

Berichte

aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Reports

from the Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry

Heft 121

2003

**Untersuchungsmethoden
für pflanzenparasitäre Nematodenarten,
die in Deutschland von Rechtsvorschriften
betroffen sind**

Methods for the isolation of plant parasitic nematodes
subject to regulations in Germany

P. Knuth, G. Lauenstein, U. Ipach,
H. Braasch und J. Müller



BBA

Herausgeber

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Braunschweig, Deutschland

**Untersuchungsmethoden
für pflanzenparasitäre Nematodenarten,
die in Deutschland von Rechtsvorschriften betroffen sind**

von

P. Knuth, G. Lauenstein, U. Ipach, H. Braasch und J. Müller

Verlag
Eigenverlag

Vortrieb
Saphir Verlag, Gutsstraße 15, D-38551 Ribbesbüttel
Telefon +49(0) 5374 6576
Telefax +49(0) 5374 6577

ISSN 0947-8809

Kontaktadressen

Dr. Peter Knuth
Landesanstalt für Pflanzenschutz
Reinsburgstr. 107
D-70197 Stuttgart
Telefon +49(0) 711 6642-142
Telefax +49(0) 711 6642-499
E-Mail Peter.Knuth@ifp.bwl.de
Internet <http://www.ifp.bwl.de>

Dr. Joachim Müller
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde
Toppheideweg 88
D-48161 Münster
Telefon +49(0) 251 87106-20
Telefax +49(0) 251 87106-33
E-Mail J.Mueller@bba.de
Internet <http://www.bba.de>

© Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis	Seite
Einführung	4
Übersicht 1	6
Übersicht 2	7
Übersicht 3	8
Methode 1 – Zystenextraktion aus Bodenproben bei <i>Globodera rostochiensis</i> und <i>G. pallida</i>	9
Methode 2 – Biotest mit Bodenproben oder mit inokulierten Zysten von <i>Globodera</i> <i>rostochiensis</i> und <i>G. pallida</i>	13
Methode 3 – Zystenextraktion aus Knollenanhangerde bei <i>Globodera rostochiensis</i> und <i>G. pallida</i>	15
Methode 4 – Elektrophorese zum Arten- und Pathotypennachweis bei <i>Globodera</i> <i>rostochiensis</i> und <i>G. pallida</i>	18
Methode 5 – Untersuchung von Kartoffelknollen (Pflanzkartoffeln) auf Befall mit Kartoffelkrätzeälchen (<i>Ditylenchus destructor</i>)	19
Methode 6 – Untersuchung von Kartoffelknollen (Pflanz- und Konsumkartoffeln) auf Befall mit Wurzelgallenälchen (<i>Meloidogyne chitwoodi</i> und <i>M. fallax</i>)	21
Methode 7 – Untersuchung von Nadelholz (außer in Form von Schnitzeln, Spänen, Holzabfall oder Holzausschuss, Verpackungskisten, Lattenkisten, Fässern, Paletten, Kistenpaletten, Stauholz) mit Ursprung in China, Japan, Kanada, Korea, Taiwan oder den USA auf <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> sowie seiner Vektoren (<i>Monochamus spp.</i>)	23
Methode 8 – Untersuchung von Verpackungsholz auf <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> sowie einer Vektoren (<i>Monochamus spp.</i>)	25
Methode 9 – Untersuchung von Rindenumus, Kultursubstraten, Pflanzen mit und ohne Wurzeln sowie anhaftender Erde auf Quarantänenematoden und schädliche Nematoden allgemein	28
Methode 10 – Untersuchung von Blumenzwiebeln und Küchenzwiebeln, die zum Auspflanzen bestimmt sind, auf <i>Ditylenchus dipsaci</i> und <i>D. destructor</i>	31

Methode 11 – Saatgutuntersuchung bei Küchenzwiebel, Schalotte und Schnittlauch sowie Luzerne und anderen kleinsamigen Leguminosen auf <i>Ditylenchus dipsaci</i>	33
Methode 12 – Saatgutuntersuchung bei Reis auf <i>Aphelenchoides besseyi</i>	35
Methode 13 – Saatgutuntersuchung bei Ackerbohnen und Erbsen auf <i>Ditylenchus dipsaci</i>	36
Methode 14 – Untersuchung von Erdbeerpflanzgut auf <i>Aphelenchoides besseyi</i>	38
Methode 15 – Untersuchung von Wurzeln bzw. Wurzelgallen bei Zierpflanzen auf Befall mit Wurzelgallenälchen (<i>Meloidogyne chitwoodi</i> und <i>M. fallax</i>)	40
Methode 16 – Untersuchung von getopften Bonsai-Pflanzen auf das Vorkommen pflanzenparasitischer Nematoden.....	42
Methode 17 – Bodenuntersuchung auf virusübertragende Nematoden.....	45
Methode 18– Ausschließlich für Rebschulen: Nachweis der Vorkultur.....	48

Nahezu alle Kulturpflanzenarten werden von verschiedenen pflanzenparasitären Nematoden befallen und geschädigt. Um Verluste zu begrenzen oder durch Verhinderung der Einschleppung von vornherein zu vermeiden, haben Deutschland, die Europäische Union und die meisten anderen Staaten entsprechende Vorschriften erlassen. Solche Regelungen betreffen natürlich neben Nematoden auch andere Pflanzenschädlinge und -krankheiten. Sie haben teilweise unterschiedliche Ursprünge oder verfolgen unterschiedliche Zwecke, wie z. B. die Pflanzenbeschauverordnung oder die Verordnung zur Neuregelung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften zur Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel. Je nach Zielsetzung einer Rechtsvorschrift kann es erforderlich sein, für dieselbe Nematodenart unterschiedliche Untersuchungsmethoden anzuwenden. Für den einzelnen Bearbeiter ist die Entscheidung darüber nicht tägliche Routine, so dass für ihn die Gesamtsituation sehr unübersichtlich wird. Es erfordert gute Fachkenntnisse und viel Erfahrung, die jeweiligen Schaderreger zu kennen und methodisch korrekt zu erfassen. Nur wenige Pflanzenschutzdienststellen der deutschen Bundesländer beschäftigen noch nematologisch geschulte Experten, die alle in diesem Zusammenhang betroffenen Kulturen und Nematoden überblicken. Bei den Arbeitssitzungen der Fachreferenten für Nematologie gab es daher in den vergangenen Jahren immer wieder Anfragen und Diskussionen zu dieser Problematik. Das führte schließlich zu dem Entschluss, eine Übersicht und Handlungshilfe zu schaffen, die es dem Verantwortlichen leichter ermöglicht, die richtige Entscheidung zu treffen. Bedeutsam schien dies auch aus juristischer Sicht im Hinblick auf die Tatsache, dass in verschiedenen Dienststellen oft sehr unterschiedliche Untersuchungstechniken eingesetzt werden, um einen bestimmten nematologischen Nachweis zu führen. Die hier vorgelegten Empfehlungen sollen die Unsicherheit mindern und können vielleicht die Grundlage sein für eine insgesamt einheitlichere Methodik. Dabei sollen die bereits vorliegenden „EPPO-Diagnostic Protocols“ nicht ersetzt werden, sondern die Basis bilden.

Wir hoffen, dass unser Ziel, einen Überblick über das Gesamtgebiet zu geben, hinsichtlich der betroffenen Nematoden- und Kulturarten zufriedenstellend erreicht werden konnte. Die Übersichtstabellen zeigen auf, bei welchen Kulturen welche Nematodenarten berücksichtigt werden müssen, und es werden jeweils die Rechtsvorschriften dafür genannt. Schwieriger ist es,

eine definitive Entscheidung für die geeignete Untersuchungsmethodik zu finden. Für die Erfassung der meisten Nematodenarten stehen unterschiedliche Techniken zur Verfügung. Die dafür erforderlichen Geräte sind nicht in allen Ämtern vorhanden, und die besonders effizienten Methoden erfordern oft viel Erfahrung, damit der angestrebte Erfolg auch erreicht wird. Häufig kann es daher vertretbar sein, eine Methode zweiter Wahl, die aber sicher beherrscht wird, weiterhin zu verwenden. In diesem Sinne müssen die Angaben zur Methodik als Empfehlungen verstanden werden, die besonders dem weniger Erfahrenen einen ersten Hinweis geben, welche Technik überhaupt in Frage kommt. Die zitierten Literaturstellen geben weitere und meist detaillierte Auskunft, und die Richtlinien der EPPO, z. B. zur Erfassung von Zysten-nematoden bei der Wirksamkeitsprüfung von Nematiziden, enthalten zusätzliche Hinweise.

In einigen Bereichen geben EPPO- und EG- Richtlinien auch für die aufgeführten Untersuchungsmethoden Rahmenbedingungen an, die eingehalten werden sollen und die bei den Empfehlungen berücksichtigt wurden. Dies gilt insbesondere für die bei einigen Nematodenarten bereits vorliegenden „EPPO Diagnostic Protocols“. Für die praktische Anwendung bedarf es aber oftmals exakterer Hinweise, die wir aus Literaturquellen entnommen oder auch aus eigener Erfahrung beschrieben und als Ergänzungen und Empfehlungen aufgeführt haben. Andererseits sind sehr komplexe Techniken, wie molekularbiologische Methoden, nicht im Detail beschrieben worden, da dies den Rahmen sprengen würde. Die zitierten Rechtsvorschriften entsprechen dem Stand des Jahres 2002, zukünftige Änderungen und Ergänzungen sind entsprechend zu berücksichtigen.

Anmerkungen:

1. Nachfolgend wird die Pflanzenbeschauverordnung in der derzeit gültigen Fassung vom 10. Oktober 2000, zuletzt geändert durch die „Dritte Verordnung zur Änderung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften vom 05.12.2002“ (BGBl. I Nr. 83 S. 4493) in abgekürzter Form wie folgt zitiert:
„Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493)“.
2. Die Angaben zu den rechtlichen Grundlagen dienen zur Information und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Kulturen	Nematodenarten	Rechtsvorschriften	Methoden	Nr.
Kartoffeln (alle Nutzungsrichtungen)	<i>Globodera rostochiensis</i> <i>Globodera pallida</i>	Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493)	Zystenextraktion Biotest Untersuchung der Knollenanhangerde	1 2 3
		Anbau innerhalb der EU-Mitgliedsstaaten: Anbau innerhalb Deutschlands: Richtlinie Nr. 69/465/EWG zur Bekämpfung des Kartoffelnematoden v. 08.12.1969 (Amtsbl. Nr. 28, S.454/67) Verordnung zur Neuregelung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften zur Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel v. 05.06.2001(BGBl. I S. 1006)	Zystenextraktion Biotest Elektrophorese (PCR) Knollenanhangerde	1 2 4 3
Pflanzkartoffeln	<i>Globodera rostochiensis</i> <i>Globodera pallida</i>	Vermehrung innerhalb Deutschlands: Pflanzkartoffelverordnung v. 21.01.1986 (BGBl. I S. 192)	Zystenextraktion Biotest Elektrophorese (PCR) Knollenanhangerde	1 2 4 3
Kartoffeln (Speise- bzw. Pflanzkartoffeln)	<i>Ditylenchus destructor</i> <i>Meloidogyne chitwoodi</i>	Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493);	Knollenuntersuchung Knollenschnitt	5 6
		Pflanzkartoffelverordnung v. 21.01.1986 (BGBl. I S. 192)		
Flächen mit Pflanzen, die zum Verpflanzen angebaut, eingeschlagen oder gelagert werden	<i>Globodera rostochiensis</i> <i>Globodera pallida</i>	Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493) Anbau innerhalb der EG-Mitgliedsstaaten: Richtlinie Nr. 69/465/EWG zur Bekämpfung des Kartoffelnematoden v. 08.12.1969 (Amtsbl. Nr. 28, S.454/67) Anbau innerhalb Deutschlands: VO zur Neuogl. pfl.schutzrechtl. Vorschriften zu Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel v. 05.06.2001 (BGBl. I S. 1006)	Knollenuntersuchung	1 2

Kulturen	Nematodenarten	Rechtsvorschriften	Methoden	Nr.
Holz Nadelholz	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493)	Holzprobenuntersuchung	7
Verpackungsholz	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Entscheidung der EU-Kommission (2001/219/EG) über befristete Sofortmaßnahmen v. 12.03.01	visuelle Bonitur Holzprobenuntersuchung	8
Rindenumus, Kultursubstrate, bewurzelte Pflanzen mit anhaftender Erde	Pflanzenparasitäre Nematoden	Anlage 1,2 und 4; im Boden freilebende Quarantänenematoden sowie schädliche Nematoden allgemein	Substratproben, Bodenuntersuchung Wurzeluntersuchung	9
Blumenzwiebel, Küchenzwiebel	<i>Ditylenchus dipsaci</i> , <i>Ditylenchus destructor</i>	Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493)	Zwiebeluntersuchung	10
Saatgut		Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493)		
Küchenzwiebel, Luzerne, Schalotte, Schnittlauch	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Anlage 2, A3, Saatgut	Saatgutuntersuchung	11
Reis	<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Anlage 2, A3, Saatgut	Saatgutuntersuchung	12
Ackerbohnen und Erbsen	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Saatgutverordnung; Dritte Änderung der Saatgutverordnung; Bundesgesetzblatt 1989, Teil 1 S. 2029	Saatgutuntersuchung	13
Erdbeerpflanzen	<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493)	Pflanzenherzuntersuchung	14

Kulturen	Nematodenarten	Rechtsvorschriften	Methoden	Nr.
Zierpflanzen		Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493)		
Araceae, Marantaceae, Musaceae	<i>Radopholus similis</i> <i>Radopholus citrophilus</i>	Anlage 2, A 2, Pflanzen außer Samen Anlage 4, Obst und Zierpflanzen	Bodenuntersuchung Wurzeluntersuchung	9
Zierpflanzen, bewurzelt mit Erde, Topfpflanzen, evtl. zum Auspflanzen bestimmt	<i>G. rostochiensis</i> <i>G. pallida</i> <i>Meloidogyne chitwoodi</i> <i>Meloidogyne fallax</i> <i>Xiphinema americanum</i> <i>Xiphinema californicum</i> <i>Longidorus diadecturus</i> <i>Nacobbus aberrans</i>	Anlage 1 bis 4: Quarantänenematoden allgemein	Zystenextraktion Bodenuntersuchung Wurzeluntersuchung	1 9 15
Bonsai	Pflanzenparasitäre Nematoden	Entscheidung 2002/887/EG der Kommission vom 08.11.2002	Bodenuntersuchung Wurzeluntersuchung Holzuntersuchung	16
Reben Vermehrungsanlagen (Edelreis- und Unterlagen-Schnittgärten, Rebschulen)	<i>Xiphinema index</i>	Rebenpflanzgutverordnung, § 7, Abs. 2	Bodenuntersuchung auf virusübertragende Nematoden	17
	andere virusübertragende Nematodenarten	Rebenpflanzgutverordnung, § 7, Abs. 2	Bodenuntersuchung auf virusübertragende Nematoden	17
nur Rebschulen	virusübertragende Nematodenarten	Rebenpflanzgutverordnung, § 7, Abs. 2	Nachweis der Vorkultur, dann evtl. keine Bodenuntersuchung notwendig	18

Zystenextraktion aus Bodenproben bei *Globodera rostochiensis* und *G. pallida*

Die Zystenextraktion aus Bodenproben ist erforderlich bei Flächen aller Nutzungsrichtungen von Kartoffeln sowie bei (Baumschul-)Flächen, auf denen Pflanzen angebaut, eingeschlagen oder gelagert werden, die zum Verpflanzen vorgesehen sind.

a) Rechtliche Grundlage:

a 1) Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

§ 5: „Die in Anlage 4 Teil I Spalte 1 aufgeführten Pflanzen, Pflanzenerzeugnisse und sonstigen Gegenstände dürfen aus einem Drittland nur eingeführt werden, nachdem festgestellt ist, dass sie den in Spalte 2 jeweils aufgeführten Anforderungen entsprechen.“

Anlage 4 Teil I; 1.1.54: Kartoffelknollen: „Die Knollen müssen ferner von einer Anbaufläche stammen, die als frei vom Goldenen Kartoffelnematoden (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber (Behrens))) und vom Weißen Kartoffelnematoden (*Globodera pallida* (Stone) Behrens) festgestellt worden ist.“

§ 13b: „Die in Anlage 4 Teil II aufgeführten Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse dürfen innergemeinschaftlich nur verbracht werden, wenn sie den in Spalte 2 jeweils aufgeführten Anforderungen entsprechen.“

Anlage 4 Teil II, 1.1.5.3 c): Kartoffelknollen: „Die Knollen müssen ferner von einer Anbaufläche stammen, die als frei vom Goldenen Kartoffelnematoden (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber (Behrens))) und vom Weißen Kartoffelnematoden (*Globodera pallida* (Stone) Behrens) festgestellt worden ist.“

a 2) Richtlinie 69/465/EWG des Rates v. 08.12.1969 (Amtsblatt Nr. 28 v. 17.02.1967, S. 454):

Artikel 2: „Die Mitgliedstaaten schreiben vor, dass Pflanzkartoffeln, die gewerbsmäßig in den Verkehr gebracht werden sollen, nur auf Flächen erzeugt werden dürfen, bei denen in amtlicher Prüfung festgestellt worden ist, dass sie nicht von Kartoffelnematoden befallen sind.“

Artikel 3: „Wird ein Auftreten des Kartoffelnematoden festgestellt, so grenzen die Mitgliedstaaten die befallene Fläche ab.“

Artikel 4 a): „Die Mitgliedstaaten schreiben vor, dass auf den befallenen Flächen keine Kartoffeln angebaut werden dürfen.“

Artikel 4 b): „Die Mitgliedstaaten schreiben vor, dass auf den befallenen Flächen keine Pflanzen, die zur weiteren Anpflanzung bestimmt sind, angebaut, eingeschlagen oder gelagert werden dürfen.“

a 3) Verordnung zur Neuregelung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften zur Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel v. 05.06.2001 (BGBl. I S. 1006):

§ 3 (5): „Die zuständige Behörde stellt fest, welcher Rasse (...) die Kartoffelnematoden auf der befallenen Fläche angehören und teilt dies den Verfügungsberechtigten und den Besitzern der in der Sicherheitszone gelegenen Grundstücke mit.“

§ 2 (1): „Wird auf einer Anbaufläche das Auftreten eines Schadorganismus nach § 1 Abs. 1 [Anm.: in diesem Fall Kartoffelnematoden] festgestellt, so grenzt die zuständige Behörde eine Sicherheitszone ab.“

§ 3 (1) 1.: „In der Sicherheitszone dürfen keine Kartoffeln angebaut werden.“ [Anm.: Ausnahmen in § 3 (3). Die Vermehrung von Pflanzkartoffeln auch in Ausnahmefällen ist nicht gestattet.]

§ 3 (1) 2.: „In der Sicherheitszone dürfen bei Kartoffelnematoden keine Pflanzen, die zum Verpflanzen auf andere Flächen bestimmt sind, angebaut, eingeschlagen oder gelagert werden.“

a 4) Pflanzkartoffelverordnung v. 21.10.1986 (BGBl. I S. 192):

§ 8 (1): „Die Anforderungen an den Feldbestand ergeben sich aus Anlage 1...“

Anlage 1 Nr. 4: „Der Feldbestand darf einen Befall der Vermehrungsfläche mit Kartoffelnematoden nicht erkennen lassen.“

§ 9 (2): „Die Feldbesichtigungen werden nur durchgeführt, wenn der Anerkennungsstelle oder der von ihr bestimmten Stelle oder Person durch Vorlage einer Bescheinigung der zuständigen Behörde nachgewiesen wird, dass diese einen Befall mit Kartoffelnematoden auf der Vermehrungsfläche nicht festgestellt hat...“

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Probenahme:

Die Probenahme erfolgt nach einer wissenschaftlich anerkannten Methode (s. EPPO Standard PM 3/30), die repräsentative Ergebnisse erzielt. Beispiele: 1) Entnahme von regelmäßigen Bodenproben (4 oder 8 Mischproben je ha bei 400 Einstichen je ha mit einem Bodenprobenstecher n. GOFFART (1958). 2) Die Einstichzahl wird auf die Flächen-größe bezogen; Entnahme, auch mittels Spezialmaschinen wie z. B. GPS-gestützter Probenentnahmegerate. Ebenfalls möglich ist die Entnahme von Bodenproben nach regelmäßigem Raster und Abfüllen auf Biotestgefäße (Verfahren n. BEHRINGER, 1969 oder STELTER & TROMMER, 1983). Auf Konsumkartoffelflächen kann auch ein formgebundener Probenahmeweg angewandt werden. Zur allgemeinen Problematik der Probenahme s. z. B. BEEN & SCHOMAKER (1996).

Zystenisolierung:

Die Zystenextraktion gliedert sich in drei Schritte:

- 1) Vorbereitung der Bodenproben durch Trocknen
- 2) Mechanische Trennung der Zysten und gleich großer Partikel von der umgebenden Bodenmatrix und
- 3) weitere Trennung der Zysten von den restlichen Bodenpartikeln.

Zu 1) Vorbereitung der Bodenproben durch Trocknen:

Durch die Trocknung wird erreicht, dass Zysten in ihrem spezifischen Gewicht herabgesetzt und leichter als die meisten Bodenpartikel werden, weshalb sie sich dann in Flotationsverfahren durch Aufschwimmen isolieren lassen. Die Trocknung erfolgt in der Regel in Brut- oder Trockenschränken für zwei Tage bei einer Trocknungstemperatur von 30 – 35 °C: Feuchte Zysten überstehen dies ohne Beeinträchtigung der Infektiosität, höhere Temperaturen aber nicht.

Zu 2) Mechanische Trennung:

Für die mechanische Trennung kommen verschiedene Flotationsgeräte in Frage, wie z. B. die Fenwick-Kanne (FENWICK 1940), die Oostenbrink-Kanne (OOSTENBRINK 1950, zit. n. HAHN, 1954), die Schuiling-Zentrifuge (CLAYDEN et al. 1985) oder die Geräte des Pollähne-Systems.

Zu 3) Weitere Trennung:

Eine kritische Phase bei der Anwendung der Flotationsmethoden ist das Aussuchen der Zysten nach dem Spülvorgang aus der verbleibenden Menge an Bodenresten.

OOSTENBRINK (1950, zit. n. HAHN 1954) führte als Erleichterung die Verwendung einer weißen Porzellanschüssel ein, in die der Siebinhalt mit Leitungswasser eingespült wird. Durch Zugabe einiger Tropfen eines Spülmittels wird die Oberflächenspannung des Wassers herabgesetzt, so dass die meisten Zysten am Rand der Schale aufgefunden werden können.

Ebenfalls möglich ist die Nutzung von anderen Hilfsmitteln wie weitere Verteilung des gewonnenen Materials auf rechteckige Siebe oder auf mit Markierungen versehene Zählchalen. SCHUILING entwickelte zusätzlich zur Zentrifuge einen Flotationseparator (CLAYDEN et al. 1985), der in einem Folgeschritt nach dem Prinzip der Fenwick-Kanne eine weitere Trennung ermöglicht. Die Zysten werden dabei nach dem Auslauf auf Filterpapier gesammelt.

Die Schritte 2) und 3) sollten in einem möglichst kurzen Zeitraum ausgeführt werden, weil die Zysten sonst wieder Wasser aufnehmen und absinken. Als zusätzlicher Arbeitsschritt ist eine Abtrennung der Zysten in Aceton oder Alkohol möglich (s. z. B. SOUTHEY 1974). Dieser Schritt erfordert aber aus Gründen der Arbeitssicherheit geeignete Absauganlagen (Explosionsgefahr).

Literatur:

- BEEN, T. & SCHOMAKER, C. (1992): Sampling strategies for the detection of potato cyst nematodes: Developing and evaluating a model. S. 182-194 in GOMMERS, F.J.M. & MAAS, P.W. (eds.): Nematology from Molecule to Ecosystem. Dekker and Huisman, Wildervank, NL.
- BEHRINGER, P. (1969): Feststellung zystenbildender Nematoden mit dem Biotest im Vierkammergefäß. Mitt. Biol. Bundesanst. **136**, 5-6.
- CLAYDEN, J.J., TURNER, S.J. & MARKS, R.J. (1985): Comparison of the Fenwick can and Schuiling centrifuge methods for the extraction of potato cyst nematodes from soil. EPPO Bull. **15**, 285-287.
- EPPO Standard PM 3/30 (1998): *Globodera pallida* & *G. rostochiensis* soil sampling methods.
- FENWICK, D.W. (1940): Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. J. Helminth. **27** (3/4), 119-128.
- GOFFART, H. (1958): Methoden zur Bodenuntersuchung auf zystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **10** (4), 49-53.
- HAHN, S. (1954): Untersuchungsmethoden zum Nachweis des Kartoffelnematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **8**, 183-189.

STELTER, H. & TROMMER, R. (1983): Ein Verfahren zum Nachweis von Boden-
verseuchungen mit *Globodera rostochiensis*, Pathotyp 1. Nachrichtenbl. Pflanzen-
schutz DDR **37**, 56-58.

SOUTHEY, J.F. (1974): Methods for detection of Potato Cyst Nematodes.
EPPO Bulletin **4** (4), 463-473.

Biotest mit Bodenproben oder mit inokulierten Zysten von *Globodera rostochiensis* und *G. pallida*

Biotestverfahren nutzen die Reproduktion schlupfbereiter Individuen an den Wurzeln von Wirtspflanzen für den quantitativen und qualitativen Nachweis. Biotests werden u. a. eingesetzt als Mittel

1. des allgemeinen Befallsnachweises,
2. der Bestimmung der Arten- und Pathotypenzugehörigkeit von Kartoffelnematoden,
3. für Spezialzwecke (Resistenzprüfung, Überprüfung der Wirksamkeit vorhergegangener Bekämpfungsmaßnahmen usw.).

a) Rechtliche Grundlage:

a 1) Allgemeiner Befallsnachweis: s. Methode 1

a 2) Bestimmung der Arten- und Pathotypenzugehörigkeit von Kartoffelnematoden:

Verordnung zur Neuregelung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften zur Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel v. 05.06.2001 (BGBl. I S. 1006).

§ 3 (5): „Die zuständige Behörde stellt fest, welcher Rasse (...) die Kartoffelnematoden auf der befallenen Fläche angehören und teilt dies den Verfügungsberechtigten und den Besitzern der in der Sicherheitszone gelegenen Grundstücke mit.“

a 3) für Spezialzwecke: z. B. nach Saatgutverkehrsrecht

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Probenahme:

Für den allgemeinen Befallsnachweis

Die Probenahme erfolgt nach einer wissenschaftlich anerkannten Methode (s. EPPO-Standard PM 3/30), die repräsentative Ergebnisse erzielen kann. Beispiele: 1) Entnahme von regelmäßigen Bodenproben (4 oder 8 Mischproben je ha bei 400 Einstichen je ha mit einem Bodenprobenstecher n. GOFFART (1958). 2) Die Einstichzahl wird auf die Flächengröße bezogen, Entnahme auch mittels Spezialmaschinen wie z. B. GPS-gestützter Probenentnahmegерäte. Auf Konsumkartoffelflächen kann auch ein formgebundener Probenahmeweg angewandt werden.

Die Art der Probenahme ist i. d. R. in den Bundesländern per Dienstanweisung geregelt. Für Baden-Württemberg gilt z. B.: 8 Bodenproben je ha, je angefangene 12,5 ar 1 Bodenprobe, bestehend aus ca. 200 cm³ Boden à ca. 40 Einstiche. Es werden nur die obersten 5 cm beprobt. Der Boden einer Probe wird direkt in die Biotestgefäße gefüllt. (Dienstanweisung des MLR vom 08.12.95).

Für die Bestimmung der Arten- und Pathotypenzugehörigkeit

Für diese Zwecke liegen in der Regel bereits isolierte Zysten vor. Es ist auch möglich, z. B. Proben aus Befallsherden zu ziehen und direkt auf die Biotestgefäße abzufüllen. Diese Probenahme erfolgt situationsbedingt. Einheitliche methodische Vorschriften gibt es nicht.

Biotest:

Verwendet werden (standardisierte) Gefäße von einem Volumen bis ca. 300 ml. Am besten bewährt haben sich bisher die eckigen Vierkammergefäße nach BEHRINGER, die allerdings nicht mehr hergestellt werden; ersatzweise können auch andere Plastikbehälter wie z. B. Einkammergefäße aus möglichst hartem und klarem Material verwandt werden, die am Boden mit Wasserablauföffnungen (z. B. mit einem LötKolben gebrannt) versehen sind. In diese Gefäße wird entweder a) die auf dem Acker gezogene Bodenprobe oder b) sterilisierte Einheitserde abgefüllt. Im Fall b) wird eine Suspension mit definierter Zahl an Eiern und Larven oder mit unverletzten Zysten eingespült oder auf anderem Wege in die Erde eingebracht.

Hinweis: Der Inhalt frischer Zysten ist nicht sofort und im vollen Umfang schlupfbereit. Besonders dann, wenn die Zysten vorher vom Versuchsansteller vorvermehrt wurden, hat sich eine „Ruhe- und Reifezeit“ von ca. sechs Monaten vor der Eingabe in die Biotestgefäße als notwendig erwiesen. Wenn die Gefäße im Gewächshaus weiter betreut werden sollen, ist es zweckmäßig, die Versuche wegen dann besseren und homogeneren Pflanzenwachstums zu geeigneten Zeiträumen anzusetzen, z. B. November – Mai. Bei der langen Zeit der Aufstellung (minimal sechs Wochen) kommt es im Gewächshaus außen und innen in den Gefäßen regelmäßig zu Algen- und Moosbildung, wenn nicht geeignete Gegenmaßnahmen ergriffen werden. Diese grünen Schichten erschweren die präzise Zystenzählung erheblich und sollten unbedingt vermieden werden, z. B. durch Einstellen der Gefäße zwischen Styroporplatten, Abdeckung mit schwarzer Folie mit Stanzlöchern o. ä.

Nach der Eingabe des Nematodenmaterials werden Augenstecklinge der ausgewählten Testsorten (mit Stechlöffel aus der Knolle ausgestochen) aufgelegt und angedrückt. Die Gefäße werden an geeigneter Stelle aufgestellt und feucht gehalten. Nach ca. 6-8 Wochen werden die Pflanzenstängel abgeschnitten und die neugebildeten Zysten werden an den von außen erkennbaren Wurzeln je Gefäß zahlenmäßig erfasst. Falls erforderlich, kann auch der Wurzelballen ausgewaschen und alle Wurzeln optisch bonitiert sowie die Erde ausgeschlämmt und bonitiert werden. Die Bonitur erfolgt zweckmäßig mit optischen Hilfsmitteln (Leuchtlupe o. ä.).

Literatur:

- BEHRINGER, P. (1967): Lebenduntersuchung auf Kartoffelnematoden in Einweggefäßen. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **19** (2), 21-23.
- BEHRINGER, P. (1969): Feststellung zystenbildender Nematoden mit dem Biotest im Vierkammergefäß. Mitt. Biol. Bundesanst. **136**, 5-7.
- EPPO Standard PM 3/30 (1998): *Globodera pallida* & *G. rostochiensis* soil sampling methods.
- KORT, J., ROSS, H., RUMPENHORST, H.J. & STONE, A.R. (1977): An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Nematologica **23**, 333-339.

Zystenextraktion aus Knollenanhangerde bei *Globodera rostochiensis* und *G. pallida*

Die Zystenextraktion aus Knollenanhangerde ist eine Maßnahme, die von einigen Importländern gefordert wird (Exportpartie ohne vorhergehenden Nachweis von Befall auf der Produktionsfläche), bei Importkontrollen an den Grenzen zu Nichtmitgliedstaaten durchgeführt wird und letztlich die Kontrolle einzelner Chargen auch im Handel innerhalb der EU zulässt. Die Nachweisverfahren entsprechen denen der Anlage 1, Unterschiede ergeben sich lediglich bei der Probenahme.

a) Rechtliche Grundlage:

a 1) **Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):§ 5:**

„Die in Anlage 4 Teil I Spalte 1 aufgeführten Pflanzen, Pflanzenerzeugnisse und sonstigen Gegenstände dürfen aus einem Drittland nur eingeführt werden, nachdem festgestellt ist, dass sie den in Spalte 2 jeweils aufgeführten Anforderungen entsprechen.“

Anlage 4 Teil I; 1.1.54: Kartoffelknollen: „Die Knollen müssen ferner von einer Anbaufläche stammen, die als frei vom Goldenen Kartoffelnematoden (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber (Behrens)) und vom Weißen Kartoffelnematoden (*Globodera pallida* (Stone) Behrens) festgestellt worden ist.“

§ 13b: „Die in Anlage 4 Teil II aufgeführten Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse dürfen innergemeinschaftlich nur verbracht werden, wenn sie den in Spalte 2 jeweils aufgeführten Anforderungen entsprechen.“

Anlage 4 Teil II, 1.1.5.3 c): Kartoffelknollen: „Die Knollen müssen ferner von einer Anbaufläche stammen, die als frei vom Goldenen Kartoffelnematoden (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber (Behrens)) und vom Weißen Kartoffelnematoden (*Globodera pallida* (Stone) Behrens) festgestellt worden ist.“

a 2) **Richtlinie 69/465/EWG des Rates v. 08.12.1969 (Amtsbl. Nr. 28 v. 17.02.1967, S. 454):**

Artikel 2: „Die Mitgliedstaaten schreiben vor, dass Pflanzkartoffeln, die gewerbsmäßig in den Verkehr gebracht werden sollen, nur auf Flächen erzeugt werden dürfen, bei denen in amtlicher Prüfung festgestellt worden ist, dass sie nicht von Kartoffelnematoden befallen sind.“

Artikel 3: „Wird ein Auftreten des Kartoffelnematoden festgestellt, so grenzen die Mitgliedstaaten die befallene Fläche ab.“

Artikel 4 a): „Die Mitgliedstaaten schreiben vor, dass auf den befallenen Flächen keine Kartoffeln angebaut werden dürfen.“

Artikel 4 b): „Die Mitgliedstaaten schreiben vor, dass auf den befallenen Flächen keine Pflanzen, die zur weiteren Anpflanzung bestimmt sind, angebaut, eingeschlagen oder gelagert werden dürfen.“

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Probenahme:

Das Ziel der Probenahme ist es, soviel Anhangerde zu gewinnen, dass sich Hinweise darauf ergeben können, ob mit der Lieferung infektiöses Nematodenmaterial verschleppt wird. Eine standardisierte systematische Methode kann wegen der unterschiedlichen Sauberkeit der Chargen und der Transportbehälter (von gewaschen und gebürstet bis hin zu annähernd ungereinigt) nicht genannt werden. Je nach Zustand der Kartoffel-

charge ist eine angepasste Methode der Erdgewinnung anzuwenden: Zusammenfegen von Erdresten auf dem Boden von Containern, Abbürsten von Knollen mit anhaftender Erde, Ausschütten von Säcken usw. Die gewonnene Erdmenge ist dann je nach zur Verfügung stehender Zeit weiter zu untersuchen.

Zystenisolierung:

Die Extraktion der Zysten gliedert sich in drei Schritte:

- 1) Vorbereitung der Erdproben durch Trocknen,
- 2) mechanische Trennung der Zysten und gleich großer Partikel von der umgebenden Bodenmatrix und
- 3) weitere Trennung der Zysten von den restlichen Bodenpartikeln.

Zu 1) Vorbereitung der Erdproben durch Trocknen

Durch die Trocknung wird erreicht, dass Zysten meistens in ihrem spezifischen Gewicht herabgesetzt und leichter als die Bodenpartikel werden, weshalb sie sich dann in Flotationsverfahren durch Aufschwimmen isolieren lassen. Die Trocknung erfolgt in der Regel in Brut- oder Trockenschränken für zwei Tage bei einer Trocknungstemperatur von 30 – 35° C: Feuchte Zysten überstehen dies ohne Beeinträchtigung der Infektiosität, höhere Temperaturen aber nicht.

Zu 2) Mechanische Trennung

Für die mechanische Trennung kommen verschiedene Flotationsgeräte in Frage wie z. B. die Fenwick-Kanne (FENWICK 1940), die Oostenbrink-Kanne (OOSTENBRINK 1950, zit. n. HAHN 1954), die Schuiling-Zentrifuge (CLAYDEN et al. 1985) oder die Geräte des Pollähne-Systems.

Zu 3) Weitere Trennung

Eine kritische Phase bei der Anwendung der Flotationsmethoden ist das Aussuchen der Zysten nach dem Spülvorgang aus der verbleibenden Menge an Bodenresten. OOSTENBRINK (1950, zit. n. HAHN 1954) führte als Erleichterung die Verwendung einer weißen Porzellanschüssel ein, in die der Siebinhalt mit Leitungswasser eingespült wird. Durch Zugabe einiger Tropfen eines Spülmittels wird die Oberflächenspannung des Wassers herabgesetzt, so dass die meisten Zysten am Rand der Schale aufgefunden werden können.

Ebenfalls möglich ist die Nutzung von anderen Hilfsmitteln wie weitere Verteilung des gewonnenen Materials auf rechteckige Siebe oder auf mit Markierungen versehene Zählchalen. SCHUILING entwickelte einen Flotationseparator (CLAYDEN et al. 1985), der nach der Art der Fenwick-Kanne eine weitere Trennung ermöglicht. Die Zysten werden dabei nach dem Auslauf auf Filterpapier gesammelt.

Die Zeitdauer, in der die Schritte 2) und 3) ausgeführt werden, sollte so kurz wie möglich sein, weil die Zysten sonst wieder Wasser aufnehmen und absinken. Als zusätzlicher Arbeitsschritt ist eine Abtrennung der Zysten in Aceton oder Alkohol möglich. Dieser Schritt erfordert aber aus Gründen der Arbeitssicherheit geeignete Absauganlagen (Explosionsgefahr).

Steht nur wenig Zeit zur Verfügung (z. B. bei Grenzkontrollen), so wird auch auf die oben genannten Schritte verzichtet und nach dem Siebschlammverfahren gearbeitet: Zwei Stecksiebe (oben 1 mm Maschenweite, unten 0,25 mm Maschenweite) werden zusammengefügt, die gewonnene Erde auf das obere Sieb gegeben und der Siebsatz dann mit

einer Handbrause gespült, bis keine Partikel mehr ausgewaschen werden. Die Rückstände werden (Siebe umdrehen, aufspülen) in einer weißen Porzellanschüssel o. ä. gesammelt und optisch unter einer Leuchtlupe oder einem Stereoskop auf Zysten gemustert.

Literatur:

- CLAYDEN, J.J., TURNER, S.J. & MARKS, R.J. (1985): Comparison of the Fenwick can and Schilling centrifuge methods for the extraction of potato cyst nematodes from soil. *EPPO Bull.* **15**, 285-287.
- FENWICK, D.W. (1940): Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodere schachtii* from soil. *J. Helminth.* **27** (3/4), 119-128.
- GOFFART, H. (1958): Methoden zur Bodenuntersuchung auf zystenbildende Nematoden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)* **10** (4), 49-53.
- HAHN, S. (1954): Untersuchungsmethoden zum Nachweis des Kartoffelnematoden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)* **8**, 183-189.

Elektrophorese zum Arten- und Pathotypennachweis bei *Globodera rostochiensis* und *G. pallida*

Während der Biotest aus biologischen Gründen eine nicht verkürzbare Bearbeitungsdauer von mindestens sechs Wochen erfordert, kann es aus sachlichen Gründen (Exportuntersuchungen o. ä.) erforderlich sein, mittels biochemischer Verfahren eine schnellere Bestimmung durchzuführen (1-2 Tage). Solche Verfahren können z. B. sein: Elektrophorese, Isoelektrische Fokussierung, serologische Methoden oder PCR. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die zweidimensionale Gelelektrophorese der Proteine. Einschränkend muss festgehalten werden, dass mit biochemischen Verfahren auch nur biologisch voneinander eindeutig abgegrenzte Organismengruppen zu trennen sind. Der Aufteilung der Kartoffelnematoden in Arten liegt eine solche klare Differenzierung zugrunde, nicht aber der Aufteilung in alle Pathotypen.

a) Rechtliche Grundlage:

Verordnung zur Neuregelung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften zur Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel v. 05.06.2001 (BGBl. I S. 1006):

§ 3 (5): „Die zuständige Behörde stellt fest, welcher Rasse (...) die Kartoffelnematoden auf der befallenen Fläche angehören und teilt dies den Verfügungsberechtigten und den Besitzern der in der Sicherheitszone gelegenen Grundstücke mit.“

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Probenahme:

Verwendet werden können nur bereits isolierte und gesäuberte Einzelzysten.

Methode: s. Literatur

Literatur:

- BAKKER, J. & GOMMERS, F.J. (1982): Differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* and of two *Globodera rostochiensis* pathotypes by means of two-dimensional electrophoresis. Proc. Kon. Nederl. Akad. v. Wetensch., Series C 85 (3), 309-314.
- OHMS, J.P. & HEINICKE, D. (1985): Pathotypen der Kartoffelnematoden. II. Bestimmung der Rassen von *Globodera rostochiensis* durch die Mikro-2D-Elektrophorese von Einzelzysten. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz 92 (3), 225-232.
- STEGEMANN, H. & RUMPENHORST, H.J. (1982): Differenzierung der Nematoden *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* durch ein- und zweidimensionale Elektrophoresen ihrer Proteine. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 43 (1), 1-7.

Untersuchung von Kartoffelknollen (Pflanzkartoffeln) auf Befall mit Kartoffelkrätzeälchen (*Ditylenchus destructor*)

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.

A 2: Pflanzen außer Samen

Pflanzkartoffelverordnung v. 21.10.1986 (BGBl. I S. 192):

§ 13, § 18: Beschaffenheitsprüfung bzw. Prüfung auf Knollenkrankheiten und äußere Mängel

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Für die hier dargestellte Vorgehensweise bei Probenahme und Untersuchung existiert noch keine etablierte Methode. Folgende Techniken erscheinen geeignet:

Beschaffenheitsprüfung durch vereidigte Probenehmer der Saatgutankennungsstelle (LUFA):

Bei der Prüfung auf äußere Mängel einer Pflanzkartoffelpartie ist auf folgende Symptome zu achten:

Dicht unter der Schale von befallenen Knollen bilden sich zunächst kleine weiße Flecke. Diese sinken später ein, vergrößern sich und verfärben sich über grau zu braun oder schwarz. Bei fortgeschrittenem Befall wird die Schale papierartig dünn und reißt letztlich auf. Darunter ist eine korkartige, krümelige, trockenfaule Masse sichtbar. Befallene Knollen schrumpfen während der Lagerung ein und können sekundär von Fäulnisregnern befallen werden (BRAASCH 1992).

Der Befall in den Knollen und damit auch die Symptomausprägung nimmt bei längerer Lagerdauer zu, erste Befallssymptome sind zunächst noch unauffällig und kaum zu erkennen. Da sich der Befall während der Lagerung von Knolle zu Knolle ausbreiten kann, sind in der Regel alle Stadien der Symptomausprägung in einer betroffenen Partie zu finden.

Probenahme:

Werden verdächtige Knollen festgestellt, so sind 5 – 10 Knollen im Plastikbeutel verpackt und mit einem Probenbegleitschreiben mit den entsprechenden Angaben zur Probe umgehend der zuständigen amtlichen Untersuchungsstelle zu überbringen.

Untersuchung:

Für die Laboruntersuchung werden die verdächtigen Gewebestücke aus der Kartoffelknolle herausgeschnitten und zerkleinert. In befallenen Knollengewebe sind alle Stadien von *Ditylenchus destructor* vorhanden und können mit der Baermann-Trichter-Methode (GOFFART 1959) gewonnen werden. Auf einen Baermann-Trichter nicht mehr als 30 g Knollenmaterial auftragen, da sonst die Stärkekörner die mikroskopische Auswertung behindern. Nach 48 h werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft

(Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung der adulten Tiere sowie der Larven nach HOOPER (1973).

Literatur:

BRAASCH, H. (1992): *Ditylenchus destructor*. BBA Informationsblatt Nr. 002 (2/94).

EPPO: *Ditylenchus destructor* – Data sheets on quarantine pests.

GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.

HOOPER, D.J. (1973): *Ditylenchus destructor*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 2, No. 21.

Untersuchung von Kartoffelknollen (Pflanz- und Konsumkartoffeln) auf Befall mit Wurzelgallenälchen (*Meloidogyne chitwoodi* und *Meloidogyne fallax*)

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

- Anlage 1: Schadorganismen, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen verboten ist.
- Anlage 4: Teil 1: Pflanzen, Pflanzenerzeugnisse und sonstige Gegenstände mit Ursprung oder Herkunft aus einem Drittland.
- Anlage 4: Teil 2: Pflanzen, Pflanzenerzeugnisse und sonstige Gegenstände mit Ursprung in der Gemeinschaft.
Stammen die importierten Knollen aus einem Gebiet, in dem das Auftreten von *M. chitwoodi* bzw. *M. fallax* bekannt ist, muss anhand von Labortests, visuellen Kontrollen und Schneiden der Knollen auf evtl. Befall untersucht werden.

Pflanzkartoffelverordnung v. 21.10.1986 (BGBl. I S. 192):

- § 13, § 18: Beschaffenheitsprüfung bzw. Prüfung auf Knollenkrankheiten und äußere Mängel

Anlässe für Untersuchungen: Deutschland ist zur Zeit noch befallsfrei. Kontrolliert und labortechnisch untersucht werden muss daher nur die Ware, die aus einem Befallsland (z. B. Niederlande) importiert wird. Da nicht auszuschließen ist, dass *M. chitwoodi* bzw. *M. fallax* nach Deutschland eingeschleppt werden könnte, sollte bei der Beschaffenheitsprüfung im Rahmen der Prüfung auf äußere Mängel auch auf die von den Wurzelgallenälchen verursachten Symptome geachtet werden.

Beschaffenheitsprüfung durch vereidigte Probenehmer der Saatgutankennungsstelle (LUFA):

Bei der Prüfung auf äußere Mängel einer Pflanzkartoffelpartie ist auf folgende Symptome zu achten:

Typische Befallssymptome sind unregelmäßige Anschwellungen an den Kartoffelknollen sowie braune Läsionen in der Schale. Verdächtige Knollen herausnehmen und durchschneiden. Bei befallenen Knollen ist das Gewebe bis ca. 1 cm Tiefe bräunlich bzw. nekrotisch, in diesem Bereich sind die weißen Weibchen sichtbar. Das innere Gewebe ist symptomlos. Die äußerlichen Symptome sind sehr variabel. Kartoffelknollen können auch stark befallen sein, ohne dass auffällige äußere Symptome vorhanden sind. Kontrollen mit Schnittproben einzelner Knollen sind bei Importen aus Befallsländern auch ohne sichtbare Schadsymptome durchzuführen.

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Für die hier dargestellte Vorgehensweise bei Probenahme und Untersuchung existiert noch keine etablierte Methode. Folgende Techniken erscheinen geeignet:

Probenahme:

Werden verdächtige Knollen festgestellt, so sind 5 – 10 Knollen im Plastikbeutel verpackt und mit einem Probenbegleitschreiben mit den entsprechenden Angaben zur Probe umgehend der zuständigen amtlichen Untersuchungsstelle zu überbringen.

Untersuchung:

Für die Laboruntersuchung werden verdächtige Gewebestücke aus der Kartoffelknolle herausgeschnitten. Aus dem Knollengewebe können die weißen Weibchen mitsamt deren Eipaketen direkt herauspräpariert werden. Nach Präparation der Hinterenden der Weibchen kann das Perinealmuster zur Artbestimmung verwendet werden (JEPSON 1985 und KARSSSEN 1996). Die Larven schlüpfen, wenn die Eimassen für einige Tage bei Raumtemperatur in Wasser aufbewahrt werden (BRAASCH 1994). Mikroskopische Bestimmung der Larven nach JEPSON (1985) und KARSSSEN (1996).

Wenn eine Sprühanlage nach SEINHORST (1950) vorhanden ist, kann darin befallenes Knollengewebe untersucht werden. Die Larven schlüpfen nach wenigen Tagen aus den Eimassen.

Die Unterscheidung zwischen *M. chitwoodi* und *M. fallax* ist morphologisch schwierig. Unterschiede treten aber im Bandenmuster bei der Elektrophorese auf, die eine eindeutige Artdifferenzierung zulassen. Zudem sind Unterschiede im Wirtspflanzenspektrum vorhanden (EPPO Data Sheets).

Literatur:

- BRAASCH, H. (1994): *Meloidogyne chitwoodi*. BBA Informationsblatt Nr. 007 (1/94).
- EPPO: *Meloidogyne chitwoodi* und *M. fallax* – Data sheets on quarantine pests.
- GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.
- JEPSON, B. J. (1985): *Meloidogyne chitwoodi*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 8, No. 106.
- KARSSSEN, G. (1996): Description of *Meloidogyne fallax* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae), a root-knot nematode from the Netherlands. Fundamental and applied Nematology **19**, 593-599.
- SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev). Tijdschr. Plantenziekten **56**, 291-294.

Untersuchung von Nadelholz (außer in Form von Schnitzeln, Spänen, Holzabfall oder Holzausschuss, Verpackungskisten, Lattenkisten, Fässern, Paletten, Kistenpaletten, Stauholz) mit Ursprung in China, Japan, Kanada, Korea, Taiwan oder den USA auf *Bursaphelenchus xylophilus* sowie seiner Vektoren (*Monochamus* spp.)

Beispiel: Import von Blockhäusern aus den USA oder Kanada

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 1: Schadorganismen, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen verboten ist (*Monochamus* spp.).

Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.

Anlage 4: Besondere Anforderungen für die Einfuhr aus einem Drittland und das innergemeinschaftliche Verbringen von Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und sonstigen Gegenständen.

Teil 1: mit Ursprung in oder Herkunft aus einem Drittland:

E Forstpflanzen, 2.2 Holz, Absatz 2.2.4.1:

- Holz von Nadelbäumen (Coniferales) mit **Ursprung in China, Japan, Kanada, Korea, Taiwan oder den USA** außer Thuja:

Das Holz muss 30 Minuten auf eine Kerntemperatur von mindestens 56 °C erhitzt worden sein (Hitzebehandlung). Die Ofentrocknung kann mit einer international anerkannten **Kennzeichnung** („Kiln-dried“ oder „K.D.“) nachgewiesen werden.

- Holz von Thuja muss entrindeet und frei von Wurmlöchern sein, die größer als 3 mm im Durchmesser sind und den Fraß von *Monochamus*-Arten anzeigen.

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Visuelle Kontrolle der Importware auf Austrittslöcher der Käfer (> 3 mm Durchmesser), vorhandene Rindenreste und (oder) Blaufäule an mindestens 5 % der Holzoberfläche einer Sendung, Stichprobenuntersuchungen auch bei unauffälligem Holz. Bei unregelmäßigkeiten in den Begleitpapieren (fehlende Hitzebehandlung) muss eine Probe entnommen werden:

Probenahme:

Die Probenahme kann mit einem Handbohrer (Schlangenbohrer, Forstner-Bohrer), einer Säge oder einer Axt erfolgen, wobei eine Erhitzung der Holzspäne unbedingt vermieden werden muss. In den Containern bzw. Waggons ist die zu kontrollierende Ware oftmals nur schwer zugänglich, über die Probenahme muss daher in Abhängigkeit der jeweiligen Situation entschieden werden. Der Probenumfang sollte pro Einheit mindesten 300 g Holz betragen. Aufbewahrung und Transport der Mischproben in Plastikbeuteln.

Untersuchung:

Zerkleinerung der groben Holzstücke mit einer Schneidmühle auf Partikel von maximal 1 cm Länge. Pro Mischprobe Untersuchung von mindestens 150 g zerkleinertem Holz für 48 Stunden nach der Baermann-Trichter-Methode (GOFFART 1959) oder in der Sprühanlage (SEINHORST 1950). Sammeln des Ablasses von den Trichtern einer Probe in einem Gefäß. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung. Diagnose mit Hilfe des „EPPO Diagnostic protocol“ für *Bursaphelenchus xylophilus* sowie des EPPO Data Sheet „*Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors *Monochamus alternatus* and *Monochamus carolinensis*“.

Literatur:

EPPO (2011): *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/4 (1).

EPPO: *Bursaphelenchus xylophilus* – Data sheets on quarantine pests.

GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 11, 49-54.

SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev) Tijdschr. Plantenziekten 56, 291-294.

Untersuchung von Verpackungsholz auf *Bursaphelenchus xylophilus* sowie seiner Vektoren (*Monochamus* spp.)

a) Rechtliche Grundlage:

a 1) Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

- Anlage 1: Schadorganismen, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen verboten ist (*Monochamus* spp.).
- Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.
- Anlage 4: Besondere Anforderungen für die Einfuhr aus einem Drittland und das innergemeinschaftliche Verbringen von Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und sonstigen Gegenständen.

Teil 1: mit Ursprung in oder Herkunft aus einem Drittland:

E Forstpflanzen, 2.2 Holz, Absatz 2.2.4.3:

- Holz von Nadelbäumen (außer Thuja) mit **Ursprung in China, Japan, Kanada, Korea, Taiwan oder den USA** in Form von Verpackungskisten, Latteboxen, Fässern, Paletten, Kistenpaletten oder anderen Ladeplanken, Stauholz, Distanzstücken oder Trägern muss frei von Wurmlöchern sein, die größer als 3 mm im Durchmesser sind und den Fraß von *Monochamus*-Arten anzeigen. Feuchtigkeitsgehalt nach Ofentrocknung max. 20 %.

Absatz 2.2.4.4: Holz in Form von Schnitzeln, Spänen, Holzabfall oder Holzausschuss mit **Ursprung in China, Japan, Kanada, Korea, Taiwan oder den USA**: Das Holz muss während dem Transport in einem Behältnis (Container) entseucht worden sein. Die Behälter müssen verplombt sein.

Thuja mit **Ursprung in China, Japan, Kanada, Korea, Taiwan oder den USA**: Holz muss entrindet und frei von Wurmlöchern > 3 mm sein. Keine Anzeichen von Fraß von *Monochamus*-Arten.

a 2) Entscheidung der EU-Kommission 2001/219/EG vom 12.03.2001 über:

Befristete Sofortmaßnahmen in Bezug auf ganz oder teilweise aus unbehandeltem Nadelholz hergestelltem Verpackungsmaterial mit **Ursprung in Kanada, China, Japan und den USA**:

Ab dem 1. Oktober 2001 gilt: Verpackungsholz aus China, Japan, Kanada und den USA muss

- eine Hitzebehandlung, 30 min bei 56 °C, oder
- eine Druckimprägnierung nach einem anerkannten Verfahren, oder
- eine Begasung mit einem zugelassenen chem. Mittel (z. B. Methylbromid) durchlaufen haben.

Jedes Packstück muss mit einer international anerkannten **Kennzeichnung** versehen sein, aus der die jeweils durchgeführte Behandlung eindeutig hervorgeht. Für Verpackungsholz aus China ist zusätzlich ein Pflanzengesundheitszeugnis (PGZ) erforderlich.

In Bezug auf Verpackungsholz aus Nadelholz erweitert die EU-Entscheidung 2001/219/EG insbesondere mit der Kennzeichnungspflicht die Bestimmungen der Pflanzenbeschauverordnung und setzt sie damit in diesem Punkt außer Kraft.

Der Kontrollablauf und Maßnahmen bei Holzverpackungen aus Japan, Kanada, USA und China nach Entsch. 2001/219/EG sind in einem Übersichtsblatt von der BBA dargestellt worden (BBA, Unger/Pfeilstetter, 30.11.01).

Wesentliche Kriterien bei der Kontrolle sind dabei:

Nadelholz (ja/nein); die **Kennzeichnung** (vorhanden oder fehlend) und das evtl. Vorhandensein von **Verdachtsmerkmalen** (Bohrlöcher > 3 mm, Rinde, Holzfeuchte deutlich über 20 %, frische Blaufäule).

Bei Kontrollen von Holzverpackungen aus Nadelholz ohne Gründe für Beanstandungen: Um die Einhaltung, der auf der Kennzeichnung bzw. dem PGZ angegebenen Maßnahmen zu überprüfen, werden nach Ermessen des Pflanzenbeschauinspektors Stichproben entnommen. Wird *B. xylophilus* nachgewiesen, muss die Vernichtung des Verpackungsholzes oder eine Behandlung nach einem amtlich zugelassenen Verfahren zur Abtötung des Nematoden angeordnet werden.

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Kontrollstellen, Orte für die Probenahme:

- Grenzeinlassstellen
- Betriebe mit Importen, die Koniferenpackholz aus Befallsländern enthalten (z. B. Elektronik, Autoindustrie, Granit)
- Lagerplätze für Packholz

Probenahme:

Werden Verdachtsmerkmale festgestellt, muss eine Beprobung des Holzes erfolgen und auf den Kiefernholznematoden untersucht werden. Die Art und Weise der Probenahme sowie der Umfang muss der jeweiligen Situation angepasst werden. Die Probenahme sollte nach Möglichkeit an mehreren Stellen erfolgen und kann mit einem Handbohrer (Schlangenbohrer), einem Akkubohrer (mit Forstner-Bohrer) oder einer Kettensäge erfolgen, wobei eine Erhitzung der Holzspäne unbedingt vermieden werden muss. Der Probenumfang einer Mischprobe sollte mindesten 300 g Holz betragen.

Untersuchung:

Zerkleinerung des Holzes (wenn erforderlich) mit einer Schneidmühle auf Partikel von maximal 1 cm Länge. Untersuchung von mindestens 30 g zerkleinertem Holz pro Verpackungsstück oder 150 g pro Sendung aus Mischproben für 48 Stunden in der Sprühanlage (SEINHORST 1950) oder nach der Baermann-Trichter-Methode (GOFFART 1959). Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Untersuchung des Extraktes. Diagnose mit Hilfe des „EPPO Diagnostic protocol“ für *Bursaphelenchus xylophilus* sowie des EPPO Data Sheet „*Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors *Monochamus alternatus* and *Monochamus carolinensis*“.

Im Verdachtsfall muss eine Bestätigung durch die BBA erfolgen.

Morphologische Referenzuntersuchung im Verdachtsfall:

Versand in gut verschlossenen Röhrchen in Wasser an die BBA/AG/ (Dr. Schröder).

Molekularbiologische Identifizierung und Verifizierung:

Mittels ITS-RFLP durch die BBA/PS/ (Dr. Burgermeister).

Literatur:

EPPO (2001): *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/4 (1).

EPPO: *Bursaphelenchus xylophilus* – Data sheets on quarantine pests.

GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.

SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev) Tijdschr. Plantenziekten **56**, 291-294.

Untersuchung von Rindenumus, Kultursubstraten, Pflanzen mit und ohne Wurzeln sowie anhaftender Erde auf Quarantänenematoden und schädliche Nematoden allgemein

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Betroffen sind die in den Anlagen 1, 2 und 4 der o. g. Verordnung aufgeführten Quarantänenematodenarten, die im Boden (Kultursubstraten) freilebend oder in Pflanzen vorhanden sein können sowie schädliche Nematodenarten, deren Adulte, Larven- und Dauerstadien (Zysten) im Boden (Kultursubstraten) vorhanden sein können. Zu beachten sind hierbei auch die Einfuhrverbote von Pflanzen und deren Erzeugnissen in die Gemeinschaft bzw. das innergemeinschaftliche Verbringen gemäß der Anlage 3 und die speziellen Anforderungen für Einfuhren und Verbringen entsprechend der Anlage 4.

Eine Untersuchung kann erforderlich sein z. B. beim Export/Import von Kompostsubstraten oder Blumenerden bzw. sonstiger Kultursubstrate, oder auch beim Export/Import von bewurzelten Pflanzen. Betroffen ist hiervon vor allem Baumschulware für Anpflanzungen im Freiland oder im Gewächshaus, aber auch der Handel mit Blumenerden und Rindensubstraten. Auch Zierpflanzen, die nicht für Pflanzungen im Freiland bestimmt sind, sind diesen Regelungen unterworfen.

b) Probenahme und Untersuchungsmethode:

Probenahme:

Art und Weise sowie der Umfang der Probenahme sind nicht festgelegt, folgender Mindestaufwand sollte nicht unterschritten werden:

Rindenumus und Kultursubstrate: Von mehreren Stellen einer Import/Exportsendung sind mindestens zehn Einzelproben zu entnehmen und zu einer Mischprobe zu vereinen. Die Probenmenge einer Mischprobe sollte 1000 ml nicht unterschreiten.

Pflanzen mit anhaftender Erde: Die Probenahme kann entweder mit einem geeigneten kleinen Bohrstock oder aber nach Entfernen des Topfes durch Entnahme von etwas Erde pro Topf erfolgen. Es ist dabei darauf zu achten, dass von den beprobten Pflanzen auch Wurzeln für die Untersuchung auf endoparasitisch lebende Nematoden (z. B. *Radopholus* spp., *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp.) entnommen werden. Die Wurzeln können zusammen mit der Bodenprobe oder getrennt in Plastikbeuteln verpackt werden. Die Probemenge sollte pro Einheit mindestens 500 ml Erde (Kultursubstrat) betragen. Die Zahl der untersuchten Pflanzen muss an den Umfang der gesamten Partie angepasst werden.

Untersuchung:

Für die Untersuchung auf Nematoden in Kultursubstraten und Wurzeln kann nach dem EPPO Standard *Phytosanitary Procedure „Testing growing medium and plants in growing medium“* vorgegangen werden. Nachfolgende Ausführungen sollen die methodischen Möglichkeiten aus nematologischer Sicht ergänzen und beschreiben weitere, zum Teil aufwändigere Extraktionsmöglichkeiten.

Bei erforderlicher gleichzeitiger Untersuchung auf zystenbildende und freilebende Nematoden muss die zu untersuchende Mischprobe geteilt werden. Die Untersuchung auf Zysten nematoden erfolgt dann wie in Methode 1 beschrieben. Die auf freilebende Arten ist abhängig vom Substrat:

Rindenumus und Kultursubstrate: Je Mischprobe 300 g Wurzelanhangerde bzw. -substrat auf mehrere Baermann-Trichter (GOFFART 1959) verteilen, und zwar direkt ohne vorherige Aufbereitung der Probe. Die Erdschicht auf dem Trichter sollte nicht dicker als 5 mm sein. Sofern die Beschaffenheit der Probe es zulässt, werden effektivere Extraktionsmethoden empfohlen (siehe unten). Sammeln des Ablasses von den Trichtern einer Probe in Reagenzgläsern. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung.

Zierpflanzen mit anhaftender Erde: Extraktion der Nematoden aus 250 ml Erde einer Mischprobe nach einem der folgenden Verfahren:

- Sieb-Dekantiermethode + Baermann-Trichter
- Sieb-Schüttelmethode + Baermann-Trichter
(mit Retsch-Laborsiebmaschine, Methode nach KNUTH, 1993)
- Seinhorst-Elutriator + Baermann-Trichter
(SEINHORST 1956)
- Oostenbrink-Elutriator + Baermann-Trichter
(OOSTENBRINK 1960)
- Zentrifuge/MgSO₄-Lösung
(CAVENESS & JENSEN 1955, GOORIS & D'HERDE 1972, MÜLLER 1980)

Wurzeluntersuchung: Mit der Sprühanlage nach SEINHORST (1950): Wurzeln grob zerkleinern und das Material auf mehrere Trichter der Sprühanlage verteilen. Nach sieben Tagen werden die evtl. vorhandenen Nematoden in Reagenzgläser abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung.

Literatur:

CAVENESS, F. E. & JENSEN, H. J. (1955): Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. Proc. Helminth. Soc. Wash. 2, 87-89.

EPPO Standards: Phytosanitary Procedures

PM 3/60(1): Testing growing medium and plants in growing medium.

PM 3/54(1): Growing plants in growing medium prior to export.

EPPO: Data sheets on quarantine pests.

- GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.
- GOORIS, J. & D'HERDE, C. J. (1972): A method for the quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. from soil. State Nematology and Entomology Research Station, 9220 Merelbeke, Belgium.
- KNUTH, P. (1993): Stengelälchen (*Ditylenchus dipsaci*) im Saatgut von Ackerbohnen und Erbsen, Untersuchungen und Ergebnisse der Jahre 1987 bis 1991 in Baden-Württemberg. Gesunde Pflanzen **45**, 250-254.
- MÜLLER, J. (1980): Ein verbessertes Extraktionsverfahren für *Heterodera schachtii*. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **32**, 21-24.
- OOSTENBRINK, M. (1960): Estimating nematode populations by some selected methods. In "Nematology" (Hrsg. Sasser & Jenkins), Univ. North Carolina Press, 85-102.
- SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev) Tijdschr. Plantenziekten **56**, 291-294.
- SEINHORST, J.W. (1956): The quantitative extraction of nematodes from soil. Nematologica **1**, 159-164.

Untersuchung von Blumenzwiebeln und Küchenzwiebeln, die zum Auspflanzen bestimmt sind, auf *Ditylenchus dipsaci* und *D. destructor*

Untersuchungen sind erforderlich z. B. beim Export/Import von Steckzwiebeln, auch innerhalb der Gemeinschaft.

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.

A 2: Pflanzen, außer Samen:

Blumenzwiebeln (in Anlage 2 namentlich aufgeführt) und **Küchenzwiebeln** müssen frei sein von *Ditylenchus dipsaci* und teilweise auch von *Ditylenchus destructor*

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Für die hier dargestellte Vorgehensweise bei Probenahme und Untersuchung existiert noch keine etablierte Methode. Folgende Techniken erscheinen geeignet:

Probenahme:

Je 100 kg Pflanzgut von Zwiebelgewächsen (Blumenzwiebel und Küchenzwiebel) wird eine Mischprobe von 25 Zwiebeln gezogen.

Untersuchung:

1. Sprühanlage nach SEINHORST (1950): Von den Zwiebeln werden die Hüllblätter entfernt, die Zwiebeln zerkleinert und das Material auf mehrere Trichter der Sprühanlage verteilt (nicht mehr als 50 g Zwiebelmaterial pro Trichter). Nach 48 h werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung von *Ditylenchus dipsaci* nach HOOPER (1972) bzw. *D. destructor* nach HOOPER (1973).

2. Baermann-Trichter-Methode mit Wasserstoffperoxid: Der Baermann-Trichter wird mit Wasserstoffperoxid angereichertem Wasser (2 ml pro Liter, 30%-iges H₂O₂, nach HIRLING 1971) gefüllt. Von den Zwiebeln werden die Hüllblätter entfernt, die Zwiebeln zerkleinert und das Material auf mehrere Baermann-Trichter verteilt. Auf einen Baermann-Trichter nicht mehr als 50 g Zwiebelmaterial geben. Nach 48 h werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung von *Ditylenchus dipsaci* nach HOOPER (1972) bzw. *D. destructor* nach HOOPER (1973).

Literatur:

EPPO: *Ditylenchus dipsaci* und *D. destructor* – Data sheets on quarantine pests.

GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.

HIRLING, W. (1971): Die Wirkung von Wasserstoffperoxid bei der Isolierung von Nematoden. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch. **78**, 335-348.

HOOPER, D.J. (1972): *Ditylenchus dipsaci*. CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 1, No. 14.

HOOPER, D.J. (1973): *Ditylenchus destructor*. CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 2, No. 21.

SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev) Tijdschr. Plantenziekten **56**, 291-294.

Saatgutuntersuchung bei Küchenzwiebel, Schalotte und Schnittlauch sowie bei Luzerne und anderen kleinsamigen Leguminosen auf *Ditylenchus dipsaci*

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.

A 3: Saatgut von:

- Küchenzwiebel
- Luzerne
- Schalotte
- Schnittlauch

muss frei sein von *Ditylenchus dipsaci*

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Für die hier dargestellte Vorgehensweise bei Probenahme und Untersuchung existiert noch keine etablierte Methode. Saatgut von den hier betroffenen Kulturen wird zudem oft in Tüten mit kleinsten Saatgutmengen (Gartenbedarf) verkaufsfertig abgepackt gehandelt. Folgende Techniken erscheinen geeignet:

Probenahme:

a) in großen Gebinden verpacktes Saatgut: Von importiertem Saatgut wird bei Küchenzwiebel, Schalotte, Schnittlauch, sowie bei Luzerne und kleinsamigen Leguminosen pro 100 kg Saatgut eine Mischprobe von 100 g entnommen. Für die Mischprobe soll von mindestens zehn Stellen der gesamten Partie Saatgut entnommen werden.

b) in kleinen Tüten verpacktes Saatgut: Das verkaufsfertig abgepackte Saatgut wird oft in großen Mengen (Wagenladungen) innerhalb der Gemeinschaft verbracht. Für eine repräsentative Untersuchung sollte 1-3 % des Importes/Exportes zur Nematodenuntersuchung entnommen werden.

Untersuchung:

1. Sprühanlage nach SEINHORST (1950): Milchwattefilter in den Trichter einlegen, jeweils 20 g Saatgut gleichmäßig verteilen, mit einem zweiten Milchwattefilter abdecken und mit einem Edelstahlsieb so beschweren, dass das Saatgut nicht weggespült wird. Nach zwei bis drei Tagen Sprühdauer werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung von *D. dipsaci* bei starker Vergrößerung nach HOOPER (1972).

2. Isolierung von *Ditylenchus dipsaci* aus Saatgut in Anlehnung an die Baermann-Trichter-Methode (GOFFART 1959) und der von SCHREIBER (1977) bzw. AUGUSTIN & SIKORA (1989) beschriebenen Quellmethode: Der Baermann-Trichter wird mit Wasserstoffperoxid angereichertem Wasser (2 ml pro Liter, 30 %-iges H₂O₂, nach HIRLING 1971) gefüllt. Auf den Milchwattfilter im Baermann-Trichter werden jeweils 20 g Saatgut gleichmäßig verteilt, mit einem zweiten Milchwattfilter abgedeckt und mit einem Edelstahlsieb so beschwert, dass das Saatgut vollständig mit Wasser bedeckt ist. Nach zwei bis drei Tagen werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung von *D. dipsaci* nach HOOPER (1972).

Literatur:

- AUGUSTIN, B. & SIKORA, R.A. (1989): Zur Methodik des Nachweises von *Ditylenchus dipsaci* in Körnerleguminosensaatgut. *Gesunde Pflanzen* **41**, 189-192.
- EPPO: *Ditylenchus dipsaci* – Data sheets on quarantine pests.
- GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)* **11**, 49-54.
- HIRLING, W. (1971): Die Wirkung von Wasserstoffperoxid bei der Isolierung von Nematoden. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.* **78**, 335-348.
- HOOPER, D.J. (1972): *Ditylenchus dipsaci*. *CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 1, No. 14.*
- SCHREIBER, E.-R. (1977): Lebensweise, Bedeutung und Bekämpfungsmöglichkeiten von *Ditylenchus dipsaci* an Ackerbohne. *Dissertation TU Berlin*, 1-150.
- SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev) *Tijdschr. Plantenziekten* **56**, 291-294.

Saatgutuntersuchung bei Reis auf *Aphelenchoides besseyi*

Anlässe für Untersuchungen: Derzeit für Deutschland nicht vorhanden. Da die Pflanzenbeschauverordnung diesen Nematoden mit aufführt, werden Untersuchungsmethoden hier nur zitiert, aber nicht näher beschrieben.

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.

A 3: Saatgut von:
- Reis

muss frei sein von *Aphelenchoides besseyi* (Reisblattälchen)

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Im EPPO Standard PM 3/38(1) "Test method for rice seed" wird eine Untersuchungsmethode beschrieben.

Literatur:

EPPO: *Aphelenchoides besseyi* – Data sheets on quarantine pests.

FRANKLIN, M.T. & SIDDIQI, M.R. (1972): C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 1, No. 4.

EPPO Standard PM 3/38(1): *Aphelenchoides besseyi*. Test method for rice seed. OEPP/EPPO Bulletin 22(2), 217-218.

Saatgutuntersuchung bei Ackerbohnen und Erbsen auf *Ditylenchus dipsaci*

a) Rechtliche Grundlage:

Saatgutverordnung:

- In: - Vierte Verordnung zur Änderung saaatgutrechtlicher Verordnungen vom 16. November 1989;
- Dritte Änderung der Saatgutverordnung (Bundesgesetzblatt 1989, Teil 1, S. 2029):

„Von Stängelälchen (*Ditylenchus dipsaci*), parasitischen Pilzen oder Bakterien darf Saatgut nicht in größerem Ausmaß befallen sein, wenn sich bei der Beschaffenheitsprüfung der Verdacht eines Befalls ergibt; bei Ackerbohnen und Futtererbsen ist ein größeres Ausmaß hinsichtlich des Befalls mit Stängelälchen gegeben, wenn in 300 Körnern mehr als 5 Stängelälchen nachgewiesen werden“.

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Probenahme:

Von einer Saatgutpartie wird je Anerkennungsnummer ein repräsentatives Muster von ca. 200 g entnommen. Für diese Mischprobe soll von mindestens zehn Stellen der gesamten Partie Saatgut entnommen werden.

Untersuchung:

Die Untersuchung erfolgt in Anlehnung an das „ISTA handbook on seed health testing“; working sheet No 57: *Vicia faba* – *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev; von G. CAUBEL.

Von jeder Mischprobe werden 2 x 80 g Körner untersucht, die in je einem Becherglas (800 ml) mit Wasser überstaut und im Kühlschrank bei 5 °C für 24 Stunden aufbewahrt werden. Eine Erhöhung der Körnermenge pro Becherglas führt in der Regel zu erheblichen Eintrübungen des Wassers und sollte vermieden werden. Danach wird der Inhalt eines Becherglases auf ein Sieb über einem Glastrichter mit verschlossenem Auslauf (Silikonschlauch, Schlauchklemme) ausgeleert. Die Körner werden verworfen. Nach 24 Stunden werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen lassen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder deren Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung nach HOOPER (1972).

Literatur:

AUGUSTIN, B. & SIKORA, R.A. (1989) : Zur Methodik des Nachweises von *Ditylenchus dipsaci* in Körnerleguminosensaatgut. Gesunde Pflanzen **41**, 189-192.

EPPO: *Ditylenchus dipsaci* – Data sheets on quarantine pests.

HOOPER, D.J. (1972): *Ditylenchus dipsaci*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 1, No. 14.

SCHREIBER, E.-R. (1977): Lebensweise, Bedeutung und Bekämpfungsmöglichkeiten von *Ditylenchus dipsaci* an Ackerbohne. Dissertation TU Berlin, 1-150.

Untersuchung von Erdbeerpflanzgut auf *Aphelenchoides besseyi*

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.

**A 2: Pflanzen, außer Samen
von Erdbeeren
müssen frei sein von *Aphelenchoides besseyi***

Die Blattälchen *Aphelenchoides fragariae* und *A. ritzemabosi* sind keine Quarantänenematoden. Die Untersuchung auf diese Schädlinge wird daher von der Pflanzenbeschauverordnung auch nicht gefordert. Beide Nematodenarten werden aber bei den nachstehenden Methoden erfasst. Sie sind besonders für die Qualitätskontrolle in Erdbeer-Vermehrungsbetrieben von Bedeutung.

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Probenahme:

Die Blattälchen halten sich in den Zwischenräumen der Blatt- und Blütenanlagen in den Pflanzenherzen auf (STRÜMPPEL 1968). Der optimale Probenahmezeitpunkt ist daher im zeitigen Frühjahr, wenn die Pflanzen die neuen Blätter noch nicht entfaltet haben (Vegetationsbeginn). Untersucht werden nur die Pflanzenherzen. Da die Befallstärke von Erdbeerpflanzen üblicherweise in „Älchen je 20 g Herzen“ angegeben wird, sind von einer Partie mindestens 20 Pflanzen zu untersuchen (HIRLING 1971a).

Bei Feldbeprobung: Es sind 4 Mischproben (je 20 Pflanzen) pro ha zu entnehmen.

Beim Import/Export von Pflanzen: Für die Untersuchung sind je 1000 Pflanzen (Topfpflanzen, Frigoware) 20 Pflanzen zu entnehmen.

Untersuchung:

1. Sprühanlage nach SEINHORST (1950): Die zerkleinerten Erdbeerherzen einer Mischprobe werden auf mehrere Trichter der Sprühanlage verteilt. Nach zwei bis vier Tagen Sprühdauer werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren.

2. Isolierung von *Aphelenchoides* spp. aus Erdbeerpflanzenherzen in Anlehnung an die Baermann-Trichter-Methode (GOFFART 1959): Der Baermann-Trichter wird mit Wasserstoffperoxid angereicherterem Wasser (5 ml pro Liter, 30%-iges H₂O₂, nach HIRLING 1971) gefüllt. Auf den Milchwattefilter im Baermann-Trichter werden die zerkleinerten Erdbeerherzen einer Mischprobe gleichmäßig verteilt, mit einem zweiten Milchwattefilter abgedeckt und mit einem Edelstahlsieb so beschwert, dass sie vollständig mit Wasser bedeckt sind. Nach vier bis fünf Tagen bei Zimmertemperatur werden die evtl. vorhandenen Nematoden in ein Reagenzglas abgelassen. Absetzen der Nematoden

über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren.

Mikroskopische Auswertung und Bestimmung von *Aphelenchoides besseyi* nach FRANKLIN & SIDDIQI (1972). Bestimmung von *A. fragariae* nach SIDDIQI (1975) bzw. *A. ritzemabosi* nach SIDDIQI (1974).

Literatur:

EPPO: *Aphelenchoides besseyi* – Data sheets on quarantine pests.

FRANKLIN, M.T. & SIDDIQI, M.R. (1972): C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 1, No. 4.

GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.

HIRLING, W. (1971a): Zur Technik der Untersuchung von Erdbeerpflanzen und Chrysanthemenblättern auf Blattälchen (*Aphelenchoides fragariae* und *A. ritzemabosi*). Anzeiger für Schädlingskunde und Pflanzenschutz **12**, 182-185.

HIRLING, W. (1971b): Die Wirkung von Wasserstoffperoxid bei der Isolierung von Nematoden. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch. **78**, 335-348.

SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev). Tijdschr. Plantenziekten **56**, 291-294.

SIDDIQI, M.R. (1974): C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 3, No. 32.

SIDDIQI, M.R. (1975): C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 5, No. 74.

STRÜMPPEL, H. (1968): Untersuchungen an mit Blattälchen (spez. *Aphelenchoides fragariae*) verseuchten Erdbeeren. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch. **75**, 129-142.

Untersuchung von Wurzeln bzw. Wurzelgallen bei Zierpflanzen auf Befall mit Wurzelgallenälchen (*Meloidogyne chitwoodi* und *M. fallax*)

Anlässe für Untersuchungen: Importe von Zierpflanzen aus Befallsländern, insbesondere wenn die Pflanzen im Freiland bzw. in natürlichem Boden im Gewächshaus angezogen wurden.

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 1: Schadorganismen, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen verboten ist.

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Für die hier dargestellte Vorgehensweise bei Probenahme und Untersuchung existiert noch keine etablierte Methode. Wirtspflanzen für *M. chitwoodi* sind u. a. aus den Familien der *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Umbelliferae* und *Vitaceae* bekannt. Bis auf wenige Differenzialwirte überschneiden sich die Wirtspflanzenspektren beider *Meloidogyne*-Arten (s. Data sheets). Folgende Techniken erscheinen geeignet:

Visuelle Kontrolle:

Typische Befallssymptome sind unregelmäßige Anschwellungen (Gallen) an den Wurzeln. Da Zierpflanzen im allgemeinen nicht zu den empfindlich reagierenden Wirtspflanzen zu zählen sind, können Schadsymptome an den oberirdischen Pflanzenteilen in der Regel nicht beobachtet werden. Die visuelle Kontrolle (Stichproben) der Wurzeln einzelner Pflanzen ist dem Umfang der Lieferung anzupassen.

Probenahme:

Werden verdächtige Symptome an den Wurzeln festgestellt, so sind 2-3 Pflanzen mit Erde und Wurzeln im Plastikbeutel verpackt und mit einem Probenbegleitschreiben umgehend der zuständigen amtlichen Untersuchungsstelle zu überbringen.

Untersuchung:

Im Labor wird zunächst überprüft, ob es sich um einen Wurzelgallenälchen-Befall handelt (mikroskopische Untersuchung der Wurzelverdickungen). Aus den Gallen können die weißen Weibchen mitsamt deren Eipaketen direkt herauspräpariert werden. Nach Präparation der Hinterenden der Weibchen kann das Perinealmuster zur Artbestimmung verwendet werden (JEPSON 1985 und KARSSSEN 1996). Die Larven schlüpfen, wenn die Eimassen für einige Tage bei Raumtemperatur in Wasser aufbewahrt werden (BRAASCH 1994). Mikroskopische Bestimmung der Larven nach JEPSON (1985) und KARSSSEN (1996).

Wenn eine Sprühanlage nach SEINHORST (1950) vorhanden ist, kann diese zur Extraktion der Larven aus dem Wurzelgewebe verwendet werden. Die Larven schlüpfen nach wenigen Tagen aus den Eipaketen.

Die Unterscheidung zwischen *M. chitwoodi* und *M. fallax* ist morphologisch schwierig. Unterschiede treten aber im Bandenmuster bei der Elektrophorese auf, die eine eindeutige Art differenzierung gewährleisten. Zudem sind Unterschiede im Wirtspflanzenspektrum vorhanden (EPPO Data Sheets).

Literatur:

- BRAASCH, H. (1994): *Meloidogyne chitwoodi*. BBA Informationsblatt Nr. 007 (1/94).
- EPPO: *Meloidogyne chitwoodi* und *M. fallax* – Data sheets on quarantine pests.
- JEPSON, B. J. (1985): *Meloidogyne chitwoodi*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 8, No. 106.
- KARSSEN, G. (1996): Description of *Meloidogyne fallax* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae), a root-knot nematode from the Netherlands. *Fundamental and applied Nematology* **19**, 593-599.
- SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaftje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev). *Tijdschr. Plantenziekten* **56**, 291-294.

Untersuchung von getopften Bonsai-Pflanzen auf das Vorkommen pflanzenparasitischer Nematoden

a) Rechtliche Grundlage:

Pflanzenbeschauverordnung vom 05.12.2002 (BGBl. I Nr. 83 S. 4493):

Anlage 2: Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse, deren Einfuhr aus einem Drittland und innergemeinschaftliches Verbringen bei Befall mit bestimmten Schadorganismen verboten ist.

Anlage 3: Pflanzen, deren Einfuhr aus einem Drittland bzw. außereuropäischen Ländern verboten ist:

Betrifft insbesondere bei Bonsai: *Pinus* spp., *Chamaecyparis* spp. und *Juniperus* spp..

Anlage 4: Besondere Anforderungen für die Einfuhr aus einem Drittland und das innergemeinschaftliche Verbringen von Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und sonstigen Gegenständen.

Teil 1: mit Ursprung in oder Herkunft aus einem Drittland:

Bonsai müssen in frischem, künstlichem oder natürlichem Kultursubstrat angezogen worden sein, das einer Entseuchung oder geeigneten Hitzebehandlung unterzogen worden ist, um sicherzustellen, dass es frei von Schadorganismen ist, und bei einer anschließenden Untersuchung als frei von Schadorganismen festgestellt worden sein, zugleich müssen angemessene Maßnahmen getroffen worden sein, um sicherzustellen, dass das Kultursubstrat frei von Schadorganismen bleibt.

Anforderung: Freiheit von Schadorganismen allgemein.

Entscheidung (2002/887/EG) der Kommission vom 08.11.2002:

Regelt die Ausnahmen, die die Einfuhr von kleinwüchsig gehaltenen *Pinus* spp., *Chamaecyparis* spp. und *Juniperus* spp. aus Japan in die Gemeinschaft gestattet (betrifft v. a. *Bursaphelenchus xylophilus* und seine Vektoren).

Anlässe für Untersuchungen: Bonsai können als getopfte Pflanzen mit Erde nur eingeführt werden, wenn vom Exportland die geforderten Auflagen erfüllt wurden, so dass keine Schadorganismen im Substrat bzw. den Pflanzen vorhanden sein können. Bei der Einfuhr von Bonsaipflanzen sind zur Überwachung dieser Anforderung Untersuchungen durchzuführen. Der Nachweis von pflanzenparasitären Nematoden jeglicher Art (nicht nur Quarantänenematoden) ist dabei als Indikator für nicht durchgeführte Maßnahmen zu bewerten. Andere, schwerer nachzuweisende Quarantänekrankheiten könnten dann möglicherweise ebenfalls vorhanden sein (Nematoden dienen als Bioindikatoren).

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Für die hier dargestellte Vorgehensweise bei der Probenahme existiert noch keine etablierte Methode. Folgende Techniken erscheinen geeignet:

Probenahme:

Es sind mindestens 50 Töpfe einer Pflanzenpartie (maximal 10 % der Pflanzen) nach dem Zufallsprinzip im Wurzelbereich zu beproben, auf jeden Fall aber so viel, dass möglichst 250 ml Substrat für die Untersuchung gewonnen werden. Es ist darauf zu achten,

dass bei der Beprobung der Töpfe auch Wurzelmaterial für die Untersuchung auf endoparasitische Nematoden mit entnommen wird. Bei Partien von 50 Töpfen oder weniger sind alle Pflanzen zu beproben. Bei größeren Substratmengen sind aus einer Mischprobe 250 ml zu untersuchen.

Bei Bonsai aus Japan ist eine mindestens dreimonatige Quarantänezeit nach der Einfuhr vorgeschrieben (2002/887/EG). Es kann davon ausgegangen werden, dass in dieser Zeit bei vorhandenem Befall von *Bursaphelenchus xylophilus* an *Pinus* spp. bei den visuellen Kontrollen Anzeichen von Schadsymptomen (Welkeerscheinungen) zu erkennen sein müssten. Von verdächtigen Pflanzen sind Ast- und/oder Stammproben zu entnehmen. Da es sich in der Regel um kleine Pflanzen handelt, kann die Probenahme mit einer Astschere erfolgen. Der Probenumfang sollte pro Einheit mindesten 150 g Holz betragen. Aufbewahrung und Transport der Mischproben in Plastikbeuteln.

Untersuchung:

Für die Untersuchung auf Nematoden in Kultursubstraten und Wurzeln kann nach dem EPPO Standard *Phytosanitary Procedure* „Testing growing medium and plants in growing medium“ vorgegangen werden. Nachfolgende Ausführungen sollen die methodischen Möglichkeiten aus nematologischer Sicht ergänzen und beschreiben weitere, zum Teil aufwendigere Extraktionsmöglichkeiten.

Erde bzw. Substrat von Bonsai-Wurzeln: Je Mischprobe 300 g Wurzelanhangerde bzw. -substrat für 48 Stunden auf mehrere Baermann-Trichter (GOFFART 1959) verteilen, und zwar direkt ohne vorherige Aufbereitung der Probe. Die Erdschicht auf dem Trichter sollte nicht dicker als 5 mm sein. Sofern die Beschaffenheit der Probe es zulässt, werden effektivere Extraktionsmethoden empfohlen:

- Sieb-Dekantiermethode + Baermann-Trichter
- Sieb-Schüttelmethode + Baermann-Trichter
(mit Retsch-Laborsiebmaschine, Methode nach KNUTH 1993)
- Seinhorst-Elutriator + Baermann-Trichter
(SEINHORST 1956)
- Oostenbrink-Elutriator + Baermann-Trichter
(OOSTENBRINK 1960)
- Zentrifuge/MgSO₄-Lösung

Sammeln des Ablasses von den Trichtern einer Probe in Reagenzgläsern. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung der pflanzenparasitären Nematoden.

Wurzeluntersuchung: Mit der Sprühanlage nach SEINHORST (1950): Wurzeln grob zerkleinern und das Material auf mehrere Trichter der Sprühanlage verteilen. Nach sieben Tagen werden die evtl. vorhandenen Nematoden in Reagenzgläser abgelassen. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Bestimmung der pflanzenparasitären Nematoden.

Holzproben von Bonsai: Zerkleinerung der groben Holzstücke mit einer Schneidmühle auf Partikel von maximal 1 cm Länge. Pro Mischprobe Untersuchung von mindestens 150 g zerkleinertem Holz für 48 Stunden nach der Baermann-Trichter-Methode (GOFFART 1959) oder in der Sprühanlage (SEINHORST 1950). Sammeln des Ablasses von den Trichtern einer Probe in einem Gefäß. Absetzen der Nematoden über mehrere Stunden durch Schwerkraft (Kühlschrank) oder Konzentration durch Zentrifugieren. Mikroskopische Auswertung und Diagnose mit Hilfe des EPPO Diagnostic protocol für *Bursaphelenchus xylophilus* sowie des EPPO Data Sheet „*Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors *Monochamus alternatus* and *Monochamus carolinensis*“.

Literatur:

EPPO (2001): *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/4 (1).

EPPO Standards: Phytosanitary Procedures

PM 3/60(1): Testing growing medium and plants in growing medium.

PM 3/54(1): Growing plants in growing medium prior to export.

EPPO: Data sheets on quarantine pests.

GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.

KNUTH, P. (1993): Stengelälchen (*Ditylenchus dipsaci*) im Saatgut von Ackerbohnen und Erbsen, Untersuchungen und Ergebnisse der Jahre 1987 bis 1991 in Baden-Württemberg. Gesunde Pflanzen **45**, 250-254.

OOSTENBRINK, M. (1960): Estimating nematode populations by some selected methods. In "Nematology" (Hrsg. Sasser & Jenkins), Univ. North Carolina Press, 85-102.

SEINHORST, J.W. (1950): De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev) Tijdschr. Plantenziekten **56**, 291-294.

SEINHORST, J.W. (1956): The quantitative extraction of nematodes from soil. Nematologica **1**, 159-164.

Bodenuntersuchung auf virusübertragende Nematoden

a) Rechtliche Grundlage:

a 1) Richtlinie 68/193/EWG über den Verkehr mit vegetativem Vermehrungsgut der Rebe:

Abl. (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften) L 093, 17.04.1968, S. 15
zuletzt geändert mit der Richtlinie 2002/11/EG, 13. Feb. 2002, Abl. L53, 23.02.2002, S. 20.

Anlage I: Voraussetzungen hinsichtlich des Bestandes

1. allgemeine Voraussetzungen

3. Es besteht eine größtmögliche Gewähr, dass der Boden für Rebschulen und für Mutterbestände, die der Erzeugung von Basisvermehrungsgut und zertifiziertem Vermehrungsgut bestimmt sind, bei der Pflanzung nicht von Schadorganismen oder deren Vektoren, insbesondere von Nematoden, die Viruskrankheiten übertragen, infiziert ist.

a 2) Rebenpflanzgutverordnung:

Rebenpflanzgut-VO vom 21. Januar 1986, BGBl. I S. 204, zuletzt geändert durch Artikel 4 der zehnten Verordnung zur Änderung saatzgutrechtlicher Verordnungen vom 1. Oktober 2001, BGBl. I S. 2588:

„Vor der Besichtigung eines Rebenbestandes nach Absatz 1, für dessen Aufwuchs die Anerkennung erstmalig beantragt wird, ist der Anerkennungsstelle ... eine Bescheinigung der zuständigen Behörde oder Stelle des Pflanzenschutzes vorzulegen, aus der hervorgeht, dass die Vermehrungsfläche **frei von Nematoden der Art *Xiphinema index* ist und dass andere virusübertragende Nematoden nur in einem Ausmaß vorhanden sind, das unter Gesichtspunkten des Pflanzenschutzes vertretbar ist.** Die für die Untersuchungen erforderlichen Bodenproben sind in der Regel in der zweiten Jahreshälfte des der Pflanzung vorhergehenden Jahres zu entnehmen. Die Bescheinigung darf zum Zeitpunkt der Beantragung der Anerkennung nicht älter als fünf Jahre sein.“ Diese Regelung ist seit 1.1.1993 in Kraft.

Erläuterung: aus fachlicher Sicht sind unter „anderen virusübertragenden Nematoden“ folgende Nematodenarten zu verstehen: *Xiphinema diversicaudatum*, *Paralongidorus maximus*, *Longidorus macrosoma*, *L. attenuatus*, *L. elongatus*, wobei letzterer als unbedenklich angesehen wird.

b) Probenahme und Untersuchungsmethoden:

Probenahme:

Termin: Wenn möglich, in der zweiten Jahreshälfte des der Pflanzung vorhergehenden Jahres.

Werkzeug: Spaten oder Edelman-Bohrer (weitlumiger Bodenbohrer).

- Bodentiefe:** In Vermehrungsanlagen 30 – 60 cm, je nach Durchwurzelung und Gründigkeit; in Rebschulen und anders genutzten Flächen 20 – 30 cm.
- Anzahl Proben:** Vermehrungsanlagen:
1 – 25 Ar mindestens sechs Proben, je weitere 4 Ar eine zusätzliche Probe.
Rebschulen:
1 – 25 Ar = drei Proben, 25 – 50 Ar = sechs Proben,
> 50 Ar = acht Proben.
Eine Probe soll etwa 1000 ml Boden umfassen.
- Bodenmenge:** Von jeder Probe werden 250 ml Feinerde aus verschiedenen Stellen des Probebeutels entnommen und untersucht; wird aus methodischen Gründen eine geringere Menge Boden ausgewaschen, muss dies entsprechend häufig wiederholt werden.

Die gesamte Untersuchung ist zu wiederholen, falls nur Larven gefunden werden (Larven reichen zur Artbestimmung nicht aus).

Extraktionsmethoden:

Sieb-Dekantiermethode (Staatl. Lehr- und Forschungsanstalt Neustadt/W, modifizierte Methode nach FLEGG 1967):

- Aufschwemmung der Probe mit Leitungswasser in einer Schale (Ø 25 cm, Inhalt ca. 1,5 l)
- zur besseren Auflösung des Bodens können 5 bis 7 Tropfen H₂O₂ zugegeben werden
- 30 Sekunden Absetzen des Bodens
- Dekantieren des Überstandes auf ein Analysensieb (Ø 20 cm, Maschenweite 200 µm)
- Vorgang 4 x wiederholen
- Überführen des Siebrückstandes in eine Schale (Ø 25 cm, Inhalt ca. 1,5 l)
- Aufschwemmen der Probe mit Wasser
- 30 Sekunden Absetzen des Bodens
- Dekantieren des Überstandes auf ein Analysensieb (Ø 20 cm, Maschenweite 160 µm)
- Vorgang 1 x wiederholen
- Überführen des Siebrückstandes auf einen Baermann-Trichter mit einem Nylonsieb, Ø 8 cm, Maschenweite 150 µm
- nach 24 h (bei Raumtemperatur) abzapfen und Auswertung mittels Binokular und Mikroskop, Artbestimmung nach BROWN & BOAG (1975), BROWN & BOAG (1977), HEYNS (1975), HOOPER (1973), PITCHER et al. (1974), SIDDIQI (1974).

Pollähne-Kanne (LBP Bayern):

- Einweichen von 250 ml Boden in 1 l Wasser
- Einengen der Suspension mit dem Bodenprobenextraktor (Pollähne-Kanne)
- überlaufende Suspension auf Sieb mit 160 µm Maschenweite auffangen und dann wie oben auf Baermann-Trichter überführen
- weiter wie bei Sieb-Dekantiermethode beschrieben.

Literatur:

- BLEYER, G. & KASSEMAYER, H.-H. (2000): Hinweise zur Untersuchung von Weinbergs- und Rebschulböden auf das Vorkommen von virusübertragenden Nematoden. Staatl. Weinbauinstitut Freiburg.
- BROWN, D.J.F & BOAG, B. (1975): *Longidorus macrosoma*: CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 5, No. 67.
- BROWN, D.J.F & BOAG, B. (1977): *Longidorus attenuatus*: CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 7, No. 101.
- FLEGG, J.J.M. (1967): Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. Ann. appl. Biol. **40**, 429-437.
- GOFFART, H. (1959): Methoden zur Bodenuntersuchung auf nichtzystenbildende Nematoden. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **11**, 49-54.
- HEYNS, J. (1975): *Paralongidorus maximus*: CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 5, No. 75.
- HOOPER, D.J. (1973): *Longidorus elongatus*: CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 2, No. 30.
- PITCHER, R.S., SIDDIQI, M.R. & BROWN, D.J.F. (1974): *Xiphinema diversicaudatum*: CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 4, No. 60.
- SIDDIQI, M.R. (1974): *Xiphinema index*: CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes Set 3, No. 45.

Ausschließlich für Rebschulen: Nachweis der Vorkultur

a) Rechtliche Grundlage:

Rebenpflanzgutverordnung:

Rebenpflanzgut-VO vom 21. Januar 1986, BGBl. I S. 204, zuletzt geändert durch Artikel 4 der zehnten Verordnung zur Änderung saatzgutrechtlicher Verordnungen vom 1. Oktober 2001, BGBl. I S. 2588.

§ 7 Abs. 2 Satz 3:

“Die zuständige Behörde oder Stelle des Pflanzenschutzdienstes kann von der Untersuchung von Bodenproben bei Rebschulen absehen, wenn auf der Fläche in den fünf der Nutzung zu Vermehrungszwecken vorangegangenen Jahren nachweislich ausschließlich Pflanzen angebaut worden sind, die keine gemeinsamen Wirte für virusübertragende Nematoden und für diesen Nematoden jeweils entsprechende Viren sind.”

b) Methode:

Ausfüllen eines Vordruckes über die Vorkulturen der letzten fünf Jahre, Bestätigung durch den entsprechenden Bewirtschafter mittels Unterschrift. Die Untersuchungsstelle entscheidet an Hand dieser Angaben, ob eine Bodenuntersuchung notwendig ist.

Erläuterung:

Auf folgende Nematoden-Virus-Kombinationen ist zu achten: *Xiphinema index* und Grapevine fanleaf virus, *X. diversicaudatum* und Arabis mosaic virus, *Paralongidorus maximus* und Raspberry ringspot virus (cherry-strain), *Longidorus attenuatus* und Tomato blackring virus (engl. Stamm), *L. macrosoma* und Raspberry ringspot virus (engl. Stamm), *L. elongatus* und Raspberry ringspot virus (schott. Stamm) bzw. Tomato black ring virus (schott. Stamm), wobei für die beiden zuletzt genannten Nematodenarten experimentell noch keine Virusübertragung auf Reben nachgewiesen werden konnte. Bei folgenden Vorkulturen muss auf jeden Fall eine Nematodenuntersuchung durchgeführt werden: Reben (Ertragsanlagen), Spargel, Obst (Gehölze, Beeren, Sträucher), Streuobstwiesen, kleingärtnerische Nutzung.

Literatur:

- BLEYER, G. & RÜDEL, M. (1996): Ist die Nematodenuntersuchung in Rebschulböden notwendig? Untersuchungsergebnisse aus Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz. Deutsches Weinbau-Jahrbuch, 85-94.

Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
erscheinen seit 1995 in zwangloser Folge.

- Heft 102, 2002: EU-Beurteilungsbericht Isoproturon. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 31. Bearbeitet von Dr. Henning Bruno und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 103, 2002: Zuständigkeiten bei der Prüfung und Zulassung von Pflanzenschutzmitteln und bei der EU-Wirkstoffprüfung. Stand: Februar 2002. Bearbeitet von Edelgard Adam, 58 S.
- Heft 104, 2002: Pflanzenschutz im ökologischen Landbau – Probleme und Lösungsansätze. Sechstes Fachgespräch am 26. Juni 2001 in Braunschweig. Abwehr von Wühlmausschäden im ökologischen Landbau. Bearbeitet von Dr. Hans-Joachim Pelz, 109 S.
- Heft 105, 2002: EU-Beurteilungsbericht Acibenzolar-S-methyl. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 32. Bearbeitet von Herbert Köpp und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 106, 2002: EU-Beurteilungsbericht Eisen(III)phosphat. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 33. Bearbeitet von Dr. Martina Erdmann-Vourliotis, Dr. Axel Wilkening und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 107, 2002: EU-Beurteilungsbericht Ethofumesat. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 34. Bearbeitet von Dr. Martina Erdmann-Vourliotis und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 108, 2002: EU-Beurteilungsbericht Cyclanilid. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 35. Bearbeitet von Dr. Henning Bruno und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 109, 2002: Alternativen zum Einsatz von kupferhaltigen Präparaten im Apfelanbau. Ergebnisse einer Literaturrecherche. Bearbeitet von Dr. Beate Göbke in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pflanzenschutz im Obstbau der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 67 S.
- Heft 110, 2002: Bewertungskonzept zum Nahtransport von Pflanzenschutzmitteln infolge Exposition über den Luftpfad (Abtrieb, Verflüchtigung und Deposition). Dr. Reinhard Winkler, Dr. Rainer Binner, Dr. Dietmar Gottschild, Dr. Wolfgang Koch und Dr. Johannes Siebers, 19 S.
- Heft 111, 2002: EU-Beurteilungsbericht Iprovalicarb. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 36. Bearbeitet von Herbert Köpp und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 112, 2002: EU-Beurteilungsbericht Proaflufuron. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 37. Bearbeitet von Dr. Henning Bruno und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 113, 2002: EU-Beurteilungsbericht Pymetrozin. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 38. Bearbeitet von Dr. Martina Erdmann-Vourliotis, Dr. Axel Wilkening und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 114, 2002: EU-Beurteilungsbericht Pyraflufen-ethyl. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 39. Bearbeitet von Dr. Henning Bruno und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 115, 2002: EU-Beurteilungsbericht Sulfosulfuron. Rechtliche Regelungen der Europäischen Union zu Pflanzenschutzmitteln und deren Wirkstoffen. Band D 40. Bearbeitet von Dr. Henning Bruno und Susanne Schaper, getr. Zählung.
- Heft 116, 2002: Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmittel (Stand: 1. Juli 2002). Bearbeitet von Andreas Spinti, 78 S.
- Heft 117, 2002: Fachgespräch „Anwendungsbestimmungen für Pflanzenschutzmittel zum Schutz von aquatischen und terrestrischen Biozönosen (Flora und Fauna) in der Praxis – ein Erfahrungsaustausch“. Bearbeitet von Dr. Rolf Forster, 68 S.
- Heft 118, 2003: Pflanzenschutz im ökologischen Landbau – Probleme und Lösungsansätze. Siebtes Fachgespräch am 6. Juni 2002 in Berlin-Dahlem. Alternativen zur Anwendung von Kupfer als Pflanzenschutzmittel. Forschungsstand und neue Lösungsansätze. Bearbeitet von PD Dr. habil. Stefan Kühne und Britta Friedrich, 89 S.
- Heft 119, 2003: Workshop Datenmanagement. Herausgegeben von Dr. Eckard Moll und Thomas Stauber, 83 S.
- Heft 120, 2003: Lesefassungen von Pflanzenschutzgesetz und Pflanzenschutzmittelverordnung. Bearbeitet von Dr. Gernot Marien Kropp, 46 S.