

VAN MINGEN et al. 2009: A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*. **11**, 927-950.

## 168 - Validierung des Flotationsverfahrens für Zystennematoden

*Validation of the flotation method to detect cyst nematodes*

**Uwe Preiß, Bernd Augustin, Judith Ginsberg**

Dienstleistungszentrum ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück Rüdesheimer Strasse 60-68, 55545 Bad Kreuznach, Deutschland, uwe.preiss@dlr.rlp.de

In der Laborarbeit erlangt die Qualitätssicherung zunehmende Bedeutung. Im Rahmen der Vorbereitung der Akkreditierung des Diagnoselabors am Dienstleistungszentrum ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück in Bad Kreuznach nach DIN ISO 17025 der deutschen Akkreditierungsstelle (DAKKS) wurde die Extraktion und Identifikation von Kartoffelzystennematoden (KZN) validiert.

Grundlage für den Validierungsplan sind die PM 7/98 (1) der EPPO (European Plant Protection Organization), sowie die spezifischen Diagnostikprotokolle. Der Anwendungsschwerpunkt des Prüfverfahrens liegt beim Nachweis der Kartoffelzystennematoden *Globodera rostochiensis* und *Globodera pallida* in Substraten und Bodenproben. Methodisch wird in Anlehnung an das OEPP/EPPO Diagnostic protocol PM 7/40(2) gearbeitet. Als Extraktionsverfahren diente der MEKU-Bodenprobenextraktor der Fa. Pollähne mit folgenden Grundeinstellungen:

- Modus: getrocknete Bodenproben
- Extraktionsdauer (180 s) / Pausenintervall (3 s)
- Einspüldruck: 65 bar
- Druck Gegenstrom: 2,5 bar
- Siebkombination (Durchmesser 20 cm) in mm: 2,5 / 0,25
- Es wurden folgende Substrate verwendet denen null bis vier Kartoffelnematodenzysten zugegeben wurden:
- Reiner Löß (pH 7,7; 0,16 % TS Subst.)
- Lößlehm (pH 7,6; 1,09 %TS)
- Lehmiger Sand (pH 7,6; 0,35 %TS)

Analytische Sensitivität

**Tab. 1** Sensitivitätsprüfung an der Nachweisgrenze

Anzahl KZN-Zysten in 400 ml Boden	absolute Anzahl Prüfungen (n)	Befunde	
		RICHTIG % (n)	FALSCH % (n)
0	59	100 (59)	0 (0)
1	56	97 (54)	3 (2)
2	60	98 (59)	2 (1)
4	64	100 (64)	0 (0)

Insgesamt wurden 239 Messungen durchgeführt. Die Akzeptanzgrenze für die Sensitivität wurde zu 99% eingehalten. Keine Probe wurde falsch positiv bewertet.

Analytische Spezifität

Die Ergebnisse der Spezifitätsprüfung zur Darstellung der selektiven Wiederfindung der Kartoffelzystennematoden (KZN) bei gleichzeitigem Vorhandensein ähnlich geformter Fremdkörper bzw.

Zysten anderer Nematodenarten. Insgesamt wurden 821 mikroskopische Differenzierungen durchgeführt. Dabei waren 99 Prozent (n=812) richtig.

### **Selektivität**

Bei der Selektivitätsprüfung wurde die Methode mit drei verschiedenen Bodenarten Löß, Lößlehm, lehmiger Sand geprüft. Bei reinem Löß wurden 95% (n=40) richtige Ergebnisse erzeugt, bei Lößlehm 99% (n=102) und bei lehmigem Sand 100% (n=99).

### **Wiederholpräzision**

Die Prüfung der Wiederholbarkeit erfolgte an der Nachweisgrenze mit einer Zyste je Bodenprobe als niedrigsten möglichen Belastungsgrad. Die Wiederholbarkeit wurde durch drei Personen und separat für drei Trägermatrices geprüft. Stets wurden acht Wiederholungen unter Berücksichtigung folgender gleichbleibender Bedingungen geprüft:

Messmethode; Mitarbeiter bzw. gleiche Mitarbeiter-Paarung (Arbeitsschritt 1: Flotation mit MEKU und Arbeitsschritt 2: Mikroskopie wurde praxisbezogen von zwei verschiedenen Mitarbeitern ausgeführt; Messinstrument; Ort; Versuchsbedingungen; Arbeitstag.

### **Reproduzierbarkeit (Vergleichspräzision)**

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit oder auch Laborpräzision oder Vergleichspräzision genannt, haben drei Personen die einzelnen Arbeitsschritte jeweils getrennt durchgeführt.

A) zu verschiedenen Terminen

B) verschiedene Mitarbeiter bei der Bedienung des MEKU-Bodenextraktors

C) verschiedene Mitarbeiter bei der Mikroskopie

Es wurden keine falsch positiven Ergebnisse, oder zu viele Nematodenzysten detektiert.

Lediglich ein Mitarbeiter konnte in drei Fällen nicht alle Nematodenzysten wiederfinden.

Die Validierung ergab, dass das installierte Prüfverfahren eine sichere Extraktion von Kartoffelzysten nematoden im Sinne der EPPO PM 7/98 (1) aus Bodenproben ermöglicht. Regelmäßige Laborvergleichsuntersuchungen (Ringtest) sind für eine dauerhafte Aufrechterhaltung des erreichten Qualitätsstandards erforderlich.

#### Literatur

OEPP/EPPO, 2007: Diagnostics - Basic requirements for quality management in plant pest diagnosis laboratories. Bulletin 37, PM 7/84, S. 580-588 Diagnostics der European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

OEPP/EPPO, 2009: Diagnostics - Globodera rostochiensis and Globodera pallida. Bulletin 39, PM 7/40(2), S. 354-368 der European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

OEPP/EPPO, 2012: Diagnostics - Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Bulletin 44(2), PM 7/98 (1), S. 1-31 der European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

Sturhan et al, 2001-2010: Materialsammlung zur Identifikation von Nematoden. Unveröffentlicht, Julius Kühn Institut, Münster.

## **169 - Influence of *Beauveria bassiana* on potato tuber damage and reproduction potential of *D. destructor* and *D. dipsaci***

**P. Mwaura<sup>2</sup>, B. Niere, S. Vidal<sup>2</sup>**

Julius Kühn-Institut, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit

<sup>2</sup>Georg-August Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Agrarentomologie, Grisebachstrasse 6, 37077 Göttingen, Germany

*Beauveria bassiana* is a cosmopolitan fungus, occurring in soils and occasionally as an endophyte in plants. Commercial biological insecticides from specific isolates of *B. bassiana* have been developed for the control of pests including the potato tuber moth, potato colorado beetle and nematodes. Potato tuber rot nematode (*Ditylenchus destructor*) and stem nematode (*D. dipsaci*), cause damage to potato tubers leading to economic losses. These nematode species are also polyphagous feeding on numerous fungal species. In this study, it was hypothesised that a complex