

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Braunschweig

Eignung serologischer Testkits zum Nachweis von *Phytophthora* spp. in Wasserproben kommerzieller Betriebe

Studies on the detection of *Phytophthora* spp. with serological test kits in water samples of nurseries

Thorsten Ufer und Sabine Werres

Zusammenfassung

Drei käufliche serologische Testkits für *Phytophthora* spp. wurden auf ihre Eignung für den Nachweis dieser Organismen in Wasserproben untersucht. Die Wasserproben wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten in Baumschulen genommen. Für die Testkits wurden die Proben filtriert und die Filter weiter verarbeitet. Als Referenzmethode diente der Rhododendronblatttest, der mit unfiltrierten Wasserproben durchgeführt wurde. Die vier Testverfahren wiesen einen unterschiedlich hohen Anteil kontaminierter Wasserproben auf. Die Rate positiver Proben lag zwischen 27,1 und 50,8 %. Die Ergebnisse der drei Testkits stimmten nicht in jedem Fall mit denen aus dem Rhododendronblatttest überein. Die Zahl falsch negativer Ergebnisse schwankte bei den drei Testkits zwischen 8,5 und 27,1 % der Proben. Es gab aber auch Proben, in denen mit dem Ködertest *Phytophthora* nicht nachgewiesen werden konnte, ein oder mehrere der Testkits aber positiv reagierten.

Stichwörter: *Phytophthora*, Nachweis, serologische Testkits, Wasser

Abstract

Three serological test kits for detecting *Phytophthora* spp. in water samples were tested. The water samples were taken from commercial nurseries on different dates during the year. The water samples for the test kits were filtered and the filters were then used. The Rhododendron leaf test using nonfiltered water samples was used as a reference. The number of samples tested positive with *Phytophthora* spp. depended on the test method and the results varied between 27.1 and 50.8 %. The results obtained with the three test kits did not correspond in all cases with those obtained with the Rhododendron leaf test. All three test kits showed false negative results varying between 8.5 and 27.1 % of the water samples. There were also some water samples which tested negative using the reference method but positive with one or more test kits.

Key words: *Phytophthora*, detection, serological detection kits, water

1 Einleitung

Die Krankheitserreger der Gattung *Phytophthora* können in der gartenbaulichen Produktion zu wirtschaftlich bedeutenden Ausfällen führen. Je nach Art befallen sie die Pflanzen vom Boden aus oder über die Luft. Die Erreger sind in ihrer Lebensweise op-

timal an Wasser angepasst. Wasser, das mit *Phytophthora* kontaminiert ist, zählt daher zu den bedeutenden Verbreitungswegen dieser Mikroorganismen (PITTIS und COLHOUN, 1984; BACKHAUS, 1989; THEMANN et al., 2002a). Für die gartenbaulichen Betriebe ist es wichtig zu wissen, ob ihr Gießwasser mit *Phytophthora*-Arten kontaminiert ist. Die Nachfrage nach zuverlässigen und empfindlichen Diagnosemethoden, die einfach zu handhaben sind, steigt. Zu den Testverfahren, die bisher zur Diagnose der Wasserkontamination geprüft wurden, gehören vor allem direktes Ausplattieren, Ködertests und verschiedene serologische Verfahren. Für einzelne *Phytophthora*-Arten kommen zunehmend molekularbiologische Nachweisverfahren hinzu.

Seit einigen Jahren werden für den gattungsspezifischen Nachweis von *Phytophthora* verschiedene serologische Testverfahren verwendet. Sie basieren auf dem klassischen Prinzip des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), das 1977 von CLARK und ADAMS für den Nachweis von Viren beschrieben wurde. Bei den so genannten *multiwell* Kits sind die Antikörper (*capture antibodies*) wie beim klassischen ELISA an die Mikrotiterplatte gebunden, bei den sogenannten *on-site* Kits dagegen an eine Membran. Die Tests wurden vor allem für den Nachweis der Erreger im Pflanzengewebe entwickelt. Alle Reagenzien und Materialien werden mitgeliefert. Die *on-site* Kits, die für den Nachweis von *Phytophthora* spp. angeboten werden, unterscheiden sich vor allem in der Art der Probenaufarbeitung. Der Aufschluss des Probenmaterials erfolgt entweder mit Hilfe kleiner Stahlkugeln oder durch Zerreiben. Der Vorteil der *on-site* Kits ist die einfache Handhabung und die schnelle Reaktionszeit. Sie können vor Ort direkt im Pflanzenbestand eingesetzt werden und ergeben innerhalb von 10 min ein Ergebnis. Die *multiwell* Kits dagegen lassen sich nur im Labor anwenden, da für diese Testverfahren ein Fotometer mit Filtern für den Bereich 620 nm und möglichst ein Mikrotiterplatten-Waschgerät benötigt wird. Im Gegensatz zu den *on-site* Kits sind sie für größere Probenzahlen besser geeignet.

Über die Eignung von kommerziellen *Phytophthora*-Kits zur Untersuchung von Wasserproben gibt es bisher nur wenige Erfahrungen (ALI-SHTAYEH et al., 1991; PETTIT et al., 2002). In Versuchen sollten daher drei kommerzielle Testkits, zwei *on-site* Kits und ein *multiwell* Kit, für den Nachweis von *Phytophthora* in Wasserproben aus Praxisbetrieben geprüft werden. Als Vergleichstest diente das Köderverfahren mit Rhododendronblättern, das ein sehr empfindliches Nachweisverfahren für Wasserproben ist (THEMANN et al., 2002b). Die Untersuchungen wurden mit Wasserproben aus dem Wasserkreislaufsystem kommerzieller Baumschulen durchgeführt. Das Wasser enthält in diesen großen Recyclingsystemen be-



Abb. 1. Die in den Untersuchungen verwendeten Testkits: a – ALERT-LF™ *Phytophthora* spp. (Neogen, UK); b – POCKET DIAGNOSTIC® *Phytophthora* (Central Science Laboratory, UK); c – Teststreifen der on-site Kits (oben: ALERT-LF™, unten: POCKET® DIAGNOSTIC); d – AGRISCREEN® LABORATORY IMMUNOASSAY *Phytophthora* (Neogen, UK)

sonders viele organische und anorganische Substanzen, von denen nicht bekannt ist, ob sie bei den serologischen Testkits zu Fehlreaktionen führen können.

2 Material und Methoden

2.1 Wasserproben und Zeitpunkt der Probenahme

Insgesamt wurden 59 Wasserproben in fünf Baumschulen an jeweils vier unterschiedlichen Stellen im Wasserrecyclingsystem genommen. Probenahmeterminen waren im Mai, August und Oktober 2005. Das Probenvolumen betrug jeweils 3 L. Etwa die Hälfte der 59 Wasserproben sah trübe aus. Bis zur Aufarbeitung wurden die Proben bei 8–10 °C gekühlt.

2.2 Testkits

Verwendet wurden zwei kommerziell angebotene *Phytophthora*-spezifische on-site Testkits („ALERT-LF™ *Phytophthora* spp.“, Neogen, UK und „POCKET DIAGNOSTIC® *Phytophthora*“, Central Science Laboratory, UK) und ein multiwell Kit („AGRISCREEN® LABORATORY IMMUNOASSAY *Phytophthora*“, Neogen, UK) (Abb. 1). Zur Vereinfachung werden im Folgenden die Bezeichnungen der Testkits abgekürzt: ALERT-LF™, POCKET DIAGNOSTIC®, AGRISCREEN®.

2.3 Probenaufarbeitung und -untersuchung mit den Testkits

Um die in den Wasserproben vorhandenen Organe von *Phytophthora* zu konzentrieren, wurden 2 L von jeder Probe filtriert. Die Filtration erfolgte nach der Methode von THEMANN et al.

(2002b) mit einem Membranfilter (Cellulosenitrat, WHATMAN® SCHLEICHER & SCHUELL Ref-Nr. 10400114, Porenweite von 8 µm, Durchmesser 50 mm). Die 2 L wurden durch insgesamt 10 Filter (jeweils 200 ml) gegeben. Die Filter lagerten bis zur Weiterverarbeitung in PE-Gefrierbeuteln vakuumverschweißt und bei –70 °C. Nach dem Auftauen wurden die 10 Filter, die zu einer Probe gehörten, jeweils in gleich große Viertel geteilt. Je 10 Viertel pro Wasserprobe bildeten die Probe für die Untersuchung mit einem Testkit. Die weitere Aufarbeitung der Filterstücke erfolgte entsprechend der Angaben für Pflanzenmaterial in der jeweiligen Gebrauchsanweisung.

– **on-site Kits (POCKET DIAGNOSTIC®, ALERT-LF™)** – Zunächst erfolgte die Zerkleinerung der Filterstücke in 5–10 mm² große Stücke. Anschließend wurden für den ALERT-LF™ die Filterstückchen in einen reißfesten Kunststoffbeutel gefüllt und der Extraktionspuffer zugegeben. Die Filterstücke wurden dann mit einem Pistill ca. 1 min gründlich mazeriert. Von dieser Mischung mussten zwei Tropfen auf den Teststreifen appliziert werden. Nach zwei bis drei Minuten wurde das Ergebnis abgelesen. Beim POCKET DIAGNOSTIC®-Kit erfolgte der Aufschluss der Filterstückchen in einem Fläschchen mit Extraktionspuffer und kleinen Stahlkugeln durch kräftiges Schütteln (1–2 Minuten). Die Auswertung erfolgte entsprechend der jeweiligen Gebrauchsanweisung.

– **multiwell Kit (AGRISCREEN®)** – Vor der Weiterverarbeitung wurden die Filterstücke entsprechend der Anleitung des nicht mehr angebotenen Zusatzkits für Wasserproben (*Water Sampling*

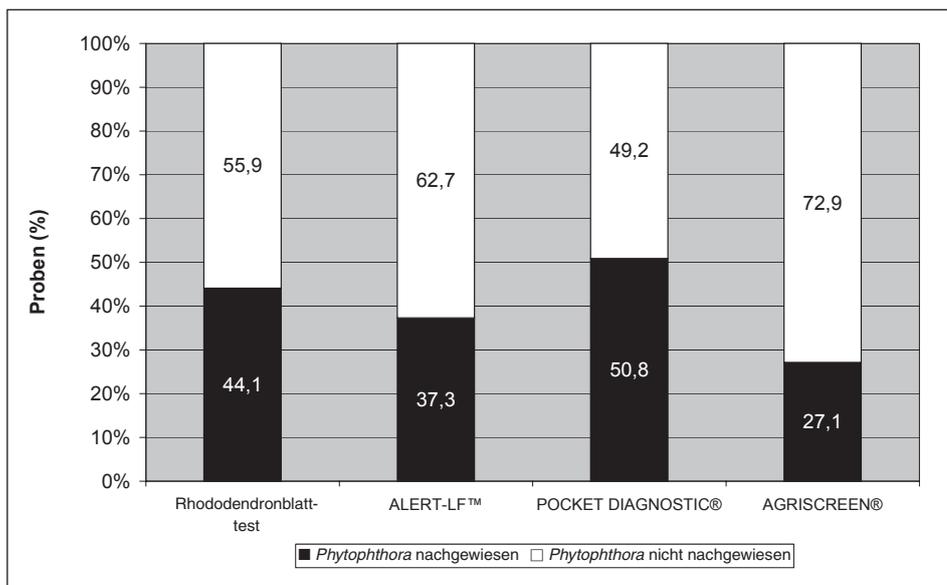


Abb. 2. Anteil Wasserproben mit positivem Nachweis von *Phytophthora* spp. in Abhängigkeit vom Testverfahren (n = 59).

Kit, ADGEN DIAGNOSTICS SYSTEMS 1995) aufgekocht. Folgende Geräte wurden für das Testverfahren verwendet: Waschen der Mikrotiterstreifen mit einem EASY WASHER EAW 812 SW1 (SLT LABINSTRUMENTS, Deutschland GmbH), Schüttelinkubation mit einem Wellwarm 1 (DENLEY INSTRUMENTS LTD.) und Extinktionsmessung bei 620 nm mit einem MULTISKAN RC351 (THERMOLABSYSTEMS). Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperaturen (18–22 °C). Eine Probe galt dann als kontaminiert mit *Phytophthora*, wenn ihre Extinktion um mehr als das Zweifache höher lag als der Extinktionswert der Negativkontrolle im jeweiligen Testansatz (persönliche Mitteilung A. MACARA, NEOGENE EUROPE).

2.4 Probenuntersuchung mit dem Rhododendronblatttest

Für den Rhododendronblatttest wurden die Wasserproben nicht filtriert, sondern ohne weitere Behandlung verwendet. Pro Probe wurde 0,5 L für den Kødertest abgemessen. Der Rhododendronblatttest wurde mit Blättern der *Rhododendron*-Hybride ‘Cunningham’s White’ nach der Methode THEMANN et al. (2002b) angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C und 14 h Licht im Wechsel mit 15 °C für 10 h für längstens 8 Tage. Die Aufarbei-

tung der Blätter erfolgte nach THEMANN et al. (2002b). Das Auswachsen charakteristischer *Phytophthora*-Strukturen wurde mikroskopisch bonitiert.

3 Ergebnisse

Der POCKET DIAGNOSTIC®-Kit erbrachte mit 50,8 % die höchste Rate positiver Proben gefolgt vom Rhododendronblatttest und dem ALERT-LF™-Kit (Abb. 2). Der AGRISCREEN®-Kit wies nur in 27,1 % der 59 Wasserproben *Phytophthora* nach.

Alle drei Kits zeigten im Vergleich zum Rhododendronblatttest falsch negative Ergebnisse (Abb. 3). Der AGRISCREEN®-Kit wies mit 27,1 % den höchsten Anteil falsch negativer Proben auf, der POCKET DIAGNOSTIC®-Kit mit 8,5 % den geringsten Anteil. Umgekehrt gab es Proben, in denen der Kødertest *Phytophthora* nicht nachweisen konnte, alle oder nur einzelne der kommerziellen Kits aber ein positives Ergebnis zeigten. Der Prozentsatz dieser Proben lag zwischen 10,2 % (AGRISCREEN®) und 15,3 % (POCKET DIAGNOSTIC®). Nur in zwei Proben ergaben alle drei Kits ein positives Ergebnis, während der Rhododendronblatttest *Phytophthora* nicht nachweisen konnte.

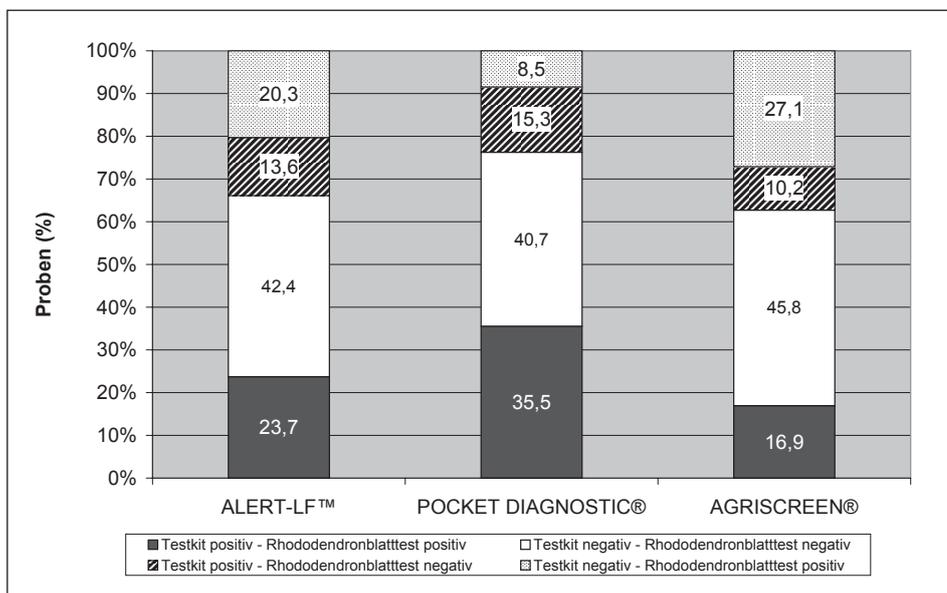
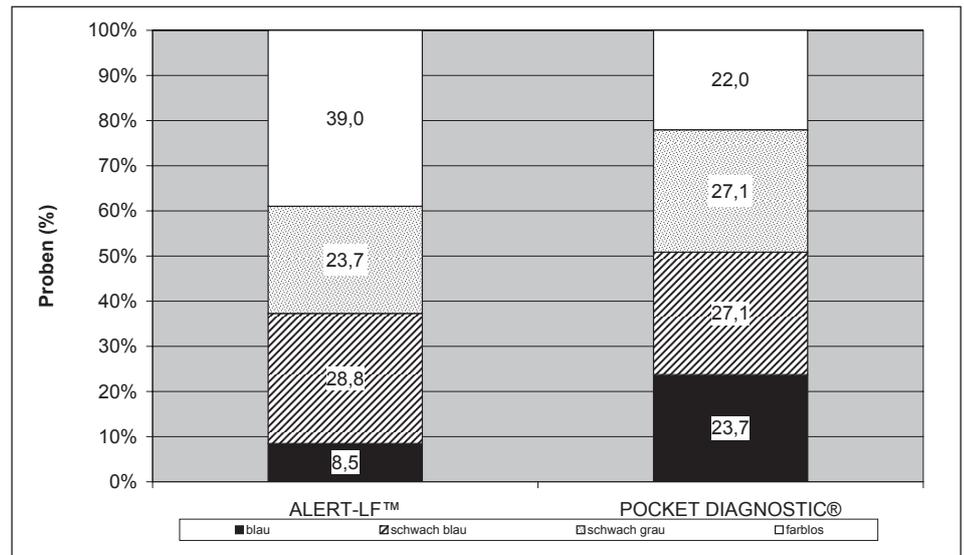


Abb. 3. Übereinstimmung der Ergebnisse der einzelnen Testkits mit den Ergebnissen des Rhododendronblatttests (n = 59).

Abb. 4. Variabilität der Färbung in der Reaktionszone für die Proben auf den on-site Kits



Die *on site* Kits (ALERT-LF™ und POCKET DIAGNOSTIC®) zeigten nicht in jedem Fall eine eindeutige Reaktion (Abb. 4). Die Reaktionszone für die Probe entwickelte Farbschattierungen von unverfärbt über zart grau bis unterschiedlich stark blau. Entsprechend der Gebrauchsanweisung wurden alle farblosen und schwach grau verfärbten Reaktionsflächen als negativ und alle blau verfärbten als positiv bewertet. Die schwache Grau- und Blaufärbung trat sowohl bei Proben auf, aus denen mit dem Rhododendronblatttest eindeutig *Phytophthora* geködert werden konnte, als auch in Proben, die in diesem Testverfahren negativ waren.

4 Diskussion und Schlussfolgerung

Phytophthora konnte sowohl mit den beiden *on-site* als auch mit dem *multiwell* Kit in den Filtern nachgewiesen werden. Der Anteil falsch negativer Proben war im Vergleich zum Rhododendronblatttest besonders beim ALERT LF™- und beim AGRISCREEN®-Kit relativ hoch. Eine Ursache für die falsch negativen Ergebnisse könnte eine zu geringe Empfindlichkeit der Testkits gegenüber geringen Antigenmengen sein. Die meisten Untersuchungen, die bisher zur Nachweisgrenze von *Phytophthora* in Wasserproben durchgeführt wurden, basieren auf dem Nachweis von Zoosporen. Die Mindestmenge von Zoosporen, die in den serologischen Testverfahren ein positives Ergebnis ergeben, hing in Versuchen mit einem ELISA-Kit zum einen von der *Phytophthora*-Art und zum anderen von der Aufarbeitungsmethode für die Filter ab (ALI-SHTAYEH et al., 1991). Bezüglich ‚falsch positiv‘ kann dagegen keine eindeutige Aussage bei den kommerziellen Kits getroffen werden. Zu einem falsch positiven Ergebnis könnte es eventuell durch eine Kreuzreaktion mit *Pythium* spp. kommen. Dies wird für die Untersuchung von Reinkulturen in der Gebrauchsanweisung des AGRISCREEN®-Kits angegeben. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass organische und mineralische Substanzen aus den Wasserproben, die sich beim Filtrieren auf den Filtern anreichern, zu Fehlreaktionen der serologischen Testkits führten. Es könnte jedoch auch sein, dass nicht die Testkits, sondern der Rhododendronblatttest falsch negativ reagiert hat. Dieser Verdacht liegt bei den zwei Proben nahe, mit denen nur der Rhododendronblatttest ein negatives Ergebnis brachte, alle drei kommerziellen Kits aber *Phytophthora* nachwiesen. In diesen beiden Wasserproben waren vielleicht keine oder keine beweglichen Zoosporen vorhanden, die die Köderblätter infizieren konnten. Die serologischen Kits können sowohl

lebende als auch tote Strukturen von *Phytophthora* nachweisen, während der Ködertest auf lebende und virulente Zoosporen angewiesen ist, die die schwimmenden Rhododendronblätter erreichen und in das intakte Blattgewebe eindringen können, um ein positives Ergebnis zu erzielen.

Da das Wasser aus den kommerziellen Wasserrecyclingsystemen in den Baumschulen in der Regel mit Sedimenten und Schwebstoffen angereichert ist, ist die Filtration außerordentlich mühsam und zeitraubend. Aber ohne die Konzentrierung von *Phytophthora*-Strukturen durch die Filtration der Wasserproben hätten die Testkits vermutlich in wesentlich weniger Wasserproben *Phytophthora* nachgewiesen. Die Notwendigkeit der Filtration bedeutet gleichzeitig die Einschränkung des Probenvolumens, das verarbeitet werden kann. Das ist ein eindeutiger Nachteil zum Rhododendronblatttest, dem im Prinzip das gesamte Wasserbecken in der Baumschule als Probe dienen kann, wenn man die Blätter direkt auf der Wasseroberfläche des Beckens während der Köderphase schwimmen lässt.

Eine Quantifizierung von *Phytophthora*-Strukturen in Wasserproben aus Praxisbetrieben ist mit den geprüften *on-site* Kits gar nicht und mit dem *multiwell* Kit nur eingeschränkt möglich. Im *multiwell* Kit könnte die Höhe der Extinktion durchaus einen ersten Hinweis auf die Gesamtmenge *Phytophthora* in der Probe geben. Aufgrund der Extinktion kann aber keine Aussage über Art, Menge und Vitalität der *Phytophthora*-Organe in der Probe getroffen werden.

Trotz dieser Nachteile sind die untersuchten Testkits durchaus eine erste schnelle Alternative zum Rhododendronblatttest, wenn in Wasserproben *Phytophthora* nachgewiesen werden soll. Dies gilt besonders für klare Wasserproben, die im Vergleich zu trüben Proben mit weniger Aufwand filtriert (konzentriert) werden können. Für trübe Wasserproben mit einem hohen Anteil an Schwebstoffen ist besonders die Kombination aus Ködertest und anschließender Untersuchung der Köder mit den Testkits für Praxisproben empfehlenswert. Wenn es nur um die Diagnose ‚*Phytophthora*‘ geht und nicht um die Bestimmung der *Phytophthora*-Art, ist besonders die Kombination Ködertest und *on-site* Kit die schnellste und einfachste Lösung. Die Kombination Ködertest und *multiwell* Kit bietet sich besonders dann an, wenn man im Labor bereits eine Ausrüstung für ELISA-Untersuchungen hat und viele Wasserproben untersuchen muss. Da die serologischen Verfahren aber nicht mit jeder *Phytophthora*-Art in den Wasserproben gleich gut reagieren (PETTIT et al., 2002; THEMANN et al., 2002b) ist

zu bedenken, dass die Testkits falsch negativ reagieren können.

Danksagung

Die Förderung der vorgestellten Untersuchungen erfolgte im Rahmen eines FuE-Projektes aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE).

Literatur

ADGEN DIAGNOSTIC SYSTEMS, 1995: *Phytophthora* (and *Pythium*) water sampling kit. Technical Booklet; ADGEN DIAGNOSTIC SYSTEMS, Watson Peat Building, Auchincruive, Ayr KA6 5HW, Scotland.
 ALI-SHTAYEH, M.S., J.D. MACDONALD, J. KABASHIMA, 1991: A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water. *Plant Disease* **75**, 305–311.
 BACKHAUS, G. F., 1989: Untersuchungen zur Verbreitung phytopathogener bodenbürtiger Mikroorganismen in wiederverwendbarem Gießwasser in geschlossenen Kultursystemen. *Pflanzenschutz Versuchsergebnisse der Landwirtschaftskammer Weser-Ems* 1989, Pflanzenschutzamt Oldenburg, 400–411.
 CLARK M. F., A. N. ADAMS, 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.

PITTIS J. E., J. COLHOUN, 1984: Isolation and identification of pythiaceus fungi from irrigation water and their pathogenicity to *Antirrhinum*, tomato and *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathologische Zeitschrift* **110**, 201–18.

PETTITT T. R., A. J. WAKEHAM, M. F. WAINWRIGHT, J. G. WHITE, 2002: Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Pathology* **51**, 720–727.

THEMANN, K., S. WERRES, H.-A. DIENER, R. LÜTTMANN, 2002a: Epidemiology of *Phytophthora* spp. in water recycling systems of commercial nurseries. *European Journal for Plant Pathology* **108**(4), 337–343.

THEMANN, K., S. WERRES, H.-A. DIENER, R. LÜTTMANN, 2002b: Comparison of different methods to detect *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries. *Journal for Plant Pathology* **84**(1), 41–50.

Informationen zu den Testkits

„ALERT-LF™ *Phytophthora* spp.“ und „AGRISCREEN® LABORATORY IMMUNOASSAY *Phytophthora*“:
 Neogen Europe Limited (UK): <http://www.neogeneurope.com>

„POCKET DIAGNOSTIC® *Phytophthora*“:
 Central Science Laboratory (CSL), UK: <http://pdiag.csl.gov.uk>

Zur Veröffentlichung angenommen: Juli 2006

Kontaktanschrift: Dr. Sabine Werres, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig, E-Mail: S.Werres@BBA.de