

Über den Nachweis von Blattrollvirus in Kartoffelknollen mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes

Von Ursula Heilmann, Stader Saatzucht, Stade

Keine andere Krankheit macht dem Züchter und Vermehrer von Saatkartoffeln so viel Mühe wie die Blattrollkrankheit. Eine wesentliche Schwierigkeit liegt darin, daß man ihren Erreger (das Virus) schwer nachweisen kann. Es gelingt einigermaßen sicher durch den Augenstecklingstest, und diese Methode ist sehr beliebt. Außerdem gibt es noch den Fuchsintest nach Bode (1). Das Fuchsin färbt alle Zellwände intensiv rot und außerdem in Stengeln und Blättern blattrollkranker Kartoffelpflanzen den Inhalt vereinzelter Phloemzellen. Man muß also in Querschnitten die sehr englumigen Zellen mit gefärbtem Plasma als Symptom für Blattrollkrankheit suchen. Täuschungen sind leicht möglich, weshalb das Verfahren für den modernen Zuchtbetrieb mit vielen Serienuntersuchungen zu anspruchsvoll ist, doch kann dieser Fuchsintest ohne Zweifel in Notfällen helfen. Darüber hinaus berichtet Bode (a. a. O.), daß ihm charakteristische Anfärbungen an blattrollkranken Knollen gelungen seien. Diese Tatsache schien uns bemerkenswert, denn man muß ja immer den Pflanzwert von Knollen bestimmen, und alle umständlichen Manipulationen mit diesen (wie keimen und in Erde zu handhohen Pflanzen heranziehen lassen) sind zeitraubend und teuer.

Wir versuchten deshalb mit großer Beharrlichkeit, diese Knollenuntersuchungen nach Bode nachzumachen. Es gelang auch, doch war uns die Bodesche Anfärbung der Zellwände mit Coriphosphin und Rhodamin B für Serienuntersuchungen nicht überzeugend genug. So griffen wir, durch Strügger (2) angeregt, zu Akridinorange. In Phloemsträngen, die im Blickfeld längs lagen und Blattrollvirus enthielten, trat nach Behandlung mit diesem Farbstoff eine eigenartige Fluoreszenz auf: an einzelnen Zellen des Bündels konnte man die Tüpfel der Wand leuchtend grünlich schimmernd auf dunklem, rotem oder grünlichem Grunde erkennen. Zunächst trat diese eigenartige Erscheinung nur bei schwerkranken Knollen auf. Eine Alkoholkonkurrenz half bald, in jedem Falle von Blattrollinfektion diese Fluoreszenz zu erreichen.

Es ist zwar für unsere Problemstellung, nämlich gesunde und kranke Knollen zu unterscheiden, gleichgültig, ob Zellwand oder Plasma charakteristisch gefärbt ist, doch möchten wir nicht unerwähnt lassen, daß man bei der deutlichen Markierung der Tüpfel diese Anfärbung mit Akridinorange für eine stark an die Zellwand gebundene Reaktion halten muß, genau wie Bodes Anfärbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen bei Blattrollkranken die Zellwände betrafen.

Wir untersuchten so schon 1952/53 eine größere Zahl von Sämlingen auf Blattrollinfektion, indem wir eine 0,01% AkridinorangeLösung bei schwachsaurem pH mit 0,5% Äthylalkohol versetzten und die Knollenschnitte darin 15 bis 20 Minuten beließen.

Das Verfahren enttäuschte uns im Ergebnis nicht. Wir fanden zwar einige Kranke mehr, als nachher auf dem Felde erschienen, doch haben wir im Feldbestande immer und besonders bei einjährigen Sämlingen mit Maskierung von Virosen zu rechnen, so daß wir diese Differenzen zwischen Laboratoriumsversuchen und Freilandbild wohl mit gutem Recht darauf zurückführen konnten, zumal wir ja auch bei Augenstecklingen, wenn sie gut gelungen sind, mehr Kranke als im Feldbestand finden und trotzdem diesen Test viel anwenden.

Leider war unsere Methode nicht gerade praktisch. Bei der Kleinheit der Phloemzellen muß man schon mit ziemlich starker Vergrößerung arbeiten, wenn man die Tüpfel erkennen will, was eine hohe UV-Lichtintensität voraussetzt. Theoretisch hätte die Speziallampe

von Leitz wohl ausgereicht, doch war der vom Überlandwerk gelieferte Strom oft überhaupt zu schwach oder sehr schwankend. Schnelles oder nur planmäßiges Arbeiten war gar nicht möglich. Diesem technischen Problem standen wir hilflos gegenüber und versuchten deshalb, auf normale Farbstoffe und normales Licht auszuweichen, um ähnlich wie beim Fuchsintest Zellinhalte anzufärben. Um den Test zu verbessern, mußte man Farbstoffe suchen, die die Zellwände nicht, wohl aber das kranke Plasma anfärben. Ein schwieriges Problem, denn bekanntlich gibt es viele Farbstoffe, die die Zellwände färben, aber keinen, der Plasma normaler Struktur anzufärben imstande ist (dazu auch Strügger 2). Doch war mir aus eigenen Versuchen im Botanischen Institut der Universität Leipzig (seinerzeit auf Anregung von W. Ruhland; unveröffentlicht) bekannt, daß man gelegentlich Protoplasma von Pflanzenzellen mit scheinbar normaler Struktur kurz vor dem Tode, etwa bei Wundreiz, ganz intensiv anfärben kann. Es wurden eifrig Versuche gemacht in der Hoffnung, daß der Befall mit Blattrollvirus eine so schwere Schädigung darstellt, daß damit befallene Zellen sich mit normalen Farbstoffen anfärben lassen. Darüber hinaus wurden Narkotika und andere Stoffe mit schwachem Einfluß auf die Plasmastruktur hinzugefügt, um bereits durch Virus geschädigtes Plasma noch weiter zu stören und so eine leichtere Anfärbbarkeit zu erzwingen. Es fanden sich auch in einem reichen Farbstoffsortiment (freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. H. Ulrich, Bonn, und Dr. Krüger, Leverkusen-Bayerwerk) Stoffe, die in Stengeln und Blattstielen, auch Lichtkeimen und unausgewachsenen Tochterknollen mit Blattrollvirus befallene Phloemzellen anfärbten. Bordeauxrot ist besonders gut dafür geeignet. Unter Zusatz von Kaliumchlorid gelingt die Anfärbung in jedem Falle. Die Lösung enthält: 0,01% Bordeauxrot (die Konzentration kann auch etwas höher sein) und 0,1 bis 0,4 mol KCl (wir begannen mit der niedrigen Konzentration und nehmen jetzt etwa 0,3 mol). Außerdem muß ein ganz bestimmter pH-Wert eingehalten werden, den wir aber mit unseren Mitteln nicht genau bestimmen können. Nach Messungen mit Lyphannpapier liegt er zwischen 3,7 und 4,0. Wir machen Probefärbungen, um den richtigen Wert einzustellen.

So schön für das Auge die Rotfärbungen sind, so sehr enttäuschte es, daß man an die vollausgereifte Knolle nicht herankam, bis der Gedanke weiterhalf, daß ja die oben beschriebene Anfärbung mit Akridinorange bei Licht eine erhebliche Schädigung des Plasmas oder zumindest der den veränderten Zellwänden benachbarten Plasmateile zur Folge hat und vielleicht nach einer solchen Behandlung eine zusätzliche Anfärbung mit normalen Farben gelingen kann und so auf Umwegen die Anfärbung mit Akridinorange auch bei normalem Licht beobachtbar wird. Ein Gemisch Akridinorange-Bordeauxrot wirkte tatsächlich in diesem Sinne. Die Lösung enthält etwa 0,005% Akridinorange, 0,01% Bordeauxrot und 0,3 mol KCl bei einem pH von 3,7—4,0 (s. o.). Die Farblösung darf nicht zu dunkel sein, weil die zu färbenden Knollenschnitte belichtet werden müssen und zwar am besten mit UV-Licht, um eine Rotfärbung in etwa 15 Minuten zu erreichen. Blattrollkranke Knollen zeigen dann in einer Reihe von Phloembündeln einzelne (oft nur eine) Zellen, die bei Längsaufsicht in ihrer vollen Länge dunkelrot gefärbt erscheinen. Sie heben sich sehr schön klar von den praktisch ungefärbten Nachbarzellen ab.

Wir arbeiten zur Orientierung mit einer Vergrößerung, bei der man gerade noch die langgestreckten Phloemzellen als rote „Strichel“ erkennen kann, und wählen dazu ein schwach vergrößerndes Objektiv und stark vergrößerndes Okular. Zum Nachprüfen wird dann ein stärkeres Objektiv genommen.

Auch nach dieser Methode finden wir mehr Virusträger, als später im Feldbestande auftreten.

Literatur

1. Bode, O.: Beitrag zum frühzeitigen Nachweis der Blattrollkrankheit der Kartoffel durch Anfärbung des Phloems. Festschrift Otto Appel der Biol. Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 1947, S. 34—36.
2. Strugger, S.: Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Naturwissenschaften 34. 1947, 267—273.

Eingegangen am 25. Januar 1955.

MITTEILUNGEN

Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung von Kartoffelpflanzen auf Blattrollbefall nach dem Fuchsinrest

Die Veröffentlichung der Methodik zum Nachweis von Blattrollinfektionen bei Kartoffelpflanzen durch Anfärbung der nekrotischen Folgeerscheinungen im Phloem mittels Fuchsin¹⁾ dürfte nicht allgemein zugänglich sein. Auf vielseitigen Wunsch wird deshalb im folgenden eine kurze Zusammenstellung über die Technik selbst gegeben, mit deren Hilfe eine Untersuchung ohne weiteres möglich sein wird.

Die Feststellung, ob blattrollverdächtige Kartoffelpflanzen — aus der Stecklingsprüfung oder vom Feld — vom Virus der Blattrollkrankheit infiziert sind, oder ob eine andere, nicht durch die Knolle übertragbare Infektionskrankheit bzw. Blattrollen aus physiologischer Ursache vorliegt, ist mit Hilfe der Fuchsinfärbemethode in einfacher Weise möglich. Zur Untersuchung werden frische Pflanzenteile benötigt; solche, bei denen bereits Fäulnis eingetreten ist oder starker *Phytophthora*-Befall vorliegt, sind unbrauchbar.

Mit einem scharfen Rasiermesser werden dünne und gleichmäßige Querschnitte dicht unterhalb eines Knotens des Stengels hergestellt, und zwar bei sekundärkranken Pflanzen (d. h. solchen, die von bereits infizierten Pflanzen abstammen und bei denen die Infektion von der Knolle ausgegangen ist) in der unteren Stengelregion, bei primärkranken Pflanzen (die also im gleichen Jahre infiziert sind) in der verdächtigen Region oder sonst in der oberen Stengelhälfte. Die Schnitte werden in die Farblösung überführt und 1—2 Minuten lang gefärbt, anschließend in Wasser zur Entfernung des Farbüberschusses ausgeschwenkt und auf einen Objektträger in einen Tropfen Wasser überführt. Als Farbstoff dient Säurefuchsin. Die Farblösung soll eine Konzentration von etwa 1 : 10 000 haben.

Die schwach rosa gefärbten Schnitte werden unter dem Mikroskop bei ungefähr 200- bis 300facher Vergrößerung betrachtet. In den Schnitten gesunder Pflanzen sind dann nur der Holzteil und die Bastfasern rot gefärbt, während alle anderen Zellelemente ungefärbt bleiben. Bei blattrollkranken Pflanzen finden sich außerdem je nach dem Grad der Erkrankung und der Resistenz der geprüften Kartoffelsorten mehr oder minder häufig auch im Phloem (= Siebteil) Rotfärbungen. Es handelt sich dabei um absterbende oder schon abgestorbene Zellen oder Zellgruppen („Phloemnekrose“); diese nehmen den Farbstoff leicht an.

Zum leichteren Verständnis sollen einige Erklärungen über den anatomischen Aufbau des Kartoffelstengels beigefügt werden. Entsprechend dem dreikantigen Aufbau des Stengels finden sich auf den Querschnitten in den drei Ecken Leitbündel, die aus einem Holzteil und einem inneren sowie einem äußeren Phloem aufgebaut sind. Mit zunehmendem Alter der Pflanze bildet sich auch zwischen den Leitbündeln eine Verbindung von Leitelementen, so daß später ein geschlossener Ring von Holzzellen zu erkennen ist, der in den Ecken allerdings wesentlich verstärkt ist. Das Außenphloem zieht sich ebenfalls als Ring um diesen Holzkörper, wohingegen das Innenphloem in kleineren Gruppen von Zellen im Parenchymgewebe, verhältnismäßig dicht an den Holzkörper angelehnt, zerstreut erkennbar ist.

Die Phloemzellen sind meist leicht von den anderen Zellen durch ihre dünnen Zellwände, den verhältnismäßig eckigen Aufbau sowie ihren geringen Durchmesser zu unterscheiden. Bei älteren Pflanzen sind die Phloemteile gegen Mark und Rinde durch außerordentlich dickwandige Bastfasern abgegrenzt, die beim Außenphloem einen geschlossenen Ring bilden können, während sie beim Innenphloem nur zerstreut auftreten.

¹⁾ Bode, O. Beitrag zum frühzeitigen Nachweis der Blattrollkrankheit der Kartoffel durch Anfärbung des Phloems. Festschrift Otto Appel, Biol. Zentralanst. f. Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 1947, S. 34—36.

Die durch das Virus hervorgerufenen Phloemnekrosen treten nur in den Phloemzellen auf, und zwar zunächst in denjenigen Zellen, die vom Holzkörper am weitesten entfernt liegen, beim Außenphloem also dicht unter dem Bastfaserring, beim Innenphloem in den Zellen, die dicht an die Bastfasern angrenzen. Es ist stets sowohl Außen- als auch Innenphloem zu prüfen, da die Nekrosen bei schwächerer Infektion durchaus nicht in beiden Phloemarten, ja sogar nicht einmal in allen drei Leitbündeln gleichzeitig aufzutreten brauchen.

Mit einiger Übung gelingt es schnell, die einzelnen Gewebeelemente voneinander zu unterscheiden und die Nekrosen im Phloem zu erkennen. Wesentlich ist, die erkrankten Phloemteile von den gleichfalls wie die Nekrosen rotgefärbten Holzelementen sowie Bastfasern zu trennen.

Anmerkung: Da nicht alles im Handel erhältliche Fuchsin eine brauchbare Reaktion gibt, prüfe man zunächst die Wirksamkeit an einwandfrei sekundärkranken Pflanzenmaterial, auch achte man darauf, daß keine Überfärbungen und dadurch Irrtümer in der Diagnose auftreten. Parenchymatische Gewebe dürfen im Mikroskop nicht gefärbt erscheinen. Da in der Reaktion nicht das Virus selbst, sondern die Folgeerscheinungen einer Infektion nachgewiesen werden, ist bei Primärinfektionen selbstverständlich eine Zeit von mehreren Tagen nach der Infektion notwendig, bis die Nekrosen nachweisbar sind. Außerdem ist die Reaktion der Sorten je nach ihrem Resistenzgrad verschieden; anfällige Sorten reagieren meist schnell durch Bildung von intensiven Nekrosen, während dies bei resistenteren Sorten nur zögernd und in weniger starker Form geschieht.

O. Bode (Braunschweig)

VIII. Internationaler Botanikerkongreß in Paris 2.—13. Juli 1954

Zum VIII. Internationalen Botanikerkongreß in Paris waren über 2000 Teilnehmer aus etwa 60 Ländern, darunter auch zahlreiche aus Übersee, erschienen, d. h. mehr als zu irgendeinem früheren dieser Kongresse, was wohl mit auf die große Anziehungskraft des Tagungsortes zurückzuführen sein dürfte. Die Biologische Bundesanstalt war durch ihren Präsidenten Professor Dr. H. Richter und den Verf. dieses Berichtes vertreten. Von deutschen Pflanzenpathologen nahmen noch teil Professor Dr. H. Braun (Bonn), Dr. G. Grümmer (Greifswald), Professor Dr. M. Linkowski (Aschersleben), Regierungsrat Dr. F. Sprau (München) und Professor Dr. G. Winter (Köln). Die feierliche Eröffnung erfolgte am 2. Juli vormittags durch den Rektor der Universität Paris, Professor J. Sarrailh, unter musikalischer Umrahmung der verschiedenen Ansprachen und Reden durch das ausgezeichnete Symphonieorchester der Garde Républicaine im großen, bis auf den letzten Platz gefüllten Sitzungssaal der Sorbonne. Die Kongreßverhandlungen wickelten sich an den folgenden Tagen in 27 Sektionen ab, die z. T. noch in Untersektionen gegliedert waren. Die zahlreichen Sitzungen wurden im Hauptgebäude der Sorbonne und den zugehörigen benachbarten Instituten abgehalten.

Aus der großen Zahl der Vorträge — weit über 1000 — können hier nur solche angeführt werden, die in das Gebiet der Pflanzenpathologie und des Pflanzenschutzes fallen oder diese Gebiete zumindest berühren.

Einige dieser Vorträge brachten allgemeine Übersichten, so der von A. F. El-Helaly (Ägypten) über den derzeitigen Stand der Pflanzenpathologie in Ägypten, der von G. Bazzigher (Schweiz): „Neues in der Forstpathologie“ und der von Lee M. Hutchins (USA) über Fortschritte der Forstpathologie in den USA.

Eine große Zahl von Vorträgen behandelte spezielle Fragen aus dem Gebiete der pilzparasitären und bak-