

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie und Pflanzenvirologie, Braunschweig

Tissue print immunoassay – eine schnelle und zuverlässige Methode für den Routinenachweis von Pflanzenviren am Beispiel der Gramineenviren

Tissue-print immunoassay – a rapid and reliable method for routinely evidence of gramineae viruses

Von Winfried Huth

Zusammenfassung

Tissue print immunoassay (TPIA) und dot-blot immunoassay (DBIA) sind zwei einfach zu handhabende, schnelle, zuverlässige und zudem kostengünstige Verfahren zum Nachweis von Pflanzenviren, die dadurch gegenüber dem ELISA wesentliche Vorteile besitzen. Obwohl ausschließlich am Beispiel von insgesamt 13 verschiedenen Gramineenviren vorgestellt, sind sie gleichermaßen auch zum Nachweis der Viren dikotyler Pflanzen einsetzbar. Es handelt sich um qualitative Nachweisverfahren, die auch bei eventuell vorhandenen unterschiedlichen Farbtiefen keine Quantifizierung der Viruskonzentration in den Geweben zulassen. Wegen seiner universelleren Verwendung auch zum Nachweis phloemgebundener Viren findet der TPIA eine breitere Anwendung als der DBIA.

Hervorzuheben ist die gegenüber ELISA wesentlich größere Empfindlichkeit des TPIA. In der Regel reicht die Virusmenge eines Blatt- oder Halmquerschnittes selbst zum Nachweis der nur im Phloem und dort auch nur in geringen Mengen vorkommenden Viren aus. Die heterogene Verteilung insbesondere der Luteoviren in den Pflanzen erfordert zur Erhöhung der Nachweis-sicherheit jedoch das Auftragen mehrerer Gewebequerschnitte.

Zu den weiteren wesentlichen Vorteilen des TPIA gegenüber dem ELISA gehören die auf weniger als 3 Stunden verkürzte Entwicklungszeit der NC-Membranen und darüber hinaus die durch eine stärkere Verdünnung der Reaktionslösungen und deren mehrfachen Gebrauch auf wenigstens ein Zehntel verringerten Kosten für eine Virusdiagnose.

Das einfache Auftragen der Proben auf die Membranen ermöglicht sogar eine Anwendung des TPIA unmittelbar am Ort der Probennahme beispielsweise zur Erfassung der Befalls-situation in Getreideschlägen. Nicht voll genutzte Membranen können darüber hinaus zwischengelagert und erst nach Auffüllen mit weiteren Proben entwickelt werden.

Dieser vielfältigen Vorteile wegen, die noch durch einen bei gleichem Zeitaufwand vergrößerten Probenumfang ergänzt werden können, ist der TPIA geeignet, den ELISA zu ersetzen. Die Vorteile werden auch nicht durch den notwendigen Gebrauch eines Binokulars zur Diagnose der phloembürtigen Viren in Frage gestellt. Mit der vorliegenden Arbeit werden Hinweise zum Gebrauch insbesondere des TPIA für den routinemäßigen Nachweis von Pflanzenviren gegeben.

Stichwörter: Gramineenviren, Nachweisverfahren, tissue print immunoassay

Abstract

Both tissue-print immunoassay (TPIA) and dot-blot immunoassay (DBIA) are two simplified serological methods which have been already used for the diagnosis of various plant pathogens. Compared with ELISA both have some essential advantages: they are less laborious, significantly reduce costs and shorten the time for disease analysis. In this paper experiences are described when predominantly TPIA were used for the detection of 13 distinct viruses of Gramineae.

Using squeezed plant sap or prints of tissue cuttings, virus antigen is directly adsorbed to water soaked nitrocellulose membranes. If the plant sap tends to turn brown, a solution containing an antioxidant is recommended. Since both methods are easy to handle samples can also be dotted on membranes outside of laboratories e.g. immediately they are taken during field inspections. Although only 2 to 3 hours are required for membrane development, results are comparable to those obtained by ELISA.

Of the two methods TPIA is a more universal method which can be used also for the detection of phloem-limited viruses (e.g. luteoviruses), whereas DBIA is predominantly applicable for virus detection in parenchymatic cells. Compared to ELISA TPIA is more sensitive. For instance, on prints of cross-sections of leaves or blades BYDV infections can already be detected when only one sieve element is infected.

Although fresh, turgescient plant material should be preferred for tests for virus diagnosis by TPIA, viruses can also be detected by both TPIA and DBIA in dried or frozen leaves. The storage time depends on the stability of the virus antigen. Membranes which have been only partially loaded with blots or tissue prints can be dried and stored for several weeks for later completion and processing of the membrane.

Because membranes are not coated with IgG and the enzyme-labelled IgG can be much more diluted as well as repeatedly used several times, costs of diagnosis by TPIA or DBIA can be reduced at least to one tenth of that of ELISA (e.g. 2.00 DM/1000 samples). When taking these advantages into account especially TPIA appears suitable to replace ELISA although the detection of phloem restricted viruses requires the use of a binocular. This paper describes TPIA as a reliable tool for the routine detection of plant viruses.

Key words: Gramineae viruses, methods of evidence, tissue print immunoassay

Enzymgekoppelte serologische Verfahren zur Diagnose von Pflanzenviren (immune-specific electron microscopy, ISEM, DERRICK, 1973; enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, CLARK and ADAMS, 1977) haben seit den ersten Veröffentlichungen in den 70er Jahren in mehrfach variiert Form Anwendung gefunden. Wegen der hochspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen sind sie für den Routinenachweis geeignet und ermöglichen darüber hinaus bei Verwendung monoklonaler Antikörper die Diagnose von Stämmen eines Virus. Die Herstellung der Pflanzenextrakte, die, insbesondere wenn sie wie bei einigen Viren notwendigerweise im Mörser erfolgt, sehr zeitaufwendig sein kann, sowie das mehrfache Pipettieren in Mikrotiter- oder ELISA-Platten sind Arbeiten, die fast ausschließlich im Labor durchgeführt werden können und sowohl den Probenumfang begrenzen als auch den Einsatz des ELISA „vor Ort“, z. B. bei der Feldbonitur, ausschließen.

Dot-blot immunoassay (DBIA) und tissue print immunoassay (TPIA) sind zwei sehr ähnliche Varianten immunologischer Nachweisverfahren, bei denen zum Unterschied zum DAS-ELISA die Antigene, z. B. Virusproteine, an eine Membran adsorbiert und mit einem wasserunlöslichen Produkt der enzymatischen Reaktion direkt nachgewiesen werden. Beide Methoden haben inzwischen eine weite Anwendung zum Nachweis von Pflanzenviren gefunden (LIN et al., 1990; HSU und LAWSEN, 1991; WEIDEMANN, 1988; KAUFMANN und KOENIG, 1993; HOHMANN, et al. 1996). Sie sind darüber hinaus auch zur Diagnose anderer, z. B. pilzlicher Pathogene (z. B. GWINN et al., 1991), geeignet. Auf die Vorteile dieser Methoden, insbesondere aber des TPIA, gegenüber dem ELISA soll im Folgenden hingewiesen werden.

Die Membranen

Für den Virusnachweis mit DBIA und TPIA haben sich anstelle von Mikrotiter- oder ELISA-Platten vornehmlich Nylon- und Nitrocellulosemembranen als proteinadsorbierende Träger bewährt (CLARK and BAR-JOSEPH, 1984; SCOTT, 1989), von denen die erstgenannten Membranen wegen höherer Elastizität weniger brüchig als letztere sind. Andere adsorbierende Unterlagen wie Filterpapier (HABER and KNAPEN, 1989) oder Polystyren und Polyvinylchlorid (NEURATH und STRICK, 1981) haben dagegen nur geringe Anwendung gefunden.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden ausschließlich Nitrocellulosemembranen (NC-Membran) mit einer Porenweite von 0,45 µm verwendet. In 300 × 3000-mm-Rollen angeboten (z. B. Schleicher und Schüll, Dassel) können sie auf jedes Format geschnitten werden, deren Maße sich nach der Größe der zu untersuchenden Objekte, nach der Anzahl erwarteter Proben, aber auch nach den im Labor vorhandenen Reaktionsgefäßen richten.

Zur Diagnose der hier im Mittelpunkt stehenden Gramineenviren wurden NC-Membranen in den Maßen 76 × 26 mm verwendet. Dieses Format wurde gewählt, weil die NC-Membranen an einer Seite mit doppelseitigem Klebeband an Objektträgern befestigt und in geeigneten Versandbehältern bruchstabil verpackt auch für den Versand geeignet sind. Eine einzige NC-Membran dieses Formates nimmt bis zu 40, ggf. die doppelte oder abhängig von dem Pflanzenmaterial sogar eine mehrfache Anzahl (maximal 160) Proben auf. Ein Raster auf den NC-Membranen erleichtert die Positionierung der Proben, wenn die Gewebeabdrucke kaum sichtbare Spuren hinterlassen. Im einfachsten Fall genügen Markierungen mit Bleistift oder wasserunlöslichem Kugelschreiber. Für den routinemäßigen Einsatz erleichtert ein Stempel das Aufbringen einer Markierung (wasserfeste Polyethylen-Stempelfarbe 337).

Vorbereitung der NC-Membranen

Abweichend vom DAS-ELISA werden die Proben direkt auf die NC-Membran aufgetragen. Trockene wie mit Wasser angefeuchtete NC-Membranen sind gleichermaßen verwendbar. Gequollene NC-Membranen sind jedoch ihrer besseren Aufnahmefähigkeit wegen trockenen Membranen vorzuziehen. Zur Quellung reicht ein kurzzeitiger Kontakt mit angefeuchtem Filterpapier. Obwohl der Feuchtigkeitsgehalt keine entscheidende Bedeutung zu haben scheint, sollten die Proben möglichst nicht auf zu nasse Membranen aufgetragen werden.

Die Verwendung spezieller Puffer zur Quellung der NC-Membranen ist nicht erforderlich. Bei Pflanzenproben, die durch oxidative Prozesse zum Verbräunen neigen (z. B. bei Knaulgras, *Dactylis glomerata*) und dadurch den Virusnachweis durch Überlagerung der Farbreaktion empfindlich stören, können zur Quellung der Membranen Lösungen von Antioxidantien beispielsweise eine frisch zubereitete, 0,02 M, entsprechend einer etwa 2,5%-Na₂SO₃-Lösung, verwendet werden.

Auftragen der Proben auf die NC-Membranen

Zu den Vorteilen von DBIA und TPIA gegenüber ELISA gehört, daß der Pflanzenpreßsaft direkt auf die NC-Membranen aufgetragen werden kann. Dadurch ist es möglich, in einer vergleichbaren Zeiteinheit einen gegenüber ELISA mehrfachen Probenumfang in den Test einzubeziehen. Die Entscheidung darüber, welche der beiden Methoden, TPIA oder DBIA, für den Virusnachweis gewählt wird, hängt im wesentlichen von der Konzentration und der Verteilung der Viren in den Geweben ab.

Dot-blot immunoassay – DBIA: Der DBIA eignet sich vornehmlich für den Nachweis von Viren, die in besonders hohen Mengen in den pflanzlichen Geweben angereichert vorkommen. Das sind insbesondere die nichtphloemgebundenen, in parenchymatischen Geweben vorkommenden Viren (z. B. barley yellow mosaic virus, BaYMV). Geringe Mengen Pflanzensaftes einer Bruch- oder Schnittstelle turgeszenten Gewebes sind für einen sicheren Virusnachweis bereits ausreichend. Wird der Pflanzensaft mit den Fingern unter leichtem Druck aus der Schnittfläche ausgepreßt, unverdünnt direkt auf die NC-Membran aufgetragen, können gelegentlich größere Anteile Chlorophylls (Chloroplasten) den Virusnachweis durch Überlagerung der Farbreaktionen erschweren. Besser geeignet sind deshalb auf jegliche Weise hergestellte Pflanzenextrakte, von denen mit Wasser (oder einem Puffer) verdünnt (1:10 oder 1:100) etwa 1 bis 5 µl auf die NC-Membranen aufpipettiert werden.

Tissue print immunoassay – TPIA: Der DBIA eignet sich nicht oder nur sehr eingeschränkt zur Diagnose phloemgebundener Viren. Insbesondere sind die Luteoviren (z. B. barley yellow dwarf virus, BYDV) wegen ihres Vorkommens ausschließlich in den Leitbündeln nur mit dem universelleren TPIA nachzuweisen. Der Virusnachweis mit TPIA erfordert wohl eine größere Sorgfalt beim Auftragen der Proben, läßt dafür aber die Verteilung der Viren in den Geweben auch dann erkennen, wenn sie, wie im Fall der phloemgebundenen Viren, nur in wenigen Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes vorhanden sind.

Voraussetzung für eine sichere Diagnose sind präzise Gewebeabdrucke auf den NC-Membranen, die zu erstellen nach wenig Übung keine Schwierigkeiten bereitet. Die Gewebe, Blätter oder Halme, werden mit einem scharfen Messer (Rasierklingen, Kutter) am besten auf gehobelten Hölzern als Unterlagen querschnitt. Die Schnittflächen werden dann ohne Druck für etwa eine halbe bis ganze Sekunde mit der Membran in Kontakt gebracht. Der Virusnachweis ist auch dann nicht in Frage gestellt, wenn bei geringem Chlorophyllgehalt der Gewebe die Abdrucke kaum sichtbar sind. Auf einen besonders sauberen Abdruck, der

nicht durch Verreißen der Schnittfläche auf der Membran verwischt (Abb. 1f) sein darf, ist vor allem bei den phloemgebundenen Viren zu achten, die sich nach einer späteren Anfärbung nur als mikroskopisch kleine Punkte darstellen. Ein längerer Kontakt der Schnittfläche mit der Membran erhöht die Nachweisgenauigkeit nicht.

Das Pflanzenmaterial

Insbesondere für den Virusnachweis mit TPIA sind frische, turgeszente Pflanzen am besten geeignet. Werden die zu testenden Proben nicht sofort auf die Membran übertragen, bleibt ihre Turgeszenz während einer Zwischenlagerung z. B. im Kühlschrank über eine begrenzte Zeit erhalten. Deturgeszente Pflanzen oder Pflanzenteile können bis zur Verwendung in einer feuchten Kammer gelagert werden.

Sofern eine Pflanze homogen mit Virus infiziert ist, können grundsätzlich alle ihre Organe, Blätter, Halme oder Wurzeln, verwendet werden. In seltenen Fällen kann die Virusverteilung innerhalb der Pflanzen, beispielsweise infolge des Befalls während fortgeschrittener Entwicklungsstadien, inhomogen und können einige Pflanzenteile virusfrei sein. Eine solche ungleiche Verteilung wird während des Virusnachweises mit ELISA meist nicht auffällig, wohl aber mit TPIA, wenn der Querschnitt zufällig durch einen virusfreien Gewebebereich geführt wurde. Deshalb wird empfohlen, Abdrucke mehrerer Blattquerschnitte oder besser sogar mehrerer Halme einer Pflanze zu erstellen. Zur Vereinfachung können mehrere übereinandergelegte Blätter gerollt und als Block geschnitten mit der NC-Membran in Kontakt gebracht werden. Halmquerschnitte sind in der Regel bereits Querschnitte durch verschiedene Blätter.

Auch gefrorene und getrocknete Pflanzenorgane eignen sich zum Virusnachweis mit TPIA. Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Tiefkühlfach werden die Pflanzenteile, wie oben beschrieben, angeschnitten und die inzwischen aufgetaute Schnittfläche auf die NC-Membran appliziert. Gefroren konserviert verringert sich allerdings mit der Dauer der Lagerung die Nachweisbarkeit mancher Viren abhängig von ihrer Stabilität. Wie bereits aus Ergebnissen von ELISA-Untersuchungen bekannt, ist die Lagerfähigkeit beispielsweise der Bymoviren (z. B. BaYMV) wegen ihrer geringen Stabilität in gefrorenem Zustand sehr begrenzt.

Dagegen bleibt die Nachweisbarkeit der meisten Viren auch nach einer mehrmonatigen Lagerung erhalten, wenn im Exsikkator über einem Trocknungsmittel möglichst schnell getrocknet wurde. Derart gelagert stehen virusinfizierte Pflanzenorgane als Vergleichsmaterial für den TPIA über einen längeren Zeitraum zur Verfügung. Wegen ihrer größeren Stabilität sind Halme besser als Blätter zur Lagerung geeignet. Vor dem Anschnitt der getrockneten Pflanzenteile und dem Auftragen auf die NC-Membranen hat sich eine Quellung in einer feuchten Kammer bewährt. MAKKOUK und COMEAU (1994) wiesen BYDV an Abdrucken nach einstündigem Quellen 5 Jahre trocken gelagerter Pflanzenteile nach.

Lagerung der NC-Membranen

Wenn die NC-Membranen nicht unmittelbar nach dem Auftragen der Proben entwickelt werden, können sie mindestens 4 Wochen, nach anderen Erfahrungen bis 9 Wochen (SAMSON et al., 1993) möglichst kühl (4 °C), vor allem aber trocken gelagert werden. Die Lagerfähigkeit gequollener NC-Membranen beispielsweise in Petrischalen liegt jedoch bei nur wenigen Tagen. Bei einer über diesen Zeitraum hinausgehenden Lagerung läßt die Nachweisbarkeit der Viren abhängig von ihrer Stabilität nach und ver-

pilzen die feuchten NC-Membranen sehr leicht. Dagegen ist eine längere Lagerung trockener NC-Membranen möglichst im Exsikkator unbedenklich. Während dieser Zeit können nicht voll genutzte NC-Membranen nach erneuter Quellung mit weiteren Proben aufgefüllt werden.

Entwicklung der Membranen

Der serologische Nachweis der Viren auf NC-Membranen wurde inzwischen in mehrfach variierten Versionen beschrieben. Die Verfahren unterscheiden sich im wesentlichen in den verwendeten Enzymen (Peroxidase, alkalische Phosphatase, Urease etc.) sowie deren Substraten (z. B. Fast Red, Nitroblau-Tetrazolium oder chemolumineszierende Stoffe). Direkte wie indirekte immunologische Verfahren kommen gleichermaßen zur Anwendung wie auch der Gebrauch biotinylierter monoklonaler Antikörper und Avidin-konjugierter Enzympräparate oder kolloidales Gold (HSU, 1984; LIN et al., 1990; ZAGULA et al., 1990; HSU und LAWSON, 1991; MAKKOUK et al., 1993).

Beide tabellarisch zusammengefaßten Varianten zur Entwicklung der NC-Membranen werden im hiesigen Institut routinemäßig eingesetzt (Tab. 1). Sie unterscheiden sich lediglich im Gebrauch unterschiedlicher Farbstoffe. Das Produkt der Reaktion mit Fast Red als Substrat der alkalischen Phosphatase markiert die Position der adsorbierten Virusproteine auf der NC-Membran rot, das Produkt der Reaktion mit Nitroblau Tetrazolium dunkelblauviolett (oder dunkelpurpurrot, Abb. 1c). Wegen der sich meist kontrastreicher abzeichnenden roten Färbung wurde Fast Red als Substrat bevorzugt verwendet. Alle Inkubationsschritte werden unter leichtem Schütteln (Schüttler oder Wippe) bei Zimmertemperatur durchgeführt. Zum Hantieren mit den leicht verletzlichen NC-Membranen werden flache, in der Philatelie gebräuchliche Pinzetten empfohlen. Wie oben erwähnt, werden die Pflanzenextrakte (DBIA) unmittelbar auf die gequollene, zuvor nicht mit Globulin beschichtete Membran aufgetragen oder die Schnittflächen der Gewebe (TPIA) mit der NC-Membran kurzzeitig in Kontakt gebracht.

Die angegebenen Zeiten für die Inkubationsschritte sind Richtwerte. Beispielsweise kann die Inkubation des Globulin-Enzym-Konjugates (GEK), abhängig von seiner Qualität und Konzentration, sogar auf eine halbe Stunde verkürzt und die Enzym-Substrat-(ES-)Reaktion nach Erreichen einer für die Bewertung ausreichenden Farbtiefe nach Ermessen vorzeitig abgebrochen werden. Die Applikation der Proben nicht einbezogen, dauert die Entwicklung der NC-Membranen weniger als 3 Stunden. Bei Verwendung von Polyvinylalkohol (MG 30 000–70 000, MIRANDA et al. 1993) wird die Entwicklungszeit um eine weitere Stunde verkürzt.

Die erforderlichen Flüssigkeitsvolumina richten sich nach der Größe der Entwicklergefäße. Zur Minimierung des GEK-Verbrauches und damit zur Senkung der Kosten verwenden wir rechteckige Gefäße, die nur wenig größer (78 × 34 mm) als die NC-Membranen (76 × 26 mm) sind. Das Flüssigkeitsvolumen ist mit 4 ml so berechnet, daß eine NC-Membran knapp überflutet wird. Bei entsprechend größerem Flüssigkeitsvolumen können andererseits mehrere Membranen (z. B. 6 ml für 2 oder 3 NC-Membranen) auch übereinander geschichtet gleichzeitig inkubieren, sofern jede für sich in der Flüssigkeit frei beweglich ist.

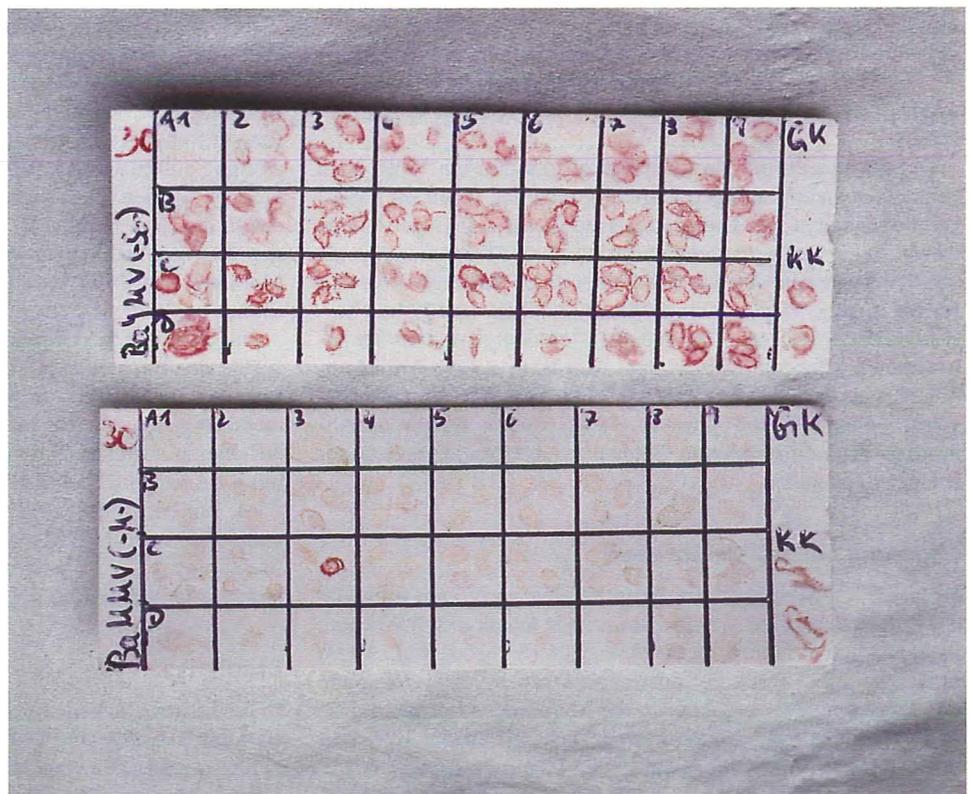
Ergebnisse

In die bisherigen Versuche wurden die nichtphloemgebundenen Bymoviren barley yellow mosaic, barley mild mosaic und wheat yellow mosaic (BaYMV, BaMMV, WYMV), die ryegrass mosaic, Agropyron mosaic und brome streak mosaic Rymoviren

Tab. 1. Schematische Zusammenfassung der Entwicklung von Nitrocellulosemembranen

1. Applikation der Proben auf eine gequollene NC-Membran	
2. Blockieren: 1 Minute Polyvinylalkohol (MG 30 000–70 000) 1 mg/ml PBST (PBST: pH 7,4, 8,0 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, 0,2 g NaN_3^* , 1% BSA, 5 ml Tween 20 pro Liter) (* NaN_3 : nur bei längerer Lagerung der Vorratslösung erforderlich)	
3. Waschen: 5 Minuten PBST	
4. Globulin-Enzym-Konjugat-Inkubation: 1 Stunde Globulin-alk. Phosphatase-Konjugat (GEK) Verdünnung in Konjugatpuffer: abhängig von der Qualität des Konjugates, ggf. weniger als 1:2000 (Konjugatpuffer: 29 g Polyvinylpyrrolidon + 2,0 g Eialbumin pro Liter)	
5. Waschen: 5 Minuten PBST	
6. Inkubation: 5 Minuten TBS, pH 7,4 (0,02 M Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl)	
7. Equilibrieren: 5 Minuten TBS, pH 8,0 (0,2 M Tris-HCl, pH 8,0 + 2,0 mM MgCl_2) TBS, pH 9,5 (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 + 0,1 M NaCl + 50 mM MgCl_2)	
8. Enzym-Substrat-Reaktion: 10 bis 15 Minuten	
Fast Red (Sigma): 90 mg in 15 ml Tris-HCl, pH 8,0 + 2,0 mM MgCl_2 Naphthol AS-MX Phosphat di-Natriumsalz (Sigma): 6,0 mg in 15 ml H_2O beide Lösungen unmittelbar vor Gebrauch ansetzen und miteinander mischen	Nitroblau Tetrazolium (NTB) (Sigma): 75 mg NTB/ml 70% Dimethylformamid 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (BCIP) (Sigma): 50 mg BCIP/ml Dimethylformamid (unverd.) (als Stammlösungen bei +20 °C lagern) vor Gebrauch 15 ml TBS pH 9,5 + 66 μl NTB + 25 μl BCIP miteinander mischen
9. Stoppen mit H_2O	
10. Trocknen der Membranen	

Abb. 1. Tissue print immunoassay:
a) Nachweis des BaYMV (oben)
bzw. des BaMMV (unten) auf se-
paraten Nitrocellulose-Membra-
nen. Auf jeder der beiden Membra-
nen befinden sich die Abdrucke
von Halmquerschnitten von 97
Pflanzen von Gerste (*Hordeum
vulgare*) in vergleichbaren Positi-
onen. Nur eine der Pflanzen war von
beiden Viren befallen. Die für den
Virusnachweis verwendeten Mem-
branen haben eine Größe von 76 x
26 mm.



(RMV, AgMV, BrSMV), die maize dwarf mosaic, sugarcane mosaic und cocksfoot streak Potyviren (MDMV, ScMV, CfSV), das wheat soil-borne mosaic Furovirus sowie das Lolium latent Potyvirus (LLV) einbezogen. Ihnen wurden als phloemgebundene Viren das barley yellow dwarf Luteovirus (BYDV-PAV) und das wheat dwarf Geminivirus (WDV) gegenübergestellt. Wirte dieser Viren waren insgesamt 37 Grasarten, darunter die Kulturgräser *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* und *Secale cereale*. Alle für die Untersuchungen ausgewählten Pflanzen oder Pflanzenteile waren, mit Ausnahme der von LLV befallenen Pflanzen, anhand der Symptome deutlich als virusinfiziert zu erkennen gewesen.

Die nachfolgend beschriebenen Erfahrungen beruhen auf Untersuchungsergebnissen, die ausschließlich mit dem TPIA gewonnen wurden, der wegen seiner universelleren Eignung vorzugsweise verwendet wurde.

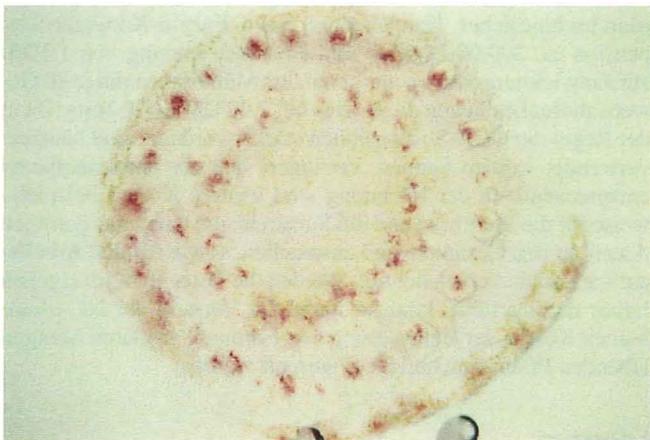
Nichtphloemgebundene Viren: Entsprechend dem Vorkommen der Bymo-, Rymo-, Furo- und Potyviren vorzugsweise in den parenchymatischen Geweben der Pflanzen werden größere Partien der Gewebeabdrucke auf den NC-Membranen angefärbt. Durch die intensive Rotfärbung bei Verwendung von Fast Red setzen sie sich deutlich von den nicht angefärbten Bereichen ab und sind mit dem bloßen Auge zu erkennen. Lediglich die den

Leitbündeln und den Interzellularräumen entsprechenden Bereiche auf den Abdrucken bleiben, wie unter dem Binokular zu erkennen ist, von der Färbung ausgespart (Abb. 1e und f).

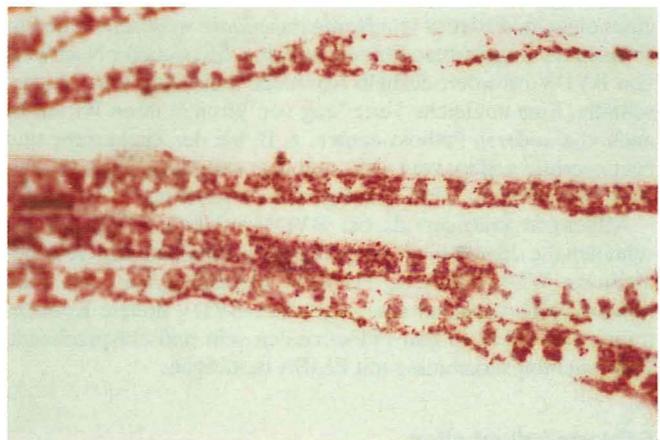
Ein Beispiel inhomogener Verteilung von Viren innerhalb infizierter Gewebe sind Pflanzen von *Lolium perenne* nach Befall von LLV. Obwohl systemisch infiziert, werden bei einem Teil der



d) Blattquerschnitt einer mit barley yellow dwarf virus (BYDV) infizierten Pflanze von Gerste (*Hordeum vulgare*) nach Anfärbung mit Fast Red.



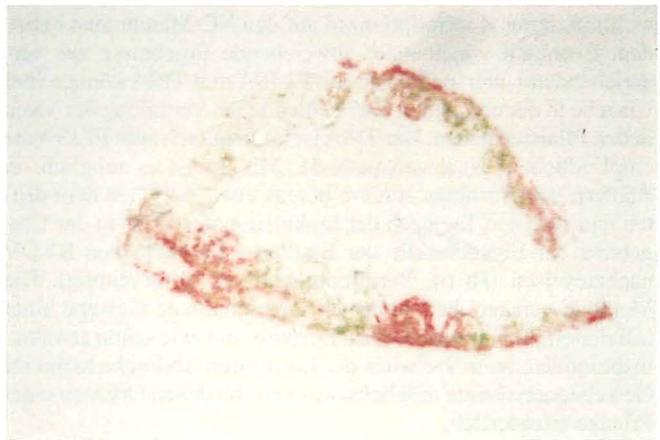
b) Querschnitt eines von Blattscheiden umgebenen Halmes einer mit wheat dwarf virus (WDV) infizierten Pflanze von Gerste (*Hordeum vulgare*).



e) Blattquerschnitte von Mais (*Zea mays*). Nicht an das Phloem gebunden wird maize dwarf mosaic virus (MDMV) ausschließlich in parenchymatischen Zellen vermehrt.



c) Halmquerschnitt einer mit barley yellow dwarf virus (BYDV) infizierten Pflanze von Gerste (*Hordeum vulgare*). Entsprechend dem Vorkommen von BYDV in den Pflanzen befinden sich die angefärbten (Nitroblau Tetrazolium) Bereiche ausschließlich im Phloem.



f) Querschnitt eines Blattes des Deutschen Weidelgrases (*Lolium perenne*) infiziert mit Lolium latent virus (LLV). Inhomogene Verteilung eines Virus in der Pflanze. Verreißen des Blattes führte zu doppeltem Abdruck auf der Membran.

Gewebeabdrucke manchmal nur wenige Bereiche, oft sogar nur kleinere, unter dem Binokular erkennbare Komplexe parenchymatischer Zellen angefärbt. Die nicht angefärbten Areale sind offenbar virusfrei (Abb. 1f).

Phloemgebundene Viren: Da das Phloem innerhalb der Blatt- oder Halmgewebe der Gräser nur wenige Zellen umfaßt, ist zur sicheren Bonitur phloemgebundener Viren auf NC-Membranen fast ausschließlich die Verwendung eines Binokulars erforderlich. Auf den NC-Membranen erscheinen die Abdrucke der virusinfizierten Leitbündel entsprechend ihrer Verteilung in den Halmen nach der Anfärbung als kleine Punkte in konzentrischer Anordnung (Abb. 1b und c) oder entsprechend dem parallelen Verlauf in den Blättern hintereinander aufgereiht (Abb. 1d). Besonders englumig sind die Zellen des Phloems zahlreicher Wildgräser. Die angefärbten Partien auf den NC-Membranen als Hinweis auf eine Virusinfektion sind selbst unter dem Binokular manchmal erst nach stärkerer Vergrößerung zu erkennen.

Nach bisherigen Beobachtungen ist insbesondere BYDV in den Pflanzen und sogar innerhalb einzelner Pflanzenorgane inhomogen verteilt. Deshalb ist auf den Abdrucken der Blatt- und Halmquerschnitte manchmal nur ein Teil der dem Phloem entsprechenden Bereiche angefärbt. Selbst innerhalb des Leitbündelverlaufes in Halmen und Blättern scheint der Phloemstrang nicht kontinuierlich mit BYDV infiziert zu sein. Auf Abdrucken einer Folge von Serienschritten mit einem Abstand von je 4 mm eines einzelnen Blattes von *Hordeum vulgare* wechselten die Positionen der angefärbten Phloembereiche. Ein sicherer Nachweis von BYDV erfordert deshalb Abdrucke mehrerer Gewebequerschnitte. Eine ungleiche Verteilung von Viren in ihren Wirten ist auch von anderen Pathosystemen, z. B. bei der Zuckerrübe und beet necrotic yellow vein virus und beet soil-borne virus (KAUFMANN und KOENIG, 1993), nachgewiesen worden.

Allgemein kräftiger als bei BYDV-infizierten Pflanzen erscheinen die dem Phloem entsprechenden Bereiche der Gewebeabdrucke WDV-infizierter Pflanzen angefärbt (Abb. 1b). Dies könnte ein Hinweis auf eine gegenüber BYDV höhere Konzentration des WDV in den Phloemzellen sein und entsprechende Untersuchungsergebnisse mit ELISA bestätigen.

Fehlermöglichkeiten

Zahl und Art möglicher Fehlerquellen sind mit denen bei einer Diagnose mit ELISA vergleichbar. Werden aktive, virusspezifische Konjugatsuspensionen und frisch zubereitete Substratlösungen verwendet, sind Zweifel an den Ergebnissen praktisch auszuschließen, wenn sich zugleich Abdrucke infizierter und nichtinfizierter Kontrollpflanzen auf den NC-Membranen befinden. Eventuell voneinander abweichende Ergebnisse aus vergleichenden Untersuchungen mit ELISA und TPIA können ihre Ursache in der erwähnten unterschiedlichen Verteilung der Viren in den Pflanzen haben. Der TPIA ist im Vergleich zum ELISA die empfindlichere Nachweismethode. Mit ihr ist es möglich, in Blättern von *Hordeum vulgare* bereits etwa zwischen dem dritten und sechsten Tag nach der Inokulation des Virus in der Umgebung der Einstichstelle der Blattläuse Partikeln von BYDV nachzuweisen (HUTH, Veröffentlichung in Vorbereitung). Die Methode versagt aber, wenn das angeschnittene Gewebe einer infizierten Pflanze virusfrei ist. Deshalb sind, wie schon erwähnt, insbesondere zum Nachweis der Luteoviren Abdrucke mehrerer Gewebequerschnitte möglichst aus verschiedenen Organen einer Pflanze erforderlich.

Unspezifische Reaktionen äußern sich überwiegend in schwach rosa Anfärbungen von Abdrucken üblicherweise virusfreier Bereiche und sind dadurch von virusspezifischen Anfärbungen zu unterscheiden, vor allem wenn auch die Abdrucke

virusfreier Kontrollpflanzen rosa angefärbt sind. Häufig sind die der Kutikula entsprechenden Abdrucke unspezifisch verfärbt. Beim DBIA können blaß rosa Anfärbungen auch als Folge einer zu starker Verdünnung des Extraktes von Pflanzen mit geringer Viruskonzentration auftreten. Zur Kontrolle und zur Absicherung des Ergebnisses ist das Auftragen von infizierten und nichtinfizierten Kontrollproben erforderlich.

TPIA – ein preisgünstiges Nachweisverfahren: Der Virusnachweis auf NC-Membranen ist ein kostengünstiges Verfahren. Abhängig von der Qualität kann die Konzentration der verwendeten GEK-Suspension auf die Hälfte bis $1/10$ gegenüber der für den ELISA verringert und kühl gelagert mehrere Tage hintereinander wiederholt verwendet werden. In unseren Versuchen mit BYDV-PAV-Antiseren eigener Herstellung war die Konjugatsuspension in einer für ELISA gebäuchlichen Verdünnung (1:1000) mehr als 20 Tage bei 14maliger Verwendung ohne Aktivitätsverlust haltbar.

Bei einem vergleichbaren Kostenaufwand können mit TPIA mindestens die 10fache, in der Regel aber eine mehrfache Anzahl Proben als mit ELISA getestet werden. Die Kosten des Virusnachweises mit TPIA werden zudem dadurch gesenkt, daß die Adsorption der Viren direkt an die NC-Membran erfolgt, ohne sie vorher wie beim DAS-ELISA mit virusspezifischem γ -Globulin zu beschichten.

Bei einer 5maligen Verwendung einer GEK-Suspension (durchschnittlicher Handelspreis einer Enzym-Konjugat-Suspension ca. 200,00 DM/ml) und einer Verdünnung von 1:1000 zur Entwicklung der von uns genutzten Membranen mit je 80 Gewebeabdrucken liegen die Kosten bei 2,00 DM/1000 Tests. Da in der Regel die GEK-Suspensionen stärker verdünnt und häufiger verwendet werden können, verringert sich der Kostenaufwand entsprechend. In der Rechnung sind weitere Kosten beispielsweise für die Membran und die Substrate, die einen nur geringen Anteil an den Gesamtkosten ausmachen, sowie für den Arbeitsaufwand nicht berücksichtigt. Werden die Tests nicht im eigenen Labor durchgeführt, können durch den Versand der NC-Membranen Kosten der Beförderung von eventuell größeren Mengen lebenden Pflanzenmaterials eingespart werden.

Literatur

- CLARK, M. F., M. BAR-JOSEPH, 1984: Enzyme immunosorbent assays in plant virology. *Methods Virology* 7, 51–85.
- CLARK, M. F., A. N. ADAMS, 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay in plant virology. *Methods Virol.* 34, 475–483.
- DERRICK, K. S., 1973: Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56, 652–653.
- GWINN, K. D., M. H. COLLINS-SHEPARD, B. B. REDDICK, 1991: Tissue print-immunoblot, an accurate method for the detection of *Acrimonium coenophialium* in tall Fescue. *Phytopathology* 81, 747–748.
- HABER, S., H. KNAPEN, 1989: Filter paper sero-assay (FIPSA): A rapid, sensitive technique for sero-diagnosis of plant viruses. *Can. J. Plant Pathol.* 11, 109–113.
- HOHMANN, F., E. FUCHS, MARIA GRÜNTZIG, LISSY KUNTZE, 1996: Entwicklung eines Routinetests zum Nachweis des sugarcane mosaic virus (SCMV) und des maize dwarf mosaic virus (MDMV) auf der Grundlage eines tissue print-immunoblotting (TPIB). *Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 103, 464–471.
- HSU, H. T., R. H. LAWSON, 1991: Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. *Plant Dis.* 75, 292–295.
- HSU, Y. H., 1984: Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. *Anal. Biochemistry* 142, 221–225.
- KAUFMANN, ANDREA, RENATE KOENIG, 1993: Detection of beet necrotic yellow vein and beet soil-borne viruses in sugarbeet by means of tissue print-immunoassay. In: C. HIRUKI (ed.): *Proceedings of the International Working Group on Fungal Vectors*. McGill University, Montreal, Canada, pp 47–50.
- LIN, N. S., Y. H. HSU, H. T. HSU, 1990: Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80, 824–828.

MAKKOUK, K. M., A. COMEAU, 1995: Evaluation of various methods for the detection of barley yellow dwarf virus by the tissue-blot immunoassay and its use for virus detection in cereals inoculated at different growth stages. *Europ. J. Plant Pathol.* **100**, 71–80.

MAKKOUK, K. M., H. T. HSU, S. G. KUMARI, 1993: Detection of three plant viruses by dot-blot and tissue-blot immunoassays using chemoluminescent and chromogenic substrates. *J. Phytopathology* **139**, 97–102.

MIRANDA, P. V., A. BRANDELLI, J. G. TEZON, 1993: Instantaneous blocking for immunoblots. *Analytical Biochemistry* **209**, 376–377.

NEURATH, A. R., N. STRICK, 1981: Enzym-linked fluorescence immunoassays using galactosidase and antibodies covalently bound to polystyrene plates. *J. Virol. Methods* **3**, 155–165.

SAMSON, R. G., T. C. ALLEN, J. L. WHITEWORTH, 1993: Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. *Am. Potato J.* **70**, 257–265.

SCOTT, D. I., 1989: Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Methods* **119**, 153–187.

WEIDEMANN, H.-L., 1988: Rapid detection of potato viruses by dot-ELISA. *Potato Research* **31**, 485–492.

ZAGULA, K. R., D. J. BARBARA, D. W. FULBRIGHT, R. M. LISTER, 1990: Evaluation of three ELISA methods as alternatives to ISEM for detection of the wheat spindle streak mosaic strain of wheat yellow mosaic virus. *Plant Dis.* **74**, 974–978.

Kontaktanschrift: Dr. Winfried Huth, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie und Pflanzenvirologie, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., **49** (8), S. 191–200, 1997, ISSN 0027-7479.
© Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Georg-August-Universität, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Göttingen

Möglichkeiten der überregionalen Anwendung des Göttinger Schadensschwellenmodells zur gezielten Unkrautbekämpfung im Winterraps

Facilities for the statewide use of the economic threshold model for weed control in winter oilseed rape

Von Bernhard Werner²⁾ und Rudolf Heitefuß¹⁾

Zusammenfassung

Die überregionale Anwendbarkeit eines in Göttingen entwickelten Schadensschwellenmodells zur gezielten Unkrautbekämpfung im Winterraps wurde in den Jahren 1993/94 und 1994/95 in einem Gemeinschaftsversuch der Universität Göttingen, der amtlichen Pflanzenschutzdienste der Länder und der „Projektgruppe Raps“ der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft auf 55 Standorten geprüft und bestätigt.

Der Verzicht auf Unkrautbekämpfungsmaßnahmen nach den Kriterien des Modells wirkte sich auf den entsprechenden Standorten nicht negativ auf unkrautbedingte Erntehinderungen sowie die Qualität und den Ertrag des Rapses aus.

Begleitend zu den Feldversuchen wurde eine Befragung der Versuchsteilnehmer zur praktischen Handhabung des Modells durchgeführt. Auf der Basis dieser Befragung wurde das Modell den praktischen Belangen angepaßt und weiter vereinfacht. Ein Vergleich des vereinfachten Modells mit dem Ausgangsmodell zeigt eine gute Übereinstimmung der Bekämpfungsentscheidungen bei einem gleichzeitig verringerten Erhebungs- und Auswertungsaufwand.

Stichwörter: Schadensschwellen, Modell, Unkrautbekämpfung, *Brassica napus*, überregionale Anwendbarkeit

Abstract

The statewide applicability of the economic threshold model, which has been developed in Göttingen for weed control in winter oilseed rape, was tested in 1993/94 and 1994/95 on 55 fields in cooperative trials of the University of Göttingen, the German advisory service for plant protection and the “task-group oilseed rape” of the German Phytomedical Society. The omission of herbicide treatments according to threshold criteria did not lead to a disturbance of combine harvesting or a loss in quality and yield of rape. In addition to the field trials the participants were asked about the practical handling of the model. Based on this survey the model was adapted to the practical interests and more simplified. A comparison of the simplified model and the original model showed corresponding decisions for weed control and at the same time reduced work by handling the model.

Key words: Economic threshold, model, weed control, *Brassica napus*, statewide applicability

Einleitung

Winterraps zeichnet sich durch ein schnelles Jugendwachstum aus. Trotz seiner relativ geringen Kulturpflanzendichte ist er in

¹⁾ Georg-August-Universität, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Göttingen

²⁾ Seit 1. 4. 96 Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland