

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 (Pechelneke, 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-methylcarbamoxyloxim) 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.

4 2 8

Julius-Kühn-Archiv

57. Deutsche Pflanzenschutztagung

6. - 9. September 2010
Humboldt-Universität zu Berlin

- Kurzfassungen der Beiträge -



Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen