

DIN EN 17722



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-07-19
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17722:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Bestimmung von Mykorrhizapilzen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17722:2023**

Plant biostimulants –
Determination of mycorrhizal fungi;
German and English version prEN 17722:2023

Biostimulants des végétaux –
Détermination des champignons mycorrhiziens;
Version allemande et anglaise prEN 17722:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-05-19 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 93 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17722:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-06 AA „Pflanzen-Biostimulanzien“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2:2019 siehe DIN ISO 5725-2:2022-05

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 17722:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Veröffentlichungsform von einer Technischen Spezifikation zu einer Europäischen Norm;
- b) Ergänzung des Abschnitts 4.3.6.5.2 „Herstellung von Platten mit modifiziertem Melin Nokrans (MMN) Medium“;
- c) Ergänzung des informativen Anhang A mit Ringversuchsdaten zur Wiederhol- und Vergleichpräzision des Verfahrens;
- d) Ergänzung des informativen Anhang ZA zum Zusammenhang mit der Verordnung für EU-Düngeprodukte.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2:2022-05, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:2019); Text Deutsch und Englisch*

– *Entwurf* –

E DIN EN 17722:2023-06

– Leerseite –

Pflanzen-Biostimulanzien – Bestimmung von Mykorrhizapilzen

Plant biostimulants – Determination of mycorrhizal fungi

Biostimulants des végétaux – Détermination des champignons mycorhiziens

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Verfahren zur Quantifizierung von Mykorrhiza	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Herstellung der Erstprobe	12
4.2.1 Allgemeines	12
4.2.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen	12
4.2.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC, en: emulsifiable concentrate)	12
4.2.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert	12
4.2.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG, en: water dispersible granules) formuliert	12
4.2.6 Feststoff – als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert	13
4.2.7 Feststoff – Substrat	13
4.3 Zählverfahren	13
4.3.1 Allgemeines	13
4.3.2 Verfahren Nr. 1: Sporenisolierung und Zählung MTT	13
4.3.3 Verfahren Nr. 2: Verfahren zur Klärung und Färbung von Wurzelproben und Zählung der Vesikel in den gefärbten Wurzelproben	15
4.3.4 Zählung der Gesamtzahl der UPM im Produkt nach Verfahren Nr. 1 + Verfahren Nr. 2 . . .	18
4.3.5 Verfahren Nr. 3: Endomykorrhiza-Bioassay	18
4.3.6 Verfahren Nr. 4: Ektomykorrhiza- und Ericoidzahl	26
5 Molekulare Charakterisierung und Identifizierung von Mykorrhiza-Isolaten	30
5.1 Allgemeines	30
5.2 Materialien und Geräte	30
5.3 Verfahren zur molekularen Charakterisierung und Identifizierung von Mykorrhiza-Isolaten	30
5.3.1 Reinigung von Sporen	30
5.3.2 DNA-Extraktion	31
5.3.3 Vorbereitung für PCR	32
5.3.4 Vorbereitung für Gelelektrophorese	34
5.3.5 Direkte Sequenzierung (ausgelagertes Sequenzierlabor)	35
6 Verfahren zur molekularen Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhiza und Ericoid	35
6.1 Allgemeines	35
6.2 Materialien	35
6.2.1 Pilzartiges Material	35
6.2.2 Molekularbiologische Kits/Reagenzien	35
6.2.3 Geräte	36
6.3 Detaillierte Beschreibung des Verfahrens	37
6.3.1 Materialvorbereitung	37
6.3.2 DNA-Extraktion und Qualitätskontrolle	37
6.3.3 PCR-Amplifikation von ITS-Sequenzen	38
6.3.4 Gelelektrophorese und Visualisierung der PCR-Produkte	38
Anhang A (informativ) Wiederholpräzision und Vergleichpräzision des Verfahrens	39
A.1 Im Ringversuch verwendete Materialien	39
A.2 Ergebnisse des Ringversuchs	39

Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2019/1009 zur Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt	42
Literaturhinweise	43

Bilder

Bild 1 — Verschiedene Arten von Mykorrhiza und Fortpflanzungseinheiten	10
Bild 2 — Siebe	14
Bild 3 — Beispiel für eine schematische Darstellung der MPN-Untersuchung	21
Bild 4 — Definition der MPN-Bewertung aus 3 Fallstudien	22
Bild 5 — Beispiel für eine MPN-Berechnung mit der MPN-Rechnersoftware	25

Tabellen

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Pflanzen-Biostimulanzien	5
Tabelle 2 — Zu verwendende Verfahren zur Zählung von UPM mit und ohne Pflanzenkulturen	11
Tabelle 3 — Zählung der Anzahl der intraradikalen Vesikel im Produkt	16
Tabelle 4 — Zählung der Anzahl der intraradikalen Vesikel im Produkt	18
Tabelle 5 — Probenahme und Probenvorbereitung mit Mykorrhiza-UPM-Konzentration	29
Tabelle 6 — Benötigte Reagenzien und Kits (1 Probe)	30
Tabelle 7 — Geräte, Glasgeräte und sonstiges Zubehör	30
Tabelle 8 — Reihenfolge für die DNA-Extraktion	31
Tabelle 9 — Primersequenzen	32
Tabelle 10 — Bestandteile für PCR	32
Tabelle 11 — Primer für die ITS-Sequenzierung von ECM/ErMF-Pilzen	38
Tabelle A.1 — Materialien, die im Ringversuch zur Zählung und Bestimmung von Mykorrhizapilzen in Pflanzen-Biostimulanzienprodukten untersucht wurden	39
Tabelle A.2 — Ergebnisse des Ringversuchs zur Zählung von Mykorrhizapilzen in Pflanzen-Biostimulanzienprodukten	40
Tabelle A.3 — Proben, die für den Ringversuch zur Bestimmung von Mykorrhizapilzen in Pflanzen-Biostimulanzienprodukten ausgegeben wurden	40
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	42

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17722:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 17722:2022 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinie(n)/Verordnung(en).

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinie(n)/Verordnung(en) siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Einleitung

Dieses Dokument wurde von den Experten des CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet. Das Europäische Komitee für Normung (CEN) wurde von der Europäischen Kommission (EC) beauftragt, Europäische Normen bzw. europäische Normungsergebnisse zu verfassen, die der Umsetzung der Verordnung (EU) 2019/1009 vom 5. Juni 2019 mit Vorschriften für die Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt („Düngeprodukteverordnung“) dienen sollen. Dieser Normungsauftrag, vorgestellt als SRM/564 und M/564/Amd1, ist auch ein Beitrag zur Strategie „Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe“. Im Rahmen dieses Normungsauftrags wurde die Arbeitsgruppe 5 „Kennzeichnung und Bezeichnungen“ (en: Labelling and denominations) gebildet, um ein Arbeitsprogramm zu entwickeln.

Das Technische Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ wurde eingerichtet, um dieses Arbeitsprogramm auszuführen, wobei eine Normenreihe erarbeitet wird. Das Interesse an Pflanzen-Biostimulanzien als wertvolles Hilfsmittel für die Landwirtschaft ist in Europa deutlich gestiegen. Es wurde erkannt, dass der Normung eine wichtige Rolle zukommt, wenn es darum geht, den Einsatz von Pflanzen-Biostimulanzien zu fördern. Die Arbeit des CEN/TC 455 ist darauf ausgerichtet, die Zuverlässigkeit der Lieferkette zu verbessern und so das Vertrauen von Landwirten, Industrie und Verbrauchern in Pflanzen-Biostimulanzien zu stärken, und wird die Kommerzialisierung der europäischen Biostimulanzienindustrie fördern und unterstützen.

Biostimulanzien, die in der Landwirtschaft eingesetzt werden, können auf vielfältige Weise angewendet werden: auf dem Boden, auf der Pflanze, als Samenbehandlung usw. Ein mikrobielles Pflanzen-Biostimulans besteht aus einem Mikroorganismus oder einem Konsortium von Mikroorganismen, wie in der Komponentenmaterialkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung angegeben.

Dieses Dokument gilt für alle Pflanzen-Biostimulanzien in der Landwirtschaft, die auf lebenden Mikroorganismen der Gattung Mykorrhiza basieren.

Tabelle 1 fasst viele der agrarökologischen Grundsätze und die Rolle von Pflanzen-Biostimulanzien zusammen.

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Pflanzen-Biostimulanzien

Erhöhung der Biodiversität
durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden
Stärkung biologischer Regulations- und Wechselwirkungsmechanismen
durch Verstärkung der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Mykorrhizae</i>
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Rhizobiaceae/Fabaceae</i>
— Sekrete, die Pflanzenhormone nachahmen (d. h. <i>Trichoderma</i>)
durch Regulierung pflanzenphysiologischer Prozesse
— z. B. Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung
Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe
— Verbesserung der Aufnahme von Nährstoffelementen
— Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffelementen im Boden
— Stimulierung des Abbaus organischer Substanz

WARNUNG — Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle gegebenenfalls zutreffenden Sicherheitsprobleme im Zusammenhang mit seiner Anwendung zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, geeignete Vorsichtsmaßnahmen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und die Einhaltung nationaler Vorschriften sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist unerlässlich, dass nach diesem Dokument durchgeführte Prüfungen von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm wurde entwickelt, um ein horizontales Verfahren für die Zählung und die Bestimmung der Gattung/Spezies [1] [2] [3] von Mykorrhizapilzen in mikrobiellen Pflanzen-Biostimulanzen in Übereinstimmung mit der Verordnung (EU) 2019/1009 des Europäischen Parlaments und des Rates bereitzustellen.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

arbuskulärer Mykorrhizapilz

AMF

AM-Pilz

biotropher mikroskopischer Pilz, der zum Stamm der Glomeromycota (synonym Glomeromycota) gehört und mit mehr als 70 % der Pflanzenarten auf der Erde obligat symbiotische Verbindungen eingeht

Anmerkung 1 zum Begriff: Arbuskuläre Mykorrhizapilze produzieren Strukturen im Inneren von Pflanzenwurzeln, wie z. B. Vesikel und/oder Endosporen, aber auch spezialisierte Nährstoffaustauschstrukturen, die Arbuskeln genannt werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Hyphen dringen nicht in den Protoplasten der Pflanzenzelle ein, sondern dringen in die kortikale Zellmembran ein, wo sie sich dichotomisch verzweigen und den Arbuskel ausbilden, der als Ort des Nährstoff- und Wasseraustausches zwischen Pflanze und Pilz gilt.

Anmerkung 3 zum Begriff: Das extraradikale Myzel des arbuskulären Mykorrhizapilzes bildet ein weitläufiges Netzwerk im Boden, wodurch die Verfügbarkeit und Absorption von Pflanzennährstoffen verbessert wird.

3.2

Ektomykorrhiza

Hyphenscheide oder -mantel, die/der die Wurzelspitze umschließt, und ein extrazelluläres Hartigsches Netz aus Hyphen, das die Pflanzenzellen in der Wurzelrinde umgibt

Anmerkung 1 zum Begriff: Nutzbringende symbiotische Verbindungen, die zwischen Fadenpilzen, vornehmlich Schlauch- und Ständerpilzen, und ungefähr 5 % bis 10 % der Nadel- und Laubbäume eingegangen werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: In manchen Fällen können die Hyphen auch die Pflanzenzellen durchdringen; dies wird dann Ektoendomykorrhiza genannt. Außerhalb der Wurzel bildet das extraradikale Ektomykorrhiza-Myzel ein weitläufiges Netzwerk im Boden, wodurch die Verfügbarkeit und Absorption von Pflanzennährstoffen verbessert wird. Da diese Pilze septierte Hyphen haben, gelten Hyphenfragmente zusammen mit Sporen als langfristig wirksame Vermehrungsstrukturen.

[QUELLE: EN 17724:—¹, 3.2.2.6.2]

1 In Vorbereitung.

3.3

Endomykorrhiza

symbiotische Verbindung, bei der ein Fadenpilz das Wurzelgewebe einer Pflanze intrazellulär besiedelt

BEISPIEL Die vier Hautgruppen von Endomykorrhiza sind die arbuskuläre, die ericoide, die orchidoide und die sebacinoiden Mykorrhiza.

[QUELLE: EN 17724:—¹, 3.2.2.6.1]

3.4

ericoider Mykorrhizapilz

Fadenpilz, der zum Stamm der Ascomycota gehört und speziell mit heidekrautartigen Pflanzen (z. B. Heidelbeere und Preiselbeere) endomykorrhizische symbiotische Verbindungen eingeht

Anmerkung 1 zum Begriff: Die intraradikale Wachstumsphase ist durch dichte Hyphenstränge in der äußersten Schicht der Wurzelzellen gekennzeichnet. Ericoide Mykorrhizapilze haben auch saprotrophe Fähigkeiten, die es der Pflanze ermöglichen können, noch nicht verfügbare Nährstoffe aufzunehmen.

3.5

in vivo

Produktion im Freiland (Gewächshaus, Tunnel, offenes Feld)

3.6

in vitro

Produktion unter monoxenischen Bedingungen

3.7

Mykorrhiza

symbiotische Beziehung zwischen einem Fadenpilz und einer Pflanze

Anmerkung 1 zum Begriff: In einer Mykorrhiza-Verbindung besiedelt der Pilz das Wurzelgewebe einer Pflanze entweder intrazellulär (Endomykorrhiza) oder extrazellulär (Ektomykorrhiza). Diese nutzbringende Interaktion verschafft den Pflanzen mehrere Vorteile, unter anderem eine verbesserte Aufnahme von Nährstoffen und Wasser.

[QUELLE: EN 17724:—¹, 3.2.2.6]

3.8

orchidoider Mykorrhizapilz

Fadenpilz, der zum Stamm der Basidiomycota gehört und speziell mit Orchideen endomykorrhizische symbiotische Verbindungen eingeht

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Hyphen des orchidoiden Mykorrhizapilzes dringen in die Wurzelzelle ein und bilden dichte Hyphenstränge, in denen der Nährstoffaustausch stattfindet.

3.9

Fortpflanzungseinheit

Bestandteil des Pilzes, der in der Lage ist, eine Symbiose mit der Wurzel zu initiieren

3.10

sebacinoider Mykorrhizapilz

endophytischer Fadenpilz, der zum Stamm der Basidiomycota, genauer gesagt zur Ordnung der Sebaciales, gehört und mit einer Vielzahl von pflanzlichen Wirten eine mutualistische symbiotische Verbindung eingeht

BEISPIEL Die Modellspezies *Piriformospora* spp.

Anmerkung 1 zum Begriff: Sebacinoiden Mykorrhizapilze besiedeln Pflanzenwurzeln mit intrazellulärem Myzel, wo die Nährstoffaustausche stattfinden.

3.11

Serendipita-Mykorrhizapilz

Serendipitaceae (früher Sebacinales Gruppe B) gehören zu einer taxonomisch, ökologisch und physiologisch vielfältigen Gruppe von Pilzen in den Basidiomycota (Reich der Pilze)

Anmerkung 1 zum Begriff: Während sie historisch als Orchideen-Mykorrhiza anerkannt sind, haben neuere phylogenetische Studien sowohl ihre pandemische Verbreitung als auch das breite Spektrum der von ihnen gebildeten Mykorrhiza-Arten gezeigt.

Anmerkung 2 zum Begriff: Serendipita-Mykorrhizapilze sind mit allen Familien der halmgutartigen Angiospermen (Blütenpflanzen) aus gemäßigten, subtropischen und tropischen Regionen assoziiert.

Anmerkung 3 zum Begriff: Der Serendipitaceae-Mykorrhizapilz sollte als ein bisher verborgenes, aber zugängliches und effektives mikrobielles Werkzeug zur Verbesserung der Pflanzenproduktivität und Stresstoleranz betrachtet werden.

3.12

Spore

sehr kleine und sehr zähe Zelle, die unter günstigen Bedingungen keimfähig ist, verursacht durch den Pilz, der für ihre Verbreitung sorgt

Anmerkung 1 zum Begriff: Es gibt sexuelle, asexuelle oder vegetative Sporen [1].

3.13

Einheit Potential Mykorrhiza

UPM, en: Unit Potential Mycorrhizal

Einheit der Zählung für Mykorrhiza

Dabei steht

- U** für eine Einheit, eine Spore oder eine Fortpflanzungseinheit jeglicher Art, die in der Lage ist, die Mykorrhiza-Bildung in der Wurzel einer Wirtspflanze zu initiieren;
- P** für ein Potential, da die Entwicklung der Symbiose von verschiedenen Faktoren abhängt (Boden, Pflanze, landwirtschaftliche Praktiken, Konkurrenz mit anderen bodenbürtigen Mikroorganismen usw.);
- M** für Mykorrhiza, da das Inokulum in der Lage ist, abhängig von den zuvor genannten Faktoren in Verbindung mit Pflanzenwurzeln neue Mykorrhizen zu synthetisieren.

BEISPIEL UPM je Gramm (% Sporen, % Fortpflanzungseinheiten) (*in vivo*, *in vitro*).

4 Verfahren zur Quantifizierung von Mykorrhiza

4.1 Allgemeines

Um die Quantifizierung in UPM zu erhalten, ist in Tabelle 2 das zur Art der untersuchten Mykorrhiza (siehe Bild 1) passende zu verwendende Verfahren aufgeführt.

Die Verfahren sind folgende:

Verfahren Nr. 1: Sporenisolierung und Zählung MTT

Verfahren Nr. 2 A + B: Färbeverfahren und Zählung von Vesikeln und Sporen in Wurzeln und außerhalb von Wurzeln

Nr. 2 A Verfahren zur Zählung von Sporen

Nr. 2 B Verfahren zur Klärung und Färbung von Wurzelproben und Zählung der Vesikel in den gefärbten Wurzelproben

Verfahren Nr. 2 B: Färbeverfahren und Zählung von Vesikeln in Wurzeln

Verfahren Nr. 3: Endomykorrhiza-Bioassay, die MPN-Untersuchung (höchstwahrscheinlichste Anzahl [en: Most Probable Number] von Mykorrhiza-Fortpflanzungseinheiten)

Verfahren Nr. 4: Plattenzählung von Ektomykorrhiza und Ericoid

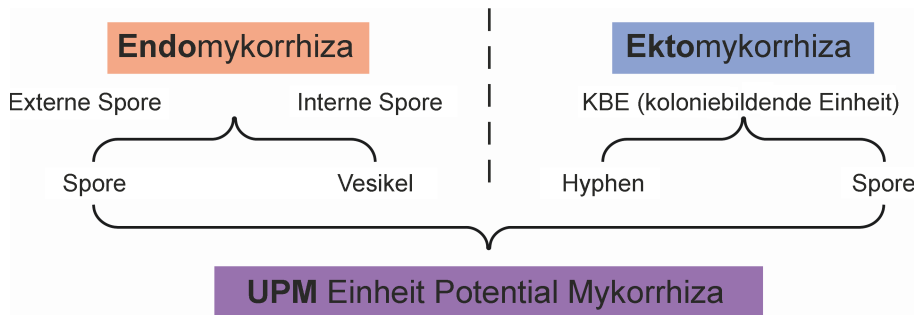


Bild 1 — Verschiedene Arten von Mykorrhiza und Fortpflanzungseinheiten

- Entwurf -

Tabelle 2 — Zu verwendende Verfahren zur Zählung von UPM mit und ohne Pflanzenkulturen

Herkunft des Produkts	Sporen extrahierbar	Sonstige Fortpflanzungseinheiten, Wurzeln extrahierbar	Endomykorrhiza	Ektomykorrhiza	Ericoid	Orchidoid	Sebacinoid	Serendipita
<i>in vitro</i> 1	Ja	NEIN	Verfahren Nr. 1	Verfahren Nr. 4	Verfahren Nr. 4			
<i>in vitro</i> 2	Ja	Ja	Verfahren Nr. 1 zur Zählung der Sporen und Verfahren Nr. 2 zur Zählung der Fortpflanzungseinheiten					
<i>in vivo</i> 1	NEIN	NEIN	Verfahren Nr. 3					
<i>in vivo</i> 2	Ja	NEIN	Verfahren Nr. 1	Verfahren Nr. 4	Verfahren Nr. 3			
<i>in vivo</i> 3	Ja	Ja	Verfahren Nr. 1 zur Zählung der Sporen und Verfahren Nr. 2 zur Zählung der Fortpflanzungseinheiten					
<i>in vivo</i> 4	NEIN	Ja	Verfahren Nr. 2			Verfahren Nr. 3	Verfahren Nr. 3	Verfahren Nr. 3

4.2 Herstellung der Erstprobe

4.2.1 Allgemeines

Basiskonzentration eines Produkts ist ein Produkt von 500 UPM/g. Die gesamte Herstellung sollte nach diesen Vorgaben erfolgen.

H Hohe Konzentration entspricht einer Konzentration von mehr als 100 000 UPM/g;

M Mittel = zwischen 1 000 UPM/g und 100 000 UPM/g;

L Niedrig = unter 1 000 UPM/g.

Bei Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen sollten unterschiedliche Mengen in einer verhältnisgleichen Menge Leitungswasser eingebracht werden, um das Verhältnis 1 : 10 wie folgt einzuhalten:

- Für H werden 2,5 g in 22,5 ml Leitungswasser verwendet;
- Für M werden 25 g in 225 ml Leitungswasser verwendet;
- Für L werden 250 g in 2,250 ml Leitungswasser verwendet.

Eine repräsentative Probe des Produkts muss nach dem folgenden Verfahren hergestellt werden, das die verschiedenen Rezepturen von Produkten auf Basis von Pflanzen-Biostimulanzien berücksichtigt.

4.2.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen

Die der Konzentration des Produkts entsprechende Probenmenge wie unter 4.2.1 beschrieben wird mit Leitungswasser, das Raumtemperatur hat, in einen Kolben gegeben und mindestens 10 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

4.2.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC, en: emulsifiable concentrate)

Die der Konzentration des Produkts entsprechende Probenmenge wie unter 4.2.1 beschrieben wird mit Leitungswasser, das Raumtemperatur hat, in einen Kolben gegeben und mindestens 10 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

4.2.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert

Die der Konzentration des Produkts entsprechende Probenmenge wie unter 4.2.1 beschrieben wird mit Leitungswasser, das Raumtemperatur hat, in einen Kolben gegeben und mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

4.2.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG, en: water dispersible granules) formuliert

Die der Konzentration des Produkts entsprechende Probenmenge wie unter 4.2.1 beschrieben wird mit Leitungswasser, das Raumtemperatur hat, in einen Kolben gegeben und mindestens 40 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist. Falls erforderlich, wird die Dispergierung der Formulierungen mit anderen Geräten, wie z. B. einem Stomacher^{®2}, unterstützt, nachdem die Partikel abgesiebt (100-Mesh-Sieb) wurden, und anschließend werden die abgesiebten Partikel in derselben Suspension resuspendiert [5].

2 Stomacher[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

4.2.6 Feststoff – als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert

Die der Konzentration des Produkts entsprechende Probenmenge wie unter 4.2.1 beschrieben wird mit Leitungswasser, das Raumtemperatur hat, in einen Kolben gegeben und mindestens 40 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist. Falls erforderlich, wird die Dispergierung der Formulierungen mit anderen Geräten, wie z. B. einem Stomacher[®], unterstützt, nachdem die Partikel abgesiebt (100-Mesh-Sieb) wurden, und anschließend werden die abgesiebten Partikel in derselben Suspension resuspendiert [5].

4.2.7 Feststoff – Substrat

Die der Konzentration des Produkts entsprechende Probenmenge wie unter 4.2.1 beschrieben wird mit Leitungswasser, das Raumtemperatur hat, in einen Kolben gegeben und mindestens 20 min lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl gerührt, bis die Verteilung optimal ist.

Da der Zeitaufwand für einige Analysen zu groß und die Kosten zu hoch sind, werden schnelle und wirtschaftliche Verfahren vorgeschlagen.

Entsprechend der Vielfalt der Mykorrhiza-Arten und abhängig von der Herkunft der Produkte und der Extraktion der Sporen und Fortpflanzungseinheiten werden mehrere Verfahren zur Quantifizierung vorgeschlagen.

4.3 Zählverfahren

4.3.1 Allgemeines

Die unter 4.3.2 beschriebenen Verfahren sind die in Tabelle 2 aufgeführten.

4.3.2 Verfahren Nr. 1: Sporenisolierung und Zählung MTT³

4.3.2.1 Verfahren zur Zählung von Sporen

Das folgende Verfahren wird für die Zählung der Sporen verwendet:

- Die Suspension wird durch eine Reihe von Sieben dekantiert, die in absteigender Reihenfolge der Öffnungsgröße angeordnet sind: 250 µm, 150 µm und 25 µm. Die groben Partikel werden auf einem groben Sieb gesammelt, während die Sporen auf einem oder mehreren feineren Sieben aufgefangen werden.
- Kräftiges Waschen mit Wasser ist erforderlich, um Sporen von Gesteinskörnungen aus Ton oder organischen Materialien zu befreien.
- Der gesiebte Inhalt wird in Behältern aufgefangen. Ein bekanntes Volumen wird übertragen (z. B. 1 ml/10 ml des gesiebten Inhalts auf die gerasterten Petrischalen/Platten und unter dem Stereomikroskop beobachtet).
- Die Anzahl der Sporen in der Platte/Schale wird gezählt. Die Gesamtzahl der Sporen in den 100 ml der Suspension wird entsprechend berechnet.
- Die Anzahl der Sporen wird in Sporen/(g der Probe) ausgedrückt.

3 Dehydrogenase-aktivierte Färbung 3-(4,5-Dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT).



Bild 2 — Siebe

4.3.2.2 Lebensfähigkeit der Sporen

4.3.2.2.1 Allgemeines

Die Sporenprobe muss absolut frei von anderen Partikeln sein, da MTT wie INT⁴ mit einigen anderen Bestandteilen reagieren kann.

4.3.2.2.2 Materialien und Geräte

Die Materialien und Geräte für die isolierten Sporen aus dem Inokulum sind wie folgt:

- MTT als erste Option, INT nur, wenn MTT nicht verfügbar ist;
- Steriles destilliertes Wasser;
- Aluminiumfolie;
- Falcon-Röhrchen (15 ml);
- Mikropipette (1 ml);
- Eppendorf^{®5}-Röhrchen;
- Pinzette;
- Petrischale;
- Mikroskop mit einer externen Lichtquelle;
- Brutschrank (28 °C).

4.3.2.2.3 Durchführung

Das folgende Verfahren wird für die Lebensfähigkeit von Sporen verwendet:

4 INT = Iodonitrotetrazolium.

5 Eppendorf[®]-Röhrchen ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

- eine Stammlösung von MTT mit einer Konzentration von 0,1 % wird in sterilem destilliertem Wasser hergestellt und mit Aluminiumfolie abgedeckt;
- aus der Erstverdünnung werden etwa 50 bis 100 Sporen mit der Pipette aufgenommen;
- diese Suspension wird über Nacht bei 28 °C im Brutschrank aufbewahrt, bevor sie verwendet wird;
- in ein Eppendorf®-Röhrchen werden 500 µl Sporensuspension gegeben;
- 500 µl MTT aus der 0,1%igen Stammlösung werden hinzugefügt, um 1 ml Endvolumen zu erhalten;
- die Eppendorf®-Röhrchen werden im Dunkeln 42 h bis 48 h bei 28 °C bebrütet;
- nach 24 h und von 42 h bis 48 h wird beobachtet;
- lebensfähige Sporen erscheinen in Abwesenheit einer externen Quelle dunkelpink und rot/lila, wenn sie mit einer externen Quelle beobachtet werden;
- die prozentuale Lebensfähigkeit kann wie folgt berechnet werden:

Sporenlebensfähigkeit (%) = (Anzahl der lebensfähigen Sporen/Gesamtzahl der Sporen) × 100.

4.3.3 Verfahren Nr. 2: Verfahren zur Klärung und Färbung von Wurzelproben und Zählung der Vesikel in den gefärbten Wurzelproben

4.3.3.1 Materialien und Geräte

Die Materialien und Geräte für die Zählung von Vesikeln sind:

- Produkt/Probe auf Mykorrhiza-Basis;
- 25-µm- bis 50-µm-Sieb für kleine Vesikel;
- 150-µm-Sieb für mittelgroße Vesikel;
- 250-µm-Sieb für sehr große Vesikel;
- Gefäße zum Auffangen der Siebung;
- Stereo-Zoom (Stereomikroskop) und einfaches Verbundmikroskop;
- Petrischalen (90 mm oder 30 mm) zur Beobachtung der Siebung unter dem Stereomikroskop;
- Mikropipetten für die Sporenentnahme;
- Zentrifuge;
- KOH-Lösung⁶ (10 %);
- Becherglas (250 ml);
- Schere und Nadeln;
- Wasserbad;

6 KOH = Kaliumhydroxid

- Grobsiebe (250 µm, 150 µm und 25 µm) zur Vermeidung von Wurzelverlusten beim Waschen/Austauschen von Lösungen;
- Kunststoffvials mit dicht schließenden Deckeln zur Lagerung von gefärbten Proben in 50 % Glycerin;
- alkalisches H₂O₂ (3 ml 25%ige Ammoniaklösung + 30 ml 10%iges H₂O₂ + 67 ml destilliertes Wasser);
- 1 % HCl;
- 50%ige Glycerin-Wasser-Lösung (Volumenanteil) zum Entfärben und Lagern von gefärbten Wurzeln;
- Lactoglycerin (876 ml Milchsäure + 64 ml Glycerin + 60 ml destilliertes Wasser);
- Bunsenbrenner/Spirituslampe.

4.3.3.2 Durchführung

Die Wurzelproben werden unter fließendem Leitungswasser gründlich gewaschen. Das Wurzelmaterial wird in ein thermoresistentes Glasbehältnis mit 50 ml Volumen gegeben und mit 10 % KOH bedeckt (nicht mehr als 2/3 des Volumens des Glasbehältnisses). Anschließend wird 30 min bis 60 min bei 80 °C im Trockenschrank bebrütet.

Die KOH-Lösung wird abgegossen und die Wurzeln werden in einem Becherglas mit mindestens drei vollständigen Wasserwechseln mit Leitungswasser gut gespült oder so lange, bis keine braune Farbe mehr im Spülwasser zu sehen ist.

Falls erforderlich, werden die Wurzeln mit alkalischem H₂O₂ bei Raumtemperatur für 10 min oder bis zum Bleichen der Wurzeln bedeckt.

Die Wurzeln werden mit mindestens drei vollständigen Wasserwechseln mit Leitungswasser gründlich gespült, um das H₂O₂ zu entfernen.

Die Wurzeln werden mit 1%iger HCl bedeckt und 3 min bis 4 min lang eingeweicht, dann wird die Lösung abgegossen. Danach wird nicht gespült, da die Proben für eine korrekte Färbung angesäuert sein müssen.

Die Wurzeln werden mit Färbelösung (5 % schwarze Tinte + 8 % Acetat in destilliertem Wasser) bebrütet und über Nacht zum Färben aufbewahrt.

Die Wurzelproben werden zum Entfärben in eine Glas-Petriplatte/Multiwell-Platte gelegt. Als Entfärbelösung wird 50%iges Lactoglycerin verwendet oder alternativ Lactoglycerin durch Leitungswasser für mindestens 2 h bis zu 24 h ersetzt.

Die Gesamtzahl der Wurzelfragmente/g, die intraradikale Vesikel enthalten, wird anhand von Tabelle 3 berechnet.

Tabelle 3 — Zählung der Anzahl der intraradikalen Vesikel im Produkt

Serien-nummer	Anzahl der Vesikel/Wurzel-fragment	Häufigkeit der Wurzel-fragmente in 1 ml	Gesamtzahl der Vesikel in 1 ml	Gesamtzahl der Vesikel in ... ml (Verdünnungs-faktor)	Gesamtzahl der Vesikel in 25 g Probe	Gesamtzahl der Vesikel/g in der Probe
1	1					
2	2					
3	3					
4	4					

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Serien-nummer	Anzahl der Vesikel/Wurzel-fragment	Häufigkeit der Wurzel-fragmente in 1 ml	Gesamtzahl der Vesikel in 1 ml	Gesamtzahl der Vesikel in ... ml (Verdünnungs-faktor)	Gesamtzahl der Vesikel in 25 g Probe	Gesamtzahl der Vesikel/g in der Probe
5	5					
6	6					
7	7					
8	8					
9	9					
10	10					

Es muss sichergestellt werden, dass

- die gesiebten Inhalte nicht mit dem Wasser weggeschwemmt werden;
- Sporen, die möglicherweise in den Rändern der Siebe gefangen sind, sorgfältig isoliert/aufgefangen werden, da die Beobachtungen sonst fehlerhaft sein können.

Eine genauere Erklärung enthält das folgende Beispiel:

- es werden 25 g des Bodens/der Probe in 100 ml sterilem Wasser suspendiert;
- es wird eine homogenisierte Suspension hergestellt;
- das Sieb wird wie in Bild 2 beschrieben verwendet;
- die gesiebten Inhalte werden aufgefangen und das Endvolumen von 100 ml rekonstituiert;
- die Suspension wird erneut homogenisiert und 1 ml der Suspension in eine Petrischale gegeben (in dreifacher Ausführung: A, B und C);
- die Anzahl der Sporen in jeder Parallelprobe wird unter dem Stereomikroskop beobachtet und berechnet; dabei wird die Anzahl der beobachteten Sporen wie folgt angenommen: 10 Sporen (A), 15 Sporen (B) und 14 Sporen (C);
- die durchschnittliche Anzahl der Sporen wird wie folgt berechnet: $(\text{Anzahl der Sporen in A} + \text{B} + \text{C}) / 3$. In diesem Fall beträgt die durchschnittliche Anzahl der Sporen 13 (dies ist die Anzahl der Sporen, die in 1 ml der Suspension beobachtet werden); ein Beispiel ist in Tabelle 4 aufgeführt;
- die Anzahl der Sporen in 100 ml Suspension wird wie folgt berechnet: durchschnittliche Anzahl der Sporen/ml $\times 100$. Im vorliegenden Fall sind es $13 \times 100 = 1\,300$ Sporen. (Dies ist die Anzahl der Sporen, die in 25 g Probe vorhanden sind);
- die Anzahl der Sporen/g wird wie folgt berechnet: Gesamtzahl der in 100 ml Probe vorhandenen Sporen / 25. In diesem Fall ist es wie folgt: $1\,300 / 25 = 52$ Sporen.

Tabelle 4 — Zählung der Anzahl der intraradikalen Vesikel im Produkt

Serien-nummer	Anzahl der Vesikel/Wurzel-fragment	Häufigkeit der Wurzel-fragmente in 1 ml	Gesamtzahl der Vesikel in 1 ml	Gesamtzahl der Vesikel in 100 ml (Verdünnungs-faktor)	Gesamtzahl der Vesikel in 25 g Probe	Gesamtzahl der Vesikel/g in der Probe
1	1	10	10	4 500	4 500	180
2	2	4	8			
3	3	2	6			
4	4	2	8			
5	5	1	5			
6	6	0	0			
7	7	0	0			
8	8	1	8			
9	9	0	0			
10	10	0	0			
Gesamt		20	45			

So werden die folgenden Ergebnisse erzielt:

- die Anzahl der Sporen/g der Probe ist 52;
- Gesamtzahl der Vesikel/g im Produkt = 180;
- Gesamtzahl der UPM/g im Produkt = Gesamtzahl der Sporen/g + Gesamtzahl der Vesikel/g = 52 + 180;
- Gesamtzahl der UPM/g im Produkt = 232.

4.3.4 Zählung der Gesamtzahl der UPM im Produkt nach Verfahren Nr. 1 + Verfahren Nr. 2

Die Gesamtzahl der UPM/g im Produkt wird wie folgt geschätzt: Gesamtzahl der UPM/g im Produkt = Gesamtzahl der Sporen/g (Verfahren 1) + Gesamtzahl der Vesikel/g (Verfahren 2).

Die Gesamtzahl der UPM im gesamten Produkt wird wie folgt berechnet: Gesamtzahl der UPM/g im Produkt × Nettogewicht (g) des Produkts.

4.3.5 Verfahren Nr. 3: Endomykorrhiza-Bioassay

4.3.5.1 Prinzip der höchstwahrscheinlichsten Anzahl von Mykorrhiza-Fortpflanzungseinheiten (Most Probable Number of mycorrhizal propagule, MPN)

Die Bestimmung des Mykorrhiza-Potentials eines Bodens oder Pilzinokulums durch die MPN-Untersuchung (Most Probable Number of mycorrhizal propagule) besteht darin, die Anzahl der Fortpflanzungseinheiten (Pilz-Fortpflanzungseinheit wie Spore, Vesikel, Sporokarp, mykorrhizische Wurzelfragmente, lebende Hyphen oder Hilfszellen) zu quantifizieren. Hierbei handelt es sich um eine biologische Untersuchung, die in der Regel in Gegenwart von Mykorrhiza-Wirtspflanzen durchgeführt wird. Der Potentialbegriff bezieht sich auf die Fähigkeit eines Boden- oder Pilzinokulums, unter vordefinierten Wachstumsbedingungen und mit vordefinierten Wirtspflanzen Mykorrhiza zu bilden, je nach Fragestellung [6].

Vorab verlangt die MPN-Untersuchung die Festlegung des Begriffs „Potential“, insbesondere bei einem Pilz-Inokulum. Die MPN-Untersuchung kann durch verschiedene Parameter stark beeinflusst werden (Wahl der Wirtspflanze, Pflanzendichte, Wahl des Substrats, Wahl der Düngung, Lichtintensität, Wachstumsbedingung,

Volumen der Anzuchttopfe und Zeitpunkt der Durchführung oder Saisonalität). Jede Bedingung, die die Keimung der Fortpflanzungseinheiten und der intraradikalen Mykorrhiza hemmt (hoher Phosphatgehalt, Art des Düngers, Art des verwendeten Substrats, Verwendung von Pflanzen mit geringer oder mittlerer Mykorrhiza, reduzierte Lichtintensität, geringe Pflanzendichte usw.), kann den Wert der durch die MPN-Untersuchung berechneten Anzahl der Fortpflanzungseinheiten mehr oder weniger stark beeinflussen (abhängig von einem Faktor von 1 bis 1 000), was möglicherweise von der tatsächlichen Anzahl der in der Probe enthaltenen Fortpflanzungseinheiten ablenkt. Der Begriff „Potential“ ist daher gleichbedeutend mit „der Fähigkeit, bezogen auf die Bedingungen der Untersuchungsdurchführung Mykorrhiza zu erzeugen“, aber auch mit der „Fähigkeit der Fortpflanzungseinheiten (die die Anzahl, die Lebensfähigkeit und die Keimruhe berücksichtigt), Mykorrhiza zu erzeugen“.

Wenn es darum geht, die nächstgelegene Anzahl der tatsächlich in einem Inokulum enthaltenen Fortpflanzungseinheiten zu bestimmen (was als „maximales Mykorrhiza-Potential“ bezeichnet werden kann), müssten Bedingungen geschaffen werden, die die Keimung der Fortpflanzungseinheiten und die intraradikale Kolonisierung fördern. Hierzu empfiehlt sich die Verwendung von hoch anfälligen Mykorrhizapflanzen wie *Plantago lanceolata*, *Trifolium pratensis* oder *Medicago truncatula*, die sich auf einem chemisch und biologisch inerten Substrat (meist sterilisierter Sand) entwickeln, sowie die kontrollierte Anwendung eines niedrig verfügbaren Phosphatdüngers (Hoagland-Lösung). Auch die Pflanzendichte ist ein wichtiger Faktor: je dichter das Wurzelsystem ist, desto größer sind die Chancen, mit einer Pilz-Fortpflanzungseinheit in Kontakt zu kommen. Möchte man hingegen, insbesondere für ein Pilzinokulum, das Mykorrhiza-Potential im Rahmen einer bestimmten Anwendung bestimmen (was man als Mykorrhiza-Potential relativ zu einem vorgegebenen Ziel bezeichnen kann), sollte die Untersuchung unter Annäherung an die Zielbedingungen durchgeführt werden, insbesondere in Bezug auf Wirtspflanze, Substrat und Düngung.

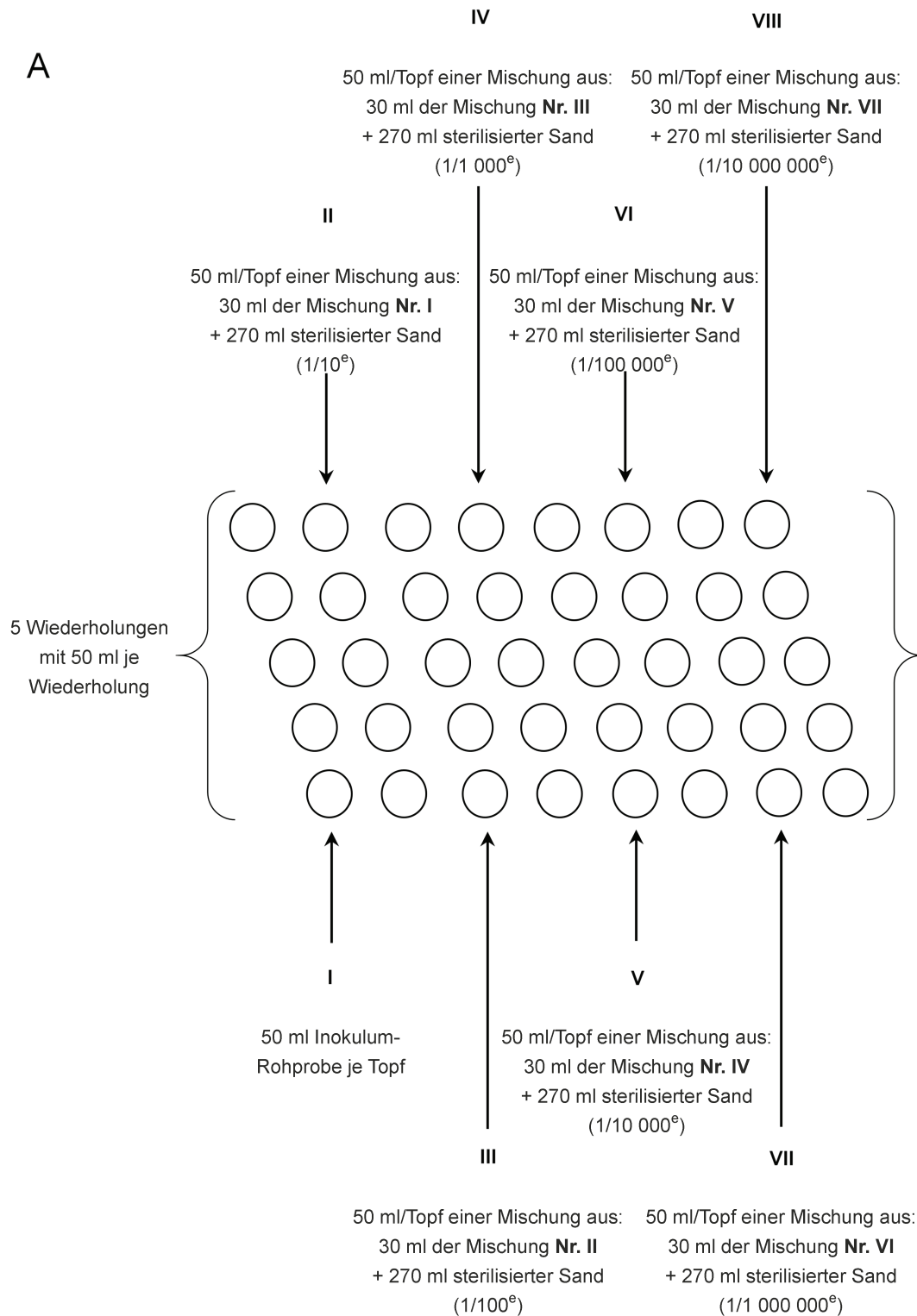
Das Prinzip der MPN-Untersuchung besteht darin, aufeinanderfolgende Verdünnungen der Probe (siehe Bild 3) mit einem sterilisierten Substrat (je nach Fragestellung entweder der gleiche Zielboden oder Sand, der zweimal bei 120 °C für 6 h sterilisiert wird) unter Verwendung einer schnell wachsenden Pflanzenart (meist eine halmgutartige Pflanze oder eine Leguminose, die sehr anfällig für eine Mykorrhizakolonisierung ist) herzustellen. Der Verdünnungsfaktor, die Anzahl der aufeinanderfolgenden Verdünnungen und die Anzahl der Wiederholungen hängen von der verfügbaren Zeit, der Art der Probe und dem gewünschten Genauigkeitsgrad ab. Der Verdünnungsfaktor beeinflusst die Genauigkeit des MPN-Untersuchungswerts; die Anzahl der Wiederholungen beeinflusst den Vertrauensbereich sowie den Standardfehler (insbesondere für Vergleichszwecke); die Anzahl der aufeinanderfolgenden Verdünnungen „kappt“ den Höchstwert, der berechnet werden kann.

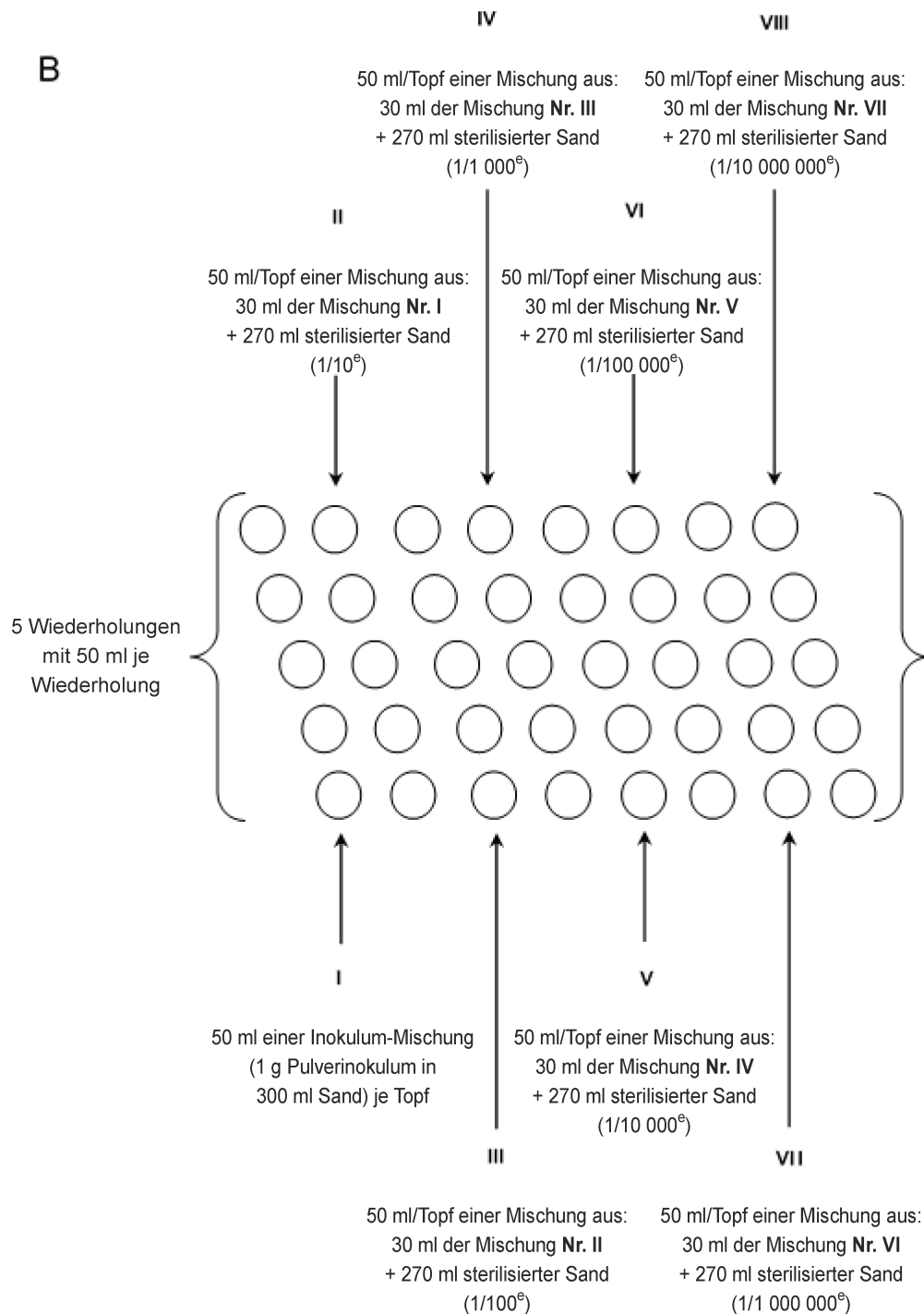
Nach 6 Wochen erfolgt eine Bewertung von intakten Wurzelsystemen nach dem Waschen und Färben mit chinesischer Tusche durch Beobachtung unter dem Binokularmikroskop. Jeder Vermerk wird mit „+“ oder „-“ gekennzeichnet, je nachdem, ob eine sichtbare Mykorrhizakolonisierung vorliegt oder nicht [7]. Die Anzahl der Fortpflanzungseinheiten je g oder je kg Boden wird dann von diesem Messwert mithilfe von Tabellen abgeleitet, die eine Reihe von statistischen Schätzungen enthalten [8], oder, was noch schneller geht, mithilfe von kostenlosen und im Internet verfügbaren Programmen [16], [17].

In Bild 1 sind zwei Arbeitsvorschriften beschrieben, die sich darin unterscheiden, ob das Inokulum roh oder auf Basis von Mykorrhiza-Wurzelfragmenten in Pulverform vorliegt. Im letzteren Fall wird die erste Verdünnung gezielt eingestellt, da die Pflanzen im reinen Pulvermaterial nicht wachsen können und die Kosten für das Pulverinokulum hoch sind.

Das Inokulum (insbesondere das Inokulum auf Pulverbasis mit Mykorrhiza-Wurzelfragmenten) kann den MPN-Untersuchungssatz mit 6 aufeinanderfolgenden Verdünnungen sättigen. In diesem Fall wird die Untersuchung abhängig von den Daten, die mit dem mikrowellenunterstützten Färbeverfahren erhalten wurden, mit 7 bis 10 aufeinanderfolgenden Verdünnungen angepasst.

Die Durchführung der MPN-Prüfung kann je nach Inokulumformulierung mehr oder weniger schwierig sein, insbesondere bei Inokulumrezepturen mit großer Partikelgröße oder Flüssig-/Gelrezeptur (Probleme könnten bei der ordnungsgemäßen Homogenisierung während der Herstellung der Verdünnung auftreten). Da die Rezeptur ein wichtiger integrativer Bestandteil eines Mykorrhiza-Inokulums ist, ist es in diesem Fall nicht ratsam, Mykorrhiza-Fortpflanzungseinheiten zu extrahieren, um dann die MPN-Untersuchung durchzuführen.





Legende

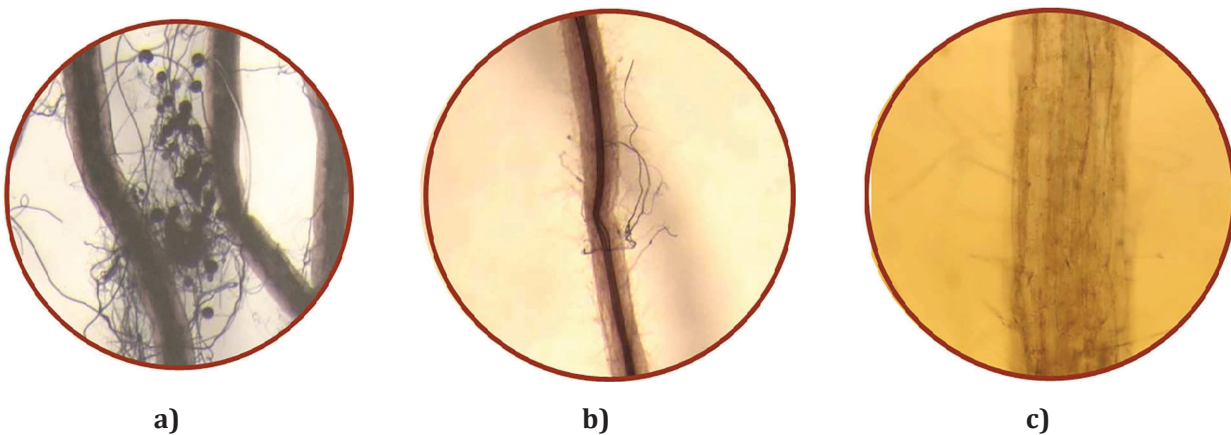
A Volumen, angepasst mit rohem Inokulum

B Volumen, angepasst mit Inokulum auf Pulverbasis mit Mykorrhiza-Wurzelfragmenten

Bild 3 — Beispiel für eine schematische Darstellung der MPN-Untersuchung

In Bild 3 wird das zu analysierende Inokulum in 6 aufeinanderfolgenden Verdünnungen (um das 10-Fache) mit fünf Parallelproben je Verdünnung verdünnt. Die Auswertung der MPN-Untersuchung hängt von der Möglichkeit ab, das gesamte Wurzelsystem zu beobachten, um nach Mykorrhiza-Fortpflanzungseinheiten zu suchen.

Eine Kolonisierung des Wurzelsystems (mit typischen Pilzstrukturen wie Vesikeln, Arbuskeln, Sporen und eventuell Hilfszellen um die Wurzeln herum) kann leicht als positiv gekennzeichnet werden (siehe Bild 4 a)). Wenn dann keine Mykorrhiza-Pilzstruktur beobachtet wird, ist die Bewertung negativ (Bild 4 c)). Die Fortpflanzungseinheiten können jedoch aus Sporen bestehen, die zwar keimen können, deren Entwicklung von Hyphen aber die Wurzel umgeben und/oder mit ihr in Berührung kommen kann, ohne in die Rinde einzudringen. Die Anwesenheit eines extraradikalen Mykorrhizapilzes sollte als positiv gekennzeichnet werden, vorausgesetzt, dass solche Strukturen gut als Mykorrhiza erkannt werden (was bedeutet, dass die Anwesenheit von Sporen und/oder Wurzelfragmenten beobachtet wird, die Vesikeln/Sporen enthalten, die mit den Hyphen verbunden sind, die mit der Wurzel in Berührung kommen oder sie umgeben). Es kann unterschieden werden zwischen der Fähigkeit, effizient Mykorrhiza in der Wurzel zu erzeugen (relatives Potential, siehe Bild 4 a)), und der Gesamtzahl der Fortpflanzungseinheiten (maximales Potential), die die Fortpflanzungseinheiten, die das kortikale Gewebe kolonisieren (Bild 4 a)), mit denen, die um das Wurzelsystem herum entdeckt werden (Bild 4 b)), berücksichtigt.



Legende

- a)** Positive Kennzeichnung, wenn die intraradikale Mykorrhizakolonisierung deutlich sichtbar ist.
- b)** Positive Kennzeichnung durch die Anwesenheit einer Hyphe, die die Wurzel umgibt und mit einer Mykorrhiza-Spore verbunden ist (im Rahmen der Erkennbarkeit solcher Strukturen), aber ohne Kolonisierung innerhalb des Wurzelsystems.
- c)** Negative Kennzeichnung, wenn keine Mykorrhiza-Pilzstruktur beobachtet wird.

Bild 4 — Definition der MPN-Bewertung aus 3 Fallstudien

4.3.5.2 Arbeitsvorschriften und Beispiele

4.3.5.2.1 Allgemeines

Es gibt 4 Schritte, um die MPN zu erhalten.

4.3.5.2.2 Schritt 1

4.3.5.2.2.1 Allgemeines

Betrachtet man nur das Mykorrhiza-Inokulum, so werden im Folgenden zwei Probentypen vorgestellt: zum einen das sogenannte „rohe“ Inokulum, d. h. ein Inokulum auf Substratbasis, das Mykorrhizaforpflanzungseinheiten in Form von Wurzelfragmenten, Sporen und/oder Hyphen enthält, und zum anderen ein reines Pulver aus Mykorrhizawurzelfragmenten, das Mykorrhizaforpflanzungseinheiten in Form von intraradikalen Sporen und Vesikeln enthält. In der Regel wird erwartet, dass die Anzahl der Fortpflanzungseinheiten bei reinem Mykorrhiza-Inokulum auf Pulverbasis höher ist als bei rohem Inokulum. Da im folgenden Beispiel 50-ml-Töpfe (Multiarray-Töpfe) verwendet werden, wird jede Verdünnung aus 300 ml Mischung hergestellt (wird entsprechend dem Volumen des Topfes angepasst). Wenn sich die Massendichte der Probe und des

Verdünnungsmittels stark unterscheiden (z. B. ein Inokulum auf Vermiculit-Basis und ein Verdünnungsmittel auf Sandbasis), ist es besser, nach Volumen und nicht nach Masse zu mischen.

4.3.5.2.2.2 Schritt 1 a): rohes Inokulum

In fünf 50-ml-Töpfen benötigt die erste Verdünnung (sogenannte Reinverdünnung) insgesamt 250 ml. Da für die Herstellung der nächsten Verdünnung ein Bruchteil der aktuellen Verdünnung benötigt wird, ist ein Zusatz (50 ml, also insgesamt 300 ml) erforderlich. Die 50-ml-Töpfe werden jeweils mit dem reinen Produkt des Mykorrhiza-Inokulums gefüllt. Es müssen also nach dem Befüllen der ersten Verdünnungsreihe noch 50 ml übrig bleiben.

4.3.5.2.2.3 Schritt 1 b): Inokulum auf Pulverbasis

1 g des Pulverinokulums wird in 300 ml sterilisiertem Sand gemischt. Danach wird jeder der 50-ml-Töpfe mit dem reinen Produkt des Mykorrhiza-Inokulums gefüllt. Es müssen also nach dem Befüllen der ersten Verdünnungsreihe noch 50 ml übrig bleiben.

4.3.5.2.3 Schritt 2: Herstellung der Verdünnung

Aus den restlichen 50 ml, die durch beide Verfahren in 1 erhalten wurden, wird die zweite Verdünnung (1/10 in diesem Beispiel) hergestellt: 30 ml des Inokulums werden mit 270 ml sterilisiertem Sand verdünnt (insgesamt 300 ml). Dann wird der 50-ml-Topf mit dieser Mischung gefüllt. Bestenfalls sind noch 50 ml vorhanden. Aus den restlichen 50 ml wird die dritte Verdünnung wie bei der zweiten hergestellt und so weiter, bis die gewünschte Endverdünnung erreicht ist. Die endgültige MPN-Untersuchung sollte 8 Verdünnungsreihen mit 10-fachen Verdünnungen und 5 Wiederholungen je Verdünnung enthalten, um den größten Teil der Produktvielfalt des Inokulums abzudecken.

4.3.5.2.4 Schritt 3: Pflanzensaat

In jeden Topf werden Samen von stark mykorrhizierenden Pflanzenarten gesät (meist *Plantago lanceolata*, *Trifolium pratensis* oder *Medicago truncatula*). Es ist erforderlich, 10 bis 15 Samen je Topf auszusäen, um ein dichtes Wurzelsystem zu bilden, das die Chancen für den Kontakt mit Pilz-Fortpflanzungseinheiten erhöht. Dann werden die Töpfe mit 0,5 cm Blähton (Partikel mit einem Durchmesser von 1 mm bis 2 mm) abgedeckt, um eine Verunreinigung durch Algen und Verdunstung zu vermeiden. Die Pflanzen werden dann 6 bis 7 Wochen lang wachsen gelassen. Die Düngung erfolgt mit einer klassischen Hoagland-Lösung 1x, einmal je Woche mit 20 ml je Topf. Danach erfolgt die Bewässerung nach Bedarf.

4.3.5.2.5 Schritt 4: Beurteilung der Beimpfung

Am Ende der Kultur werden die Wurzeln der einzelnen Töpfe geerntet und gewaschen (Vorsicht bei der Kennzeichnung) und anschließend mit schwarzer Tinte angefärbt [8]. Dann wird die Anwesenheit (durch „-“ oder „-“) von Mykorrhizapilzen in der Wurzel und/oder um das gesamte Wurzelsystem herum unter dem Binokular (oder ggf. Mikroskop) bewertet.

Anschließend wird der MPN-Rechner (MPN-Rechnerprogramm, siehe Link oben) wie in Bild 5 unten gezeigt vorbereitet und die Anzahl der Fortpflanzungseinheiten je Liter (l) oder Kilogramm (kg) je nach verwendetem Inokulumtyp geschätzt (siehe 4.5.2.1 und 4.5.2.2).

Link: http://www.icaais.org/archive/pdf/2016abstracts/ICAIS%20Tuesday%20PM%20Session%20C/250_Molina.pdf

Beim Vermischen der Erde/des Inokulums mit dem Substrat, das als Verdünnungsmittel dient, werden wegen der möglichen Anwesenheit elektrostatischer Partikel (dies ist bei kleinen Mykorrhiza-Wurzelfragmenten der Fall) Handschuhe und ein Mundschutz getragen und die Mischung gut von Hand in einem Glasbecher mit einem Fassungsvermögen von 2 l bis 5 l durchgeführt. Dieses Mischen ist entscheidend für die korrekte Durchführung der Verdünnungen (Streuung der Fortpflanzungseinheiten). Das Becherglas sollte auch zwischen den einzelnen Verdünnungen gereinigt werden (das Becherglas muss vor der Verwendung getrocknet werden, um ein Anhaften des Inokulums an der Oberfläche zu vermeiden).

Es ist ratsam, einen Abstand (eine Reihe) zwischen den Verdünnungen zu lassen, um die Entwicklung der Mykorrhiza am Boden der Töpfe zu vermeiden, es sei denn, jeder Topf enthält ein Vlies, um die Wurzelentwicklung nur innerhalb des Topfes zu beschränken.

Bei der Anzucht ist darauf zu achten, dass die Lichtintensität mindestens 18 000 lx beträgt (optimal sind 35 000 lx bis 40 000 lx für 8 h bis 12 h oder besser noch natürliches Licht im Gewächshaus).

Die Temperatur sollte zwischen 22 °C und 30 °C liegen, optimal um 26 °C.

Es ist erforderlich, regelmäßig und bedarfsgerecht zu gießen und zu vermeiden, dass das Substrat zu viel Wasser enthält, was für die gute Entwicklung der Mykorrhizapilze schädlich ist.

Hinsichtlich der Düngung (bei Verwendung von Sand als Verdünnungsmittel) sollte eine kontrollierte Nährlösung, wie z. B. Hoagland, in einer Menge von 20 ml bis 50 ml je Topf einmal je Woche bevorzugt werden [11].

Eine Kulturdauer von 6 bis 7 Wochen wird dringend empfohlen, um die meiste Zeit der Sporenkeimung von verschiedenen Mykorrhiza-Arten abzudecken. Es wird nicht empfohlen, diese Kulturzeit zu verkürzen. Die Wachstumszeit darf je nach Spezifikation, die auf einem bestimmten Mykorrhizaprodukt angegeben ist, verlängert werden.