

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN
LANDWIRTSCHAFTLICH-GÄRTNERISCHE FAKULTÄT
Institut für Gartenbauwissenschaften
Fachgebiet Phytomedizin
Leitung: Prof. Dr. C. Büttner



Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin-Dahlem, ☎ (Skr) 030-31471139, Telefax 030-31471178

Herrn
E. Nevermann
Menno Chemie GmbH
Langer Kamp 104
22850 Norderstedt

Telefon	030-31471175
Telefax	030-31471178
E-Mail	carmen.buettner@agrar.hu-berlin.de
Datum	31.03.2004

Gutachten

Sehr geehrter Herr Nevermann,

hiermit sende ich Ihnen das Gutachten zu

Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit des Präparates Menno-Florades an Spargel unter Berücksichtigung der Erreger Asparagus Virus-2 und Tobacco streak virus

und verbleibe mit freundlichen Grüßen,
Ihre

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. Büttner', written in a cursive style.

Prof. Dr. C. Büttner

Gutachten

Zur viruziden Wirksamkeit des Präparates Menno-Florades an Spargel unter Berücksichtigung des *Tobacco streak virus*

Das Spargel-Sterben (Asparagus-Decline) geht mit deutlichen Ertragseinbußen einher. So sinkt der Ertrag in den Spargelanlagen schon 5 bis 8-Jahre nach deren Pflanzung, sodass eine Nutzung der Spargelfelder über den sonst üblichen Zeitraum von 10-15 Jahren ökonomisch unrentabel wird. Als charakteristische Symptome treten Wachstumsdepressionen auf, die sowohl den unterirdischen als auch den oberirdischen Teil der Spargelpflanze betreffen. Das Spargelkraut zeigt ein gestauchtes Wachstum; die Anzahl und Länge der zu erntenden Stangen ist reduziert.

Die Erkrankung geht auf einen Ursachenkomplex von pflanzenbaulichen, klimatischen und phytopathologischen Faktoren zurück. Drei Viren, das *asparagus virus 1* (AV-1), *asparagus virus 2* (AV-2) und *tobacco streak virus* (TSV) können mit dem Absterben der Pflanzen und den daraus resultierenden Ertragseinbußen assoziiert sein.

Asparagus Virus 1 (AV-1)

Der zur Gruppe der Potyviren gehörende Krankheitserreger mit einer flexiblen Partikelmorphologie (Länge etwa 740 µm, Breite 13 µm) ist weltweit in Spargelpflanzen verbreitet. Während das Pathogen bei Einzelinfektion keine Symptome induziert, sind bei den häufig auftretenden Mischinfektion mit *Asparagus virus 2* (AV-2), *Tobacco streak virus* (TSV) oder *Cucumber mosaic virus* (CMV) virusinduzierte Symptome zu beobachten, die zu ökonomisch bedeutenden Ertragsverlusten führen. Das AV-1 wird mechanisch beispielsweise beim Stechen sowie durch verschiedene Blattläuse wie *Aphis craccivora* und *Myzus persicae* übertragen. Mit einer Beständigkeit *in-vitro* von 2-11 Tagen vermag der Erreger außerhalb des Wirtes nur kurz seine Infektiosität zu erhalten.

Asparagus Virus 2 (AV-2)

Der zur Gruppe der isometrischen Ilarviren gehörende Erreger verursacht in Spargelpflanzen eine Stauchung sowie Absterbeerscheinungen. Untersuchungen in Neuseeland zeigten, dass Av-2 freie Pflanzen signifikant ($P=0.05$ bzw. $P=0.005$) höhere Erträge (18 % bzw. 30 %) marktfähiger Stangen liefern. Unterschiede im Grad der AV-Infektion zwischen einzelnen Sorten konnten bisher nicht ermittelt werden. Der Erreger kann mechanisch sowie durch Samen und Pollen übertragen und im Bestand verbreitet werden. Das im Vergleich zu jungen Pflanzen vermehrte Auftreten in älteren Beständen deutet auf eine Übertragung des Erregers beim Stechen oder sonstigen Schnitt-/Pflegemaßnahmen hin.

Tobacco streak virus (TSV)

Dieses isometrische, zu den Ilarviren gehörende Virus weist einen weiten Wirtspflanzenkreis auf. So zählen viele Arten aus mehr als 30 Familien der Mono- als auch Dikotyledonen zu den Wirten. An Spargel verursacht das Virus eine makroskopisch deutlich erkennbare Stauchung der Sproßachse. Die physikalischen Eigenschaften des Erregers mit einem thermalen Inaktivierungspunkt zwischen 53 und 64°C und einer Beständigkeit *in-vitro* von 1,5 Tagen lassen einen eher instabilen Erreger vermuten.

Die Übertragung erfolgt mechanisch beispielsweise bei Schnitt- und Pflegearbeiten durch Wunden. Darüber hinaus kann das Virus durch Vektoren (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), Pollen sowie bei einigen Pflanzenarten wie beispielsweise *Phaseolus vulgaris* und *Datura stramonium* auch durch Samen übertragen werden. Durch eine Messerdesinfektion

bei der Spargelernte unter Anwendung eines viruzid gegen das TSV wirkende Desinfektionsmittel kann ein Übertragungsweg des Erregers unterbrochen und somit die weitere Ausbreitung der Erkrankung im Bestand verlangsamt oder sogar verhindert werden.

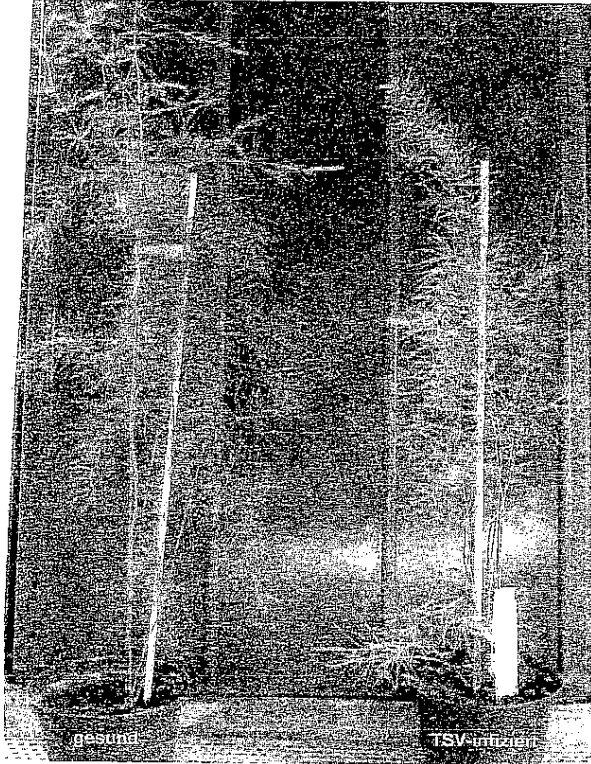


Abb. 1
Vergilbung und Wachstumsdepression an Spargelpflanzen induziert durch das *Tobacco streak virus* (rechts)

links: gesunde, TSV-freie Pflanze
rechts: TSV-infizierte Pflanze

Anzucht von Spargel- und krautigen Indikatorpflanzen

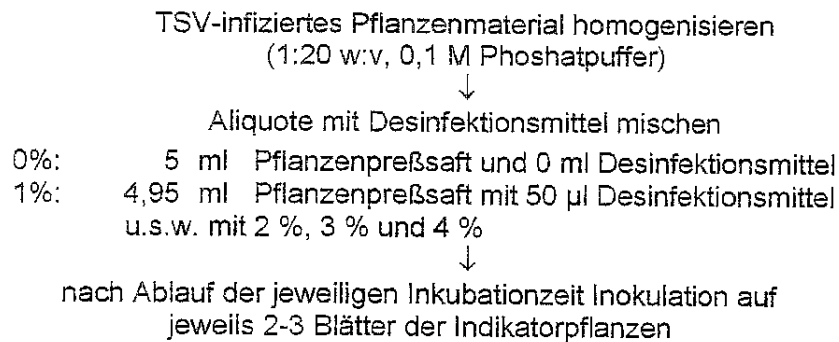
Spargel- und Gänsefuß-Pflanzen wurden für die Infektionsversuche fortlaufend angezogen (ausgesät, pikiert und getopft) und unter Gewächshausbedingungen kultiviert.



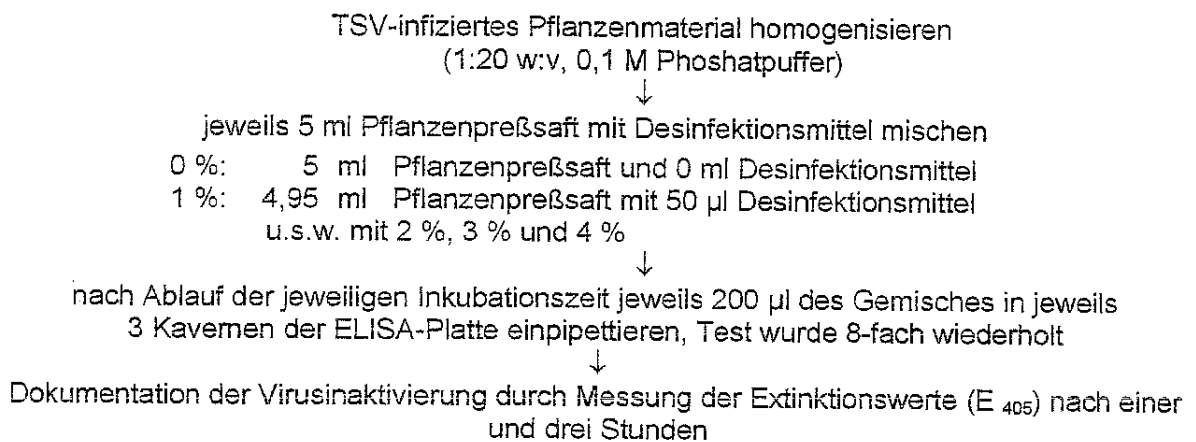
Abb. 2:
Anzucht von krautigen Testpflanz
Pfeil links (vorne): *Chenopodium quino*.
Pfeil rechts (hinten): *Asparagus officinalis*

Versuchsdurchführung

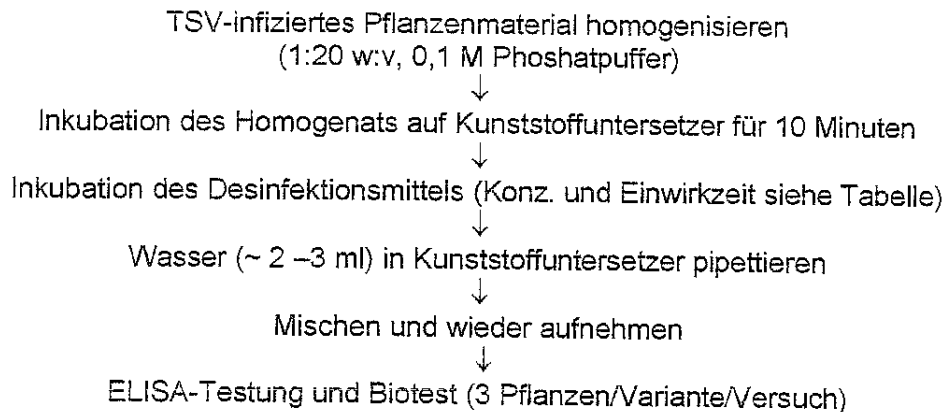
I. Biotest (Blatt-Inokulation)



II. *In-vitro*-Testung (Nachweis mit ELISA)



III. Stellflächendesinfektion (Nachweis mit Biotest und ELISA)



Tab.: Geprüfte Mittelkonzentration und Einwirkzeiten zur Stellflächen
desinfektion unter Verwendung von Menno-Florades

Inkubationszeit	Mittelkonzentration in %		
	0	2	3
5 Minuten	+	+	+
30 Minuten	+	+	+
1 Stunde	+	+	+
5 Stunden	+	+	+

IV. Messerdesinfektion (Nachweis Biotest (stem/leaf-slashing), ELISA)



Abb.
Stem- und leaf slashing ar
Chenopodium quinoa

Pfeil links: leaf shlashing
Pfeil rechts: stem shlashir

Skalpelli in Pflanzenhomogenat (TSV-infiziertes Pflanzenmaterial) eintauchen
(Zeit des Eintauchens 5 Sekunden)



Skalpelli in Desinfektionsmittel tauchen (Mittelkonzentration siehe Tab.)



nach jeweiliger Inkubationszeit Stengel und/oder Blatt von
ausgewählten Indikatorpflanzen 6 x einritzen

Tab.: Geprüfte Mittelkonzentration und Einwirkzeiten zur Stellflächen
desinfektion unter Verwendung von Menno-Florades

Inkubationszeit	Mittelkonzentration in %			
	0	2	3	4
1 Minute	+	+	+	+
3 Minuten	+	+	+	+
5 Minuten	+	+	+	+
10 Minuten	+	+	+	+

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

In-vitro Testung

Das *Tobacco streak virus* kann mit Hilfe des Desinfektionsmittels Menno-Florades inaktiviert werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht der viruziden Wirksamkeit des Präparates gegen TSV in Abhängigkeit von der Mittelkonzentration und der Inkubationszeit. Die Infektiosität des TSV blieb während der Inkubationszeit von maximal 16 Stunden - sofern kein Desinfektionsmittel zugesetzt wurde - erhalten. Eine sichere, vollständige Inaktivierung erfolgt *in-vitro* unabhängig von der gewählten Mittelkonzentration (1, 2 oder 5 %) bei einer Inkubationszeit von 16 Stunden.

Tab. 1: *In-vitro* Testung der viruziden Wirksamkeit von Menno-Florades mit Hilfe des ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay) unter besonderer Berücksichtigung der Mittelkonzentration und Einwirkzeit unter Angabe der Pflanzenanzahl (TSV-frei/behandelt), n>3, Wdh 3, nt: nicht getestet

Mittelkonz.	Inkubationszeit						
	30 Sek.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.
0 %	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
1 %	6/9	0/9	3/9	nt	0/9	nt	3/9
2 %	0/9	0/9	0/9	6/9	0/9	0/9	nt
3 %	3/9	6/9	6/9	9/9	6/9	nt	nt
4 %	nt	0/15	nt	3/9	0/9	nt	0/9

Mittelkonz.	Inkubationszeit		
	1 Std.	7 Std.	16 Std.
0 %	0/12	0/12	0/12
1 %	0/9	9/9	9/9
2 %	3/9	0/9	9/9
5 %	3/9	6/9	12/12

Stellflächendesinfektion

Unter Praxisbedingungen soll eine mechanische Übertragung der Erreger über die Stellflächen durch entsprechende Desinfektionsmaßnahmen unterbunden werden. Die unter diesen Bedingungen vorliegenden Virustiter (infizierte Pflanze, kontaminierte Stellfläche) sind niedriger als die bei der *in-vitro* Testung verwendeten.

Daher ist es nicht erstaunlich, dass zur Stellflächendesinfektion eine Mittelkonzentration von 2 % bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten ausreicht (Tab. 2).

Tab. 2: *In-vivo* Testung der viruziden Wirksamkeit von Menno-Florades zur Desinfektion von Kunststoffmaterialien (Töpfe, Stellflächen) mit Hilfe von krautigen Indikatorpflanzen unter Berücksichtigung der Mittelkonzentration und Einwirkzeit unter Angabe der Pflanzenanzahl (TSV-frei/behandelt), (n > 3, Wdh.: 3, nt: nicht getestet)

Mittelkonz.	Inkubationszeit			
	5 Min.	30 Min.	1 Std.	5 Std.
0 %	0/12	0/12	0/12	0/12
2 %	0/12	9/9	9/9	9/9
3 %	9/9	6/9	6/9	9/9

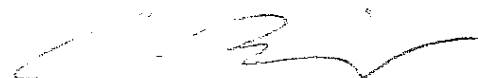
Messerdesinfektion

Praxisversuche zur Messerdesinfektion zeigten, dass selbst nach Tauchen des Messers in ein TSV-kontaminiertes Blatthomogenat durch Schnittverletzungen an gesunden Testpflanzen der Erreger nicht immer übertragen werden konnte. Eine Mittelkonzentration von 3 % bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten reicht nach *in-vivo*-Testung krautiger Indikatorpflanzen aus (Tab. 3). Diese Testergebnisse sind nach unseren bisherigen Erfahrungen auf Spargelpflanzen übertragbar. Um die zur sicheren Dekontamination der Messer unter Praxisbedingungen beim Spargelstechen erforderlichen Mittelkonzentration und Inkubationszeit zu ermitteln, sollen zur Spargelernte weitere Testreihen vorgenommen werden. Für die Einführung in die Praxis wären Inkubationszeiten von 30 Sekunden anzustreben, um jede Stange mit einem desinfizierten Messer zu stechen. Sollte die sichere Dekontamination der Messer längere Inkubationszeiten erfordern, könnte zumindest für einen begrenzten Dammbereich mit einem desinfizierten Messer gearbeitet werden. Schon durch eine solche Maßnahme könnte eine Eindämmung (Verlangsamung) der Virusausbreitung erzielt werden.

Tab. 3: *In-vivo* Testung der viruziden Wirksamkeit von Menno-Florades zur Messerdesinfektion mit Hilfe von krautigen Indikatorpflanzen unter Berücksichtigung der Mittelkonzentration und Einwirkzeit unter Angabe der Pflanzenanzahl (TSV-frei/behandelt), (n > 3, Wdh.: 3, nt: nicht getestet)

Mittelkonz.	Inkubationszeit			
	1 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.
0 %	0/12	0/12	0/12	0/12
2 %	0/9	6/9	9/9	9/9
3 %	9/9	6/9	9/9	9/9
4 %	6/9	9/9	9/9	9/9

Humboldt-Universität zu Berlin
Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät
Institut für Gartenbauwissenschaften
Fachgebiet Phytomedizin
Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin
Tel.: 31 47 11 39, Fax: 31 47 11 78
email: Phytomedizin@agrar.hu-berlin.de



Prof. Dr. C. Büttner

Einsatz von Desinfektionsmitteln mit viruzider Wirksamkeit im Spargelanbau

Martina Bandte, Nicola Große und Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät
 Institut für Gartenbauwissenschaften
 Fachgebiet Phytomedizin
 Lentzeallee 55/57
 D-14195 Berlin
 eMail: phytomedizin@agrar.hu-berlin.de



Einleitung

Im Spargelanbau treten zunehmend Absterbercheinungen auf, die mit Ertragsverlusten einhergehen. So sinkt der Ertrag der als Dauerkultur angelegten Spargelflächen schon 5 bis 6 Jahre nach der Pflanzung, sodass eine Nutzung der Spargelfelder über den sonst üblichen Zeitraum von 10-15 Jahren ökonomisch unrentabel wird. Als charakteristische Symptome treten Wachstumsdepressionen auf, die sowohl den unterirdischen als auch den oberirdischen Teil der Spargelpflanze betreffen. Das Spargelkraut zeigt ein gestauchtes Wachstum; die Anzahl und Länge der zu erntenden Stangen ist reduziert. Die auch als Asparagus-Decline bezeichnete Krankheit, geht auf einen Ursachenkomplex von pflanzenbaulichen, klimatischen und phytopathologischen Faktoren zurück.

Drei Viren, das *asparagus virus 1* (AV-1), *asparagus virus 2* (AV-2) und *tobacco streak virus* (TSV) sind mit dem Absterben der Pflanzen und den daraus resultierenden Ertragsverlusten assoziiert (Abb. 1 a,b).

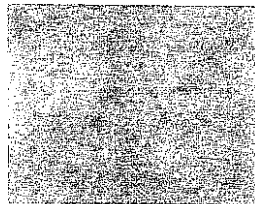


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung von Tobacco streak virus (TSV); isometrische Partikel. Durchmesser: 27-35 nm

Das Tobacco streak virus (TSV) gehört zu den Iarviten und hat einen weiten Wirtspflanzenkreis. So zählen viele Arten aus mehr als 30 Familien der Mono- als auch Dikotyledonen zu den Wirten. Die Übertragung erfolgt mechanisch beispielsweise bei Schnitt- und Pflegearbeiten durch Wunden. Darüber hinaus kann das Virus durch Vektoren (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), Pollen sowie bei einigen Pflanzenarten wie beispielsweise *Phaseolus vulgaris* und *Datura stramonium* auch durch Samen übertragen werden.

Die vorgestellten Untersuchungen stellen Übertragungswege der Viren im Spargelanbau vor und zeigen Möglichkeiten der prophylaktischen Bekämpfung durch Messerdesinfektion bei der Spargelernte unter Anwendung eines viruzid gegen das TSV wirkenden Desinfektionsmittels auf.

Material und Methoden

Die Untersuchungen erfolgten sowohl mit Spargel- als auch krautigen Indikatorpflanzen wie *Chenopodium quinoa* (Abb. 2). Die Pflanzen wurden zunächst durch mechanische Inokulation mit dem Isolet PV-0612 (DMSE, Braunschweig) infiziert. Die *Chenopodium*-Pflanzen entwickelten charakteristische chlorotische Lokalläsionen (Abb. 3).

Der Nachweis der Infektion erfolgte im Bioassay, elektronenoptisch mit Hilfe von Adsorptionspräparaten und serologisch mit dem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (SRA25506/9500, Linare, Wertheim-Bettingen).

Die Prüfung des Desinfektionsmittels Menno-Florades wurde zunächst *in-vitro* vorgenommen. Anschließend erfolgte eine Testung des Präparates unter Anwendung ausgewählter Mittelkonzentrationen und Einwirkzeiten *in vivo*. Dazu war das Verfahren des stemleaf slashing einzusetzen (Abb. 4). Bei diesem Verfahren werden Blätter und Stängel der Testpflanze mit einem TSV-kontaminierten Messer/Skalpell eingewirzt.

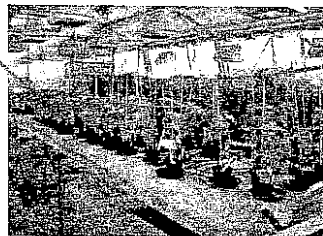


Abb. 2: Kultivierung der Testpflanzen *Chenopodium quinoa* (Pfeil links, vorne) und *Asparagus officinalis* (Pfeil rechts, hinten)

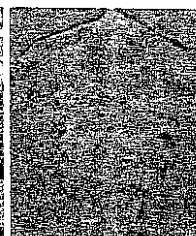


Abb. 3: Chlorotische Lokalläsionen an *Chenopodium quinoa* nach mechanischer Inokulation mit Tobacco streak virus (TSV)



Abb. 4: Infektion von *Chenopodium*-Pflanzen mit Tobacco streak virus unter Anwendung des Stem-slashing (Pfeil links) und leaf-slashing (Pfeil rechts)

Ergebnisse und Diskussion

Das Spargelkraut TSV-infizierter Pflanzen zeigt 12 Wochen nach der mechanischen Inokulation Chlorosen und ein gestauchtes Wachstum (Abb. 5).

Das Tobacco streak virus kann mit Hilfe des Desinfektionsmittels Menno-Florades inaktiviert werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht der viruziden Wirksamkeit des Präparates gegen TSV in Abhängigkeit von der Mittelkonzentration und der Inkubationszeit. Die Infektiosität des TSV blieb während der Inkubationszeit von maximal 16 Stunden – sofern kein Desinfektionsmittel zugesetzt wurde – erhalten. Eine sichere, vollständige Inaktivierung erfolgt unabhängig von der gewählten Mittelkonzentration (1, 2 oder 5 %) bei einer Inkubationszeit von 16 Stunden.

Unter Praxisbedingungen soll eine mechanische Übertragung der Erreger durch entsprechende Desinfektionsmaßnahmen unterbunden werden. Die unter diesen Bedingungen vorliegenden Viruslasten (infizierte Pflanze, kontaminierte Stellfläche) sind niedriger als die bei der *in-vitro* Testung verwendeten. Zur Stellflächendesinfektion reicht eine Mittelkonzentration von 3% bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten aus (Tab. 2).

Praxisversuche zur Messerdesinfektion zeigten, dass selbst nach Tauchen des Messers in ein TSV-kontaminiertes Blatthomogenat durch Schnittverletzungen an gesunden Testpflanzen der Erreger nicht immer übertragen werden konnte. Eine Mittelkonzentration von 3% bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten ist als ausreichend einzustufen. Weitere Testreihen werden derzeit durchgeführt.



Abb. 5: TSV-infizierte Spargelpflanze (rechts) mit Chlorosen und Wachstumsdepressionen; gesunde Kontrollpflanze (links)

Tab. 1: Viruzide Wirksamkeit von Menno-Florades im *in-vitro*-Test in Abhängigkeit ausgewählter Mittelkonzentrationen und Inkubationszeiten (n=3, 2 Wiederholungen) e: TSV inaktiviert, o: TSV nicht inaktiviert, nt: nicht getestet

Mittelkonz.	Inkubationszeit									
	30 Sek.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	30 Min.	1 Std.	2 Std.	16 Std.	
0%	o e e	e e o	e e e	e e e	e e e	e e e	e e e	e e e	e e e	
1%	o e e	e e e	e e o	e e e	e e e	e e e	e e e	e e e	e e e	
2%	e e e	e e e	e e e	e e e	e e e	nt	e e e	e e e	e e e	
3%	e e o	e e e	e e e	e e e	e e e	nt	nt	nt	nt	
4%	nt	e e e	e e e	e e e	e e e	e e e	nt	nt	nt	
5%	nt	nt	nt	nt	nt	nt	e e e	e e e	e e e	

Tab. 2: Viruzide Wirksamkeit von Menno-Florades bei der Messerdesinfektion in Abhängigkeit ausgewählter Mittelkonzentrationen und Inkubationszeiten (n=3, 3 Vdh.) e: TSV inaktiviert, o: TSV nicht inaktiviert

Mittelkonz.	Inkubationszeit			
	5 Min.	30 Min.	1 Std.	5 Std.
0%	e e e	e e e	e e e	e e e
2%	e e e	e e e	e e e	e e e
3%	e e e	e e e	e e e	e e e

Zusammenfassung

- Durch eine Messerdesinfektion bei der Spargelernte unter Anwendung eines viruzid gegen das TSV wirkenden Desinfektionsmittels kann ein Übertragungsweg des Erregers unterbrochen und somit die weitere Ausbreitung der Erkrankung im Bestand verlangsamt oder sogar verhindert werden.
- Die Messerdesinfektion sollte unter Einsatz von 3% Menno-Florades mit einer Inkubationszeit von 5 Minuten erfolgen.
- Zur sicheren Desinfektion von Stellflächen oder sonstigen Kunsterfmaterialien ist eine Inkubationszeit von 5 Stunden bei einer Mittelkonzentration von 3% einzusetzen.