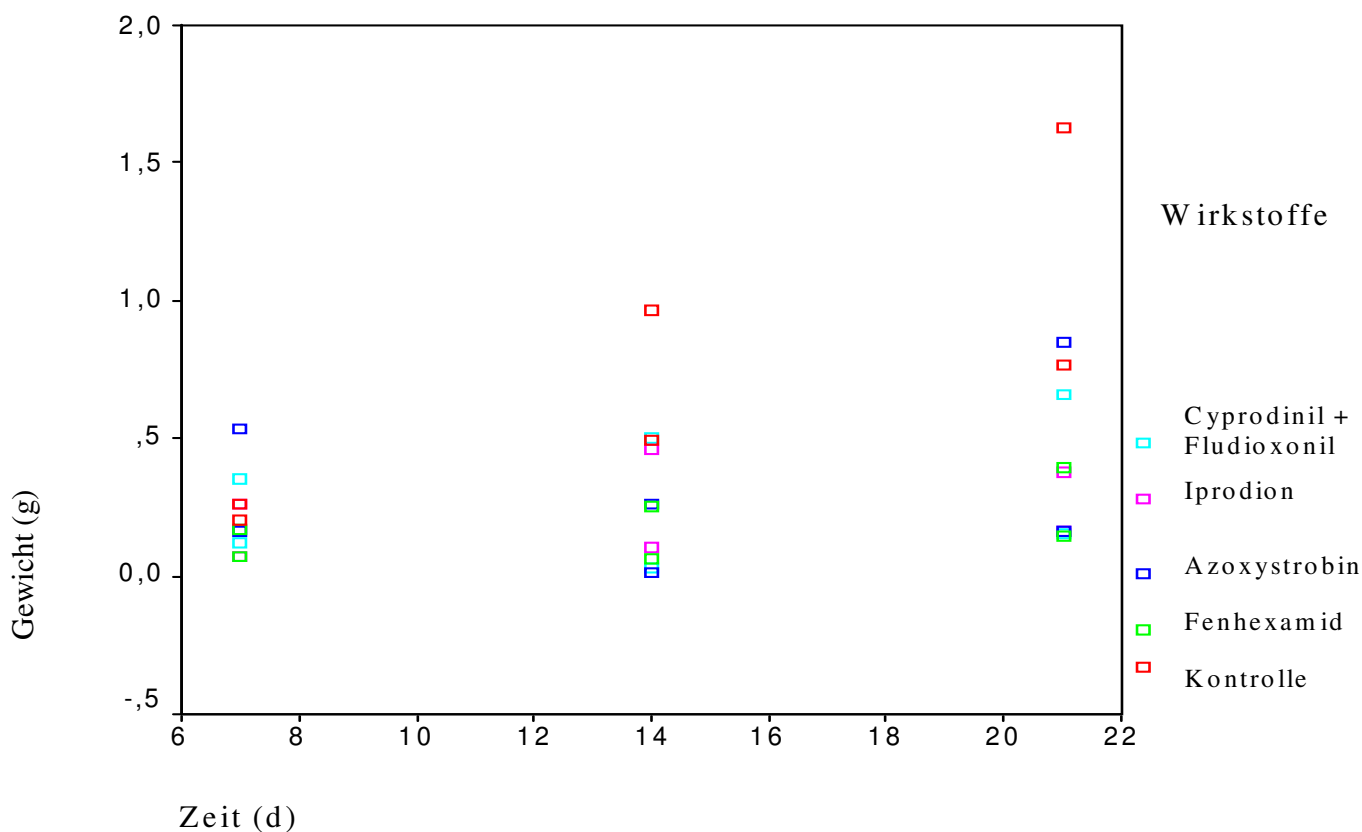


Abb. 11. Einfluss von Cyprodinil + Fludioxonil, Iprodion, Azoxystrobin und Fenhexamid auf die Trockenmasse des Myzelgewichts (g) nach 7, 14 und 21 Tagen. Es sind beide Wiederholungen dargestellt, für die eine Regressionsgerade berechnet wurde.

Test im Folientunnel:

Die erfolgreiche Infektion konnte in beiden Versuchsjahren bestätigt werden. Da in diesem Betrieb in Oberösterreich eine natürliche Infektion mit *C. coccodes* auftrat, wurde ein Befall auch an nicht infizierten Pflanzen festgestellt.

Bei der Azoxystrobin-Variante und auch der Cyprodinil/Fludioxonil-Variante waren die Wurzeln hellbraun und trotz künstlicher Infektion mit *C. coccodes* optisch durch keinen Pilzbefall verändert (Abb. 12). Es konnten mit bloßem Auge oder mithilfe des Stereomikroskopes keine Sklerotien, Verdickungen, Verbräunungen oder andere Strukturen gefunden werden. Nach längerer Inkubation in der Feuchten Kammer konnten jedoch Sporen von *C. coccodes* mikroskopiert werden.

Konzentrationsreihen:

Die eingesetzten formulierten Wirkstoffe führten allesamt nur zu einem reduzierten Wachstum des Myzels aus den eingesetzten Sklerotien (Abb. 12), wobei Azoxystrobin und Fludioxonil in allen Konzentrationsstufen das Wachstum am stärksten reduzierten. Kein Wirkstoff verhinderte das Wachstum und die Keimung der Sporen gänzlich. Es ist für die Praxis interessant, wie lange die Wirkstoffe eine Hemmwirkung ausüben, wann ein Wachstum erneut einsetzt und sich damit dann u.U. nach Saisonende erneut eine Population aufbauen kann. Fast alle Wirkstoffe greifen in den Metabolismus des Pilzes ein und verändern somit das Aussehen von Myzel und Sklerotien (Abb. 13).

Die drei eingesetzten Isolate reagierten verschieden, dies war jedoch nicht statistisch signifikant.

Den Einfluss von Fungiziden auf das Wachstum von Sklerotien unterstreichen zahlreiche Messergebnisse aus der Literatur, die sich mit den oben genannten Beobachtungen decken [Dillard 1988; Uribe und Loria, 1994]. Der ersten Arbeit ist Tabelle 13 entnommen:

Tab. 13: Durchmesser des Sklerotienwachstums auf V8-Agar nach 12 Tagen:

| Wirkstoff (Präparatname) | 1 µg a.i. / ml | 10 µg a.i. / ml | 100 µg a.i. / ml |
|----------------------------|----------------|-----------------|------------------|
| Anilazine (Dyrene 4F) | 95 | 64 | 0 |
| Anilazine (Dyrene 50 WP) | 93 | 69 | 0 |
| Mancozeb (Dithane M 45) | 93 | 90 | 45 |
| Chlorothalonil (Bravo 500) | 75 | 51 | 29 |
| Chlorothalonil (Bravo 720) | 82 | 46 | 39 |

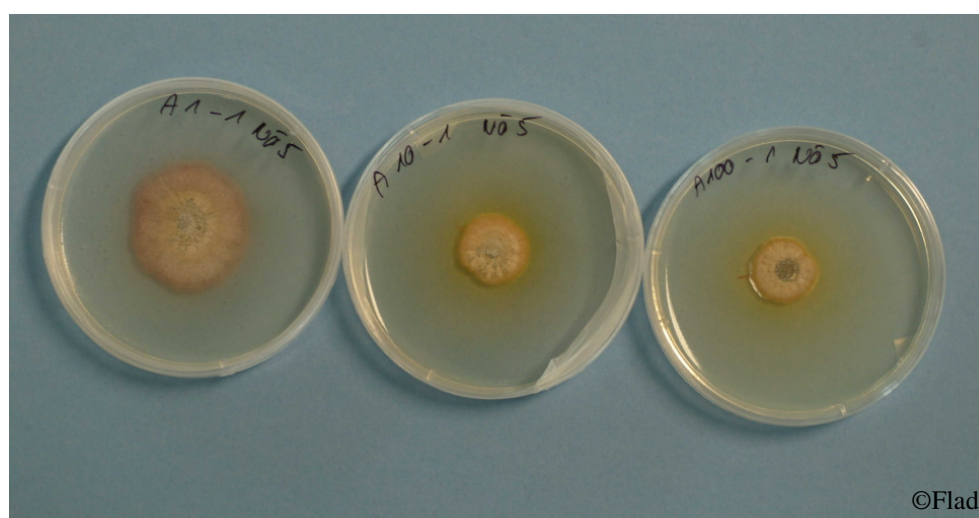
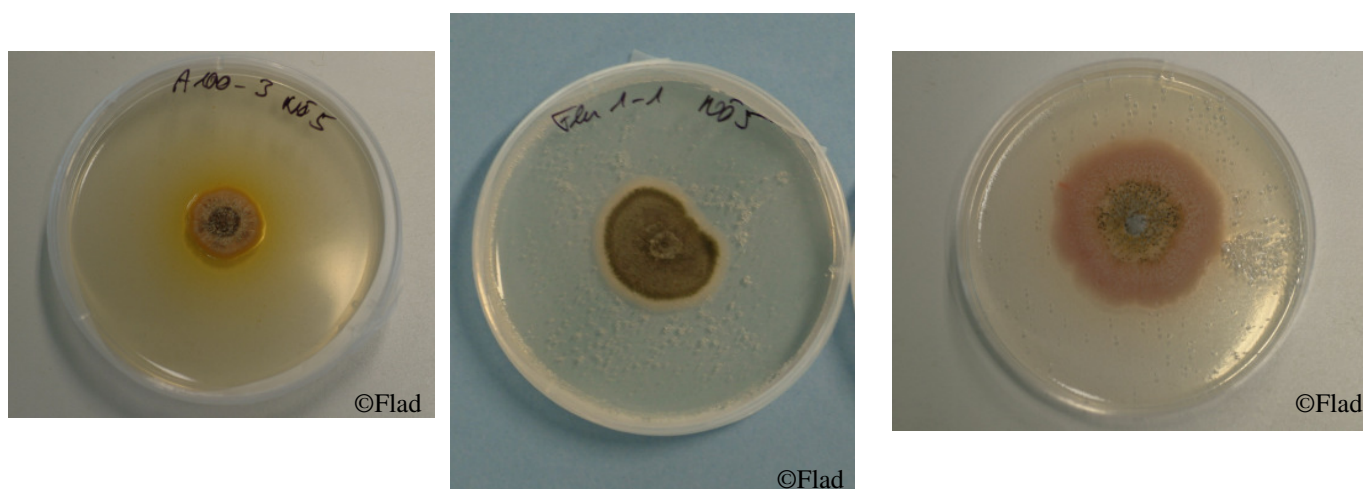
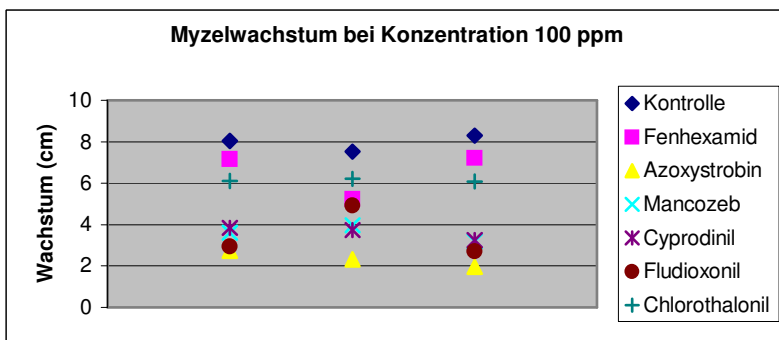
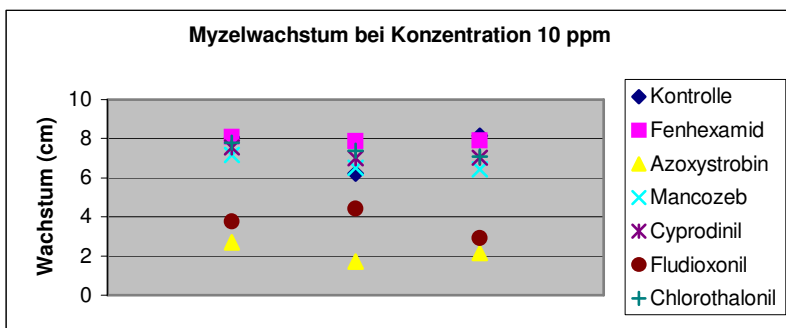
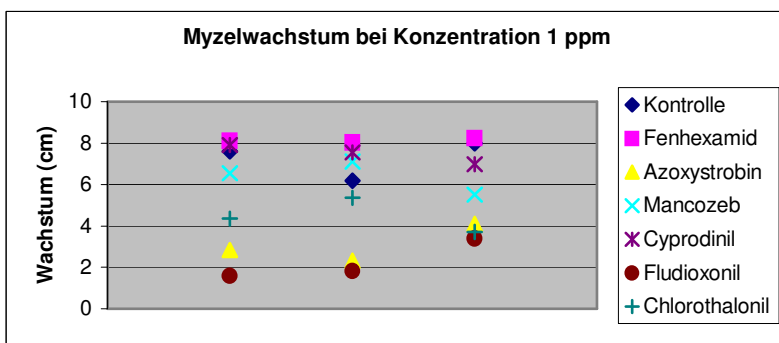


Abb. 12: Isolat NÖ 5 mit v.l.n.r. 1, 10, 100 µg a.i./ml Agar (PDA)

Abb. 13: Veränderte morphologische Eigenschaften von *Colletotrichum coccodes* durch den Zusatz von Wirkstoffen im Agar



Myzelwachstum von *C. coccodes* auf Agar mit verschiedenen Wirkstoffzusätzen in den Konzentrationen 1, 10, 100 ppm. In jeder Grafik von links nach rechts die Isolate OÖ4, S7 und NÖ5.

Diskussion

Alle in vitro getesteten Wirkstoffe zeigten eine Wirkung auf das Wachstum von *C. coccodes*. Mit Ausnahme von Azoxystrobin in Wasseragar kam es aber immer nur zu einer Hemmung und nicht zum vollständigen Verhindern des Wachstums. Es ist daher schwer zu beurteilen, ob die Präparate, die in vivo eingesetzt wurden, auch zu einer Reduktion führten. Es konnte nur bei Azoxystrobin und Cyprodinil mit Fludioxonil eine Reduktion der Infektion optisch festgestellt werden, die anderen Varianten unterschieden sich in der Befallsstärke nicht von der infizierten Kontrolle.

Wenn es durch Einsatz der Präparate jedoch nur zu einer verlangsamten Entwicklung oder Wachstumsunterbrechung der Sklerotien kommt, kann sich nach Ende der Saison, wenn die Wirkung der Fungizide nachlässt, erneut ein Befallspotenzial durch Sklerotien an Ernterückständen oder im Boden aufbauen. Wird zu Beginn der folgenden Saison wieder mit einem Fungizid behandelt und dadurch erneut eine Ausbreitung der Krankheit auf den Wurzeln verhindert, ist ein Anstieg des Befallsdrucks nicht relevant. Eine chemische Kontrolle wird damit in der Folge unverzichtbar.

Es ist bekannt, dass Wirkstoffe in vitro deutlich besser wirksam sind als in vivo [Küng Färber et al. 2002]. Dies bestätigte sich bei Iprodion und Fenhexamid, die in der Flüssigkultur das Myzelwachstum signifikant verringerten, jedoch in vivo bei der Bonitur keine sichtbare Wirkung hatten.

Es kann beim Einsatz von Azoxystrobin auf Grund der guten Hemmwirkung in allen Versuchen davon ausgegangen werden, dass es auch bei geringerer Konzentration sowohl in vitro als auch in der Praxis in vivo wirksam ist.

Durch die bekannte Gefahr der Resistenzbildung bei dem ständigen Einsatz des gleichen Fungizids bzw. aus der gleichen Wirkstoffgruppe [Gullino und Garibaldi 1997], wurden Wirkstoffe aus ganz unterschiedlichen Wirkstoffgruppen ausgewählt und untersucht. Azoxystrobin ist zur Bekämpfung von *C. coccodes* grundsätzlich geeignet und reduziert das Myzelwachstum bei beiden Versuchen in vitro stark. Auch die Wirkstoffe Cyprodinil und Fludioxonil zeigen eine signifikante Reduktion des Myzelgewichts. Es ist ein Wechsel dieser beiden Präparate aus den Wirkstoffgruppen der Strobilurine bzw. Pyrimidinderivate und Phenylpyrrole zu empfehlen, um dem Resistenzrisiko zu begegnen.

Üblicherweise wird mit den Formulierungen der Wirkstoffe gearbeitet [Dillard 1988, Uribe und Loria 1994], da die Reinwirkstoffe nur in organischen Lösungsmitteln und da auch nur

schwer löslich sind. Die Formulierungen enthalten zum Teil jedoch auch Farbstoffe und trüben den Agar so, dass ein genaues Messen des Myzels auf dem milchigen Agar nicht exakt möglich war. Aus diesem Grund wurden im Agar weniger Wirkstoffe getestet und alle Substanzen in Flüssigkultur untersucht, wo das Myzel gewogen wurde und keine optische Messung nötig war.

In vivo kommt es trotz einer Gießanwendung der getesteten Fungizide bei künstlicher Infektion der Tomatenpflanzen zu einem leichten Befall durch *C. coccodes*, dieser führt aber nicht zu sichtbaren Symptomen oder Schäden und hat wahrscheinlich auch keine Auswirkungen auf die Wasser- und Nährstoffversorgung durch die Wurzeln oder den Ertrag. Eine Blattapplikation mit Azoxystrobin führte zu keiner sichtbaren Reduktion der Symptome an den Wurzeln. Der Wirkstoff wird zwar als systemisch beschrieben, jedoch bezieht sich dies auf die Mobilität im behandelten Blatt und nicht innerhalb der Pflanze. Azoxystrobin ist nur im Xylem und nicht im Phloem mobil, sodass möglicherweise eine Gießanwendung die Blätter schützt, jedoch nicht eine Blattapplikation einen Wurzelbefall verhindert. Grundsätzlich ist der Einsatz von Azoxystrobin präventiv oder zu einem frühen Zeitpunkt kurativ am wirkungsvollsten.

Wichtig ist für die Bekämpfung der Fruchtfäule der Einsatz von resistenten oder weniger anfälligen Sorten. Resistente Sorten bieten einen äquivalenten Schutz wie drei bis sieben Anwendungen mit Chlorothalonil bei anfälligen Sorten [Barksdale und Stoner 1981]. Ob diese Ergebnisse auf die Bekämpfung der Schwarzen Wurzelfäule übertragbar sind, ist noch ungeklärt. Resistente Sorten für einen Wurzelbefall durch *C. coccodes* sind noch nicht bekannt.

Die Bekämpfung des Erregers in hydroponischen Systemen scheint einfach, da die Präparate der Bewässerung zugesetzt werden können, wie dies auch mit den Nährlösungen geschieht. Im Gegensatz zur Bekämpfung des bodenbürtigen Erregers in Erde ist das Bodenvolumen, d.h. das Substrat begrenzt und somit leichter zu behandeln. So kann in hydroponischen Tomatenkulturen bei Auftreten von *Didymella lycopersici* die Bekämpfung mit einer Kombination zweier Wirkstoffe über die Bewässerung erfolgen [Staunton und Cormican 1980]. Wie bereits erwähnt, konnte bei Untersuchungen zum Einsatz von Chlor zur Bekämpfung von Wurzelpathogenen in hydroponischen Systemen eine Reduktion des Wurzelbefalls mit *C. coccodes* erreicht werden; keine negative Auswirkung auf das

Wurzelwachstum oder den Ertrag wurden festgestellt [Cook und Devine 1979]. Die *in vitro* im dargestellten Versuch erfolgreich getesteten Präparate gegen *C. coccodes* sind momentan jedoch nicht als Gießbehandlung oder in der Hydroponik für Tomaten zugelassen (Pflanzenschutzmittel-Register).

Das bisherige Auftreten in Österreich in der Hydroponik rechtfertigt keine Bekämpfung, wohl aber manchmal das Auftreten und der verursachte Ertragsverlust in Erdkulturen. Es ist eine genaue Beobachtung des Ertragsausfalls notwendig und eine Evaluierung der Bekämpfungsmöglichkeiten. Die Bonitur von Symptomen an den Pflanzen im Folientunnel deckte sich mit den Ergebnissen *in vitro* und legt die Vermutung nahe, dass ein Einsatz von Azoxystrobin und Cyprodinil/Fludioxonil, evtl. mit dem Gießwasser, eine gute, wenngleich noch nicht zugelassene, Bekämpfungsmaßnahme wäre.



Abb. 14. Künstlich infizierte Wurzeln, die mit folgenden Wirkstoffen mit 0,1%igen Formulierungen behandelt wurden: obere Reihe v.l.n.r.: Azoxystrobin (Blattapplikation), Cyprodinil/Fludioxonil (Gießbehandlung), Kontrollpflanze mit natürlichem Befall von *C. coccodes*; untere Reihe v.l.n.r.: Kontrollpflanze mit künstlichem Befall von *C. coccodes*, Azoxystrobin und Mancozeb (beide Gießbehandlung).

Der Einfluss von Pflanzenschutzmitteln auf den Ertrag

Material und Methoden

In einem Betrieb in Eferding, Oberösterreich wurden 2001 und 2002 Tomatenpflanzen (Sorte Mercedes) künstlich mit *Colletotrichum coccodes* ($2,6 \times 10^6$ Sporen/Pflanze, Isolat S7, Steiermark, 96% Keimfähigkeit auf PDA) im Gießverfahren zu Beginn der Saison (Anfang Mai) infiziert. Jede Variante umfasste jeweils 10 Pflanzen, es wurden 3 Wiederholungen durchgeführt. Die Pflanzenschutzmittel wurden im Abstand von vier Wochen drei Mal in der Saison (Juni bis August) mit 0,1% Formulierungen gegossen (5l/10 Pflanze). Während der gesamten Saison wurden die Erträge pro Parzelle erfasst.

Es gab folgende Varianten:

- Kontrolle ohne *C. coccodes*
- Kontrolle mit *C. coccodes*
- Ortiva (Azoxystrobin) mit *C. coccodes*
- Contans (*Coniothyrium minitans*) mit *C. coccodes*
- Rovral (Iprodion) mit *C. coccodes*

Ergebnisse und Diskussion

Es konnte eine erfolgreiche Infektion mittels Untersuchung der Wurzeln festgestellt werden. Im Betrieb kommt es jedoch zu einem natürlichen Befall durch *Colletotrichum coccodes*, was dazu führte, dass beide Kontrollen mit dem Erreger befallen waren. Sie unterschieden sich optisch nicht in der Befallsintensität.

Tab. 14: Erträge pro Variante, 2001

| | Parzelle | | Ertrag (kg) | Ertrag (kg) /Pflanze |
|------------|----------|-------------------|-------------|----------------------|
| Variante 1 | 1 | Kontrolle | 24,7 | |
| Variante 1 | 9 | ohne | 30,85 | 2,63 |
| Variante 1 | 12 | <i>C.coccodes</i> | 23,2 | |
| Variante 2 | 2 | Kontrolle | 24,3 | |
| Variante 2 | 8 | mit | 30,8 | 2,9 |
| Variante 2 | 14 | <i>C.coccodes</i> | 31,85 | |
| Variante 3 | 3 | Contans | 22,95 | |
| Variante 3 | 10 | Contans | 24,05 | 2,29 |
| Variante 3 | 11 | Contans | 21,6 | |
| Variante 4 | 4 | Ortiva | 26,6 | |
| Variante 4 | 7 | Ortiva | 27,3 | 2,78 |
| Variante 4 | 15 | Ortiva | 29,5 | |
| Variante 5 | 5 | Rovral | 34,95 | |
| Variante 5 | 6 | Rovral | 27 | 3,13 |
| Variante 5 | 13 | Rovral | 32 | |

Es konnte kein Einfluss der Präparate auf den Ertrag der infizierten Tomatenpflanzen erkannt werden (Tab. 14). Der Versuch 2002 ergab die gleichen Tendenzen (Werte deshalb nicht dargestellt) und es konnte ebenfalls kein Einfluss der Präparate auf den Ertrag der infizierten Pflanzen festgestellt werden. Die Erträge im Jahr 2002 fielen auf Grund des Hochwassers im ausgewählten Betrieb allerdings grundsätzlich sehr gering aus.

Auch in der Literatur finden sich Versuchsergebnisse, wo es durch eine Fungizidanwendung bei einem Befall von *Colletotrichum coccodes* zu keiner Ertragssteigerung kommt [Louws et al. 1996]. Jedoch beziehen sich diese und ähnliche Versuche aus den USA jeweils auf Untersuchungen zum Auftreten der Fruchtfäule an Tomaten und nicht auf die Schwarze Wurzelfäule.

Molekularer Nachweis von *Colletotrichum coccodes* an Tomatenwurzeln

Einleitung

Der klassische Nachweis erfolgt mittels Mikroskop und durch Erkennen der Seten auf den Sklerotien und der einzelligen Sporen mit Öltröpfchen. Es wird auch ein spezieller V8-Agar beschrieben, um Infektionskolonien, die aus infizierten Blattstücken wachsen, zählen zu können [Byrne et al. 1998] und ein selektives Medium, um *C. coccodes* direkt aus der Erde zu isolieren [Farley 1972].

Es sind eine Vielzahl an molekularbiologischen Arbeiten bekannt, die sich mit der Sequenzierung verschiedenster Genabschnitte von *Colletotrichum* sp. beschäftigen [Martinez-Culebras et al. 2003, Sherriff et al. 1994, Sreenivasaprasad et al. 1992]. Auch quantitative Nachweismethoden existieren, um die Menge des *C. coccodes* Inokulums mittels real-time PCR im Boden nachzuweisen [Cullen et al. 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Schwarze Wurzelfäule, verursacht durch den Erreger *C. coccodes* eine häufige Erkrankung bei Tomatenpflanzen in Österreich darstellt und zunehmende wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Der Nachweis erfolgte bisher über das komplexe Schadbild an Tomatenwurzeln, eine eindeutige Abgrenzung gegenüber dem Schadbild der Korkwurzelerkrankung, hervorgerufen durch einen Befall mit *Pyrenochaeta lycopersici* ist jedoch nur schwer möglich. Eine mikroskopische Bestimmung, wie sie auch in weiten Teilen dieser Arbeit Anwendung fand, ist zeitaufwendig und erfordert die eindeutige Ausprägung aller morphologischer Bestimmungsmerkmale. Dies macht den Nachweis und die Identifikation von *C. coccodes* sehr komplex und erfordert die Anwendung verbesserter Methoden.

Bei einem ELISA-Nachweis (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) bindet ein enzymatisch markierter Antikörper an ein zu bestimmendes Antigen. Nach Zugabe des Enzymsubstrates erfolgt eine sichtbare Farbreaktion. Obwohl bereits eine Vielzahl entsprechender Analyse-Kits auf dem Markt sind, z.B. IDENTIKIT™ der Firma ADGEN für die Gattung *Colletotrichum*, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass neben *C. coccodes* auch noch andere *Colletotrichum*-Arten als Wurzelpathogene bei Tomaten vorkommen. Bisher sind als Anthraknoseverursacher bei Tomatenpflanzen und -früchten *C. capsici* [Sreenivasaprasad et al. 1996], *C. dematium* (Pers.) Grove [DalBello 2000], *C.*

gloeosporioides Penz. und *C. acutatum* J.H. Simmonds beschrieben [Barksdale und Koch 1969, Batson und Roy 1982, Pantidou und Schroeder 1955, Sreenivasaprasad et al. 1992]. Der ELISA-Nachweis ist daher nicht sensitiv genug, um *C. coccodes* von anderen *Colletotrichum*-Arten zu differenzieren.

Der oben genannte Kit eignete sich auch nur für einen Nachweis von *Colletotrichum* aus Reinkulturen und nicht von Wurzeln, da er nicht ausreichend sensitiv für einen Wurzelbefall ist.

Die Polymerase-Kettenreaktions-Methode (PCR) hingegen ist äußerst empfindlich und spezifisch. Sie basiert auf der Vermehrung der isolierten pathogenen DNA und der Identifikation mittels Elektrophorese. Obwohl bereits entsprechende Primer (künstlich synthetisierte spezifische Oligonukleotide) zur Amplifikation eines speziesspezifischen Fragments der nukleären ribosomalen DNA (nrDNA) von *C. coccodes* bei Kartoffelpflanzen und -knollen entwickelt wurden [Cullen et al. 2002], sind Standardisierung und Validation der Routineanalysen zur Identifikation von *C. coccodes* an Tomatenwurzeln im Labor notwendig.

Material und Methoden

Probengewinnung und -aufarbeitung

C. coccodes wurde von Tomatenwurzeln isoliert und als Reinkultur auf PDA kultiviert und gelagert. Zahlreiche *C. coccodes* Isolate wurden zufällig aus der in Kapitel 3 beschriebenen Isolatesammlung ausgewählt. Im Folgenden werden exemplarisch die Isolate W1 (Wien), S2 (Steiermark) und K4 (Kärnten) dargestellt.

Vom Rand wachsender Kulturen wurden Sklerotien auf V8-Agar abgeimpft und nach 4-6 Tagen Sporen gewonnen. 10^7 - 10^8 Sporen wurden in 100 ml Flüssigmedium Czapek-Dox mit Oxytetracyclin (0,05 g/l) 4 Tage bei Raumtemperatur in Erlenmeyerkolben geschüttelt (125 rpm). Anschließend wurde das Myzel mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und bis zur DNA-Isolierung bei -20°C gelagert.

DNA-Extraktion

Für die Isolierung genomischer Pilz-DNA wurde das durch die Probenaufarbeitung gewonnene Myzel verwendet. Vor der Zugabe des FG1-Extraktionspuffers wurde das Myzel in flüssigem Stickstoff zermahlen. Die gesamte Extraktion mit dem E.N.Z.A. Fungal DNA

Mini Kit (peqlab) erfolgte laut Angaben des Herstellerprotokolls. Die isolierte DNA wurde in 100µl eluiert und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Charakterisierung der ribosomalen DNA als molekularer Marker

Die rDNA codiert die Gene der 28S-, 18S- und 5,8S-Untereinheiten der Ribosomen. Dazwischen befinden sich die nichtkodierenden internen transkribierten Spacer (ITS) 1 und 2 (Abb. 15). Diese Einheit liegt im nukleären Genom in hoher Kopienzahl (bis zu 200 im haploiden Genom) tandemartig hintereinander vor. Voneinander getrennt durch nicht transkribierte Spacer (NTS), die zusammen mit dem kurzen extern transkribierten Spacer (ETS) die so genannte „intergenic spacer“ Region bilden.

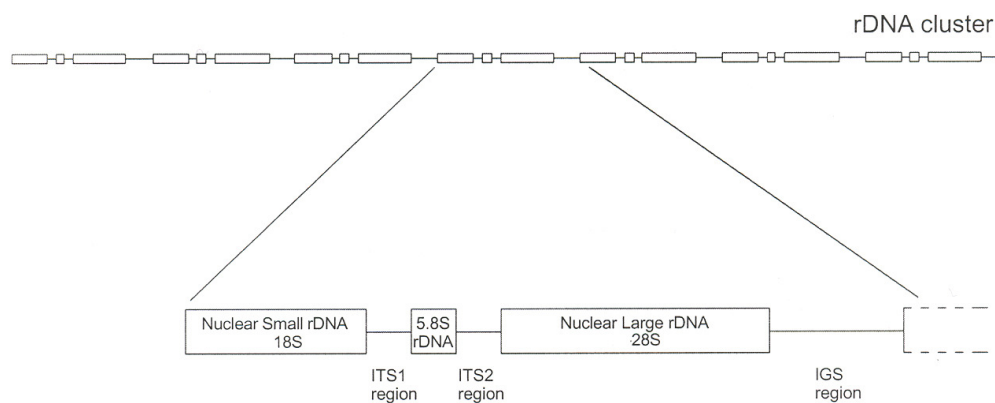


Abb. 15. Schema zum Aufbau der ribosomalen DNA

Für die Gattung *Colletotrichum* wird die größte genetische Variabilität innerhalb der ITS1-Region gefunden [Sreenivasaprasad et al. 1996]. Mitunter kann dieser Bereich sogar kurze taxonspezifische Nukleotidsequenzen für einzelne *Colletotrichum*-Taxa enthalten. Solche spezifischen Abschnitte können dann zur Etablierung eines PCR-basierten Nachweises verwendet werden, so z.B. für *C. coccodes* an Kartoffel [Cullen et al. 2002], *C. acutatum* an Erdbeere [Martinez-Culebras et al. 2003] und *C. gloeosporioides* an Yamswurzel [Sreenivasaprasad et al. 1996].

Zur besseren Evaluierung der Taxonspezifität der Primer von Cullen et al. [2002] auch für *C. coccodes*-Isolate von Tomatenwurzeln wurde ein Alignment (Programm BioEdit) der Nukleotidsequenzen der ITS1-Region von *Colletotrichum*-Arten, die neben *C. coccodes* an

Tomatenpflanzen vorkommen können, erstellt. Folgende *Colletotrichum* ITS1 Sequenzen aus der Datenbank der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden verwendet: *C. coccodes* (AB105970, AB105969, AY211498, AJ301953, Z32933, Z32931, Z32930); *C. acutatum* (AJ536212, AJ536202, AJ536209); *C. gloeosporioides* (Z32957, Z32947, AB105971, AY177326); *C. capsici* (Z32937, Z32936, Z32935); *C. dematium* (AJ301954, AB046607, Z32938). Das Isolat Z32930 von *C. coccodes* wurde von Tomate isoliert [Sreenivasaprasad et al. 1996]. Die Sequenz AJ536212 wurde ursprünglich als *Glomerella miyabeana* (von Tomate isoliert) beschrieben [Johnston und Jones 1997], später aber von Martinez-Culebras et al. [2003] in die *C. acutatum*-Gruppe eingeordnet. Alle anderen *Colletotrichum*-Isolate stammen von unterschiedlichen Wirtspflanzen aus verschiedenen Ländern. Es wurde darauf geachtet innerhalb genetisch variabler Artengruppen (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides*) möglichst die gesamte bisher bekannte Variation in das Alignment mit einzubeziehen.

| | | | | | | |
|----------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 5 | 15 | 25 | 35 | 45 | 55 |
| AB105970 | GGT GGCCGCT | GCGGACCC-C | CCTCCCGGCC | CTGCCCTC-- | --ACGGG--C | GGAGCG |
| AB105969 | GGT GGCCGCT | GCGGACCC-C | CCTCCCGGCC | CTGCCCTC-- | --ACGGG--C | GGAGCG |
| AY211498 | GGT GGCCGCT | GCGGACCC-C | CCTCCCGGCC | CTGCCCTC-- | --ACGGG--C | GGAGCG |
| AJ301953 | GGT GGCCGCT | GCGGACCC-C | CCTCCCGGCC | CTGCCCTC-- | --ACGGG--C | GGAGCG |
| Z32933 | GGT GGCCGCT | GCGGACCC-C | CCTCCCGGCC | CTGCCCTC-- | --ACGGG--C | GGAGCG |
| Z32931 | GGT GGCCGCT | GCGGACCC-C | CCTCCCGGCC | CTGCCCTC-- | --ACGGG--C | GGAGCG |
| Z32930 | GGT GGCCGCT | GCGGACCC-C | CCTCCCGGCC | CTGCCCTC-- | --ACGGG--C | GGAGCG |
| AJ301954 | GGTCCCC--T | CGGGGACG-C | CCTCCCGGCC | ACGCCCTTC- | --ACGGGG-C | GAGGCG |
| AB046607 | GGTCCCC--T | CGGGGACG-C | CCTCCCGGCC | ACGCCCTTC- | --GCGGGG-C | GAGGCG |
| Z32938 | GGTCCCC--T | CGGGGACG-C | CCTCCCGGCC | ACGCCCTTC- | --GCGGGG-C | GAGGCG |
| AJ536212 | GAAGCCTCTC | GCGGGCGACC | CCTCCCGGCG | CCGGCCCC-A | TCACGGGGGC | GGAGCG |
| AJ536202 | GAAGCCTCTC | GCGGGCCTCC | CCTCCCGGCG | CCGGCCCCA | CCACGGGGAC | GGGGCG |
| AJ536209 | GAAGCCTCTC | GTGGGCGGAC | CCTCCCGGCG | CCGGCCCC-G | TCACGGGGGC | GGAGCG |
| Z32937 | G-TCCCCTAA | AAAGGACG-- | TCTCCCGGCC | CTCTCCCGTC | CGCGGG---T | GGGGCG |
| Z32936 | G-TCCCCTAA | AAAGGACG-- | TCTCCCGGCC | CTCTCCCGTC | CGCGGG---T | GGGGCG |
| Z32935 | G-TCCCCTGA | AAAGGACG-- | TCTCCCGGCC | CTCTCCCGTC | CGCGGG---T | GGGGCG |
| Z32957 | TCTCCGCGAC | ACTCCCGG-- | CCTCCCGGCC | CCGG----- | -GCGGG---T | CGG-CG |
| Z32947 | TCTCCGCGAC | CCTCCCGG-- | CCTCCCGCCT | CCGG----- | -GCGGG---T | CGG-CG |
| AB105971 | TCTCCGTGAC | CCTCCCGG-- | CCTCCCGGCC | CCGG----- | -GCGGG---T | CGG-CG |
| AY177326 | TCTCCGCGAC | CCTCCCGG-- | CCTCCCGCCT | CCGG----- | -GCGGG---T | CGG-CG |
| AJ311879 | TCTCCGCGAC | CCTCCCGG-- | CCTCCCGCCT | CCGG----- | -GCGGG---T | CGG-CG |

Abb. 16. Ausschnitt aus den Nukleotidsequenzen der ITS1-Region verschiedener *Colletotrichum*-Taxa, die an Tomate isoliert werden können. Der *C. coccodes*-spezifische Abschnitt ist gelb unterlegt.

Es zeigt sich, dass auch *C. coccodes* von Tomate isoliert, einen taxonspezifischen Abschnitt der ITS1-Region enthält. Damit sind die von Cullen et al. entwickelten Primer auch für unsere Untersuchung geeignet. Da bereits bei allen hier aufgezeigten relevanten *Colletotrichum*-Taxa der Einsatz dieser Primer negativ war, wurde darauf verzichtet und nur eine erfolgreiche Amplifikation von *C. coccodes* im Labor etabliert.

PCR Amplifikation

Es wurden die *C. coccodes*-spezifische Primer zur Amplifikation der ITS-Regionen nach Cullen et al. [2002] eingesetzt.

Cc1NF1 5'TGCCGCCTGCGGACCCCCCT 3' taxonspezifische Nukleotidsequenz (ITS1)

Cc2NR1 5'GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA 3' 5' Ende (ITS2)

Die PCR zur Amplifizierung der ITS-5.8S-Region wurde nach folgendem 25 µl-Ansatz durchgeführt: ungefähr 100 ng DNA-Extrakt, 0.2 mM Nukleotide, 1 µM Primer und 0.5 U DynazymeDNA Polymerase (Finnzymes).

Zur Denaturierung wurde der Ansatz für 3 Minuten auf 94°C erhitzt, ein Zyklus im Thermozykler (Mastercycler[®], Eppendorf) bestand aus folgenden Schritten:

- | | | |
|------------|--------------------|-----------------|
| 1. Schritt | (Denaturierung) | 20 sek bei 94°C |
| 2. Schritt | (Primer-Bindung) | 20 sek bei 68°C |
| 3. Schritt | (Primer-Extension) | 40 sek bei 72°C |

Der Zyklus wurde 30-mal wiederholt. An den letzten Zyklus schloss sich eine 7-minütige Extensionszeit bei 72°C und eine Kühlung bei 4°C an.

Die PCR-Produkte wurden in einem 1-prozentigen Agarosegel, gefärbt mit Ethidium-Bromid, aufgetrennt und unter UV-Licht die erfolgte Amplifikation kontrolliert (Abb. 17). Die Fragmentlänge wurde mit Hilfe einer 1000 bp-Leiter (GIBCO) bestimmt.

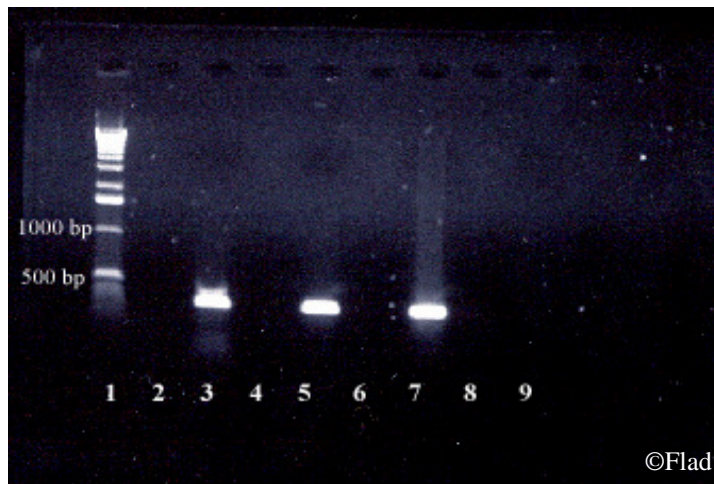


Abb. 17. Auftrennung der DNA-Fragmente (349 bp) mittels Agarosegel-Elektrophorese nach Amplifikation der ITS-5.8S-Region mit *C. coccodes*-spezifischem Primerpaar. Spur 1: 1000bp-DNA-Leiter; Spur 3: Isolat W1; Spur 5: Isolat K4; Spur 7: Isolat S2; Spur 9: Negativkontrolle; (Spur 2, 4, 6, 8: kein Produkt aufgetragen).

Ergebnisse und Diskussion

Es konnte der spezifische PCR-Nachweis von *C. coccodes* an Tomatenwurzeln erfolgreich etabliert werden.

Trotz intensiver Bemühungen gelang es jedoch nicht, die Pilz-DNA direkt aus infizierten Tomatenwurzeln zu isolieren, um den Nachweis noch schneller zu erbringen. Es wird ein, wenn auch zeitlich sehr kurzer, Zwischenschritt in vitro für den genetischen Nachweis notwendig bleiben.

Die Bestimmung von *Pyrenochaeta lycopersici* mittels spezifischer Primer wird die Diagnose und Unterscheidung der beiden angesprochenen Krankheiten stark vereinfachen und beschleunigen. Sequenzen der Arbeitsgruppe Pucci et al. haben sich als sehr geeignet für spezifische Primer erwiesen [2003] und sollen Mitte 2004 publiziert werden. Möglicherweise lassen sich die beiden PCR-Nachweisreaktionen sogar in einer Multiplex PCR

zusammenfassen, sodass in einem Arbeitsschritt eine eindeutige Aussage zum Auftreten beider Erreger getroffen werden kann.

Zur Aufgabenstellung der Pathotypendifferenzierung mittels PCR ist eine Definition eines Pathotyps notwendig, da dieser Begriff ebenso wie der Begriff der ‚Art‘ rege diskutiert wird. Ein Pathotyp ist eine physiologische Rasse, die nur noch ganz spezielle Sorten einer Art befallen kann [Börner 1997]. So bildet z.B. *Erysiphe graminis* Pathotypen aus; ein Übergang von einer Getreidesorte auf eine andere ist nicht möglich. Auch von *Pyrenochaeta lycopersici* ist eine Bildung von Pathotypen bekannt.

Bislang ist eine Pathotypenbildung bei *Colletotrichum coccodes* nur in einem einzigen Fall bekannt. Es handelt sich hierbei um einen bestimmten Stamm („strain“) von *Colletotrichum coccodes* (183088), der zur biologischen Unkrautbekämpfung gegen *Abutilon theophrasti* eingesetzt werden soll. Dieser Pathotyp befällt ausschließlich *Abutilon* (keine Rechtschreibvorschläge), bislang das einzige Isolat, das eine Spezies aus der Familie der *Malvaceae* befällt, andere Wirtspflanzen wurden erfolglos getestet [mündliche Mitteilung, Dauch 2004]. Dieser kann mithilfe eines spezifischen Primers nachgewiesen werden. Diese Methode kann zur Evaluierung des Inokulumpotenzials im Feld bei Einsatz als biologische Unkrautbekämpfung eingesetzt werden [Dauch et al. 2003]. Weitere Pathotypenbildungen sind bei *C. coccodes* unbekannt und sind ohnehin für die Praxis nicht relevant.,,

Literaturverzeichnis

- Abruzzetti, G. and Ruggini, L. 1993. Protection of tomato in the greenhouse. *Terra e Sole* 48:608, 211-214
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., and Freeman, S. 2003. Characterisation of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93 (5):579-587
- Andreas, Chr. 1990. Gurken auf Steinwolle. *Gemüse* 11:508-512
- Anonym 1985. *Tomato Diseases. A Practical Guide for Seedsmen, Growers & Agricultural Advisors*. Cal Graphics Calif. USA, Petoseed Co., INC. Breedings growers
- Anonym. 1997. *C. coccodes* found in seeds of *Capsicum annuum* and pathogenicity to Solanaceous plants. <http://www.um.dk/danida/evalueringsrapporter/1997-2/annex5>
- Anonym. 2001. Holzfasermatten als Substrat - Demonstrationsversuch der Wiener Landwirtschaftskammer, *Gemüsebaupraxis* 3:4-5
- Barksdale, T.H. 1967. Light-induced in vitro sporulation of *Colletotrichum coccodes* causing tomato anthracnose. *Phytopath* 57:1173-1175
- Barksdale, T.H. 1972. Resistance in tomato to six anthracnose fungi. *Phytopath* 62:6, 660-663
- Barksdale, T.H. 1975. Evidence for two mechanisms of resistance to tomato anthracnose. *Proceedings of the American Phytopathological Society* 2:121
- Barksdale, T.H. and Stoner, A.K. 1981. Levels of tomato anthracnose resistance measured by reduction of fungicide use. *Plant Dis* 65:71-72
- Barksdale, T.H. and Koch, E.J. 1969. Methods of testing tomatoes for anthracnose resistance. *Phytopath* 59:1373-1376
- Bar-Tal, A. and Rengel, Z. 1999. The significance of root size for plant nutrition in intensive horticulture. In: *Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications*. Food Products Press, Binghamton, USA 115-139
- Batson, W.E. and Roy, K.W. 1982. Species of *Colletotrichum* and *Glomerella* pathogenic to tomato fruit. *Plant Dis* 66, 1153-1155
- Bedlan, G. 1988. *Colletotrichum coccodes* - eine Tomatenkrankheit. *Gartenbauwirtschaft* 17:8
- Bedlan, G. 1999. *Gemüsekrankheiten*, Österreichischer Agrarverlag, 3. Auflage 205-206
- Blakeman, J.P. and Hornby, D. 1966. The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia and conidia. *Trans. Br.mycol.Soc.* 49(2):227-240
- Bliss, W.R.D. 1997. Control of water borne pathogens in hydroponics using Nylate. *Proceedings of the 9th International Congress on Soilless Culture*, St. Helier, Jersey, Channel Islands, April 1996, 61-73
- Börner, H. 1997. *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Eugen Ulmer Verlag, 7. Auflage 91, 288

-
- Brown, A.E. and Adikaram, N.K.B. 1983. A role for pectinase and protease inhibitors in fungal rot development in tomato fruits. *Phytopathologische Zeitschrift* 106:3, 239-251
 - Byrne, J.M., Hausbeck, M.K., and Hammerschmidt, R. 1997. Conidial germination and appressorium formation of *Colletotrichum coccodes* on tomato foliage. *Plant Dis* 81:715-718
 - Byrne, J.M., Hausbeck, M.K., and Latin, R.X. 1997. Efficacy and economics of management strategies to control anthracnose fruit rot in processing tomatoes in the midwest. *Plant Dis* 81:1167-1172
 - Byrne, J.M., Hausbeck, M.K., Meloche, C., and Jarosz, A.M. 1998. Influence of dew period and temperature on foliar infection of greenhouse-grown tomato by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis* 82:6, 639-641
 - Cannon, P., Bridge, P.D., and Monte, E. 2000. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M.B. APS Press Minnesota, USA
 - Chesters, C.G.C. and Hornby, D. 1965 a. Studies on *Colletotrichum coccodes* I. The taxonomic significance of variation in isolates from tomato roots II. Alternative host tests and Tomato fruit inoculations using a typical Tomato root isolate. *Trans. Br.mycol.Soc.* 48:573-581
 - Chesters, C.G.C. and Hornby, D. 1965 b. Studies on *Colletotrichum coccodes* II. Alternative host tests and tomato fruit inoculations using a typical tomato root isolate. *Trans. Br.mycol.Soc.* 48 (4): 583-594
 - Cisar, C.R., Thornton, A.B. and TeBeest, D.O. 1996. Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Teleomorph: *Glomerella cingulata*) with different host specificities mate on northern jointvetch. *Biological Control* 7:1,75-83
 - Colbach, N. and Saur, L. 1998. Influence of crop management on eyespot development and infection cycles of winter wheat. *European Journal of Plant Pathology* 104(1):37-48
 - Cook, R. and Devine, K. 1979. Chlorine clean-up for NFT still risky. *Grower* 31:08,4
 - Costache, M. and Poncu, J. 1998. Research on the behaviour of some processing tomato genotypes to infection by *Colletotrichum atramentarium* (Berk. & Br.) Taub. *Anale Institutul de Cercetari pentru Legumicultura si Floricultura* 15:185-190
 - Crüger, G. 1983. *Pflanzenschutz im Gemüsebau*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 2. Auflage, 255-284
 - Crüger, G. 1991. *Pflanzenschutz im Gemüsebau* Eugen Ulmer Verlag, 3. Auflage, 238
 - Cuany, A., Lavergne, J.C., Clerjeau, M., and Nourrisseau, J.G. 1974. The effect of methyl bromid and dazomet on a disease complex associated with tomato. *Pepinieristes horticulteurs maraichers* 47:37-39, 41-42
 - Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., and Duncan, J.M. 2002. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology* 51:281-292
-

-
- DalBello, G. M. 2000. First report of *Colletotrichum dematium* on tomato in Argentina. Plant Dis. 84:198
 - Dauch A.L., Watson, A.K., Jabaji-Hare, S.H. 2003. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. J Microbiol Methods 55:1, 51-64
 - Daughtrey, M.L. and Schippers, P.A. 1980. Root death and associated problems. Acta Horticulturae 98:283-291
 - Davet, P. 1972. Researches on *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes. IV. Development of the fungus on tomato in relation to the age of the plant and its roots. Phytopathologia Mediterranea 11:2, 103-108
 - Davet, P. 1976. Behaviour of fungi associated with tomato corky root in Lebanon on different substrates. Annales de Phytopathologie 8:2, 159-169
 - Davet, P. 1976. Production of pectin transeliminase by spores of *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes. Annales de Phytopathologie 8:1, 25-29
 - Davet, P. 1976. Study of some interactions between fungi associated with tomato corky root. I. Non-parasitic phase. Annales de Phytopathologie 8:2, 171-182
 - Davet, P. and Ravise, A. 1976. Inhibition of *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes, *Pyrenocheta lycopersici* Schneider et Gerlach and their pectinolytic enzymes by substances produced by various *Lycopersicon* Mill. in response to infection by the root parasite complex. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences 282:14, 1351-1354
 - Dehorter, G. 1998. Some observations on black-dot of potato: a disease on the vegetation often ignored *Phytoma* 502, 36-37
 - Delon, R. 1975. Ultrastructural and cytochemical studies of tomato roots parasitized by *Colletotrichum coccodes*. Phytopathologische Zeitschrift 84:4, 322-342
 - Diaz, S.J., Espinoza, N.N., and Marquez, B.M.G. 1994. Effect of rapeseed and tall oatgrass on yield of dry peas and estimation of economic thresholds of control. Agricultura Tecnica Santiago 54(1):15-21
 - Dillard, H.R. 1988. Influence of temperature, pH, osmotic potential, and fungicide sensitivity on germination of conidia and growth from sclerotia of *Colletotrichum coccodes* in vitro. Phytopath 78:10, 1357-1361
 - Dillard, H.R. 1989. Effect of temperature, wetness duration, and inoculum density on infection and lesion development of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. Phytopath 79:10, 1063-1066
 - Dillard, H.R. and Cobb, A.C. 1997. Disease progress of black dot on tomato roots and reduction in incidence with foliar applied fungicides. Plant Dis 81:1439-1442
 - Dillard, H.R. and Cobb, A.C. 1998. Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. Plant Dis 82:235-238

-
- Dillard, H.R., Johnston, S.A., Cobb, A.C., and Hamilton, G.H. 1997. An assessment of fungicide benefits for the control of fungal diseases of processing tomatoes in New York and New Jersey. *Plant Dis* 81:677-681
 - Doken, M.T. 1984. Infection studies on some tomato cultivars by *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes isolated from potatoes. *Journal of Turkish Phytopathology* 13:1,1-8
 - Dorenda, M. 1974. Investigations on the phytopathologic aspects of the mycoflora formed in cultivated soils under the influence of rotation. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych* 160:113-150
 - Ducomet, V. 1908. Recherches sur quelques maladies des plantes cultivées III. Une nouvelle maladie de la pomme de terre: 'la dartrose' *Annls. Ec.natn. Agric. Rennes* 2:24-47
 - Farley, J.D. 1972. A Selective Medium for Assay of *Colletotrichum coccodes* in Soil. *Phytopath* 62:1288-1293
 - Farley, J.D. 1976. Survival of *Colletotrichum coccodes* in soil. *Phytopath* 66:5, 640-641
 - Fulling, B.A., Tigchelaar, E.C., and Latin, R. 1995. Integration of host resistance and weather-based fungicide scheduling for control of anthracnose of tomato fruit. *Plant Dis* 79:228-233
 - Glaeser, G. 1971. Das Auftreten wichtiger Schadursachen an Kulturpflanzen in Österreich im Jahr 1970. *Pflanzenschutzberichte XLII*, 91-104
 - Gottwald, T.R., Trocine, T.M., and Timmer, L.W. 1997. A computer-controlled environmental chamber for the study of aerial fungal spore release. *Phytopathology* 87(10):1078-1084
 - Grove, G.G. and Campell, R.N. 1987. Host range and survival in soil of *Pyrenochaeta lycopersici*. *Plant Dis* 71:806-809
 - Gullino, M.L. and Garibaldi, A. 1997. Resistance to fungicides. *Informatore Agrario* 53(15):63-65
 - Gullino, M.L., Minuto, G., and Garibaldi, A. 1995. Fungal diseases of tomato grown in the greenhouse: development of the problems and possible solutions. *Informatore Fitopatologico* 45:9, 30-39
 - Hindorf, H. 2000. *Colletotrichum* spp. Causing anthracnose of tropical crops. *Proc. 2nd Conf. (Sub)trop. Fruits* 275-281
 - Hodosyne-Kiss, F. and Hodosy, F. 1984. Susceptibility of tomato varieties to fruit rot pathogens in the field in 1980-1982. *Zoldsegtermesztesi Kutato Intezet Bulletinje* 17:43-51
 - Hong, J.K. and Hwang, B.K. 1998. Influence of inoculum density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis* 82:1079-1083
 - Illman, W.I., Ludwig, R.A., and Farmer, J. 1959. Anthracnose of canning tomatoes in Ontario. *Can J Bot* 37:1237-1246

-
- Ismail, M.R., Ahmad, R., and Roeber, R.U. 1997. Differential growth and yield responses of tomato plants grown in different solution concentrations using nutrient film technique and sand culture. *Acta Horticulturae* 450:449-455
 - Jenkins, S.F. and Averre, C.W. 1983. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in north carolina greenhouses. *Plant Dis* 67:968-970
 - JianRong, S., YuZhong, W., HuaiGu, C., and SuWen, S. 1996. Screening and utilization of antagonistic bacteria for controlling sharp eyespot of wheat. *Chinese Journal of Biological Control* 12(4):161-164
 - Johnson, D.A. 1994. Effect of foliar infection caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. *Plant Dis* 78:1075-1078
 - Johnson, D.A., Douhan, L.I., and Geary, B. 2002. Report of *Colletotrichum coccodes* associated with Mentha. *Plant Dis* 86:695
 - Johnston, P.R. and Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89:420-430
 - Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*, APS Press, Minnesota, USA
 - Kendrick, J.B. and Walker, J.C. 1948. Anthracnose of tomato. *Phytopath* 38:247-260
 - Kim, W.G., Jee, H.J., and Cho, W.D. 1998. Black dot root rot of tomato caused by *Colletotrichum coccodes*. *Korean Journal of Plant Pathology* 14:3, 209-211
 - Koss, H. and Murach, D. 1996. Effect of high nitrogen inputs on root systems and mycorrhiza of pine. *AFZ Der Wald* 51(26):1466-1468
 - Krug, H. 1986. *Gemüseproduktion - ein Lehr- und Nachschlagewerk für Studium und Praxis*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 338-354
 - Küng Färber, R.B., Chin K.M., and Leadbitter, N. 2002. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Manag Sci* 58:261-267
 - Lalev, S. and Bakhariev, D. 1975. Effect of steaming greenhouse soil. *Rastitelna Zashchita* 23:8, 11-13
 - Lees, A. K. and Hilton, A. J. 2003. Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. *Plant Pathology* 52 (1):3-12
 - Louws, F.J., Hausbeck, M.K., Kelly, J.F., and Stephens, C.T. 1996. Impact of reduced fungicide and tillage on foliar blight, fruit rot, and yield of processing tomatoes. *Plant Dis* 80:1251-1256
 - MacNab, A.A., Pennypacker, S.P., and Barksdale, T.H. 1989. Tomato early blight and fruit rot levels influenced by variety and fungicide treatments, 1988. *Biol. Cult. Tests* 4:29
 - Malathrakis, N.E., Kapetanakis, G.E., and Linardakis, D.C. 1983. Brown root rot of tomato, and its control, in Crete. *Ann appl Biol* 102:2, 251-256
 - Manning, W.J. 1980. Relationship of *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum coccodes* to basal stem canker of tomato. *Plant Dis* 64:1, 76-78

-
- Martinez-Culebras, P.V., Querol, A., Suarez-Fernandez, M.B., Garcia-Lopez, M.D., and Barrio, E. 2003. Phylogenetic Relationship Among *Colletotrichum* Pathogens of Strawberry and Design of PCR Primers for their Identification. *J. Phytopath* 151:135-143
 - Mass, J.L. and Howard, C.M. 1985. Variation of several anthracnose fungi in virulence to strawberry and apple. *Plant Dis* 69:164-166
 - McLean, K.S. and Roy K.W. 1991. Weeds as a source of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose on tomato fruit and cotton seedlings. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13(2), 131-134
 - McPartland, J. and Hosoya, T. 1998. Species of *Colletotrichum* on ginseng (*Panax*). *Mycotaxon* 67:3-8
 - Miller, A.N., Ng, T.J., and Barksdale, T.H. 1984. Comparison of inheritance of resistance to tomato anthracnose caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Dis* 68:875-877
 - Mohan, S.K., Davis, J.R., and Sorensen, L.H. 1992. Infection of aerial parts of potato plants by *Colletotrichum coccodes* and its effects on premature vine death and yield. *Am. Potato J.* 69:547-559
 - Moore, W.C. 1959. *British parasitic fungi*. Cambridge University Press 430 pp
 - Moriwaki, J., Tsukiboshi, T., and Sato, T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequence. *Journal of General Plant Pathology* 68 (4): 307-320
 - Moya, P., Cantin, A., Miranda, M.A., Primo, J., and Primo-Yufera, E. 1999. Synthesis and biological evaluation of new analogues of the active fungal metabolites N-(2-Methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline and N-(2-Methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline. *J. Agric. Food Chem.* 47:3866-3871
 - O'Gara, P.J. 1917. The occurrence of *Colletotrichum solanicolum* O'Gara on eggplant. *Phytopath* 7:226-227
 - Okhovat, M., Zafari, D.M., Karimi-Roozbahani, A.R., and Rohani, H. 1994. Study on biological control of black dot disease of potato by *Trichoderma* Pers. *Ex Fr. Iranian Journal of Agricultural Sciences* 25(3):35-42
 - Pantidou, M.E. and Schroeder, W.T. 1955. Foliage as a source of secondary inoculum for tomato anthracnose. *Phytopath* 45:338-345
 - Park, S.H., Lee, J.T., Chung, S.O., and Kim, H.K. 1999. Forecasting the pepper grey mould rot to predict the initial infection by *Botrytis cinerea* in greenhouse conditions. *Plant Pathology Journal* 15(3):158-161
 - Porta-Puglia, A. and Montorsi, F. 1982. Osservazione sulla micoflora di semi di melanzana. *Informatore Fitopatologico* 32:37-41
 - Portela, S., Vilella, F., and Bartoloni, N. 1997. Greenhouse tomato cultivation: comparison of traditional and hydroponic methods. *Revista de la Facultad de Agronomia Universidad de Buenos Aires* 16(3):193-198
 - Poysa, V., Brammall, R.A., and Pitblado, R.E. 1993. Effects of foliar fungicide sprays on disease and yield of processing tomatoes in Ontario. *Can J Pl Sci* 73:4, 1209-1215

-
- Precheur, R.J., Bennett, M.A., Riedel, R.M., Wiese, K.L., and Dudek, J. 1992. Management of fungicide residues on processing tomatoes. *Plant Dis* 76:700-702
 - Pronczuk, M., Bojanowski, J., Warzecha, R., and Laudanski, Z. 1996. Is eyespot a danger for maize culture in Poland? *Plant Breeding and Seed Science* 40(3-4):83-92
 - Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M.B. 2000. *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. APS Press, Minnesota
 - Pucci, N., Di Stefano, G., and Infantino, A. 2003. Development of specific primers for identification and detection of *Pyrenochaeta lycopersici*. Abstracts of the 8th International Congress of Plant Pathology, February 2003, Christchurch, New Zealand
 - Raid, R.N. and Pennypacker, S.P. 1987. Weeds as hosts for *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis* 71:643-646
 - Riccioni, L and Conca, G. 1998. First Report of *Colletotrichum coccodes* on Soybean in the United States. *Plant Dis* 82:959
 - Robbins, M.L. and Angell, F.F. 1968. A technique for inoculating tomato fruits with the anthracnose pathogen, *Colletotrichum coccodes*. *Phytopath* 58:887
 - Robbins, M.L. and Angell, F.F. 1970. Tomato anthracnose: Inheritance of reaction to *Colletotrichum coccodes* in *Lycopersicon* spp. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 95:469-471
 - Roy, A.K. 1973. Effects of *Aphelenchus avenae* on tomato plants infected with *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum coccodes*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 80:1, 23-33
 - Rumpel, J., Felczynski, K., Kaniszewski, S., and Vogel, G. 1997. Results of experiments with soilless open field tomato culture in Germany and Poland. Proceedings of the 9th International Congress on Soilless Culture, St. Helier, Jersey, Channel Islands, April 1996, 373-380
 - Sanogo, S. 1995. Epidemiology of tomato anthracnose caused by *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes. Ph.D. thesis. The Pennsylvania State University, University Park
 - Sanogo, S., Pennypacker, S.P., Stevenson, R.E., and MacNab, A.A. 1997. Weather variables associated with infection of tomato fruit by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis* 81:753-756
 - Santa-Marta, J.M.C.P. 1986. A new disease of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes in Portugal *Publicacao Laboratorio de Patologia Vegetal, Verissimo de Almeida* 50:3pp.
 - Sapers, G.M., Phillips, J.G., Panasiuk, O., Carre, J., Stoner, A.K., and Barksdale, T. 1978. Factors affecting the acidity of tomatoes. *HortScience* 13:187-189
 - Schneider, R. und Gerlach, W. 1966. *Pyrenochaeta lycopersici* nov.spec., der Erreger der Korkwurzelkrankheit der Tomate. *Phytopath Zeitschrift* 56:117-122
 - Schneider, R.W., Grogan, R.G., and Kimble, K.A. 1978. *Colletotrichum* root rot of greenhouse tomatoes in California. *Pl Dis Rep* 11:969-971

-
- Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., Lafay, J.F., Brygoo, Y., and Bailey, A. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Exp. Mycol.* 18:121-138
 - Shishkoff, N. and Campbell, R.N. 1990. Survival of *Pyrenochaeta lycopersici* and factors affecting infection. *Plant Dis* 74:889-894
 - Simon, A.M. 1979. Immunity analysis of diverse genetic resources of tomatoes with a view to practical breeding under cover. *Trudy po Prikladnoi Botanike* 64:1, 55-57
 - Slusarski, C. 1989. Effect of soil fumigation on growth, health and yield of several tomato cultivars. *Biuletyn Warzywniczy* 1,149-153, Supplement
 - Smith, I.M., Dunez, J., Lelliott, R.A., Phillips, D.H., and Archer, S.A. 1988. *European Handbook of Plant Disease*. Blackwell Scientific Publications 330-331
 - Snowdon, A.L. 1991. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Wolfe Scientific 58-59, 304-305
 - Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E., and Mills, P.R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:265-281
 - Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., Meehan, B.M., and Brown, A.E., 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* 39, 499-512
 - Staunton, W.P. and Cormican, T.P. 1980. The effects of pathogens and fungicides on tomatoes in a hydroponic system. *Acta Horticulturae.* 98:293-297
 - Stensvand, A., Gadoury, D.M., Amundsen, T., Semb, L., and Seem, R.C. 1997. Ascospore release and infection of apple leaves by conidia and ascospores of *Venturia inaequalis* at low temperatures. *Phytopathology* 87(10):1046-1053
 - Stevenson, W.R., Evans, G.E., and Barksdale, T.H. 1978. Evaluation of tomato breeding lines for resistance to fruit anthracnose. *Pl Dis Rep* 62:11, 937-940
 - Sutton, B.C. 1992 The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.* Bailey, J.A. and Leger, M.J., ed. Wallingford, UK: CABI 1-26
 - Tao, M.J., Zhang, Z.M., Luo, Y.Y., and Chen, S.F. 1994. Relationship between the ratio of *Rhizoctonia solani* diseased lesion height: plant height and yield loss in first cropping rice. *Plant Protection* 20(3):11-12
 - Thomas, G.G., Pennypacker, S.P., and MacNab, A.A. 1981. Organisms associated with fruit rot in Pennsylvania canning tomatoes. *Phytopathology* 71:260
 - Tsrer L., Erlich, O., and Hazanovsky, M. 1994. *Colletotrichum* on potato in Israel, is it a new disease? *Phytoparasitica* 22:88
 - Tu, J.C. and Poysa, V. 1997. The diversity and overwintering of *Colletotrichum coccodes* in tomato fields in southwestern Ontario. *Microbios* 91: 153-163

-
- Uribe, E. and Loria, R. 1994. Response of *Colletotrichum coccodes* to fungicides in vitro. *American Potato Journal* 71:7, 455-465
 - Valid, A.L. 1974. On the life cycle of the pathogen of anthracnose of tomato, *Colletotrichum atramentarium* (Berk. & Br.) Taub. in the Krasnodar region. *Mikologiya i Fitopatologiya* 8:2, 130
 - White, J.G. and Scott, A.C. 1973. Formation and ultrastructure of microsclerotia of *Pyrenochaeta lycopersici* *Annals of Applied Biology* 73:163-166
 - Wilhelm, S. 1956. A sand-culture technique for the isolation of fungi associated with roots. *Phytopath* 46:293-295
 - Xiao, C.L. and Subbarao, K.V. 1998. Relationships between *Verticillium dahliae* inoculum density and wilt incidence, severity, and growth of cauliflower. *Phytopathology* 88(10):1108-1115
 - Yasuda, K. 1997. Control threshold on sweet potato, *Ipomoea batatas* L., damaged by the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) (Coleoptera: Curculionidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 41(4):201-207
 - Younkin, S.B. and Dimock, A.W. 1944. Foliage infections of *Lycopersicon esculentum* by *Colletotrichum phomoides*. *Phytopathology* 34:976-977
 - Zekki, H., Gauthier, L., and Gosselin, A. 1996. Growth, productivity, and mineral composition of hydroponically cultivated greenhouse tomatoes, with or without nutrient solution recycling. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121(6):1082-1088

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt in:

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
ehemals Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft
Institut für Pflanzengesundheit
Spargelfeldstr. 191
A-1226 Wien
<http://www.ages.at>

Bei den Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich für ihre Hilfe und angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt ferner dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft (BMLFUW) für die Finanzierung der Projektarbeit, sowie dem Projektleiter o.Univ. Prof. Dr. K. Pieber, Institut für Obst- und Gartenbau, Universität für Bodenkultur, Wien und Herrn HR Univ.-Doz. Dr. G. Bedlan, Institut für Pflanzengesundheit, AGES, Wien.

Autoren:

Dipl.-agr. Biol. FLAD Ulrike, Universität für Bodenkultur, Institut für Obst- und Gartenbau,
Peter-Jordan-Str. 82, 1190 Wien

Univ.-Doz. Dr. BEDLAN G., Österreichische Agentur für Gesundheit und
Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Pflanzengesundheit, Spargelfeldstr.191, 1226 Wien

Tagungsteilnahmen, Workshops, Veröffentlichungen, Vorträge bzw. Poster:

- Teilnahme an „Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau“, September 2001, Wien, Österreich
- Teilnahme am Laborpraktikum „DNA-Sequenzanalyse und molekulare Phylogenie“, Dezember 2001, Wien, Österreich
- Teilnahme an „39. DGG-Tagung“, Februar 2002, Braunschweig, Deutschland
- Vortrag bei „ALVA-Tagung“, Mai 2002, Klosterneuburg, Österreich
- Posterpräsentation bei der 53. Deutsche Pflanzenschutztagung, DPG, September 2002, Bonn, Deutschland
- Posterpräsentation bei „8th International Congress of Plant Pathology“, Februar 2003, Christchurch, Neuseeland
- Teilnahme an Workshop „*Colletotrichum*“, Februar 2003, Christchurch, Neuseeland
- Teilnahme an „40. Gartenbauwissenschaftliche Tagung“, Februar 2003, Weihenstephan, Deutschland
- Vortrag bei „Arbeitskreis Phytomedizin im Gartenbau“, April 2003, Wetzlar, Deutschland
- Teilnahme am AGES Forum „Pestizid-Rückstände“, März 2003, Wien, Österreich
- Veröffentlichung in „Pflanzenschutzberichte, Band 61, Heft 1, 41-44, 2003
- Posterpräsentation bei „Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau“, September 2003, Wien, Österreich
- Posterpräsentation bei „41. Gartenbauwissenschaftliche Tagung“, Februar 2004, Wien, Österreich