

- Durchführung der akuten Risikobewertung unter Verwendung der ARfD
- Verfeinerung der Expositionsabschätzung für die akute Risikobewertung
- Durchführung spezieller Experimente für die Ableitung der ARfD.

Im Rahmen der Entwicklung des GD wurde eine retrospektive Analyse über die Ableitung der ARfD im Rahmen der EU-Bewertung zur Aufnahme der Wirkstoffe in den Anhang I der RL 91/414/EWG in den Jahren 2000 bis 2008 durchgeführt. Bei 48 % der 198 betrachteten Wirkstoffe war die Ableitung einer ARfD nicht erforderlich. Bei weiteren 48 % der Wirkstoffe war die Ableitung einer ARfD und der Ausschluss unannehmbarer akuter Effekte für Verbraucher unter Verwendung der üblichen toxikologischen Studien gemäß den Vorgaben des Anhang II der RL 91/414/EWG möglich. Bei 4 % der Wirkstoffe konnten unannehmbare akute Risiken für Verbraucher bei Verwendung einer konventionell abgeleiteten ARfD nicht ausgeschlossen werden. Für 2 % konnte die Vertretbarkeit akuter Effekte durch eine weitergehende Expositionsabschätzung hinreichend belegt werden. Bei 2 % der Wirkstoffe war eine weiterführende tierexperimentelle Studie mit einmaliger Verabreichung des Wirkstoffs erforderlich, um die Unvertretbarkeit akuter Effekte für Verbraucher hinreichend ausschließen zu können.

Zum Stand der Entwicklung des GD: Im März 2007 hat das 19. OECD WNT-Meeting die Entwicklung des GD ins Programm aufgenommen. Im September 2007 wurde ein erster Entwurf des GD unter Federführung Deutschlands erstellt und nachfolgend über die OECD zur Kommentierung verteilt. Insgesamt gab es auf OECD-Ebene drei Kommentierungsrunden und zwei Expert-Meetings. Das 22. OECD WNT-Meeting im März 2010 hat den Entwurf des GD vom 29.01.2010 angenommen und dem Joint Meeting im November 2010 zur Verabschiedung empfohlen.

Sektion 35 – Diagnose und Nachweisverfahren

35-1 - Drechsler, N.¹⁾; Habekuß, A.²⁾; Thieme, T.¹⁾; Schubert, J.²⁾

¹⁾ BTL Bio-Test Labor GmbH Sagerheide; ²⁾ Julius Kühn-Institut

Nachweis von Getreide-Geminiviren

Detection of cereal geminiviruses

Die Geminiviren *Wheat dwarf virus* (WDV) und *Barley dwarf virus* (BDV) rufen bei befallenen Getreide u. a. Zwergwuchs und Vergilbung hervor und führen zu Ertragsminderungen bis hin zum Absterben der Pflanze. Beide Viren werden von der Zwergzikade *Psammotettix alienus* Dahlb. persistent aber nicht propagativ übertragen. WDV wurde in Deutschland erstmals Anfang der 90er Jahre nachgewiesen. Für die Zukunft wird eine Zunahme des Befalls prognostiziert, da die Klimaerwärmung zu einer längeren Aktivitätsphase des Vektors im Herbst führt und befallene Pflanzen mildere Winter überdauern und somit als Infektionsquelle im Frühjahr zur Verfügung stehen können. Erstmals wurden quantitative Realtime PCR-Verfahren entwickelt, mit denen es möglich ist, WDV und BDV nicht nur sensitiv nachzuweisen, sondern auch die Viruskopienzahl zu ermitteln. Mit Primern in konservierten Regionen des Virusgenoms werden beide Viren nachgewiesen. Es stehen aber auch TAQMAN-Sonden für einen differenzierten Nachweis von BDV und WDV zur Verfügung. Die absolute Quantifizierung des Virengehalts erfolgt durch eine Standardverdünnungsreihe aus kloniertem Virus. Die Nachweisgrenze wurde ermittelt und mit der des ELISA-Verfahrens verglichen. Der Presssaft von stark WDV-infizierten Pflanzen wurde dazu mit dem von nichtinfizierten Pflanzen verdünnt. Mit der Realtime-PCR gelang der Nachweis auch noch in Verdünnungen von 10^{-8} , während der DAS-ELISA die Nachweisgrenze bei 10^{-4} erreicht.

Geeignete DNA-Extraktionsverfahren für den Nachweis der Viren sowohl in der Pflanze als auch in der Zikade wurden entwickelt und für den Durchsatz von großen Probenanzahlen adaptiert. Mit den PCR-Verfahren ist das Virus bereits nach 24 Stunden in der Pflanze nachweisbar. Es zeigte sich, dass der Virusgehalt in den Zikaden nicht darauf schließen lässt, ob die Pflanze krank wird. Bei allen Untersuchungen wurden jeweils auch ELISA und eine Symptombonitur durchgeführt. Dabei fiel auf, dass nicht jede in der PCR positiv getestete Pflanze auch Symptome zeigte. Auch korrelierte die Kopienzahl bzw. der ELISA-Wert nicht mit der Stärke der Symptomausprägung. An der stark anfälligen Wintergerstensorte 'Rubina' wurde unter Gewächshausbedingungen die Verteilung des Virus in der Pflanze in den ersten vier Wochen nach Infektion untersucht. Das Virus trat ungleichmäßig verteilt auf. Des Weiteren wurden Feldproben im Frühjahr analysiert, um zu ermitteln, welche Viruskopienzahlen unter natürlichen Infektionsbedingungen vorkommen. Die Ergebnisse werden diskutiert.

35-2 - Zahn, V.

Landwirtschaftskammer Niedersachsen

Nachweismöglichkeiten von *Tobacco rattle virus* in der Routinetesting

Detection of *Tobacco rattle virus* in routine testing

Das *Tobacco rattle virus* (TRV) ruft in der Kartoffelproduktion in Deutschland starke Schäden hervor. Neben Nekrosen im Knollenfleisch von Kartoffeln, der sog. Eisenfleckigkeit oder Pfropfenkrankheit kommt es bei Pflanzkartoffeln auch zu einer verminderten Keimfähigkeit. Über den Einfluss auf die Entwicklung einer infizierten Staude liegen nur sehr wenige Ergebnisse vor. Die aus einer infizierten Mutterknolle gebildeten Tochterknollen sind nicht alle mit TRV infiziert. Erschwerend kommt hinzu, dass die Knollennekrosen vielfach erst während der Lagerung auftreten und dann beim Auslagern und der Sortierung entdeckt werden. Virussympptome an den Pflanzen im Feld sind sehr selten und auch nicht eindeutig anzusprechen, so dass eine Selektion infizierter Stauden ausgesprochen schwer ist. Hauptüberträger dieses Virus sind freilebende Nematoden der Gattungen *Trichodorus* und *Paratrichodorus*, die sich entweder an infizierten Knollen oder an den über 300 anderen Wirtspflanzen beladen und über Wochen infektiös bleiben. Eine Kontakt- oder Blattlausübertragung von kranken zu gesunden Pflanzen konnte in einem Versuch ausgeschlossen werden.

Das Virus selbst hat ein zweigeteiltes Genom und kann in zwei Typen auftreten. Der sog. M-Typ mit einer Proteinhülle und der sog. NM-Typ, der nicht in der Lage ist eine Proteinhülle auszubilden. Serologisch ist der NM-Typ aufgrund des Fehlens einer Proteinhülle nicht nachweisbar.

Für den Kartoffelanbauer stellen sich im Zusammenhang mit dem TRV nun zwei Fragen:

- Sind meine Kartoffeln, in denen ich Nekrosen gefunden habe, wirklich mit TRV infiziert oder handelt es sich um eine physiologische Störung?
- Ist mein Feld, auf dem ich Kartoffeln anbauen will, mit TRV infiziert?

Ein Nachweis aus Knollen und Blatt mit Hilfe des ELISA-Testes ist nicht erfolgreich, da der NM-Typ nicht erfasst wird und im Falle des Knollennachweises der hohe Stärkegehalt den ELISA-Test inhibiert. Versuche mit dem Tissue-Print-Verfahren an der Knolle waren nur zum Teil erfolgreich, da die Viren nur in sehr geringer Menge im Knollenfleisch vorhanden sind und der NM-Typ ebenfalls nicht nachgewiesen wird. Eine gesicherte Aussage über eine Infektion mit TRV ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Ein sicherer Nachweis von TRV aus infiziertem Knollengewebe gelang mit einer Nested-PCR, die von der Fa. Bioplant in Ebstorf entwickelt wurde. Das Verfahren dauert einen Tag und ist auch in einem Routinelabor problemlos anwendbar. Nachteilig dabei ist, dass nur aus symptomtragenden Knollen sichere Nachweise erzielbar sind.

Eine Infektion mit TRV in der Erde der geplanten Anbaufläche kann durch einen Tabaktest nachgewiesen werden. Der in die Erdprobe des Testfeldes gepflanzte Tabak (*Nicotiana debney*) im 2-Blattstadium zeigt bei einer Kontamination mit beladenen Nematoden nach 5 – 6 Wochen Wachstum im Gewächshaus eindeutige Symptome einer TRV-Infektion. Aus den Tabakwurzeln kann dann mit Hilfe der PCR (Primerentwicklung von Prof. Varrelmann, Georg-August-Universität Göttingen) eine Infektion mit TRV sicher nachgewiesen werden. Ausschlaggebend für die Aussagekraft des Testes ist die Homogenität der Probenahme, da die Nematodennester auf einer Anbaufläche nicht gleichmäßig verteilt sind. Für zukünftige Arbeiten ist angedacht, Bodenproben von geplanten Kartoffelanbauflächen vorab auf freilebende Nematoden zu untersuchen. Werden darin Nematoden gefunden, so sollen diese mit Hilfe der PCR auf TRV untersucht werden.

35-3 - Hühnlein, A.¹⁾; Schubert, J.¹⁾; Thieme, T.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ BTL Bio-Test Labor GmbH Sagerheide

Quantitativer Nachweis des Kartoffel-Blattrollvirus in Vektoren

Quantitative detection of *Potato leafroll virus* in vectors

Für die Bewertung von Pflanzenschutzmitteln oder von Pflanzen mit neuen Eigenschaften (gewonnen im Rahmen einer konventionellen Züchtung, durch Einsatz biotechnologischer Verfahren oder durch gentechnische Methoden) können Effekte auf Insekten als Ziel- und Nicht-Zielorganismen mit Hilfe von Parametern der „life table statistic“ (z. B. Lebensdauer, Fortpflanzungs- oder Sterblichkeitsrate bei konstanten oder fluktuierenden Temperaturen) untersucht werden. Diese Experimente sind sehr zeitintensiv. Deshalb wird nach weiteren Merkmalen gesucht, die es besonders in Hinblick auf Pflanzen mit neuen Eigenschaften erlauben, mögliche Stoffwechseleränderungen in den Pflanzen aufzuzeigen. Es wird vermutet, dass ein veränderter Metabolismus der Pflanze Auswirkungen auf die Attraktivität für Herbivoren wie Aphiden haben kann (Birkett et al. 2000, Zvereva und Kozlov 2006, Beale et al.

2006, De Vos 2007). Somit werden zunehmend Untersuchungen über den Einfluss der Pflanzen auf das Nahrungsverhalten der Aphiden und die Akquisition bzw. Transmission von pflanzenpathogenen Viren durchgeführt. Da eine Virusinfektion der Pflanze die Attraktivität für Aphiden verändern kann (Castle et al. 1998, Mowry and Ophus 2006, Alvarez et al. 2007, Srinivasan and Alvarez 2007), müssen solche Experimente unter standardisierten Bedingungen für die Pflanzen durchgeführt werden. Weiterhin wird ein sehr sensitives quantitatives Nachweisverfahren für die Viren in den Vektoren benötigt, um die Menge von der Aphide aufgenommener Viren zu ermitteln.

Am Beispiel des *Potato leafroll virus* (PLRV) (Genus Polerovirus; Familie Luteoviridae) wird die Entwicklung einer neuen quantitativen Nachweismethode dargestellt. PLRV wird persistent und besonders effektiv von *Myzus persicae* übertragen, wobei sich das Virus im Vektor nicht vermehrt (zirkulativ). Daher ist es als Indikator für eine veränderte Nahrungsaufnahme der Aphiden besonders geeignet. Zudem stellt es neben dem *Potato virus Y* (PVY) eines der bedeutendsten Viren im Kartoffelanbau dar. In den letzten Jahren sind mehrere quantitative PCR (qPCR)-Verfahren für den Nachweis von PLRV in Kartoffelpflanzen oder -knollen entwickelt worden (Agindotan et al. 2007, Mortimer-Jones 2009). Die entwickelten Assays sind allerdings nur bedingt für den Nachweis in Aphiden geeignet, da Primer und Sonden häufig unspezifisch im Aphidengenom binden. Weil es sich bei PLRV um ein RNA-Virus handelt, müssen zudem spezielle Extraktionsverfahren entwickelt werden, die sich auf Grund des hohen Fettanteils in Aphiden von den RNA-Extraktionsverfahren bei Pflanzen unterscheiden können. Extraktionsverfahren, die als spezielle Kits erhältlich sind oder nur die Hämolymphe der Aphiden umfassen (Liu et al. 2005), sind sehr kostenintensiv und häufig für die Bearbeitung einer hohen Probenzahl ungeeignet. Andere, bereits entwickelte Extraktionsverfahren (Singh et al. 1995 und 1996) weisen häufig eine sehr geringe RNA-Ausbeute auf, die außerdem oft von schlechter Qualität und daher für die RT-qPCR nicht geeignet ist. Auf der Basis einer Immunocapture-RT-qPCR wurde ein kostengünstiges, spezifisches Assay für den quantitativen Nachweis von PLRV in Vektoren entwickelt, das einen hohen Probendurchsatz ermöglicht. Indem die Viruspartikel direkt mit Hilfe von Antikörpern an das Reaktionsgefäß gebunden werden, sind die anschließende reverse Transkription und qPCR sehr spezifisch. Da die Bindung des Antigens an die Antikörper ein dynamischer Prozess ist, wurde mit Antikörperüberschuss gearbeitet, um eine möglichst hohe Zahl an Viruspartikeln zu binden. Zudem wurden für die Herstellung der Standards zum Vergleich nicht nur RNA-Transkripte, sondern auch gereinigte PLRV-Partikel verwendet. Hinsichtlich der Virusreinigung wurde außerdem eine Kostenreduzierung geprüft, indem zur Freisetzung der Partikel aus dem Phloem eine Enzymmischung eingesetzt wurde, die auch industriell bei der Herstellung von Frucht- und Gemüsesäften Verwendung findet. Auf diesem Weg kann eine Reinigung von PLRV aus Pflanzengewebe preisgünstig und mit einer hohen Ausbeute durchgeführt werden. Die entwickelte Nachweismethode ist wesentlich sensitiver als der gewöhnlich eingesetzte ELISA.

Literatur

- [1] Agindotan et al. (2007) J. Virol. Meth. 142: 1-9.
- [2] Alvarez et al. (2007) Entomol. Exp. Appl. 125: 135-144.
- [3] Beale et al. (2006) Plant Biol. 103: 10509-10513.
- [4] Birkett et al. (2000) PNAS 97: 9329-9334.
- [5] Castle et al. (1998) Ann. Entomol. Soc. Am. 91: 661-667.
- [6] De Vos (2007) BioEssays 29: 871-883.
- [7] Liu et al. (2005) J Virol. Meth. 132: 174-180.
- [8] Mortimer-Jones (2009) J. Virol. Meth. 161: 289-296.
- [9] Mowry and Ophus (2006) J. Insect Sci. 6: 1-8.
- [10] Singh et al. (1995) J. Virol. Meth. 55: 133-143.
- [11] Singh et al. (1996) J. Virol. Meth. 59: 189-196.
- [12] Srinivasan and Alvarez (2007) Environ. Entomol. 35: 546-553.
- [13] Zvereva und Kozlov (2006) Glob. Chang. Biol. 12: 27-41.

35-4 - Moritz, G.¹; Brandt, S.¹; Sseruwagi, P.²; Myamba, A.²; Waiganjo, M.³; Subramanian, S.⁴

¹ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; ² National Crops Resources Research Institute (NACRRI), Uganda;

³ Kenya Agricultural Research Institute, Kenia; ⁴ International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE), Kenia

Entwicklung eines LucID 3.5-Identifikations- und Informationssystems für Schad-Thripse in Ostafrika

Thripse sind kleine Insekten, die an vielen Kulturpflanzen durch stechend-saugende Pflanzensaftaufnahme und Vektoreigenschaften (Tospoviren) zu enormen Schäden führen. In Afrika sind eine ganze Reihe von Kulturpflanzenarten, wie z. B. Auberginen, Bananen, Baumwolle, Bohnen- und Getreidearten, Kaffee, Kakao, Luzerne, Mais, Reis, Tee, Tomaten und Zitrusfrüchte, diesem Befall ausgesetzt. Im Gegensatz dazu sind lokal

verfügbare Bestimmungshilfen kaum vorhanden. Aufgrund der Technisierung verschiedener Regionen Afrikas ist die Nutzung von Computern und die Einführung von LucID 3.5-Keys äußerst erfolgsversprechend. Schnelle Identifikation und zahlreiche Informationen erlauben neben dem Einsatz für IPM-Programme vor allem auch die Nutzung der Software für die Untersuchung von Dispersionen, Befall, Schadpotenzial und Vektoreigenschaften verschiedener Schadhripse. Ebenso ist bei exakter Diagnose eine gezielte Bekämpfung mit geeigneten Antagonisten (*Metarhizium anisopliae*) möglich, sowie die Diagnose invasiver Arten (*Frankliniella occidentalis*), die Verschiebung von Schaderregerspektren (*Megalurothrips sjostedti*) und eine zuverlässige Pflanzenbeschau von Exportgütern Ostafrikas (z. B. *Scirtothrips dorsalis*) äußerst wichtig. Der LucID-Key „Identification and Information Tools for Pest thrips of East Africa“ enthält neben dem Key mit Informationen zur Biologie, Systematik und biogeographischen Verbreitung der ermittelten Spezies eine Datenbank mit bisher in Afrika beschriebenen Arten. Eine molekulare Diagnostik ist online für alle ontogenetischen Stadien möglich.

35-5 - Golecki, B.; Berger, M.; Stula, E.-M.; Kruse, H.
Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein

Diagnose von *Phytophthora ramorum* und anderen *Phytophthora*-Arten an Gehölzen im Bundesland Schleswig-Holstein

Diagnosis of *Phytophthora ramorum* and other *Phytophthora* species on ornamental shrubs in the federal state of Schleswig-Holstein

Im Referat 'Phytopathologische Diagnostik' des amtlichen Pflanzenschutzdienstes der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein werden seit 2002 eine Vielzahl an Gehölzen auf *Phytophthora ramorum* und andere *Phytophthora*-Arten untersucht. In den Jahren 2002 bis 2009 wurden einerseits umfangreiche Kenntnisse zur Nachweisbarkeit von *Phytophthora ramorum* und/oder anderen *Phytophthora*-Arten in unterschiedlichen Regionen der Pflanze erarbeitet. Andererseits wurde die Nachweissicherheit von *Phytophthora ramorum* bei der Anwendung unterschiedlicher Testmethoden überprüft. Für die vergleichenden Untersuchungen wurden Sprossabschnitte bzw. komplette Pflanzen (einschließlich Substrat) mit Verdachtssymptomen aus Betrieben und dem öffentlichen Grün herangezogen, die im Rahmen der jährlichen Pflanzengesundheitsinspektionen entnommen wurden. Im Zeitraum 2002 bis 2005 wurden alle auffälligen Pflanzen bzw. Pflanzenteile mittels Platten- und Kødertest untersucht. In den Jahren 2006 bis 2009 wurde zusätzlich die PCR eingeführt, um zu überprüfen, ob dieses Verfahren als schneller Screeningtest zukünftig für die Routinediagnostik eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse aller Diagnosen aus den Jahren 2002 bis 2009 werden hinsichtlich der oben genannten Aspekte vorgestellt, bewertet und diskutiert.

35-6 - Weinert, N.¹⁾; Piceno, Y.²⁾; Ding, G.-C.¹⁾; Heuer, H.¹⁾; Berg, G.³⁾; Schloter, M.⁴⁾; Andersen, G.²⁾; Smalla, K.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ Lawrence Berkeley National Laboratory, USA; ³⁾ Technische Universität Graz; ⁴⁾ Helmholtz Zentrum München

PhyloChip-Analysen erlauben neue Einblicke in die bakterielle Diversität in der Rhizosphäre und in Effekte von Standort und Sorten

Der von der Pflanze beeinflusste Boden wird als Rhizosphäre bezeichnet. Insbesondere die Wurzelexsudate führen zu einer Anreicherung bestimmter Bakterien und Pilzpopulationen in diesem Habitat, die ihrerseits für die Pflanzengesundheit, aber auch für die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Pflanze bedeutsam sind (Berg und Smalla, 2009). Traditionell genutzte Kultivierungsverfahren erfassen aber nur einen kleinen Teil der bakteriellen Diversität, da die meisten Bakterien im Boden nur schwer oder nicht zu kultivieren sind. Daher war das Wissen über die Diversität von Bakterien und Pilzen in der Rhizosphäre und im Boden lange sehr begrenzt.

Durch die Nutzung kultivierungsunabhängiger DNA-Techniken konnten in den letzten 15 Jahren neue Einblicke in die Diversität von Bakterien, Archeen und Pilzen im Boden gewonnen werden. Mit Hilfe der PCR werden 16S rRNA-Genfragmente (Bakterien, Archeen) bzw. 18S/ITS (Pilze) aus der Boden- bzw. Rhizosphären-DNA amplifiziert. Mit molekularen Fingerprinting-Techniken wie der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) konnten wir zeigen, dass die Zusammensetzung der Bakterien und Pilze in der Rhizosphäre sehr stark vom Standort, von der Pflanzenart und vom Pflanzenentwicklungsstadium abhängt (Smalla et al., 2001; Heuer et al., 2002; Costa et al., 2006, 2007). Die Analyse der Rhizosphäre von sieben Kartoffelgenotypen, die an zwei Standorten (Roggenstein und Oberviehhausen) in randomisierten Blockanlagen angebaut wurden, mit Hilfe derDGGE zeigte, dass der Einfluss der Sorten im Vergleich zum Einfluss des Standorts gering ist (Weinert et al., 2009). Hier berichten wir über die Nutzung sogenannter PhyloChips zur Untersuchung der bakteriellen Diversität in der Rhizosphäre von drei Kartoffelsorten ('Désirée', 'Baltica', 'Sibu') zum Entwicklungsstadium EC 60. Aus der

Rhizosphären-DNA (drei Wiederholungen pro Sorte) wurden die 16S rRNA-Gene amplifiziert, fragmentiert (50 – 200 bp) und mit Biotin markiert. Die Biotin-markierten PCR-Produkte wurden mit einem PhyloChip (Affymetrix) hybridisiert. Auf dem Chip befinden sich mehr als 300.000 Oligonucleotide, die die Detektion von 8741 OTU (operational taxonomic units) erlauben (Brodie et al., 2007). Sowohl die PhyloChip-Entwicklung als auch die Hybridisierung wurden am Lawrence Berkeley National Laboratory in Berkeley (Kalifornien, USA) durchgeführt. Mit Hilfe der PhyloChip-Hybridisierungen konnten zwischen 1.500 und 2.000 OTU in der Rhizosphären-DNA detektiert werden. Die meisten OTU konnten den *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* und *Acidobacteria* zugeordnet werden (Weinert et al., eingereicht). Der relative Anteil der wichtigsten Phyla war für beide Standorte vergleichbar. Mit Hilfe statistischer Methoden wurden die Taxa bestimmt, die signifikante Unterschiede in der relativen Abundanz in Abhängigkeit vom Standort bzw. der Sorte zeigten. Auch mit dieser Methode konnten nur wenige Taxa identifiziert werden, die signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Sorte zeigten. Interessanterweise gehören viele biologische Kontrollstämme, aber auch bakterielle Pathogene zu diesen Taxa.

Die Vorteile und Limitierungen von PhyloChip-Hybridisierungen im Vergleich zu anderen Fingerprinting-Methoden werden diskutiert.

Literatur:

- [1] Berg, G., Smalla, K. (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68: 1–13.
- [2] Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Moberg Parker, J. P., Zubietta, I. X., Piceno, Y. M., and Andersen, G.L. (2007) Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci* 104: 299-304.
- [3] Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., Smalla, K. (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 236-249.
- [4] Costa, R., Gomes, N. C. M., Krögerrecklenfort, E., Opelt, K., Berg, G., Smalla, K. (2007) *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. *Environ Microbiol* 9: 2260-2273.
- [5] Heuer, H., Kroppenstedt, R.M., Lottmann, J., Berg, G., Smalla, K. (2002). Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Appl Environ Microbiol* 68: 1325-1335.
- [6] Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* 67: 4742-4751.
- [7] Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Heuer, H., Schloter, M., Berg, G., Smalla, K. (2009) Rhizosphere microbial communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differed less than those of different potato cultivars. *Appl Environ Microbiol* 75: 3859-3865.

35-7 - Marx, P.¹⁾; Kühne, S.¹⁾; Jahn, M.¹⁾; Makulla, A.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

Entwicklung einer Methode zum Wirkungsnachweis resistenzinduzierender Präparate (Pflanzenstärkungsmittel)

Method for testing the efficacy of products for improving the resistance of plants

Während auf der einen Seite die Verfügbarkeit von Pflanzenstärkungsmitteln enorm zugenommen hat, wächst bei den Anwendern die Unsicherheit, ob Pflanzenstärkungsmittel in der Praxis eine ausreichende Wirksamkeit zeigen. Im Julius Kühn-Institut wurden im Auftrag des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) deshalb Untersuchungen zur Entwicklung einer Methode zum Wirkungsnachweis resistenzinduzierender Pflanzenstärkungsmittel durchgeführt. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen dabei die Entwicklung einer praktikablen, leicht durchführbaren Methode und deren universelle Durchführbarkeit.

Nach umfangreichen Voruntersuchungen zu verschiedensten Wirt-Pathogen-Systemen erwies sich die Kultur Radies (*Raphanus sativus*) in Verbindung mit dem Schaderreger Falscher Mehltau (*Peronospora parasitica*) als das am besten geeignete Prüfsystem.

Die Anzucht der Versuchspflanzen erfolgte in Zimmergewächshäusern in einem begehbaren Klimaraum. Geprüft wurde ein Pflanzenextrakt (Pechnelke, 2,7%ig) im Vergleich zu einem Standard (β -Aminobuttersäure (BABA), 5 mM) und zu einer Kontrolle (Aqua dest). Die Pflanzen wurden zweimal behandelt; sieben Tage nach der Aussaat erfolgt die erste, nach elf Tagen die zweite Anwendung des Extraktes bzw. Standard und Kontrolle mit je 0,5 ml Lösung je Pflanze. Die Pflanzen der drei Varianten wurden anschließend in jeweils drei Gruppen unterteilt. Jede Gruppe wurde 24, 48 oder 72 Stunden nach der letzten Applikation der Prüfsubstanzen mit einer Sporensuspension der Dichte 2×10^4 Sporen/ml inokuliert. Anschließend wurde regelmäßig die Entwicklung der Sporulation verfolgt.

Bei einer sichtbaren Sporulation in den Kontrollen auf etwa 50 % der Keimblattfläche (in der Regel 10 bis 14 Tage nach Inokulation) erfolgte die Auswertung der Ergebnisse. Dazu wurde aus den befallenen Keimblättern eine Sporensuspension gewonnen und deren Dichte bestimmt. Gezählt wurden die Sporen in den Suspensionen; jeder Wiederholung und Variante wurde zehnmal ein Aliquot entnommen, das dreimal gezählt wurde. Für die statistische Auswertung wurde der mittlere Wert aus den drei Messungen der Sporendichte je Wiederholung berechnet. Der Vergleich jeweils zweier Varianten (Kontrolle vs. BABA, Kontrolle vs. Präparat und BABA vs. Präparat) wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Es erfolgten drei Auswertungen, ein Vergleich zwischen den Varianten mit 24 Stunden Abstand zwischen Anwendung und Inokulation, eine zweite mit 48 Stunden Abstand und die dritte bei 72 Stunden Abstand.

Im Ergebnis zeigten sich deutliche Unterschiede: In der Kontrolle war die Dichte der Sporensuspension aus befallenem Keimblattmaterial in allen drei Gruppen (24, 48 und 72 Stunden) am höchsten (12.500, 10.000, 12.000 Sporen/ml). Etwas niedriger war die Dichte der Prüfpräparat-Variante in der Gruppe der 24 Stunden (10.000 Sporen/ml) und deutlich niedriger in den Gruppen 48 und 72 Stunden (5.000, 2.500 Sporen/ml). Die BABA-Variante wies in der Gruppe 24 Stunden (2.500 Sporen/ml) und 48 Stunden (0 Sporen/ml) die geringste Dichte auf. In der Gruppe der 72 Stunden wurden 5.000 Sporen/ml gemessen. Für die Gruppen 48 und 72 Stunden sind alle Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant. In dem getesteten Wirt-Pathogen-System *Radies-Falscher Mehltau* war die Bestimmung der Dichte der Sporensuspension aus befallenem Keimblattmaterial sehr gut geeignet, um Unterschiede zwischen den Varianten herauszustellen. Insgesamt konnte unter Berücksichtigung der entsprechenden Versuchsparameter eine Reduktion der Sporendichte in der Präparatvariante im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Für das geprüfte Wirt-Pathogen-System wurden die Sorte, die Anzucht der Kulturpflanzen, die Haltung der Stammkultur, die Anwendung der Präparate sowie Anwendungsabstände, Inokulumdichten, Zeitabstände zwischen Inokulation und Behandlung sowie Boniturverfahren definiert. Die Testmethode ist standardisierbar. Die entwickelte Methode ist gut geeignet, einen Wirkungsnachweis resistenzinduzierender Präparate zu ermöglichen.

35-8 - Welke, B.; Ulrichs, C.
Humboldt-Universität zu Berlin

Entwicklung eines Enzymsensors zur Detektion von Pestiziden im Gartenbau

Konventionelle Methoden zum Nachweis von Pestizidrückständen in landwirtschaftlichen und gärtnerischen Produkten sind meist kosten- und equipmentintensiv. Konsumenten können sich nur begrenzt eigenverantwortlich vor dem Verzehr pestizidbelasteter Nahrungsmittel schützen und sind auf die Transparenz der Nahrungsmittelhersteller und auf unabhängige Prüfunternehmen angewiesen. Die Gewährleistung von schadstoffunbelasteten Nahrungsmitteln sollte jedoch bei der Lebensmittelherstellung immer höchste Priorität haben. Deshalb besteht die Notwendigkeit der Erweiterung diagnostischer Möglichkeiten zum Nachweis chemischer Substanzen in Lebensmitteln.

Biosensoren bieten ein hohes Entwicklungspotenzial auf dem analytischen Markt. Sie reagieren sehr empfindlich auf Stoffänderungen innerhalb der untersuchten Matrix und sind meist mehrfach verwendbar. Ebenso sind sie miniaturisierbar und kostenunintensiv herstellbar.

Innerhalb dieser Studie wird das Nachweisverhalten von auf Bakterien basierenden Biosensoren am Testorganismus *E. coli* XL1-Blue MRF' gegenüber unterschiedlicher Carbamat- und Organophosphatverbindungen untersucht. Ziel der Studie ist die Weiterentwicklung und Evaluierung spezifischer Achetylcholinesterasesensoren mit bioelektrischem Funktionsprinzip (Bioelectric recognition assay, BERA) unter Betrachtung der Änderung des Biosensor- Membranpotentials. Butocaboxim (3-(Methylthio)butanon-O-methylcarbamoyloxim) und Diazinon (O,O-Diethyl-O-(2-isopropyl-6-methyl-pyrimidin-4-yl)phosphorothioat) konnten anhand der *E. coli*- Sensoren bis zu einer Konzentration von 10 pM bzw. 10 nM nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Untersuchungen mit Neuroblasten N2-Zellen gegenüber Carbaryl (1-Naphtholmethylcarbamat) und Chlorpyrifos (O,O-Diethyl-O-3,5,6-trichlor-2-pyridylphosphorothioat) erreicht [1].

Literatur

- [1] Mavrikou S., Flampouri K., Moschopoulou G., Mangana O., Michaelides A. and Kintzios S. (2010) Assessment of Organophosphate and Carbamate Pesticide Residues in Cigarette Tobacco with a Novel Cell Biosensor Sensors 2008, 8, 2818-2832.