

0. 334. 1367

Keller
J. S. P. Z

Diss. ETH Nr. 8285

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DES ELISA-VERFAHRENS
ZUM SERIENMÄSSIGEN NACHWEIS VON VIREN (PLRV UND PVY)
BEI DER KARTOFFEL UNTER BERÜCKSICHTIGUNG
DES INFEKTIONSZEITPUNKTES DER PFLANZEN UND
DES PHYSIOLOGISCHEN ZUSTANDES DER KNOLLE

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Technischen Wissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
JAN REK
Dipl. Natw. ETH
geboren am 24. März 1954
von Thalwil ZH

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. E. R. Keller, Referent
Dr. P. Gugerli, Korreferent
Dr. F. A. Winiger, Korreferent

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1987

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. <u>EINLEITUNG</u>	9
1. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	9
1.1. Bedeutung der Kartoffel als Kulturpflanze	9
1.2. Problematik der Kartoffelproduktion	10
1.3. Massnahmen zur Erzielung von gesundem Pflanzgut	11
1.4. Einsatz von ELISA zum Nachweis von Viruskrankheiten	14
1.5. Zielsetzung	17
II. <u>MATERIAL UND ALLGEMEINE VERSUCHSMETHODIK</u>	19
1. ELISA - VERFAHREN	19
1.1. Materialien zur Durchführung von ELISA	19
1.1.1. Geräte	20
1.1.2. Testplatten	28
1.1.3. Pufferlösungen	29
1.1.4. Antiseren	32
1.1.5. Positive Kontrollen	32
1.2. Prinzip und Durchführung des ELISA - Verfahrens	33
1.2.1. Die Beschichtung der Platten mit Antikörpern	33
1.2.2. Die Probenzugabe	34
1.2.3. Die Konjugatzugabe	35
1.2.4. Die Substratzugabe	35
1.2.5. Die Auswertung der Farbreaktion	37
1.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse	41

2. GEWINNUNG DES PROBENSAFTES	41
2.1. Herstellung von Blatt-, Stengel-, Wurzel-, Keim- und Stolonensaft	42
2.2. Gewinnung des Knollensaftes	42
2.3. Vorbehandlung der Knollen für die Testierung	44
3. VERGLEICHSMETHODEN	44
3.1. Igel - Lange Test	45
3.2. A6 - Test	46
3.3. Augenstecklingstest	47
III. <u>UNTERSUCHUNGEN UND DISKUSSION</u>	48
A) DIE BEDEUTUNG DES PHYSIOLOGISCHEN ZUSTANDES DER KARTOFFELKNOLLE ZUM ZEITPUNKT DES VIRUSNACHWEISES MIT E L I S A	48
1. EINLEITUNG	48
2. VERSUCHSANORDNUNG	49
3. EINFLUSS DER KUENSTLICHEN KEIMRUHEBRECHUNG AUF DIE ERFASSUNG VON PVY UND PLRV	54
3.1. Nachweis von PVY in primär infizierten Knollen	54
3.2. Nachweis von PLRV in primär infizierten Knollen	55
4. EINFLUSS DER VORLAGERUNGSDAUER UND -TEMPERATUR DER KNOLLEN AUF DIE NACHWEISSICHERHEIT UND KONZENTRATION VON VIREN	56
4.1. Nachweis von PVY in primär infizierten Knollen	56
4.2. Nachweis von PLRV in primär infizierten Knollen	68

5. VERTEILUNG VON PVY UEBER DIE KRONENHAELFTE UNTERSCHIEDLICH VORBEHANDELTER KNOLLEN	70
5.1. Nachweissicherheit	71
5.2. Viruskonzentration	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	75
B) AUSWIRKUNGEN DES INFektionsZEITPUNKTES DER PFLANZEN AUF DEN NACHWEIS VON VIREN MITTELS E L I S A	96
1. EINLEITUNG	96
2. VERSUCHSANORDNUNG	96
2.1. Freilandversuch 1985	96
2.2. Gewächshausversuch 1986, Viruswanderung in der Kartoffelpflanze	100
3. FREILANDVERSUCH 1985	102
3.1. Virusnachweis an Kartoffelpflanzen während der vegetativen Phase	102
3.1.1. Nachweis von PVY	102
3.1.2. Nachweis von PLRV	105
3.2. Nachweis von PVY und PLRV an der Knolle	106
3.2.1. Nachweis an unbehandelten Knollen sofort nach der Ernte	106
3.2.2. Nachweis an Knollen nach künstlicher Keimruhebrechung	108
3.2.3. Nachweissicherheit an natürlich keimenden Knollen	123
3.3. Infektionserfolg bei den Knollen primär und sekundär infizierter Pflanzen	126

4. GEWAECHSHAUSVERSUCH 1986	128
4.1. Verteilung von PVY und PLRV in sekundär infizierten Pflanzen	128
4.2. PVY-Verteilung bei zeitlich gestaffelten Primärinfektionen	129
4.2.1. Frühe Primärinfektionen	130
4.2.2. Späte Primärinfektionen	133
4.2.3. Diskussion	134
5. ZUSAMMENFASSUNG	136
C) ANWENDUNG VON MISCHSERUM R/Y IM RAHMEN DER ZERTIFIZIERUNG VON PFLANZKARTOFFELN SOWIE ZUVERLAESSIGKEIT IN ROUTINEUNTERSUCHUNGEN	149
1. EINLEITUNG	149
2. VERSUCHSANORDNUNG	149
2.1. Die Beschichtung der Platten mit Antikörpern	150
2.2. Die Konjugatzugabe	150
3. DIE VERWENDUNG VOM MISCHSERUM R/Y	150
4. DIE ZUVERLAESSIGKEIT VON ELISA UND DER VERGLEICH MIT ANDEREN TESTMETHODEN	152
IV. <u>SCHLUSSFOLGERUNGEN FUER DIE SERIENUNTERSUCHUNGEN</u>	
1. EINLEITUNG	155
2. GERAETE	158

3. VORARBEITEN FÜR DAS ELISA-VERFAHREN	157
3.1. Reagenzien und Puffer	157
3.2. Die Beschichtung der Platten mit Antikörpern	158
3.3. Die Vorbereitung der Knollen	158
4. UNTERSUCHUNG DER PROBEN	159
4.1. Massnahmen zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen	159
4.2. Die Beschichtung der Platten mit Knollensaft	161
4.3. Die Konjugatzugabe	163
4.4. Die Messung und Auswertung der Ergebnisse	163
V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	165
Summary	168
VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	170
Lebenslauf	181
Verdankungen	183

I. EINLEITUNG

1. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

1.1. Bedeutung der Kartoffel als Kulturpflanze

Nicht immer erfreute sich die Kartoffel der heutigen Beliebtheit, es brauchte Jahrhunderte, bis die Kartoffel ihre grosse Bedeutung in Land- und Volkswirtschaft erreicht hatte.

Die Geschichte der Kartoffel begann in Europa zwischen 1565 und 1570. Als Nahrungsmittel wurde sie anfänglich verschmäht, die Ausbreitung erfolgte sehr langsam. Als Nutzpflanze erlangte die Kartoffel zuerst Verwendung im Schweinefutter. Erst eine Reihe von Missernten, die um 1770 Hungersnot auslösten, verhalfen der Kartoffel zum endgültigen Durchbruch und zu einer starken Ausdehnung der Anbaufläche.

Im 20. Jahrhundert erkannte die moderne Ernährungswissenschaft den Gesundheitswert der bescheidenen Kartoffel. Heute steht die Kartoffel als Naturerzeugnis in vorderster Linie der Versorgung mit Lebensmitteln. Sie stellt eine willkommene Ackerfrucht dar, die sowohl für die Gesunderhaltung der Fruchtfolgen wie auch für die Einkommensbildung wichtig ist (Müller, 1984).

Von der richtigen Ernährung des Menschen ist die Kartoffel mit ihren wertvollen Inhaltsstoffen und dem hohen Sättigungs- und Genusswert nicht wegzudenken (Solms et al., 1984). Sie ist bei uns in Form von Frischkartoffeln und als Veredelungsrohstoff bis heute eines der wichtigsten Grundnahrungsmittel geblieben. Lange Zeit war die Kartoffel die einzige Ackerfrucht in der Schweiz, die den Bedarf voll gedeckt hat. Sie ist heute tatsächlich einer der Grundpfeiler der Landesversorgung mit inländischen Lebensmitteln.

1.2. Problematik der Kartoffelproduktion

Bei der grossen Bedeutung der Kartoffel für die Ernährung, die Fütterung und als industrieller Rohstoff ist es wichtig, dass Ertragsausfälle und Qualitätsbeeinträchtigungen vermieden werden können. Die Ausnützung des vollen Ertragspotentials und die Qualität der Kartoffel werden durch viele Faktoren begrenzt, nicht zuletzt durch Krankheiten und Schädlinge. Besondere Aufmerksamkeit muss der Bekämpfung von Viruskrankheiten geschenkt werden (Keller, 1959). Ein Virusbefall an Kartoffelpflanzen kann sowohl qualitative (Berces et al., 1984; Winiger et al., 1987) wie auch quantitative (Winiger et al., 1974) Auswirkungen haben. Es sind vor allem die durch Viruskrankheiten verursachten Ertragseinbussen, die wirtschaftlich ins Gewicht fallen.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für einen zufriedenstellenden wirtschaftlichen Ertrag ist die Verwendung von gesundem, anerkanntem Saatgut. Verschiedene Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, dass unter ungünstigen Bedingungen der Ertragsausfall bei Verwendung von viruskranken Saatknollen im Extremfall 80% bis 90% gegenüber Aufwuchs aus gesundem Saatgut betragen kann (Salzmann et al., 1969; Bärecke, 1961).

Zusätzlich bilden die virusinfizierten Pflanzen im Feld neue Infektionsherde, die eine weitere Ausbreitung der Viruskrankheiten durch Blattläuse stark begünstigen. Andere Massnahmen, wie Düngung, Pflanzenschutz, Anbautechnik, bessere Sorten usw. (Schöber et al., 1984) können sich erst dann ertragssteigernd auswirken, wenn als Ausgangsmaterial gesundes Saatgut verwendet wurde.

1.3. Massnahmen zur Erzielung von gesundem Saatgut

Die hohen Anforderungen an die Saatkartoffelproduktion sind vom Verlangen bestimmt, mit gesunden Saatknohlen einen vollen Ertrag erzielen zu können.

Eine erfolgreiche Saatkartoffelproduktion in der Schweiz ist mit besonderen Anstrengungen verbunden. Für die Erzeugung von Saatkartoffeln sind jene Länder prädestiniert, die auf Grund der klimatischen und topographischen Verhältnisse möglichst frei von virusübertragenden Blattläusen sind. In der Schweiz muss die Blattlaussituation stark berücksichtigt werden. Die Gefahr der Virusausbreitung ist gross, da oft benachbarte Speisekartoffelfelder mit virusinfizierten Pflanzen Infektionsherde darstellen, von wo aus die Krankheiten in die gesunden Saatkartoffelfelder übertragen werden.

Verwendung von gesundem Ausgangsmaterial, Wahl einer isolierten, geschlossenen Lage als Schutz gegen die Infektion von Nachbarfeldern und gründliche Entfernung viruskranker Pflanzen durch Säuberung sind daher einige der Anforderungen an die Arbeit der Vermehrer.

Da die Vermehrung der Kartoffeln auf vegetativem Weg erfolgt, ist schliesslich der tatsächliche Virusbefall der Saatknohlen als Qualitätskriterium ausschlaggebend. Aus diesem Grund erfolgt die definitive Anerkennung von Saatkartoffelposten aufgrund des Resultates der Untersuchung von Knollenmustern.

Seit Jahrzehnten wird die schweizerische Saatkartoffelproduktion vor der definitiven Anerkennung mit Hilfe geeigneter Nachweisverfahren auf das Vorkommen von Viruskrankheiten untersucht. Geschichtlich gesehen haben folgende Massnahmen zur Verbesserung der Saatkartoffelqualität wesentlich beigetragen (vgl. auch Berces et al., 1972):

- Einführung der Frühernte im Jahr 1948.

- Einbau des Igel-Lange-Testes (ILT) zum Nachweis des Blattrollbefalls (PLRV) ins Anerkennungssystem im Jahre 1955.
- Einführung des A6-Testes zur Erfassung der Mosaikviren PVY und PVA im Jahre 1961.
- Eingang des Freilandtestes in die Praxis in der Westschweiz zu Beginn der siebziger Jahre.
- Ablösung der bisherigen Testverfahren durch ELISA, eine neue serologische Nachweismethode im Herbst 1983. Diese Uebernahme wurde aufgrund der Resultate im Rahmen der vorliegenden Arbeit wesentlich erleichtert.

Mit der frühzeitigen Vernichtung von Kraut und Stengel bei der Frühernte versucht man Spätinfektionen zu verhüten und die Wanderung der bereits eingedrungenen Viren in der Pflanze in Richtung Knolle zu unterbrechen. Durch die Einführung der Frühernte konnte die Qualität des Saatgutes bereits wesentlich verbessert werden. Es stellte sich aber bald heraus, dass weitere Massnahmen nach der Ernte nötig waren; es galt, die schlechten Saatgutposten noch vor der Weiterverwendung zu eliminieren, damit die durchschnittliche Qualität des Saatgutes weiter erhöht werden konnte. Aus dieser Erkenntnis wurden sukzessive neue, geeignetere Verfahren zum Nachweis von Viruskrankheiten ab Knolle nach der Ernte eingeführt.

Der 1955 eingeführte Igel-Lange Test (ILT) ermöglichte den Nachweis des Blattrollvirus direkt in der Kartoffelknolle und führte erwartungsgemäss zur Qualitätsverbesserung des inländischen Saatgutes (Berces et al., 1966).

Der Einbruch von Tabakrippenbräune (Y-Virus-Stamm) in den europäischen Raum und deren starke Ausbreitung verlangte nach einem neuem Test, da die verursachte Krankheit oft latent verläuft und eine zuverlässige Säuberung der Bestände nicht möglich ist. Durch den Einbau des A6-Tests in das Anerkennungssystem konnten die mit Y-Virus verseuchten Posten noch vor dem Verkauf ausgeschlossen werden (Keller et al., 1962).

Eine zusätzliche Information über den Virusbefall erhielt man aufgrund des zu Beginn der siebziger Jahre in der Westschweiz eingeführten Freilandtestes (Münster et al., 1973).

Bis zum Herbst 1983 wurden im Rahmen der Saatkartoffelanerkennung die oben erwähnten Testverfahren angewandt. Dies bedeutet, dass im Zeitraum zwischen der Ernte und dem Verkauf des Saatgutes im Herbst jährlich zwischen 500'000 und 700'000 Knollen untersucht wurden. Diese grossen, durch die Testierung verursachten Aufwendungen haben sich sicherlich gelohnt. Durch die konsequente Kontrolle des inländischen Saatgutes ist es gelungen, von 1955 an praktisch alle sogenannten Versagerposten mit erheblichem Virusbefall vor dem Verkauf zu eliminieren. Dies war eine Voraussetzung, um das Vertrauen der Landwirte in das inländische Saatgut zu stärken.

Trotz der guten Qualität der Testergebnisse, hat man aber vor allem aus arbeitstechnischen Ueberlegungen nach neuen Wegen in der Testierung gesucht. Die Anwendung der bisherigen Verfahren in der Praxis wies verschiedene Nachteile auf. Für den Nachweis der wichtigsten Viren (PVY, PVA, PLRV) mussten verschiedene Testverfahren angewandt werden. Der A6-Test erlaubte im wesentlichen nur die Erkennung von PVY und PVA, der ILT dagegen nur den Nachweis von PLRV. Die Verwendung von zwei verschiedenen Methoden verunmöglichte den gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen Viren, die dadurch entstandenen Umtriebe mit der Mustervorbereitung wirkten sich auf den Arbeitsablauf negativ aus. Eine Automatisierung der Tests und deren Auswertung war nicht möglich, da die Bonitierung visuell erfolgte und die richtige Interpretation der Symptome von grosser persönlicher Erfahrung abhängig war. Die Verwendung des Freilandtestes weist ebenfalls bedeutende Nachteile auf. Der benötigte Flächenbedarf ist relativ gross, der Test ist stark witterungsabhängig und die latent infizierten Pflanzen werden nicht erfasst. Für sichere Aussagen ist eine

zusätzliche Ueberprüfung mit Labortests nötig.

Serologische Methoden (Präzipitations- und Agglutinationsmethode) werden schon seit vielen Jahren - auch im Kartoffelbau - zum Virusnachweis eingesetzt (Matthews, 1957; Shepard, 1972). Sie ermöglichen den Nachweis verschiedener wirtschaftlich wichtigen Kartoffelviren (PVX, PVS, PVM und PVY), ausgenommen PVA und PLRV, in oberirdischen Pflanzenteilen mit einer Methode. Da es jedoch in den Knollen nicht gelingt, die Kartoffelviren Y (PVY) und A (PVA) sowie Blattrollvirus (PLRV) sicher nachzuweisen, ist der Einsatz der älteren serologischen Verfahren für serienmässige Massenuntersuchungen im Rahmen der Saatkartoffelzertifizierung nicht sinnvoll.

1.4. Einsatz von ELISA zum Nachweis von Viruskrankheiten

Die Hoffnung auf den serienmässigen Einsatz der Serologie eröffnete sich erst mit der sehr empfindlichen ELISA-Variante.

ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay) wurde erstmals 1971 in der Humanmedizin beschrieben (Engvall et al., 1971, 1972; Voller et al., 1974) und wird seit 1976 zum Nachweis von pflanzenpathogenen Viren eingesetzt (Clark et al., 1977; Voller et al., 1976). Inzwischen wird der Test bei vielen Kulturen (Bar-Joseph et al., 1979; Gonsalves, 1979; Lister, 1978; Reeves et al., 1978; Casper, 1977a;), Vektoren (Clarke et al., 1980; Gugerli, 1984a) und für die unterschiedlichen Pathogene (Clark et al., 1978; Stevens et al., 1979; Cother et al., 1980; Casper et al., 1979; Beguin et al., 1984) mit Erfolg angewandt.

Mit den Fragen über die Eignung und den Einsatz von ELISA zum Nachweis von Kartoffelviren, haben sich verschiedene Institute beschäftigt. Nachhaltige Impulse in der Schweiz gab Gugerli. In den ersten Publikationen berichten mehrere Autoren über die eindeutige Identifizierung verschiedener Kartoffelviren, PLRV und PVA inbegriffen, in Extrakten aus

Kartoffelblättern (Casper, 1977b; Walter et al., 1979; Mehrad et al., 1978; Maat et al. 1978a, 1978b). Bereits seit 1977 wurden durch Gugerli im Rahmen verschiedener Projekte wichtige Arbeiten an der Eidgenössischen Landwirtschaftlichen Forschungsanstalt von Changins durchgeführt.

Die Voraussetzung für die Anwendung des ELISA-Verfahrens ist die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörper. Zwischen 1977 und 1980 wurden an der Forschungsanstalt von Changins Antiseren gegen zehn verschiedene Kartoffelviren hergestellt (Gugerli, 1980b; 1984b). Mit Hilfe der zuerst produzierten PVY-spezifischen Antikörpern gelang es Gugerli schon 1977 PVY in Kartoffelblättern nachzuweisen (Gugerli, 1978; Gugerli, 1979b). Durch die erfolgreiche Gewinnung der Antiseren für PVA und PLRV im gleichen Jahr (Gugerli, 1979a) war es erstmals möglich, alle wichtigen Kartoffelviren serologisch zu erfassen.

Für eine erfolgreiche Weitervermehrung ist der Gesundheitszustand der Saatknolle massgebend, daher konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf den Virusnachweis direkt ab Knolle (Gugerli, 1980a; Gugerli et al., 1980). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen deutlich, dass für den Virusnachweis an der Knolle die Viruslokalisation und der physiologische Zustand der Knolle (vor allem für PVY und PVA) sowie störende unspezifische Reaktionen berücksichtigt werden müssen. Die Zuverlässigkeit von ELISA konnte durch die künstliche Keimruhebrechung mit Rindite wesentlich verbessert werden (Gugerli et al., 1980). Das Ausbleiben der unspezifischen Reaktionen wurde durch gezielt verbesserte Pufferlösungen und durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern erreicht (Gugerli, 1982).

Der Nachweis der Kartoffelviren mit Hilfe des ELISA-Verfahrens bringt im Vergleich zu konventionellen Methoden (ILT, A6-Test, Agglutinationstest usw.) verschiedene Vorteile mit sich (Casper et al., 1981). So können mit dieser Methode nicht nur alle Viren, sondern auch Bakterien und Pilze erfasst werden. Langfristig gesehen ist dieser Aspekt nicht zu vernachlässigen, da in der Zukunft im

Rahmen der Zertifizierung von Kartoffelsaatgut möglicherweise auch andere Krankheitserreger erfasst werden müssen.

Beim Nachweis von pflanzlichen Viren ist es unerlässlich, dass die verwendete Testmethode auf sehr kleine Konzentrationen von nachzuweisendem Virus anspricht. Ein genauso wichtiger Faktor ist die Differenzierung unter nahe verwandten Viren. Beide Anforderungen erfüllt ELISA ausgezeichnet. Die Unterscheidung von nahe verwandten Virusstämmen (Mc. Laughlin et al., 1978) und die Identifikation von verschiedenen Serotypen (Rochow et al., 1979; Uyemoto, 1980) funktioniert mit ELISA zuverlässig. ELISA-Empfindlichkeit ist um das tausendfache höher als die des Agglutinationstestes. Dies erlaubt den sicheren Nachweis von geringsten Viruskonzentrationen (Gera et al., 1978; Gugerli, 1978; Lister et al., 1979; Bar-Joseph et al., 1980). Die für den Test benötigten Proben können dadurch sehr klein gehalten werden und man kann grundsätzlich alle Pflanzenteile (Blätter, Knospen, Wurzeln, Samen, Knollen) verwenden. Zusätzlich können dank der hohen Empfindlichkeit Krankheitserreger bereits vor der Symptomausbildung nachgewiesen werden (Gugerli, 1979b).

Auch im Hinblick auf die Massenuntersuchungen in der Praxis sind durch ELISA bedeutende Vorteile zu erwarten. Immerhin müssen während der Testperiode von 2 Monaten an der Forschungsanstalt Zürich-Reckenholz rund 500'000 Knollen untersucht werden. Eine Automatisierung des Testes ist weitgehend möglich (Gugerli, 1980b, 1981), wodurch sowohl die Qualität der Arbeit, als auch die Testgeschwindigkeit gesteigert werden. Die Beurteilung der Proben ist bei ELISA nicht von subjektiven Faktoren abhängig, die rechnerische Auswertung der Reaktionen erfolgt aufgrund der gemessenen Extinktionswerte.

Die Anwendung des ELISA-Verfahrens ist jedoch auch mit einigen Problemen verbunden. In der Literatur werden unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Ergebnisse über die Eignung und Zuverlässigkeit von ELISA zum Nachweis von

Kartoffelviren präsentiert. Vor allem die Testierung ab Kartoffelknolle scheint besondere Probleme zu bereiten (Wigger, 1983, 1984; Munzert et al., 1981, 1983; Winiger et al., 1983; Gugerli, 1978, 1979b; Rek et al., 1984; Kerlan et al., 1984; Vetten et al., 1983; Ehlers et al., 1983; de Bokx et al., 1979). Viele Hinweise deuten darauf hin, dass der zuverlässige Virusnachweis eng mit dem physiologischen Zustand der Pflanze verbunden ist (Gugerli et al., 1980). Auch andere Faktoren, wie der Zeitpunkt der erfolgten Virusinfektion, die Eigenschaften der Viren selber und der für den Test verwendete Pflanzenteil scheinen die Testsicherheit entscheidend zu beeinflussen.

Am Beispiel der Kartoffelknolle wird die unterschiedliche Virusverteilung gut ersichtlich. Während PVY im Rindengewebe und in den Leitbündeln zu finden ist, kommt das PLRV nur in den Leitbündeln vor. Der Anstieg der Viruskonzentration nach Beendigung der Keimruhe ist nicht zu übersehen (Gugerli, 1980a; Gugerli et al., 1980; Weidemann, 1981, 1982; Weidemann et al., 1982).

Die Anwendung des Tests in der Praxis ist auch bezüglich Anforderungen an das Personal anspruchsvoll. Eine rationelle Durchführung der Massenuntersuchungen erfordert geeignete technische Einrichtungen, die kompliziert und teuer sind.

Für eine erfolgreiche Arbeit mit ELISA sind also nicht nur die biologischen Aspekte der Kartoffelpflanze resp. virusbedingte Unterschiede zu berücksichtigen. Die Wahl von geeigneten technischen Einrichtungen, die Optimierung der Testmethode selber wie auch die Verwendung von geeigneten Reagenzien und Seren sind von entscheidender Bedeutung.

1.5. Zielsetzung

Aufgrund der ermutigenden Forschungsergebnisse von Gugerli hat man sich an der Eidgenössischen Forschungsanstalt Zürich - Reckenholz entschlossen, ELISA im Hinblick auf einen möglichen Einsatz im Rahmen der Zertifizierung von

Saatkartoffeln zu prüfen. Die ersten bei uns serienmässig durchgeführten Versuche mit Knollen führten jedoch, wie in vielen anderen Instituten auch, nicht zu den erhofften Ergebnissen. Da die Gründe für die Misserfolge unbekannt waren und zusätzlich durch die bereits erwähnten widersprüchlichen Publikationen über die Nachweissicherheit ab Knolle verunsichert, haben wir beschlossen, die Probleme der ELISA-Anwendung für die Serienuntersuchungen ab Knolle im Rahmen dieser Arbeit zu studieren. Sämtliche Untersuchungen wurden an der Forschungsanstalt Zürich-Reckenholz durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit verschiedenen pflanzenphysiologischen Fragen, die mit der Eignung von ELISA zum Nachweis von Viren bei der Kartoffel, insbesondere in der Kartoffelknolle, innerhalb der Zertifizierung von Pflanzkartoffeln zusammenhängen. Zur Zielsetzung gehörte vor allem die Charakterisierung von Bedingungen, die es ermöglichen, ELISA als sicheres, rationelles und kostengünstiges Virusnachweisverfahren ab Knolle einzusetzen. Dieses Ziel sollte durch die Untersuchung der Einflüsse folgender Faktoren erreicht werden:

- Bedeutung des physiologischen Zustandes der Kartoffelknolle zum Zeitpunkt des Virusnachweises (Vorlagerungsbedingungen, Inkubationsdauer nach künstlicher Keimruhebrechung, jahresbedingte Unterschiede, Sorte usw.).
- Auswirkungen des Infektionzeitpunktes der Pflanzen auf den Nachweis von Viren (Alter der Pflanze bei der Primärinfektion, Sekundärinfektionen).
- Technische Aspekte für den Einsatz in der Gross-Serie.

Nachdem die ausführlichen Labor- und Feldversuche erfolgreich abgeschlossen waren, konnte dieses Ziel erreicht werden. Ab Herbst 1984 wurden die bisherigen Testverfahren vollumfänglich durch ELISA als Grundlage für die endgültige Saatkartoffelanerkennung abgelöst.

II. MATERIAL UND ALLGEMEINE VERSUCHSMETHODIK

Sofern bei der späteren Beschreibung der Experimente nicht anders erwähnt, gelten allgemein die folgenden Bedingungen.

1. ELISA - VERFAHREN

Das ELISA-Verfahren (enzyme - linked immunosorbent assay) ist ein hochempfindlicher, immunologischer Test, dessen Prinzip auf einer Antigen - Antikörper Wechselwirkung beruht. Dass heute ELISA beim Nachweis vieler Pathogene zur Standardmethode zählt, ist nicht nur der Entwicklung und Verbesserung der Methodik zu verdanken. Der Durchbruch zum Routinetest wurde erst durch die Automatisierung, den Einsatz von Computern und qualitativ hochstehenden Reagenzien möglich. Der Einstieg grosser Firmen, sowohl auf dem Gerätesektor wie auch bei der Herstellung von Reagenzien und Antiseren unterstützte die rasche Entwicklung bedeutend. Heute sind kommerzielle Seren und Enzymkonjugate in Form von Test-Kits von verschiedenen Herstellern erhältlich.

1.1. Materialien zur Durchführung von ELISA

Die praktische Durchführung des ELISA-Verfahrens besteht hauptsächlich aus mehrmaligem Auffüllen und Inkubieren der Mikrotitrationsplatten mit verschiedenen Lösungen, anschliessendem Waschen und photometrischer Messung der Farbreaktionen. Während des Tests wird jede Platte 4x mit Flüssigkeit beschichtet und 3x gründlich gewaschen. Einerseits ist die Zuverlässigkeit von ELISA nicht unwesentlich von der Genauigkeit des Pipetierens und des Waschens abhängig, anderseits müssen alle diese Arbeiten während der Serienuntersuchungen möglichst schnell erledigt

werden können. Im Verlauf der Testperiode werden an einem Arbeitstag ca. 15'000 Knollen im ELISA untersucht. Um dieses grosse Pensum sowohl rationell als auch qualitativ befriedigend bewältigen zu können, haben wir unser ELISA-Labor mit geeigneten technischen Hilfsmitteln ausgestattet.

1.1.1. Geräte

- Pipetiergeräte

Für das Einfüllen von Lösungen in die Mikrotitrationsplatten verwenden wir je nach der Anzahl der zu untersuchenden Testplatten verschiedene Pipetiervorrichtungen. Die Beschichtung von einzelnen Platten erfolgt entweder mit verstellbarem Mikrodispensor (50-200 μ l) der Firma Socorex (Abb. 1), oder mit Hilfe von Dilutor/Dispensor Microlab 1000 (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH), der mit einem "12-Kanal manifold" (Abb. 2) versehen ist.

Bei grösseren Serienuntersuchungen, wo ein sekundenschnelles Füllen der Platten erforderlich ist, kommt der pneumatische 96-Kanal Dispensor der Firma MEKU (E. Pollähne, Feinmechanik, Hannover, D) zum Einsatz (Abb. 3). Ein besonders wertvolles Hilfsmittel stellt der Sampler 505 (Tecan AG, Hombrechtikon, CH) dar (Abb. 4). Diese vollautomatisierte, computergesteuerte Pipetierstation löst alle Verdünnungs- und Verteilungsprobleme sowohl bei der Arbeit mit Röhrchen (Abb. 4A), als auch beim Abfüllen von Mikrotitrationsplatten (Abb. 4B).

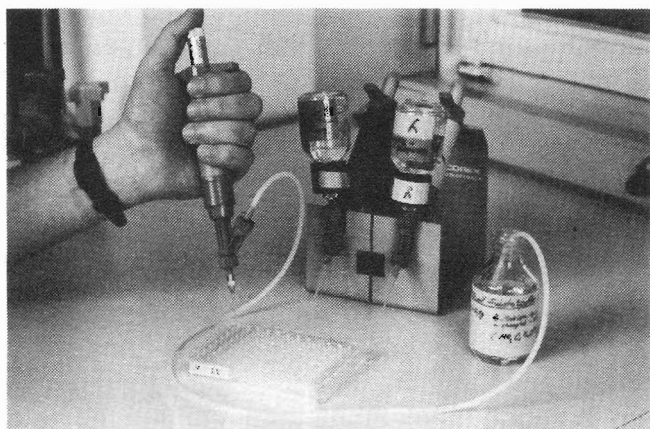


Abbildung 1: Beschichtung der Mikrotitrationsplatte mit verstellbarem Mikrodispensor

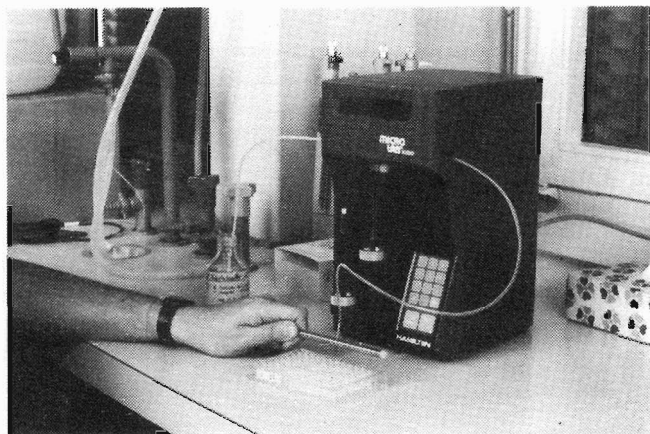


Abbildung 2: Beschichtung der Mikrotitrationsplatte mit Hilfe von "12-Kanal manifold"

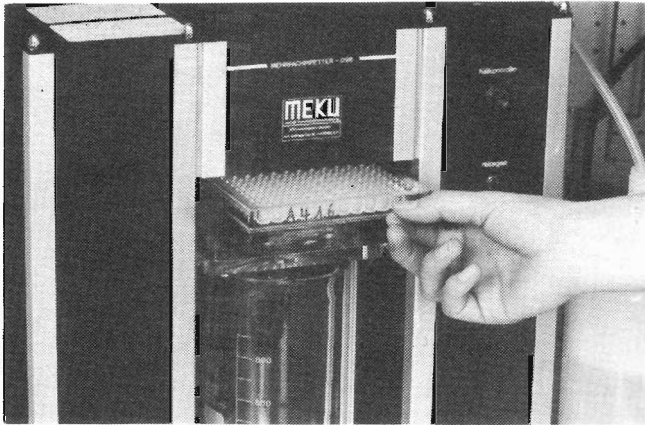


Abbildung 3: Pneumatischer 96-Kanal Dispensor (MEKU)

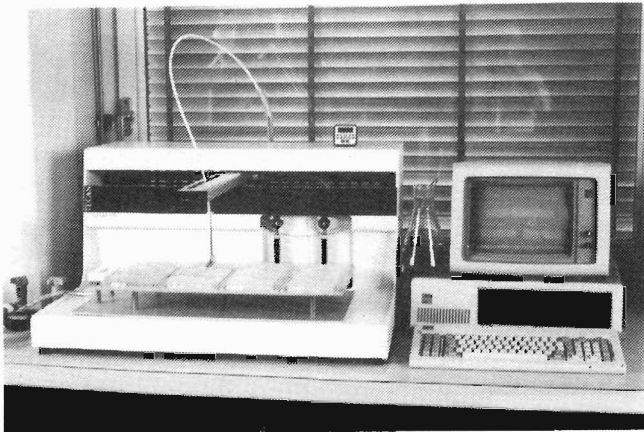


Abbildung 4: TECAN-Sampler 505 (Gesamtansicht)

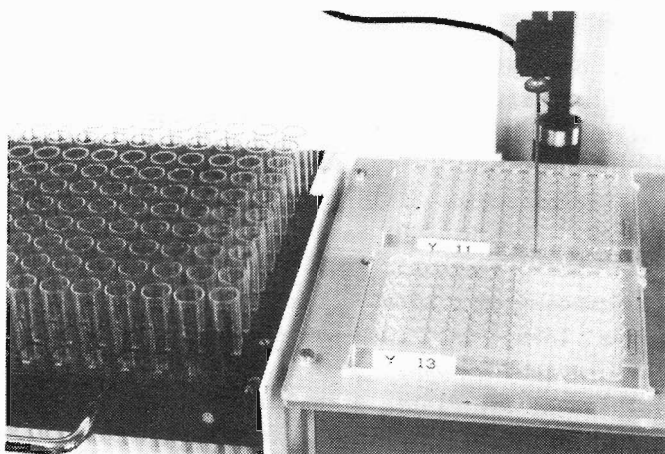


Abbildung 4A: TECAN-Sampler 505 (Probenverteilung aus Reagenzglaschen)

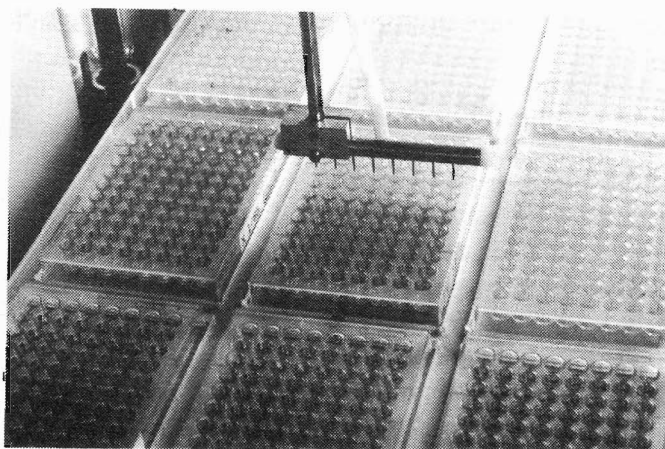


Abbildung 4B: TECAN-Sampler 505 (Abfüllen von Mikrotitrationsplatten)

- Waschmaschine

Zwischen den einzelnen Testschritten des ELISA-Verfahrens ist ein gründliches Waschen der Plattenvertiefungen unerlässlich. Das manuelle Waschen der Platten ist zwar möglich, jedoch sehr zeitraubend und schwer reproduzierbar. Mit der Waschmaschine SLT 220 (Abb. 5) der Firma Kontron (Kontron AG, Zürich, CH) haben wir ein Gerät gefunden, das für ein hervorragendes, automatisches Auswaschen aller freien Komponenten sorgt. Das Gerät verfügt über ein Düsensystem (Abb. 5A), das jede einzelne Kavität für sich gründlich wäscht. Damit wird eine Cross-Kontamination ausgeschlossen, die Platte steht für weitere Arbeitsschritte wieder in trockenem Zustand zur Verfügung. Die gewünschten Waschbedingungen sind individuell programmierbar und garantieren bei Einhaltung gewisser Vorsichtsmassnahmen eine hohe Reproduzierbarkeit des Tests. Obwohl die Waschmaschine über eine integrierte Fehlererkennung verfügt, muss das Waschergebnis wegen der gelegentlich vorkommenden Verstopfungen des Düsensystems regelmässig kontrolliert werden.

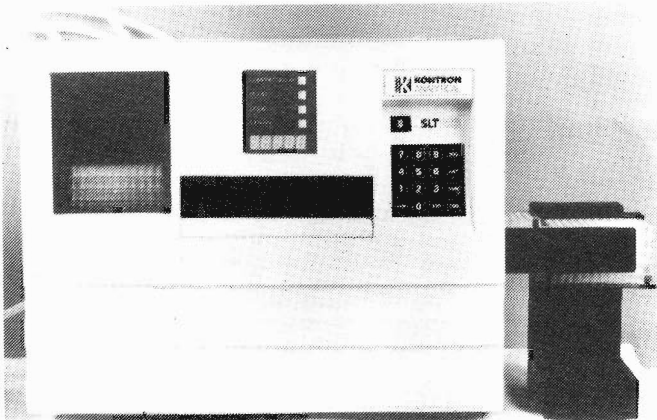


Abbildung 5: Waschmaschine SLT 220

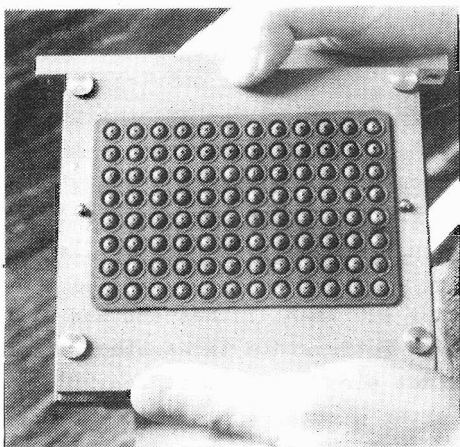
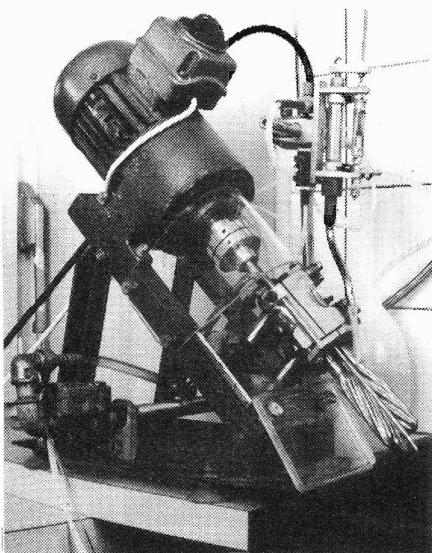


Abbildung 5A:
Düsensystem der Wasch-
maschine SLT 220

- Geräte zur Probensaftherstellung



Bei der Herstellung von Keim-, Stengel-, Wurzel-, Blatt- und Stolonensaft wird das entsprechende Pflanzenmaterial mit der Pollähne-Pressen (E. Pollähne, Feinmechanik, D-Hannover) zerkleinert und gleichzeitig mit Puffer versetzt. Die bei uns verwendete Pressen ist mit gezahnten Walzen und einer pneumatischen Dosier- vorrichtung für automatische Pufferzugabe versehen.

Abbildung 6: Pollähne-Pressen

Werden Kartoffelknollen im ELISA untersucht, wie das bei der Saatgutenerkennung geschieht, ist eine zweckmässige und rationelle Saftentnahme mit einem speziellen Knollensaft-Extractor nach Dr. Gugerli möglich. Die ursprüngliche Pollähne-Version des von Gugerli entwickelten Testbohrers (Gugerli, 1979b) wurde auf Grund der gesammelten Erfahrungen in Zusammenarbeit mit der Firma Tecan (Tecan AG, Hombrechtikon, CH) weiter verbessert und in Serie gebaut. Dieses Gerät erleichtert die Probeentnahme an der Knolle erheblich. Eine Arbeitskraft kann pro Stunde 300-350 Knollen verarbeiten.

Der Tecan Knollensaft-Extractor 400 (Abb. 7) besteht aus 3 Untereinheiten. Der Bohrkopf mit rotierendem Zahnarztbohrer verletzt die Knolle und es bildet sich ein Safttropfen. Die Aufnahme einer genau definierten Menge Knollensaft und dessen Verdünnung auf die gewünschte Endkonzentration besorgt die Dilutoreinheit. Zur Vermeidung einer möglichen Kontamination, wird die Bohreinheit nach jeder Probeentnahme in einer separat gesteuerten Waschstation gereinigt und getrocknet.

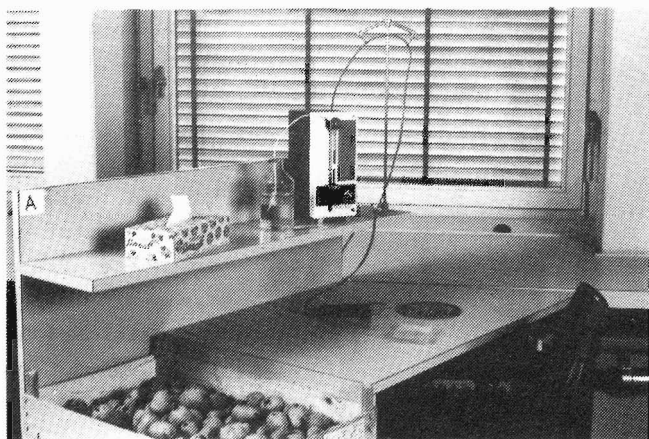


Abbildung 7: Knollensaft - Extractor 400

- Photometer

Die Photometer-Anlage ist für hochempfindliche Bestimmungen unerlässlich. Für unsere Tests verwenden wir die Anlage der Firma Dynatech (Dynatech Produkte AG, Kloten, CH), bestehend aus einem 2-Wellenlängen-Messsystem Photometer MR-600 und APPLE II Computer (Abb. 8). Diese Photometer-Computer Kombination erlaubt die vollautomatische Messung und Auswertung direkt in Mikrotitrationsplatten im Durchlichtverfahren. Die Messwerte werden in Form eines Auswertungsblattes dokumentiert.

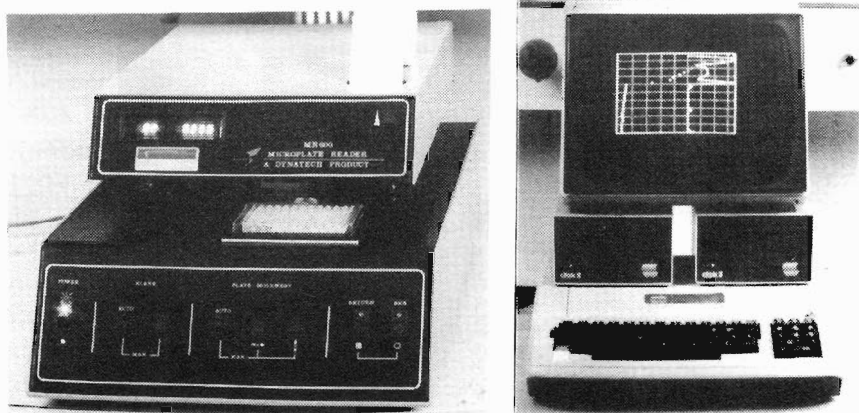


Abbildung 8: Photometer-Anlage mit Computer

1.1.2. Testplatten

Für die Durchführung des ELISA-Verfahrens sind spezielle Testplatten erforderlich. Diese Mikrotitrationsplatten sind (Abb. 9) aus Polystyrol, weisen 96 Kavitäten mit je 400 μ l Volumen auf und dienen als feste Phase für die Adsorption von Antikörpern. Während unserer Labor- und Routinetests verwendeten wir die ELISA-Platten der Firma Bioreba (Bioreba AG, Basel, CH), nachdem wir praktisch keine Qualitätsunterschiede bei den Vergleichsuntersuchungen der Fabrikate der Firmen Dynatech AG, Kontron AG und Bioreba AG festgestellt hatten.

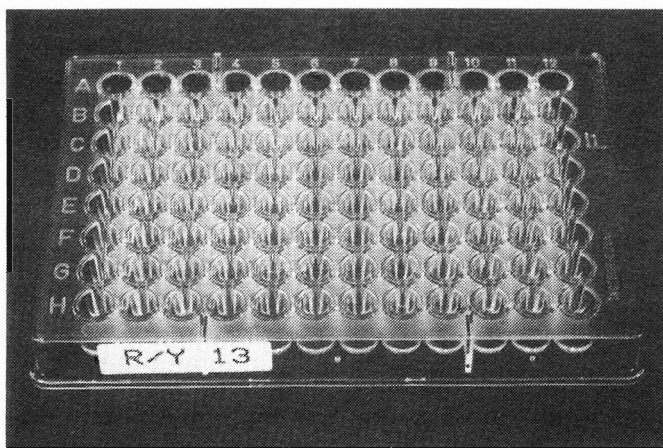


Abbildung 9: Mikrotitrationsplatte aus Polystyrol

1.1.3. Pufferlösungen

Alle in unserem ELISA-Labor benötigten Pufferlösungen wurden auf Vorrat für eine Woche ausreichend zubereitet und bis zum Gebrauch bei 40°C gelagert.

Um Verwechslungen zu vermeiden, wurden für die Zubereitung und Aufbewahrung der Lösungen stets die gleichen, mit verschiedenfarbigen Etiketten markierten Vorratsflaschen verwendet. Durch diese Massnahme konnte auch die Gefahr von Kontaminationen bei der Seren- bzw. Substratzubereitung auf ein Minimum reduziert werden.

Zusammensetzung der Pufferlösungen:

Sofern nicht anders erwähnt, handelt es sich bei den verwendeten Reagenzien um Chemikalien von reinster handelsüblicher Qualität.

Citronensäure	Bender + Hobein
DIECA (Natriumdiäthylthiocarbaminat)	Bender + Hobein
Diethanolamin	Bender + Hobein
Eialbumin	Difco
HCl	Bender + Hobein
H ₂ O	Ionentauscher
KCl	Bender + Hobein
KH ₂ PO ₄	Bender + Hobein
NaCl	Bender + Hobein
Na ₂ CO ₃	Bender + Hobein
NaHCO ₃	Bender + Hobein
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	Bender + Hobein
NaN ₃	Merck
p-Nitrophenylphosphat	Fluka (puriss.p.a)
PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Fluka
Tween 20	Bender + Hobein

Die gebrauchsfertig gelieferten Puffer und Seren stammen von der Firma Bioreba AG, vormals Inotech Diagnostik AG, Basel/Schweiz.

- Beschichtungspuffer

Na ₂ CO ₃	1.59 g	} Aufgelöst in 1000 ml H ₂ O, pH=9.6
NaHCO ₃	2.93 g	
NaN ₃	0.20 g	

- Probenpuffer

Für die Untersuchung von Blatt-, Stengel- und Keimproben wurde folgender Puffer verwendet:

PVP	20.00 g	} Aufgelöst in 1000 ml PBS, pH=7.4
Tween 20	0.50 ml	

Bei der Herstellung vom Probensaft aus Knollen, Wurzeln und Stolonen war die Zugabe von 1% Eialbumin unerlässlich (Gugerli, 1979a).

Nach der Anleitung von Bioreba wird dazu Eialbumin zuerst im Wasser aufgelöst und anschliessend dem Puffer zugegeben.

- Konjugatpuffer

Zur Steigerung der Testsicherheit wird dieser Puffer in speziell abgestimmter Zusammensetzung von der Firma Bioreba AG gebrauchsfertig geliefert.

- Substratpuffer

Diethanolamin	97.00 ml	} Aufgelöst bei 50°C
H ₂ O	800.00 ml	
NaN ₃	0.20 g	

Nach vollständiger Auflösung muss der pH-Wert mit HCl eingestellt und das Volumen mit H₂O auf 1000 ml ergänzt werden. Der pH-Wert des Substratpuffers beträgt 9.8.

Unmittelbar vor dem Gebrauch wird dieser Lösung p-Nitrophenylphosphat zugesetzt (0.1 g pro 100 ml).

- PBS = Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung

NaCl	8.0 g	} Aufgelöst in 1000 ml H ₂ O, pH=7.4
KH ₂ PO ₄	0.2 g	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2.9 g	
KCl	0.2 g	
NaN ₃	0.2 g	

Da diese Lösung in sehr grossen Mengen als Bestandteil des Probenpuffers und für die Plattenwaschung verwendet wird, kann sie auf Vorrat in 10-facher Konzentration angesetzt werden und ist in dieser Form monatelang stabil.

- Waschpuffer

Zur Plattenwaschung wird PBS mit 0.05% Tween 20 verwendet.

- Referenzpuffer. Puffer für die Aufbewahrung von virusinfiziertem Pflanzensaft

Citronensäure	1.05 g,	aufgelöst in 50 ml H ₂ O
Na ₂ HPO ₄	7.10 g,	aufgelöst in 250 ml H ₂ O

Diese zwei Lösungen werden zusammengemischt und auf pH=7.0 eingestellt. Erst jetzt setzt man der resultierenden Lösung 0.68g DIECA zu.

Die Zubereitung des Referenzpuffers erfolgt stets frisch und die entsprechenden Proben werden nach der Zugabe von Pflanzensaft sofort eingefroren (-22°C).

1.1.4. Antiseren

Die Produktion und der kommerzielle Vertrieb der verwendeten Testkits basieren auf einer engen Zusammenarbeit zwischen der Firma Bioreba AG und der Forschungsanstalt Changins. Die Seren werden gemeinsam im Rahmen vertraglich definierter Entwicklungs- und Forschungsprojekte laufend verbessert. Beim PVY handelt es sich immer um monoklonale Antikörper, bei allen übrigen Viren erfolgt der Nachweis mit polyklonalen Antikörpern.

Vor dem Testeinsatz wird jeder neue Serumbatch auf Qualität (Verdünnungsreihe und Spezifität) geprüft. Der Nachweis von PVY und PLRV im Rahmen der Saatkartoffelanerkennung geschieht mit Mischserum (PVY + PLRV).

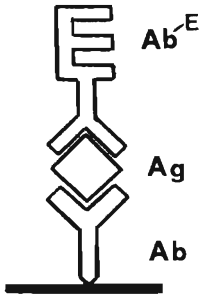
1.1.5. Positive Kontrollen

Als Indikator für die korrekte Testdurchführung werden in zwei Kavitäten jeder ELISA-Platte die entsprechenden positiven Referenzen aufgetragen. Damit diese während der ganzen Testsaison vergleichbare Standard-Extinktionswerte liefern, werden sie auf Vorrat, für die ganze Testperiode ausreichend, wie folgt zubereitet:

Das Blattmaterial von infizierten Pflanzen (keine Mischinfektionen!) wird mit Referenzpuffer im Verhältnis 1:1 homogenisiert, durch Gaze filtriert und in Portionen zu 2 ml eingefroren (-22°C). Die gefrorenen Proben bleiben während mindestens einem Jahr aktiv. Am Tag der Verwendung wird der gefrorene Referenzsaft frisch mit Extraktionspuffer 40-fach verdünnt und als Standardreferenz im ELISA verwendet.

1.2. Prinzip und Durchführung des ELISA-Verfahrens

Je nach Art der durchzuführenden Untersuchung gibt es verschiedene Varianten des ELISA-Verfahrens. Bei dem für den Nachweis von Karoffelviren verwendeten Verfahren handelt es sich um den "Doppelantikörper-Sandwich-Typ". Diese Variante besteht aus den an die feste Phase adsorbierten Antikörpern, dem Antigen und dem Konjugat (Abb. 10).



Ab = Antikörper
 Ag = Antigen
 Ab^E = Konjugat

Abbildung 10:
 ELISA (Doppelantikörper-Sandwich)

Als Reaktionsgefäß (feste Phase) werden Mikrotitrationsplatten verwendet. Die für die Identifikation von Viren spezifischen Antikörper werden in geeigneten Tieren durch deren Immunsystem gebildet, im Blut angereichert und von hier aus isoliert und gereinigt. Neue Techniken der Zellfusion erlauben die Produktion der monoklonalen Antikörper in vitro (Gugerli et al., 1983). Beim Konjugat handelt es sich um Antikörper, die mit einem Enzym, in unserem Fall alkalischer Phosphatase, gekoppelt sind. Dieses Enzym spaltet das Substrat und ist so schliesslich für den visuellen bzw. photometrischen Virusnachweis verantwortlich.

1.2.1. Die Beschichtung der Platten mit Antikörpern

Im ersten Schritt des ELISA-Verfahrens (Abb. 11A) wird die aus Polystyrol hergestellte Mikrotitrationsplatte für den Nachweis bestimmter Viren aktiviert. Dies geschieht durch

die Adsorption von im Beschichtungspuffer gelösten Antikörpern an die Innenwände der Plattenvertiefungen. Die bei uns verwendete Serumverdünnung beträgt für Einzelvirusuntersuchungen 1:2'000. Die Plattenkavitäten werden mit je 220 μ l Antikörperlösung gefüllt und anschliessend dicht verschlossen während der Nacht bei 6°C inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit werden alle überschüssigen, nicht an die Plattenwand gebundenen Antikörper in der Waschmaschine durch Spülungen mit Waschpuffer entfernt. Die so beschichteten Platten können jetzt in trockenem Zustand bis zur Weiterverwendung bei -22°C aufbewahrt werden. Die Lagerung ist mindestens 6 Monate ohne Qualitätseinbusse möglich.

1.2.2. Die Probenzugabe

Im zweiten Schritt des ELISA (Abb. 11B) wird das zerkleinerte, mit Probenpuffer versetzte Pflanzenmaterial in die Plattenkavitäten gefüllt. Enthält die zu untersuchende Probe Viruspartikel, so werden diese von den Antikörpern gebunden. Es entsteht also ein fester Komplex zwischen den an die Plattenwand angelagerten Antikörpern und den dazu komplementären Antigenen (Viruspartikeln).

Die in unseren Tests verwendete Standardverdünnung des Pflanzensafts mit Probenpuffer beträgt 1:10, das untersuchte Probenvolumen 180 μ l. Die Empfindlichkeit des Tests steigt mit zunehmender Reaktionszeit zwischen Antigen und Antikörper. Damit auch geringste Viruskonzentrationen erfasst werden, erfolgt die Inkubation der dicht verschlossenen, mit Probensaft gefüllten Platten während 14 bis 24 Stunden über Nacht bei 6°C. Bedingt durch arbeitsfreie Tage muss diese Zeitspanne gelegentlich bis 72 Stunden verlängert werden. Dies ist auf Grund unserer Untersuchungen ohne Qualitätseinbusse möglich.

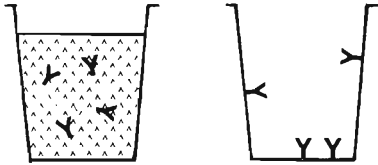
Nach abgeschlossener Inkubation werden alle nicht gebundenen Inhaltsstoffe des Pflanzensaftes während des folgenden Waschvorganges aus der Platte entfernt.

1.2.3. Die Konjugatzugabe

Die erste Antigen - Antikörper Reaktion hat bei der Probenzugabe stattgefunden. An den dort gebildeten Antigen - Antikörper Komplex werden jetzt in einer zweiten Antigen - Antikörper Reaktion enzymmarkierte Antikörper (=Konjugat) angelagert (Abb. 11C). Bei diesem Reaktionsschritt werden die Plattenkavitäten mit je 190 μ l Konjugatlösung beschichtet, die Konjugatverdünnung beträgt 1:1'500. Da die Knollenuntersuchungen am frühest möglichen Termin erfolgen, haben wir bewusst auf höhere Verdünnungsraten verzichtet. Um auch bei geringen Viruskonzentrationen sichere Testresultate zu erhalten, darf die Inkubation der dicht verschlossenen Platten bei 30°C nicht unter 4 Stunden verkürzt werden. Der nachfolgende Waschvorgang muss besonders sorgfältig durchgeführt werden, da bereits die geringsten Rückstände ungebundenen Konjugats zu unspezifischen Reaktionen führen.

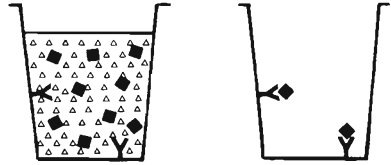
1.2.4. Die Substratzugabe

Der letzte Schritt des ELISA-Verfahrens (Abb. 11D) dient der Sichtbarmachung der Viruskonzentration. Wenn in der Probe Viren vorhanden, so spaltet das Enzym (alkalische Phosphatase) des in der Platte festgebundenen Konjugats die zugesetzte Substratlösung (p-Nitrophenylphosphat). Die Farbe des zersetzten Substrats (Nitrophenol) wechselt von farblos zu gelb. Die Inkubation der mit je 160 μ l Substratlösung beschichteten Plattenvertiefungen dauert bei Zimmertemperatur 1 Stunde. Eine Verlängerung der Inkubation ist nicht empfehlenswert, da die nichtenzymatische Zersetzung des Substrates und die mit der Zeit auftretenden unspezifischen Reaktionen auch zur Gelbfärbung der Platte führen können.

A) BESCHICHTUNG

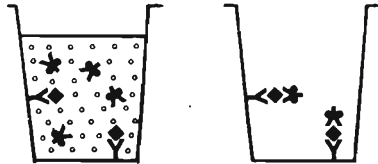
Antikörper (Y) werden an die Innenwand der Plattenvertiefung (feste Phase) angelagert.

Inkubation bei 6°C, 18 Stunden

B) PROBENZUGABE

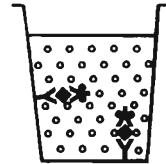
Viruspartikel der Probe (◆) verbinden sich mit den Antikörpern (Y) zu einem Komplex.

Inkubation bei 6°C, 18 Stunden

C) KONJUGATZUGABE

Enzymkonjugierte Antikörper (✱) verbinden sich mit den Viruspartikeln (◆).

Inkubation bei 30°C, 4 Stunden

D) SUBSTRATZUGABE

Das Enzym des Konjugates (✱) spaltet das Substrat. Intensität der Gelbfärbung ist der Viruskonzentration in der Probe direkt proportional.

Inkubation bei 22°C, 1 Stunde

Abbildung 11: Das ELISA-Verfahren (Doppel-Antikörper Sandwich-Typ).

1.2.5. Die Auswertung der Farbreaktion

Die Intensität der Farbentwicklung ist von der Menge des umgesetzten Substrates abhängig. Die Zersetzungsrate ist um so höher, je mehr Enzymmoleküle in der Plattenkavität gebunden sind. Da das Enzym-Konjugat vom Antikörper - Antigen Komplex gebunden wird, können Enzymmoleküle in der Platte nur dann vorkommen, wenn in der untersuchten Probe Virus vorhanden war. Somit ist die Farbentwicklung der Viruskonzentration direkt proportional.

Grundsätzlich wäre eine visuelle Auswertung der Farbentwicklung möglich, wesentlich genauer und zuverlässiger ist jedoch die Messung der Extinktion bei 405 nm mit Hilfe eines Photometers. Die photometrische Messung ermöglicht eine zuverlässige Differenzierung der Farbintensität auch bei Proben, bei denen die Unterschiede visuell nicht bemerkt werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der direkten Erfassung der Messdaten und deren Auswertung in einem Computer.

Bei der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse wurde der Grenzwert für die Unterscheidung zwischen virusinfizierten und virusfreien Proben rechnerisch aus den gemessenen Extinktionswerten, für jede Mikrotitrationsplatte individuell, bestimmt (pers. Mitteilung Gugerli). Die individuelle Auswertung hat sich bewährt, da die Extinktionswerte durch die verschiedenen Viren, die Qualität der verwendeten Seren, sowie durch arbeitsablaufbedingte Unterschiede bei der Testdurchführung und probenbedingte Unterschiede, wie z.B. verwendeter Pflanzenteil, Kartoffelsorte, physiologischer Zustand der Pflanze, beeinflusst werden.

Bedingt durch diese Faktoren wurde auf die Angabe eines absoluten, allgemein gültigen Grenzwerts verzichtet. Für die Auswertung haben wir folgende, vom Computer automatisch durchgeführte Methode entwickelt (Abb. 12A, 12B):

- Die 96 Extinktionswerte einer Platte werden der Grösse nach aufsteigend sortiert.
- Vom tiefsten Wert aufwärts werden je 3 Werte zu einer Gruppe gefasst, deren Mittelwert und die Streuung bestimmt wird. Man erhält so 32 Mittelwerte und die zugehörigen Streuungen.
- Die Kurven der Mittelwerte und der Streuungen werden in einem Koordinatensystem OD vs. Gruppennummer dargestellt.

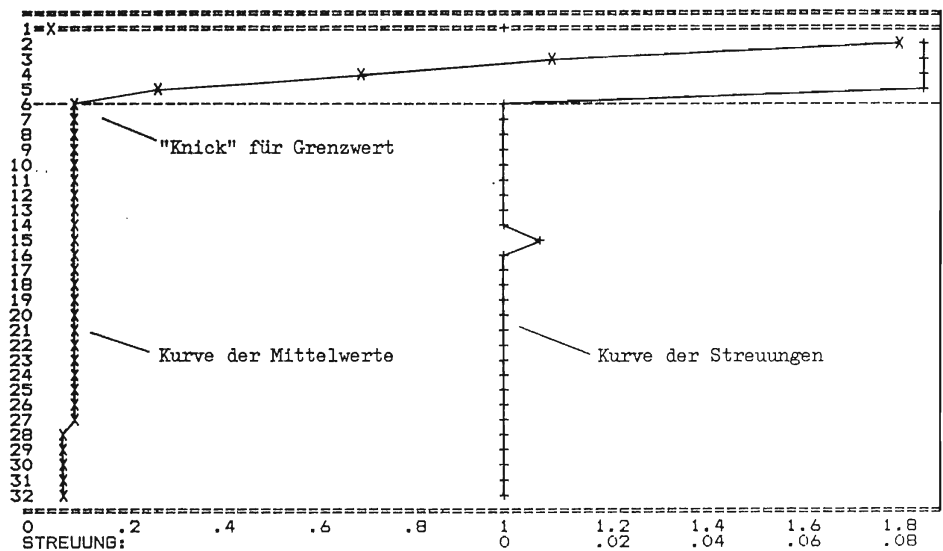
Der Knick in einer oder beiden dieser Kurven wird vom Computer errechnet (ELISA-READER-PROGRAMM, Reckenholz) und ist für die Grenzwertbestimmung aus folgenden Ueberlegungen wichtig:

- Die Extinktionswerte der virusfreien Proben sind untereinander gleich, d.h. so lange die gebildeten Dreiergruppen nur aus virusfreien Werten bestehen, ist der Verlauf der Mittelwerte und Streuungen geradlinig.
- Besteht eine Gruppe aus virusfreien und virusinfizierten Extinktionswerten, so steigt der Mittelwert und die Streuung dieser Gruppe beachtlich, da die Messwerte innerhalb der Gruppe unterschiedlich sind. Dieser Durchschnittswertanstieg macht sich in der graphischen Darstellung als Knick in der Kurve bemerkbar.
- Sollten zufällig nach drei virusfreien Werten drei virusinfizierte folgen (Streuung innerhalb solcher Gruppen bleibt unverändert), so entsteht mindestens in der Kurve der Mittelwerte ein Knick.

Auf diese Art kann der Computer durch eine einfache Kurvenanalyse den Grenzwert für die tiefste virusinfizierte Probe ermitteln und den effektiven Virusbefall in der Platte angeben. Zusätzlich können die Kurvenprofile verschiedener Mikrotitrationsplatten als Qualitätskontrolle untereinander verglichen werden. Eine Platte mit abweichendem Kurvenprofil ist leicht erkennbar. Dies ermöglicht die Entdeckung von fehlerhaft entwickelten Platten und hilft mit, falsche Testresultate zu vermeiden (Abb. 12B).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.06	0.07	0.07	0.07	*0.89	0.07	0.07	0.07	*1.72	0.07	0.07	0.08
B	0.06	*1.13	0.07	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.05	0.06	0.06	0.06
C	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07
D	0.06	0.06	0.06	*2.00	0.06	0.06	0.05	0.07	*0.60	0.07	0.07	0.07
E	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	*0.33	0.07	0.06	0.06	0.07	0.07
F	*0.34	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.07	0.07	*1.35	0.06
G	0.05	0.06	0.05	0.06	*0.60	0.06	0.05	*0.89	0.07	0.07	0.07	0.06
H	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	*1.93	0.07	0.06	0.07	*1.93

/ Puffer
 / Referenz PLRV
 / Referenz PVY

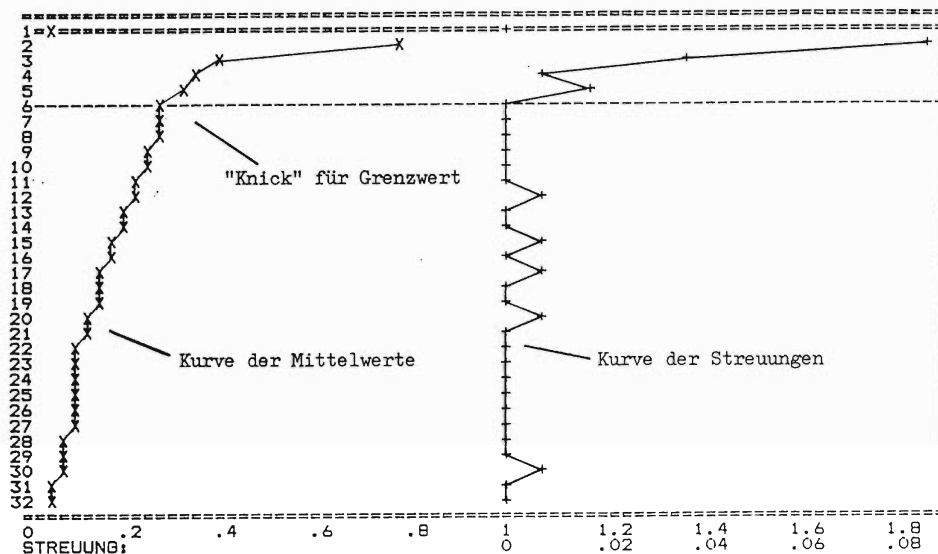


GRENZWERT*1.4=	0.09	KRANK %	= 11.82
PUFFER	= 0.06	ANZAHL KRANK	= 11
REFERENZ-1	= 0.06	GROSST.BES.	= 0.08
REFERENZ-2	= 1.93	KLEINST.KRANK	= 0.33
BOHRPLATZ	= C	VIRUSART	= Y

Abbildung 12A: Auswertung der Farbreaktion (optimale Reaktionen)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.21	0.17	0.15	0.21	0.27	0.09	0.03	*0.43	0.07	0.32	0.32	0.21
B	0.26	0.07	0.23	0.07	0.05	0.18	0.02	0.12	0.05	0.07	0.03	0.25
C	0.08	0.17	0.18	0.24	0.05	0.15	0.14	0.05	0.06	0.06	0.02	0.07
D	0.06	0.12	0.14	0.27	0.15	0.05	0.33	0.07	0.22	0.17	0.02	0.12
E	0.22	0.06	0.11	0.07	0.07	0.05	0.33	0.18	0.26	0.23	0.02	*0.47
F	0.12	0.25	0.05	0.24	0.13	0.07	0.23	0.23	0.12	0.25	0.02	0.05
G	0.11	0.09	0.14	0.08	0.06	0.07	0.06	0.20	0.10	0.19	*1.00	0.05
H	0.11	0.07	0.25	0.17	0.08	0.03	0.34	0.20	0.28	0.37	*0.87	0.30

Puffer
 Referenz PLRV
 Referenz PVY



GRENZWERT*1.4=	0.39	KRANK %	= 4.3
PUFFER	= 0.05	ANZAHL KRANK	= 4
REFERENZ-1	= 0.05	GRESST.GES.	= 0.37
REFERENZ-2	= 0.30	KLEINST.KRANK	= 0.43
BOHRPLATZ	= B	VIRUSART	= Y

Abbildung 12B: Auswertung der Farbreaktion (schlechte Reaktionen, Test wird wiederholt)

1.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung wurde auf forschungsanstalt-eigenem Computer (Data General MV 10'000) durchgeführt.

Die Interpretation der Ergebnisse einzelner Verfahren erfolgte durch die Anwendung verschiedener Statistikmodule (WIDAS-Paket der MSI Dr. Wälti AG, Buchs/SG, CH), die auf der Basis folgender Test's aufgebaut sind:

- Wilcoxon
- Mann-Withney
- z-Test

2. GEWINNUNG DES PROBENSAFTES

Der zuverlässige Nachweis von Viren mit ELISA hängt stark vom verwendeten Pflanzenteil und der Art der Probensaftherstellung ab. Man kann zwar jedes beliebige Pflanzenorgan für die Untersuchung verwenden, bei der Schlussfolgerung bezüglich Virusbefall der ganzen Pflanze muss man jedoch vorsichtig sein.

Wie unsere Experimente zeigen, ist die Virusverteilung in der Pflanze stark vom Alter (=physiologischer Zustand) der Pflanze und dem jeweiligen Virus abhängig (vgl. auch Gugerli, 1978). Der Virusbefall variiert nicht nur unter den verschiedenen Organen der gleichen Pflanze, auch innerhalb des gleichen Organs können sowohl virusfreie, wie auch virusinfizierte Zonen vorkommen (Weidemann, 1981; Weidemann et al., 1982). Eine wichtige Rolle spielt auch die Zeitspanne zwischen dem Infektions- und Untersuchungszeitpunkt, da die Viruswanderung innerhalb der Pflanze zeitabhängig ist (Vulic et al., 1963). Nicht unbedeutend ist die Art der Saftgewinnung. Bei einigen Viren genügt das einfache Pressen des Saftes, oft ist jedoch die mechanische Zerstörung von Gewebe für den Austritt von Viren notwendig.

Je nach Zielsetzung der Untersuchungen wurden zwei

verschiedene Methoden der Probensaftgewinnung angewandt. Die dazu verwendeten Einrichtungen sind bereits in Abschnitt 1.1.1. vorgestellt.

2.1. Herstellung von Blatt-, Stengel-, Wurzel-, Keim- und Stolonsaft

Ungefähr 0.3 g des entsprechenden Pflanzenmaterials werden in der Walzenpresse zermahlen und mit 3 ml Probenpuffer versetzt. Die so verdünnte Probensaftsuspension wird am Walzenende im Reagenzglas aufgefangen. Ein entsprechendes Teilvolumen wird nach der Sedimentation der ungelösten Gewebepartikel in die Mikrotitrationsplatte transferiert.

2.2. Gewinnung des Knollensaftes

Die Knollensaftgewinnung bildet den zeitraubendsten und aufwendigsten Teil des Testes ab Knolle. Die Verwendung des Knollenbohrers nach Gugerli (Gugerli, 1978) wird jedoch auch den Anforderungen der Seriearbeit gerecht, sofern nicht mit einer grossen Zahl der zu untersuchenden Viren gearbeitet wird.

Der optimale Ort für die Probeentnahme ist die Basis keimender Augen (Gugerli, 1980a; Gugerli et al., 1980; Weidemann, 1982). An dieser Stelle verletzt der rotierende Zahnarztbohrer sowohl die Rinden- und Markschiicht, als auch die Leitbündel (Phloem und Xylem) der Kartoffelknolle. Deshalb können hier alle Viren, unabhängig von ihrem bevorzugten Aufenthaltsort, nachgewiesen werden.

Bei der Knollensaftgewinnung wird der Bohrer an der Basis des apikalen Auges angesetzt. Vom austretenden Saft werden 20 μ l entnommen (Abb. 13A). Diese werden in einem anschliessenden Arbeitsschritt unter gleichzeitiger Verdünnung mit 170 μ l Probenpuffer in die ELISA-Platte abgegeben (Abb. 13B). Während des nachfolgenden

Waschvorganges wird die Dilutorkanüle mit 200 μ l Probenpuffer gespült und der ganze Bohrkopf unter hohem Druck mit Wasser gewaschen und mit Pressluft getrocknet (Abb. 13C).

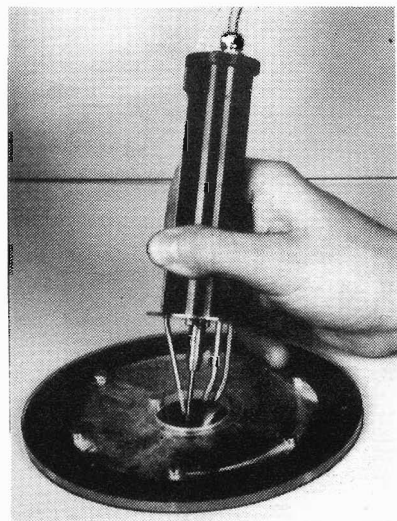
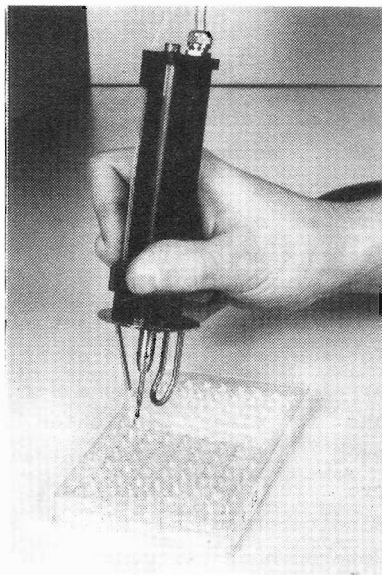
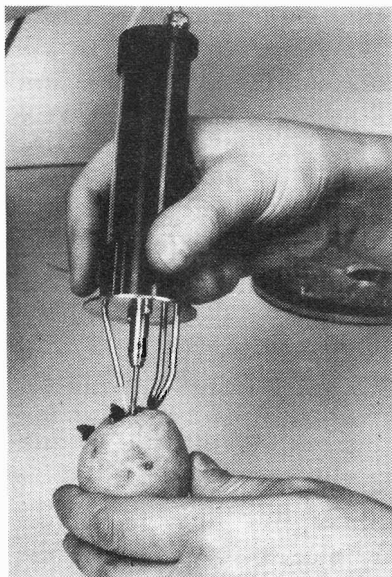


Abbildung 13:
Gewinnung des Knollensaftes

- A: Knolle anbohren
- B: Saftabgabe in die Platte
- C: Reinigung des Bohrkopfes

2.3. Vorbehandlung der Knollen für die Testierung

Der zuverlässige Virusnachweis ab Knolle ist nicht jederzeit durchführbar. Wie im experimentellen Teil ausführlich behandelt, ist die Viruskonzentration in der Knolle vom Zeitpunkt der erfolgten Infektion und dem physiologischen Zustand der Knolle abhängig (Gugerli et al., 1980; Weidemann, 1982; Vetten et al., 1983). Da die Vermehrung der Viren in stoffwechselaktiven, wachsenden Geweben stattfindet, ist für die sichere Durchführung des Testes eine künstliche Brechung der Keimruhe unerlässlich.

Die Brechung der Keimruhe wird durch die Behandlung der Knollen mit Rindite (Aethylenchlorhydrin, Aethylendichlorid, Tetrachlorkohlenwasserstoff im Volumenverhältnis 7:3:1) erreicht. Die Begasung der schalenfesten Knollen erfolgt bei uns in einer gasdichten Kabine während 48 Stunden bei 24°C. Die Rinditekonzentration beträgt dabei 3'000 ml pro 20 m³ Rauminhalt. Anschliessend an die Rinditebehandlung werden die Knollen bis zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt in einer belichteten Kabine bei 22°C gelagert.

3. VERGLEICHSMETHODEN

Die Nachweisgenauigkeit des ELISA-Verfahrens wurde mit den konventionellen Tests (ILT und A6-Test) verglichen. Die endgültige Virusdiagnose erfolgte durch die Ueberprüfung im Augenstecklingstest. Um allen Unsicherheiten bei der Bonitierung von Augenstecklingen aus dem Weg zu gehen, wurden die Blätter der Stecklingspflanzen zusätzlich im ELISA ab Blatt untersucht.

3.1. Igel-Lange Test

Der Igel-Lange Test ermöglicht den Nachweis von PLRV kurz nach der Ernte direkt an den Knollen (Berces und Keller, 1966). Für den Test werden unbehandelte, während 14 Tagen bei 17°C vorgelagerte Knollen verwendet. Bei Knollen, die anschliessend aus technischen Gründen mit Rindite behandelt wurden, muss der Igel-Lange Test unmittelbar nach der Vergasung erfolgen, da sonst störende Reaktionen die virusbedingte Kallosebildung beeinträchtigen.

Die Methodik des Tests beruht auf der Erkenntnis, dass die Blattrollinfektionen im Phloem die Bildung von Kalloseanhäufungen auslösen, die sich mit Resorcin blau anfärben lassen. Im ersten Testschritt werden Knollenscheiben hergestellt. Zu diesem Zweck wird der Schnitt mit einem Doppelmesser vom Nabel ausgehend tangential geführt; man erfasst damit einen grossen Bereich der Gefässbündelzone. Die ca. 2.5 mm dicken Scheiben werden anschliessend während 8 Minuten mit Resorcin gefärbt und mit Leitungswasser gespült. Die Beurteilung der angefärbten Knollenschnitte mit Kalloseanhäufungen (Abb. 14) erfolgt unter einem Binokularmikroskop mit 20-facher Vergrösserung.



Abbildung 14: Igel-Lange Test

3.2. A6 - Test

Beim A6-Test gelingt es, die Virusinfektionen PVY und PVA mit Hilfe der Testpflanze A6 (*Solanum demissum* x *Aquila*) zuverlässig nachzuweisen (Keller et al., 1962).

Werden die Blätter der Testpflanze mit Saft einer mosaikkranken Pflanze eingerieben, so bilden sich deutliche Nekrosen (Abb. 15). Zum Nachweis der Mosaikviren in der Knolle wird zuerst die Keimruhe mit Rindite gebrochen und die Knollen werden 3-4 Wochen bei diffusem Licht und einer Temperatur von 24°C vorgekeimt. Haben die Keime eine Länge von mindestens 10 mm erreicht, so werden sie gequetscht und auf gepflückte, mit Karborundpulver bestäubte A6-Blätter abgerieben. Die eingeriebenen Blätter werden mit Leitungswasser gründlich gespült und auf feuchtem Filterpapier in dicht geschlossenen Plastikschaalen bei 24°C und 1000 Lux während 7 Tagen inkubiert. Nach dieser Frist können die Symptome auf den Testblättern beurteilt werden.

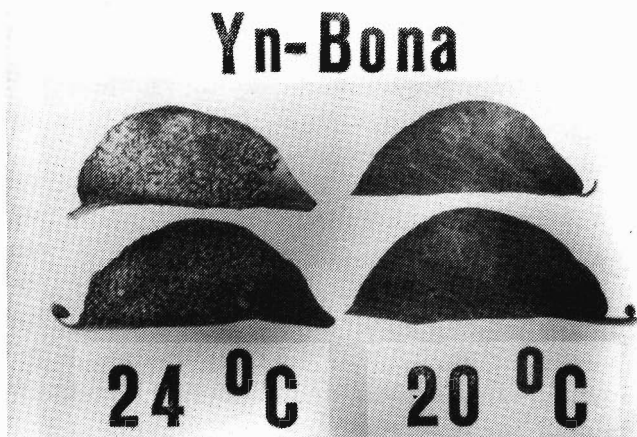


Abbildung 15: A6 - Test

3.3. Augenstecklingstest

Im Augenstecklingstest werden aus den zu untersuchenden Knollen im Gewächshaus junge Pflanzen gezogen und auf Virussymptome kontrolliert. Dazu wird den gut angetriebenen Knollen ein Auge samt Keim mit Rundmesser ausgestochen und in ein Sand-Erde Gemisch (1:1) eingetopft. Nach 6 bis 8 wöchiger Wachstumszeit unter Gewächshausbedingungen werden die Pflanzen visuell (Münster et al., 1954) resp. im ELISA ab Blatt beurteilt.

III. UNTERSUCHUNGEN UND DISKUSSION

A) DIE BEDEUTUNG DES PHYSIOLOGISCHEN ZUSTANDES DER KARTOFFELKNOLLE ZUM ZEITPUNKT DES VIRUSNACHWEISES MIT ELISA

1. EINLEITUNG

Das Kartoffelpflanzgut muss auf Grund der Vorschriften für die Zertifizierung auf Virusbefall getestet werden. Für die endgültige Anerkennung ist das Ergebnis von ELISA direkt an der Knolle massgebend. Virusverteilung und Konzentration in der Knolle und damit auch die Testsicherheit werden jedoch durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die Vermehrung der Viren ist eng mit dem normalen Stoffwechsel der Wirtszellen verbunden. Metabolische Prozesse in der Pflanze werden durch das Alter des Organismus kontrolliert.

Während des Jahreszyklus durchläuft die Kartoffel verschiedene Vegetationsabschnitte. Die metabolische Aktivität in der Knolle wechselt rhythmisch mit der Knollenausbildung, der Keimruhe und der neuen Auskeimung. Alle Veränderungen im Stoffwechsel werden durch wechselnde Enzymaktivitäten und -mengen ausgelöst; die Bildung der Enzyme selber ist wiederum von vorangehender Transkription und Translation der Nukleinsäuren abhängig. Die Ursache für den wechselnden Metabolismus ist also auf die Wechsel in der Transkription zurückzuführen.

Auch während der Keimruhe ist die genetische Information vollständig vorhanden, aber repressiert, d.h. es findet keine Expression der Gene in Form von m-RNA, die für die Enzymsynthese notwendig ist, statt. Bei den Viren handelt es sich um Nucleoproteide. Sie tragen lediglich die Information für ihre Spezifität. Für die Biosynthese ihrer Substanz sind die Viren ganz auf den Stoffwechselmechanismus der

Wirtszellen angewiesen. Im stoffwechselaktiven Gewebe wird nicht nur die Virusvermehrung aktiviert. Nachdem die Viruskonzentration die Initialkonzentration um ein Vielfaches übertroffen hat, erfolgt mit dem Assimilationsstrom ein Transport der zuerst lokal begrenzten Viren in Richtung physiologisch aktive Zellbereiche. Ist die Wirtszelle genetisch inaktiv, so findet auch keine Virusvermehrung statt. Für einen zuverlässigen Virusnachweis ist daher der physiologische Zustand der Knolle zu berücksichtigen. Umweltfaktoren, die den Metabolismus beeinflussen, können auch die Zuverlässigkeit des Tests verändern.

In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden die Auswirkungen verschiedener, die Knollenphysiologie beeinflussender Faktoren auf die Virusnachweisbarkeit geprüft. Einen wichtigen Bestandteil der Experimente bildete die Suche nach optimalen Vorbehandlungsmethoden der Knollen, die eine frühe und zuverlässige ELISA-Durchführung ermöglichen.

2. VERSUCHSANORDNUNG

Das für die mehrjährigen Versuche benötigte Knollenmaterial wurde in den Jahren 1981 bis 1985 unter ortsüblichen Bedingungen auf dem Betrieb der Eidgenössischen Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau Zürich-Reckenholz produziert. Da es bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten um die Nachweisbarkeit von Kartoffelviren in Knollen primärinfizierter Feldpflanzen geht, wurde als Ausgangsmaterial stets gesundes, zertifiziertes Saatgut der Sorten Bintje, Colmo, Desiree, Sirtema und Palma verwendet. Die Feldversuche wurden in vierreihigen Parzellen (100 Knollen = 25 m²) angelegt.

Ein Teil des Ausgangsmaterials wurde zu Vergleichszwecken an einer möglichst isolierten, geschützten Lage für die Weitervermehrung gesunder Knollen ausgepflanzt. Die

Produktion von primärinfizierten Pflanzen erfolgte unter natürlichen Bedingungen, d.h. mit den jährlich auftretenden Blattlauspopulationen im Feld mit Hilfe von Infektionsreihen. Zu diesem Zweck wurde jeweils zwischen 2 gesunde Reihen eine Reihe mit sekundär infizierten Mutterknollen (Virusträger für PVY=Bona, PLRV=Maritta) gepflanzt. Das Staudenziehen und die Ernte erfolgten praxisgerecht, d.h. nach den Vorschriften für die Saatgutproduktion der Klasse A.

Die geernteten Knollen der primärinfizierten Pflanzen wurden nummeriert und mit gesundem Knollenmaterial so gemischt, dass die in weiteren Experimenten verwendeten 100-Knollen-Muster einen Virusbefall von ca. 30% aufwiesen. Die je pro Zeitpunkt und Variable im ELISA untersuchten 100 Knollen wurden nach der Ernte, der Zielsetzung der Untersuchung entsprechend, wie in den Abbildungen 16 A bis C dargestellt, behandelt. Der Nachweiserfolg wurde auf Grund der Knollenüberprüfung mit ELISA ab Augenstecklingsblatt berechnet.

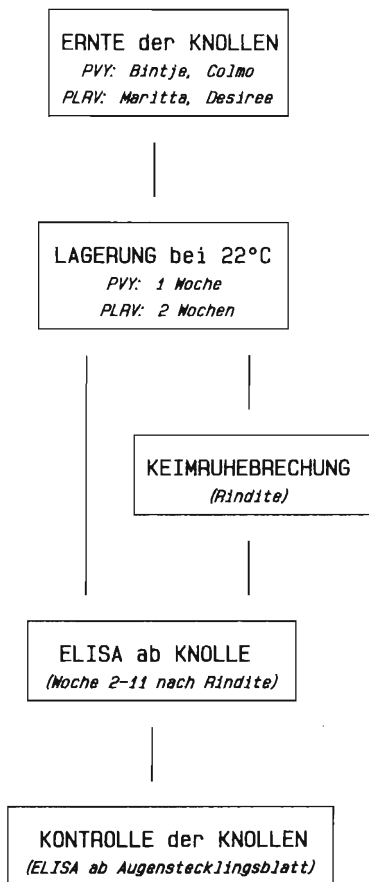


Abbildung 16/A:

Einfluss der Keimruhebrechung auf die Erfassung von PVY und PLRV

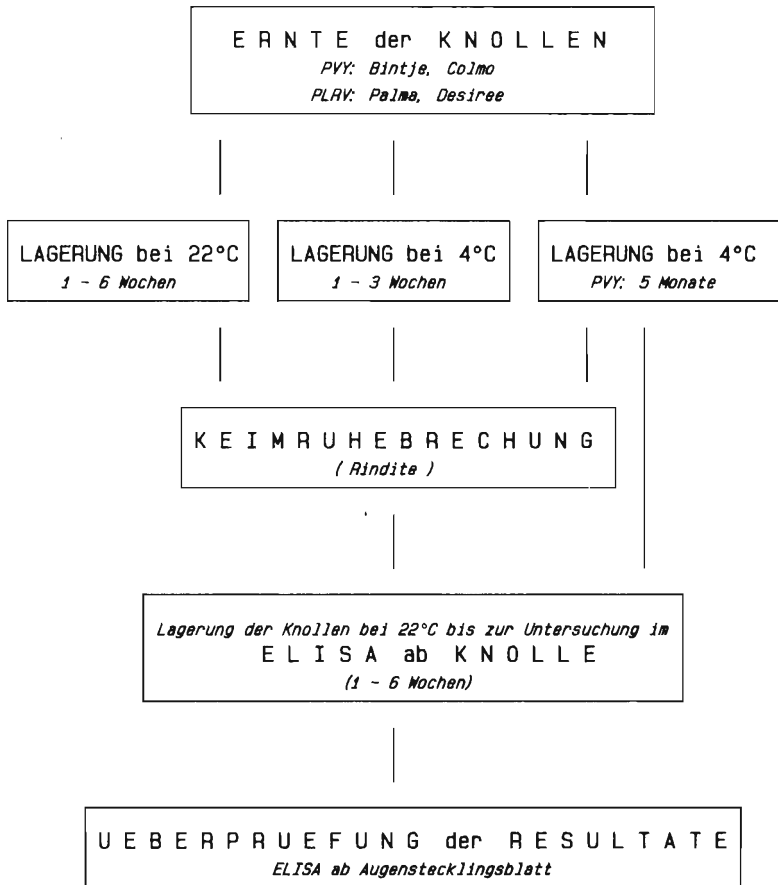


Abbildung 16/B:
Einfluss der Vorlagerungstemperatur und -dauer auf die Erfassung
von PVY und PLRV

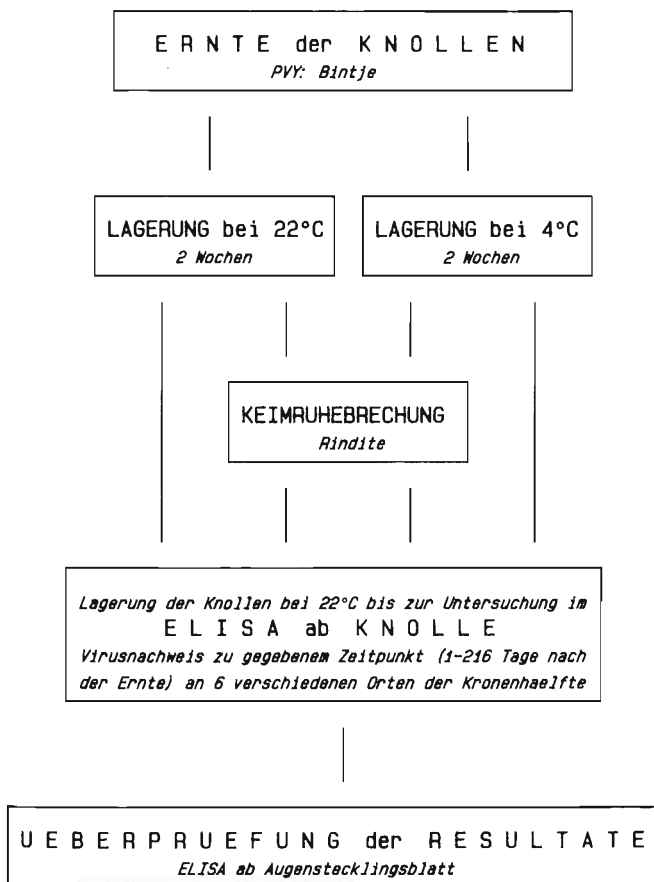


Abbildung 16/C:
Verteilung von PVY ueber die Kronenhälfte unterschiedlich
vorbehandelter Knollen

3. EINFLUSS DER KUNSTLICHEN KEIMRUHEBRECHUNG AUF DIE ERFASSUNG VON PVY UND PLRV

Dieser experimentelle Block diente einer ersten Standortbestimmung bei der Testierung von Knollenmaterial mittels ELISA. Die Abbildungen 17 bis 19 geben einen Ueberblick über die Nachweisbarkeit von PVY und PLRV in Knollen primär infizierter Pflanzen an unterschiedlichen Untersuchungsterminen kurz nach der Ernte.

3.1. Nachweis von PVY in primär infizierten Knollen

Für die Zertifizierung von Saatkartoffeln ist es wichtig, die Knollen im Herbst so schnell wie möglich auf ihren Gesundheitszustand untersuchen zu können, damit der Handel über die Partien verfügen kann. Eine zuverlässige und schnelle Erfassung von PVY ist nur in mit Rindite behandelten Knollen möglich. In der Abbildung 17 erkennt man deutlich den positiven Effekt der Keimruhebrechung. Beide untersuchten Sorten (Bintje und Colmo) zeigen bereits 2 Wochen nach der Keimruhebrechung eine starke Zunahme der Testsicherheit gegenüber unbehandelten Knollen. Vier bis fünf Wochen nach der Behandlung mit Rindite ist eine hundertprozentige Viruserfassung gewährleistet, wobei die Sorte Colmo die optimale Testbereitschaft etwas später erreicht.

Die sortenspezifischen Unterschiede werden bei der Betrachtung der unbehandelten Knollen noch deutlicher. Der Virusnachweis bleibt bis 10 Wochen nach der Ernte unter 40% und ist bei Colmo gegenüber Bintje noch unzuverlässiger. Diese Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen von de Bokx et al. (1979), und Gugerli et al. (1980), die über schlechte Nachweissicherheit in Knollen während der Keimruhe berichten.

3.2. Nachweis von PLRV in primär infizierten Knollen

In Bezug auf die Nachweissicherheit von PLRV zeigen die beiden geprüften Sorten Desiree und Maritta grundsätzlich das gleiche Verhalten. Wie bereits durch Gugerli (1981, 1982), Gugerli et al. (1980), und Ehlers et al. (1983) beobachtet wurde, liefert der Nachweis von PLRV an unbehandelten, bei 22°C gelagerten Knollen von Anfang an bedeutend bessere Resultate, als dies beim PVY der Fall war. Die Rate der erfassten, unbehandelten virusinfizierten Knollen steigt bei Maritta mit zunehmender Inkubationsdauer innerhalb 10 Wochen nach der Ernte von 65% bis auf 100% (Abb. 19). Im Vergleich dazu gestaltet sich der Virusnachweis an unbehandelten Knollen der Sorte Desiree etwas ungünstiger, die Nachweissicherheit schwankt während der Untersuchungsperiode zwischen 50% und 90% (Abb. 18).

Der positive Effekt der Keimruhebrechung auf die Erfassung des Virusbefalls ist auch bei PLRV unverkennbar. Unmittelbar nach der Rinditebehandlung beträgt die Testsicherheit bei beiden Sorten 90%, bereits 2 bis 3 Wochen später können alle virusinfizierten Knollen erfasst werden (Abb. 18 und 19).

Für die Probenentnahme erweist sich, vor allem bei unbehandelten Knollen der Sorte Desiree, das Nabelende gegenüber der Krone als günstiger. Dies ist keineswegs überraschend, da bereits Gugerli (1980) und Weidemann et al. (1982) mit Hilfe von serologischen Untersuchungen zeigen konnten, dass PLRV vor allem am Nabelende, unabhängig vom Keimstadium der Knolle, vorhanden ist. In einer ruhenden Knolle befindet sich nach diesen Befunden mehr PLRV im Nabel-, als im Kronenbereich.

Nach der Rinditebehandlung zeigen unsere Untersuchungen am Nabel- resp. Kronenende keinen signifikanten Unterschied mehr in der Nachweissicherheit. Eine ähnliche Abnahme der Differenzen zwischen Nabel- und Kronenende nach Brechung der Keimruhe konnte bereits Gugerli (1980) feststellen. Diese Tatsache hat für die praktische Durchführung von ELISA zum

gleichzeitigen Nachweis von mehreren Viren grosse Bedeutung, da die meisten Kartoffelviren (PVY, PVA, PVX, PVS, PVM) am Kronenende in höheren Konzentrationen vorkommen (Gugerli, 1981; Weidemann, 1981). Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der Viruserfassung sortenspezifisch, so fallen die schlechtere Erfassung von PLRV und die deutlicheren Unterschiede zwischen Nabel und Krone in unbehandelten Knollen der Sorte Desiree auf.

4. EINFLUSS DER VORLAGERUNGSDAUER UND -TEMPERATUR DER KNOLLE AUF DIE NACHWEISSICHERHEIT UND KONZENTRATION VON VIREN

Die im Abschnitt 3.1. vorgestellten Resultate haben deutlich gezeigt, dass für den erfolgreichen Virusnachweis direkt an der Knolle eine künstliche Keimruhebrechung mit Rindite unumgänglich ist. Der physiologische Zustand der Knolle und damit auch die Viruskonzentration, bzw. die Nachweissicherheit, werden jedoch durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die folgenden Resultate zeigen die Bedeutung der Lagertemperatur und -dauer nach der Ernte auf die Viruskonzentration und die Nachweissicherheit von PVY resp. PLRV.

4.1. Nachweis von PVY in primär infizierten Knollen

- Einfluss der Dauer der Vorlagerung

Werden infizierte Knollen nach der Ernte unterschiedlich lang vorgelagert, so ist ihre Reaktion auf eine künstliche Keimruhebrechung nicht identisch. Die Abbildung 20 zeigt den zeitlichen Verlauf der Nachweissicherheit bei Knollen, die bis zur Rinditebehandlung während 1 bis 6 Wochen bei 22°C gelagert wurden. Alle sechs Verfahren zeigen zwar eine unmittelbare, auf die Keimruhebrechung folgende

Verbesserung der Virusnachweisbarkeit, sie unterscheiden sich jedoch in den Zunahmeraten. Während eine 1 bis 2 Wochen lange Vorlagerung den gleichen, parallelen Kurvenverlauf zeigt, bewirkt eine längere Vorlagerung eine zusätzliche Aktivierung des Metabolismus und damit eine Verbesserung der Nachweissicherheit. Für die Erfassung von 90% der infizierten Knollen muss bei 1 bis 2 Wochen vorgelagerten Knollen eine Wartezeit von 4 bis 5 Wochen eingehalten werden. Die gleiche Testsicherheit erreicht man bei 6 Wochen vorgelagerten Knollen bereits 2 Wochen nach der Keimruhebrechung (Abb. 20). Diese zusätzliche Aktivierung reicht jedoch nicht aus, die durch die Vorlagerung verlorene Zeit wieder aufzuholen. Betrachtet man den insgesamt benötigten Zeitraum für das Erreichen der Testbereitschaft, so bewirkt eine möglichst früh nach der Ernte durchgeführte Keimruhebrechung die gesamthaft kürzeste Wartezeit für den zuverlässigen Nachweis von PVY.

- Einfluss tiefer Temperaturen während der
Vorlagerungsperiode

Eine weitere Verbesserung des PVY-Nachweises kann durch die Lagerung der Knollen bei tieferen Temperaturen erreicht werden. Die Rate der erfassten virusinfizierten Knollen ist durch die Vorlagerung bei 4°C stark erhöht, die maximale Testsicherheit wird 1 bis 2 Wochen früher erreicht (Abb. 21). Die Erfassung von PVY kann also sowohl durch längere Vorlagerung der Knollen, wie auch durch tiefere Lagertemperatur gesteigert werden. Dabei ist zu beachten, dass der Temperatureffekt bei kürzerer Vorlagerungszeit ausgeprägter ist. Sind die Knollen bereits durch eine verlängerte Lagerung teilweise aktiviert worden, so ist die Wirkung der tiefen Temperatur geringer. Es scheint, dass die Knollen eine bestimmte Keimruhe erreichen müssen, damit sie auf die Keimruhebrechung mit Rindite optimal ansprechen.

- Einfluss der künstlichen Keimruhebrechung bei bereits keimenden Knollen

Die künstliche Keimruhebrechung ist auch dann angebracht, wenn nach langer Lagerung bereits die natürliche Keimung eingesetzt hat. Unsere Ergebnisse und auch die Untersuchungen von de Bokx et al. (1979), und Vetten et al. (1983) beweisen, dass die natürliche Keimruhebrechung zu keinen zuverlässigen Resultaten führt. Die Abbildung 22 zeigt den Virusnachweis in keimenden Knollen, bei denen der Metabolismus nach fünfmonatiger Lagerung bei 40°C entweder künstlich durch Rinditebehandlung, oder auf natürliche Art durch anschließende Inkubation bei 22°C zusätzlich aktiviert wurde. Der positive Effekt der Rinditebehandlung ist unverkennbar. Obwohl der erfasste Virusbefall auch bei natürlich keimenden Knollen eine zunehmende Tendenz zeigt, erreichen die mit Rindite behandelten Vergleichsknollen eine hundertprozentige Testsicherheit viel früher. Während der Beobachtungsdauer von 5 Wochen nach der Vergasung, bleibt in natürlich keimenden Knollen die Nachweissicherheit unter 75%. Diese Beobachtung entspricht nicht den Vorstellungen von Vetten et al. (1983), die berichten, dass die Behandlung von keimenden Knollen mit Rindite, keine Auswirkungen auf ELISA-Resultate zeigt.

Wie bereits im Abschnitt 3.1. erwähnt, sind auch in diesem Experiment sortenspezifische Unterschiede feststellbar. Der zuverlässige Virusnachweis an Knollen der Sorte Bintje ist 3 Wochen nach der Rinditebehandlung, bei Colmo aber erst eine Woche später (Abb. 22) möglich. Auch ohne künstliche Keimruhebrechung ist der Virusnachweis an Knollen der Sorte Bintje besser möglich, als dies bei Colmo der Fall ist.

- Veränderungen in der Viruskonzentration

Die Viruskonzentration in infizierten (=Reaktion im ELISA positiv) Kartoffelknollen wurde an Hand der Extinktionswerte

beurteilt. Die Ergebnisse der verschiedenen Verfahren sind in den Abbildungen 23 und 24 zusammengefasst. Der Effekt der Keimruhebrechung ist unmittelbar nach der Behandlung zu beobachten. Bei allen Verfahren beginnt die Viruskonzentration zu steigen und erreicht ihren Maximalwert in 2 bis 4 Wochen nach der Keimruhebrechung (Abb. 23), dabei werden bei länger vorgelagerten Knollen weniger hohe Viruskonzentrationen erreicht. Nachdem die Viruskonzentration in den Knollen ihren Maximalwert erreicht hat, nimmt mit zunehmender Inkubation der Virusgehalt in den Kartoffelknollen ab. Die tiefsten Extinktionswerte bleiben jedoch durchwegs so hoch ($\Rightarrow 0.50$), dass eine Differenzierung zwischen "Gesund" und "Virusinfiziert" problemlos möglich ist.

Eine erhöhte Rate der Virusvermehrung kann ebenfalls durch tiefere Vorlagerungstemperatur (4°C) erreicht werden. Dies ist aus der Abbildung 24 ersichtlich, ebenso kann man hier auch die typische Konzentrationsabnahme nach dem Erreichen des Maximalwertes beobachten. Die Extinktionswerte gesunder Knollen bleiben während der ganzen Testperiode tief ($= < 0.10$), sie werden durch die Rinditebehandlung nicht beeinflusst.

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der Virusnachweissicherheit mit jenem der Viruskonzentration (Abb. 20 und 23, resp. 21 und 24), so korrelieren die entsprechenden Kurven nicht während der ganzen Testperiode. In der ersten Phase nach der Keimruhebrechung werden sowohl zunehmend mehr virusinfizierte Knollen erfasst, als auch steigende Viruskonzentrationen gemessen. Die maximale Virusnachweisbarkeit wird aber durchwegs zu einem Zeitpunkt erreicht, in welchem der Virusgehalt der Knollen bereits einen tieferen, teilweise minimalen Wert aufweist. Durch diese Tatsache ist es gefährlich, aufgrund der Viruskonzentration alleine Schlussfolgerungen auf die Virusnachweissicherheit zu ziehen.

Abbildung 17

Erfassung von PVY bei Bintje und Colmo, Versuchsjahr 1981

Knollen nach der Ernte 1 Woche bei 22°C vorgelagert, anschließend vergast und am Kronenende untersucht

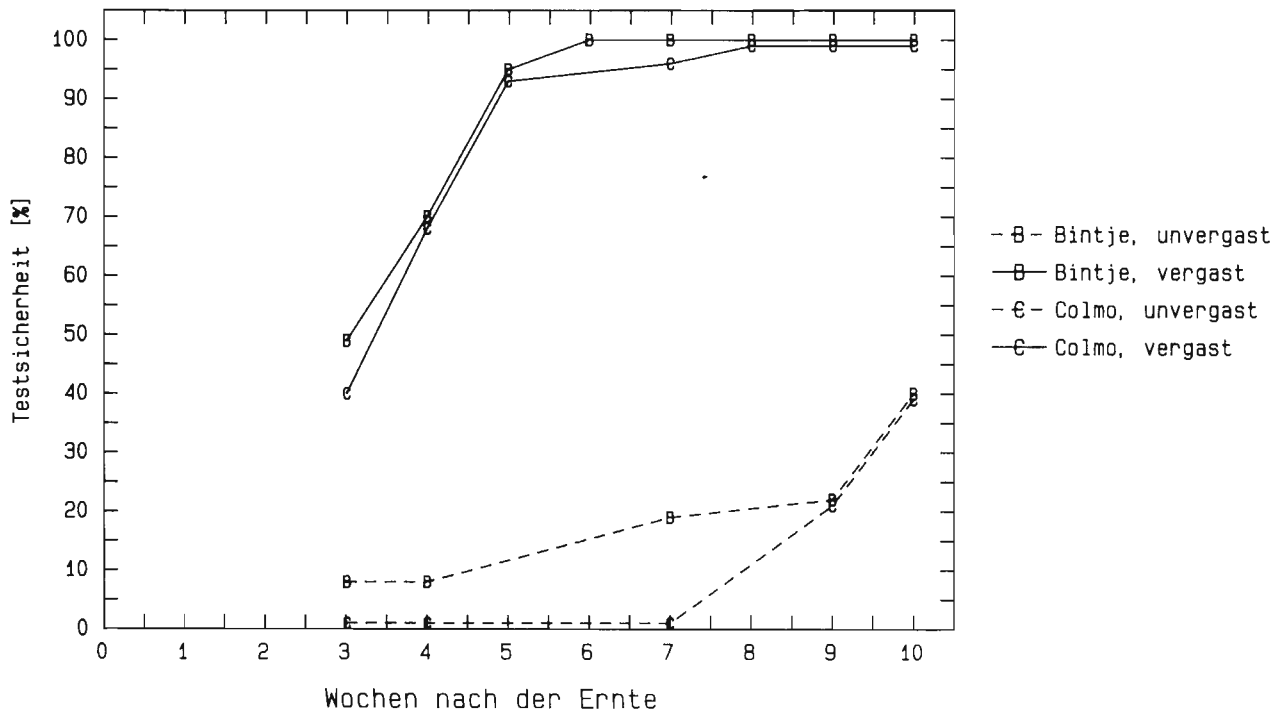


Abbildung 18

Erfassung von PLRV bei Desiree, Versuchsjahr 1981

Knollen nach der Ernte 2 Wochen bei 22°C vorgelagert, anschliessend vergast und am Nabel- resp. Kronenende untersucht

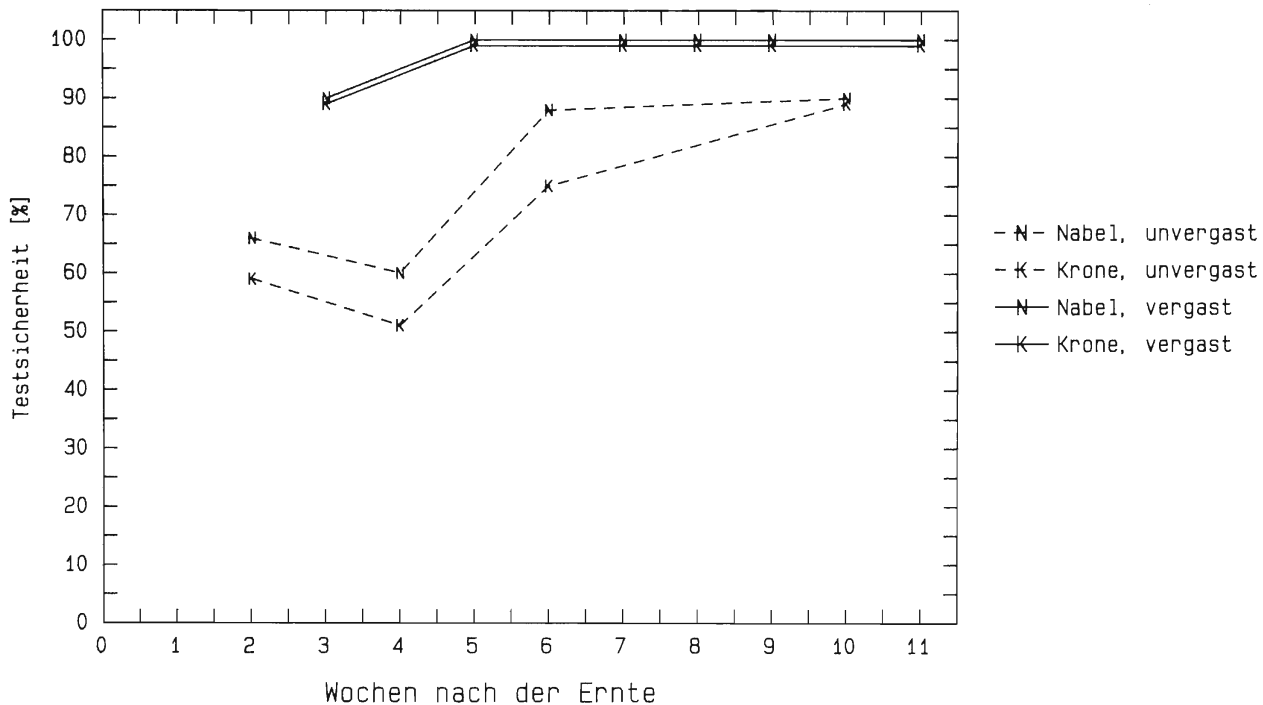


Abbildung 19

Erfassung von PLRV bei Maritta, Versuchsjahr 1981

Knollen nach der Ernte 2 Wochen bei 22°C vorgelagert, anschließend vergast und am Nabel- resp. Kronenende untersucht

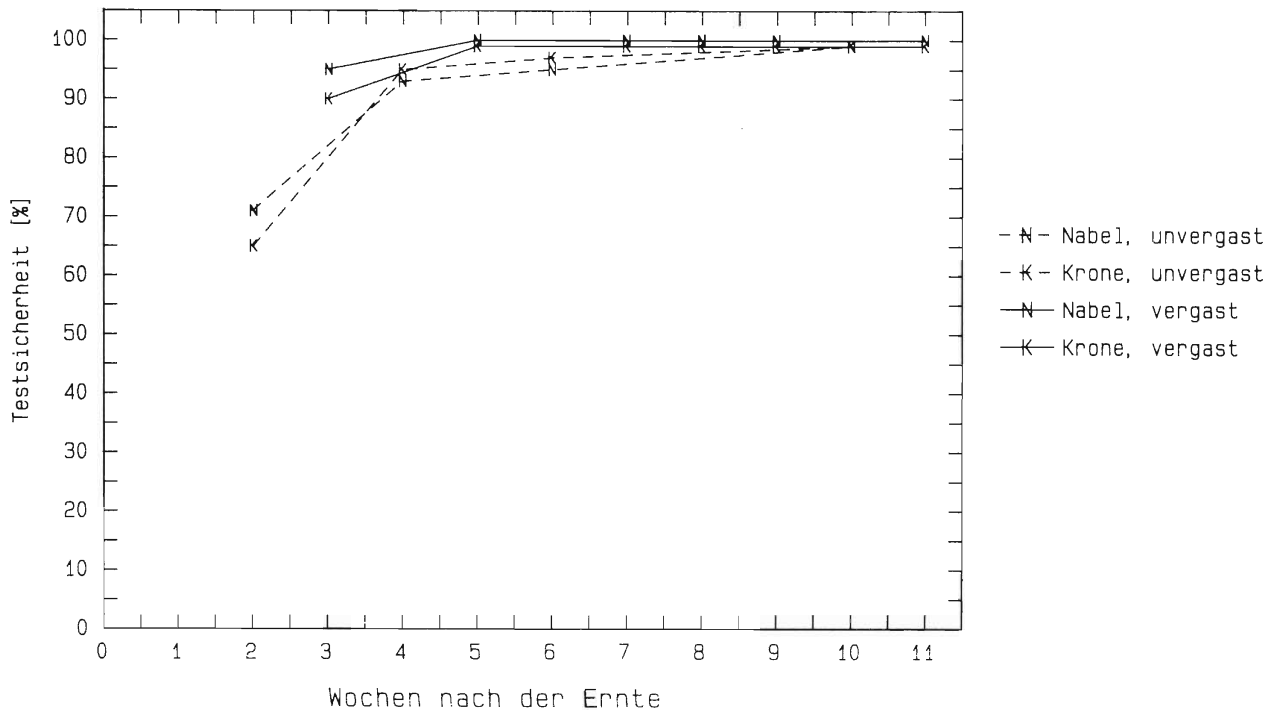


Abbildung 20

Einfluss der Vorlagerungsdauer auf die Erfassung von PVY, Versuchsjahr 1982
Knollen der Sorte Bintje nach der Ernte bei 22°C unterschiedlich lang vor-
gelagert, anschliessend vergast und am Kronenende untersucht

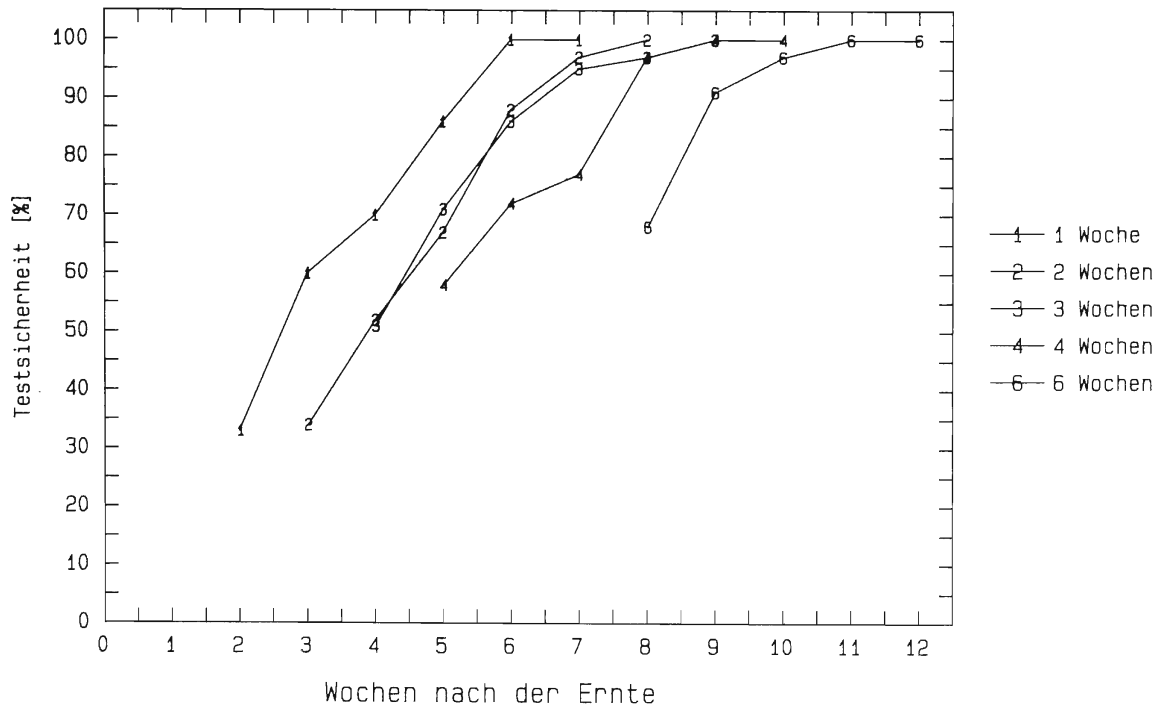


Abbildung 21

Einfluss der Temperatur auf die Erfassung von PVY, Versuchsjahr 1982
Knollen der Sorte Bintje nach der Ernte bei 4°C resp. 22°C vorgelagert, anschliessend vergast und am Kronenende untersucht

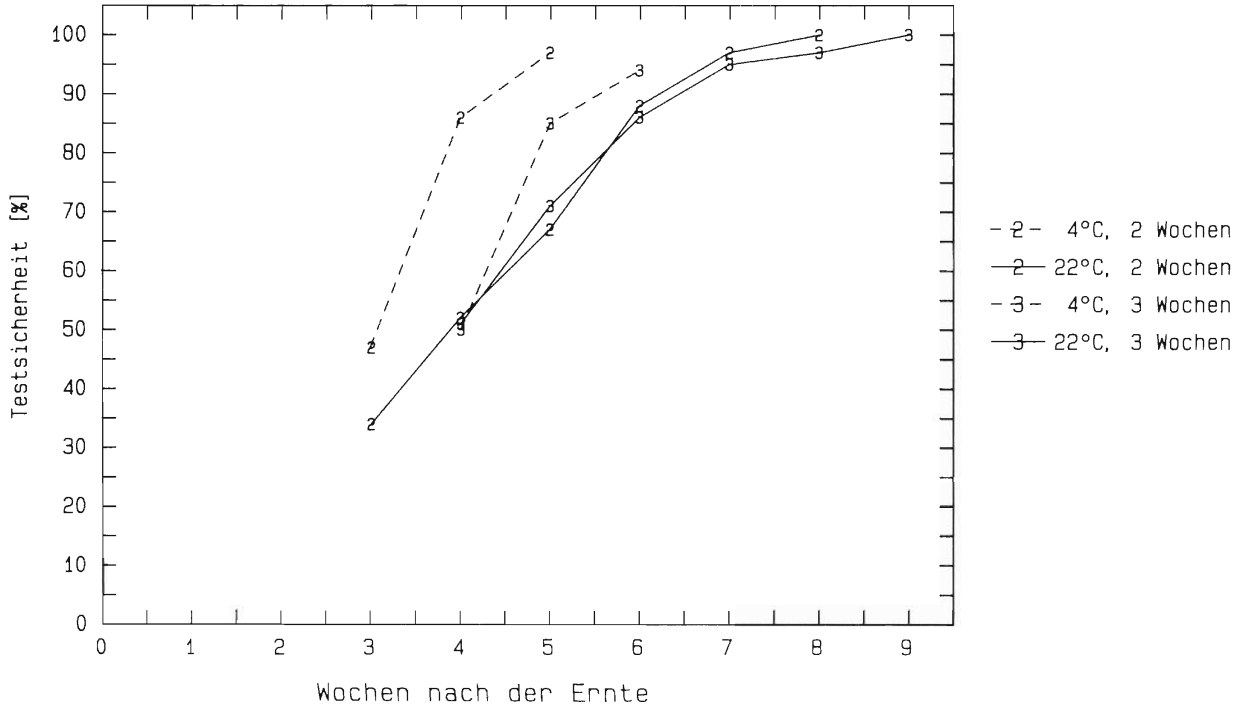


Abbildung 22

Erfassung von PVY nach langer Lagerung, Versuchsjahr 1983

Knollen der Sorte Bintje resp. Colmo nach der Ernte 5 Monate bei 4°C in Dunkelheit gelagert, anschliessend vergast und an der Krone untersucht

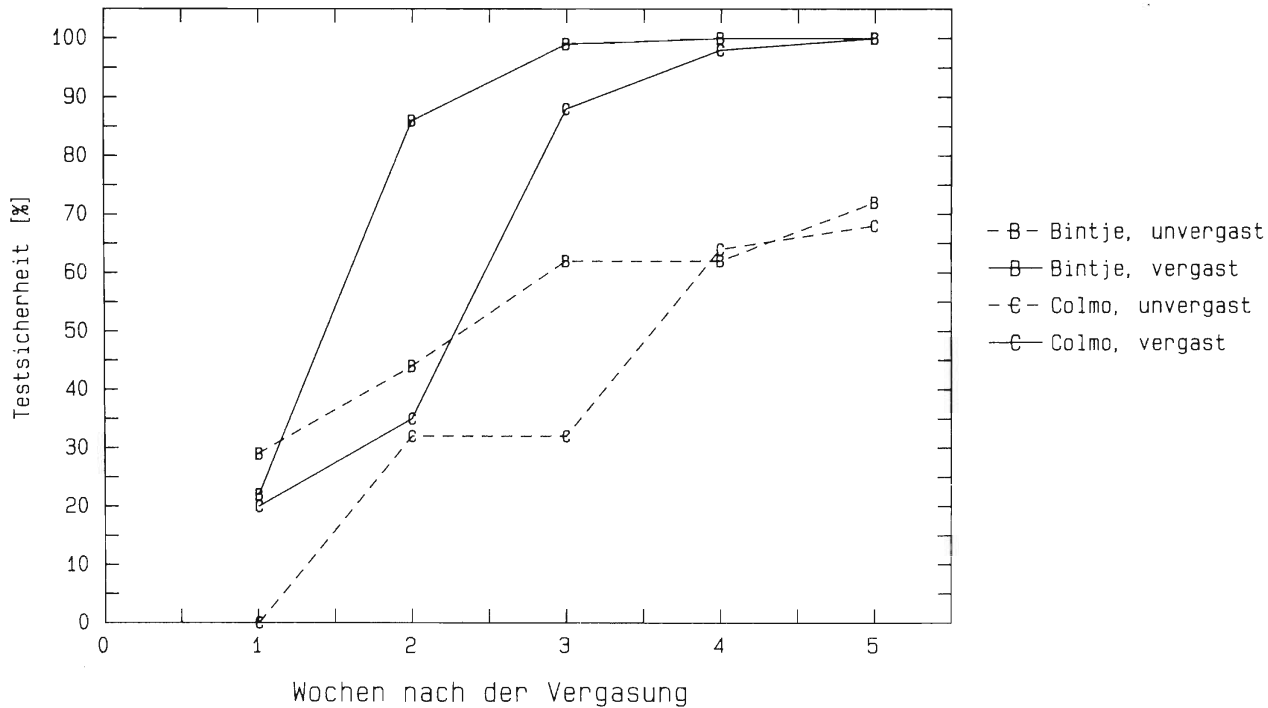


Abbildung 23

Einfluss der Vorlagerungsdauer auf die PVY-Konzentration, Versuchsjahr 1982
Knollen der Sorte Bintje nach der Ernte bei 22°C unterschiedlich lang vor-
gelagert, anschliessend vergast und am Kronenende untersucht

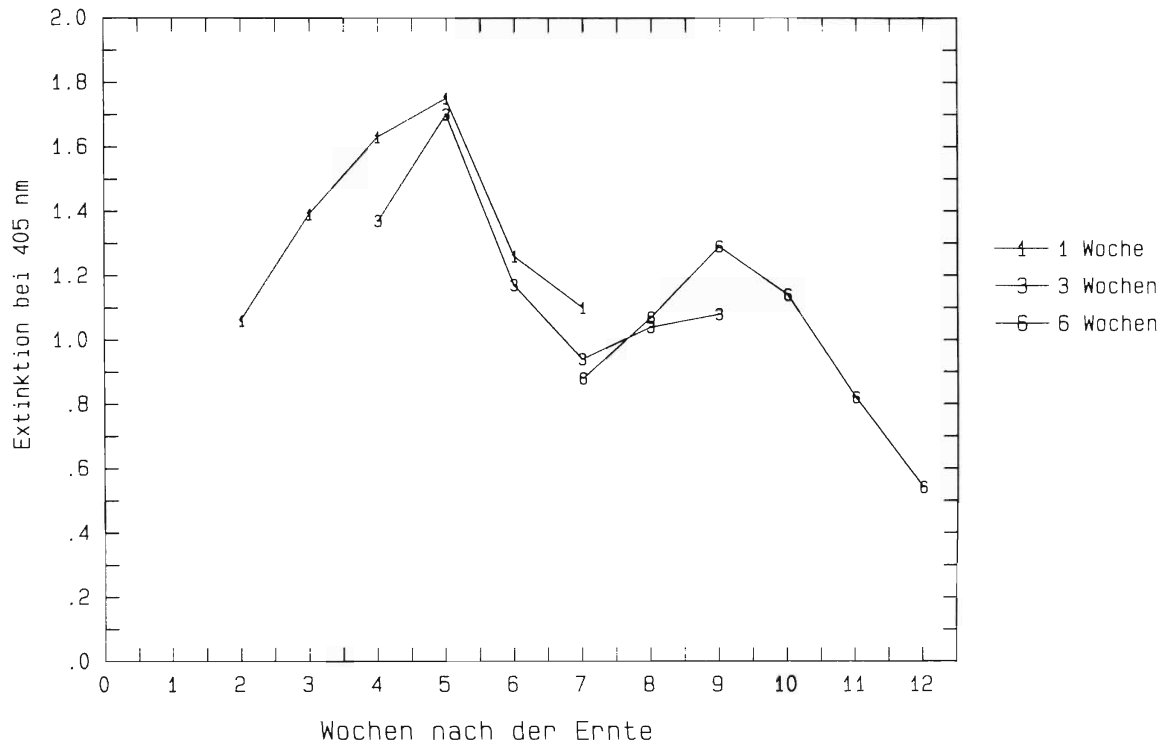
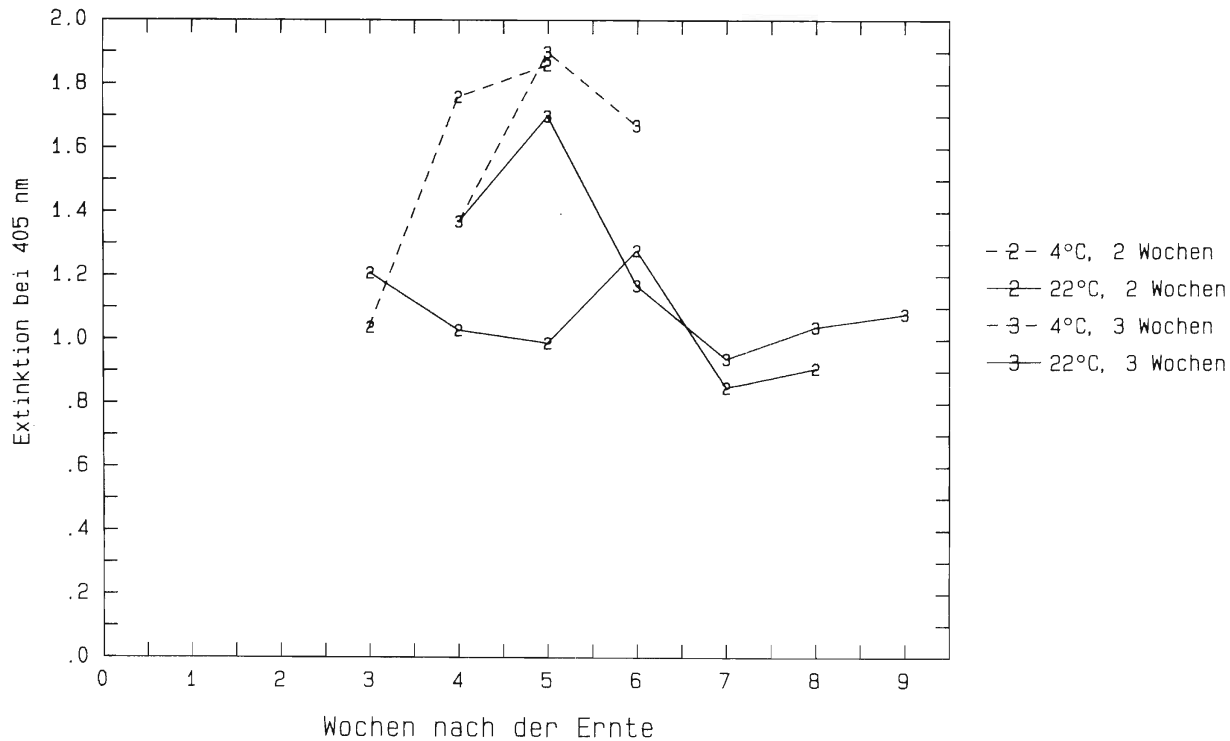


Abbildung 24

Einfluss der Temperatur auf die PVY-Konzentration, Versuchsjahr 1982
Knollen der Sorte Bintje nach der Ernte bei 4°C resp. 22°C vorgelagert, anschliessend vergast und am Kronenende untersucht



4.2. Nachweis von PLRV in primär infizierten Knollen

- Einfluss der Dauer der Vorlagerung

Die Nachweisbarkeit und die Konzentration von PLRV wurde am Nabel- resp. Kronenende bei den Sorten Desiree, Colmo und Palma geprüft.

Unabhängig von Vorlagerungsdauer und Sorte, können bereits eine Woche nach der künstlichen Keimruhebrechung praktisch alle PLRV-infizierten Knollen erfasst werden (Abb. 25 und 26). Etwas schlechtere Nachweissicherheit zeigen Knollen der Sorte Palma, die vor der Rinditebehandlung eine Woche bei 22°C vorgelagert wurden. Immerhin werden auch bei diesen Knollen von Anfang an mehr als 90% der Virusinfektionen erfasst. Beim gesamten, in diesem Experiment untersuchten und mit Rindite behandelten Knollenmaterial war die PLRV-Nachweissicherheit vom Saftentnahmeort unabhängig. Sowohl das Kronen- wie auch das Nabelende sind für die Testierung gleich gut geeignet.

- Einfluss tiefer Temperatur während der Vorlagerungsperiode

Die ohnehin hohe Testsicherheit kann durch Vorlagerung bei 4°C weiter verbessert werden (Abb. 25 und 27). Eine Ausnahme, am ersten Untersuchungszeitpunkt nach der Keimruhebrechung, bilden die Knollen der Sorte Palma, die 2 Wochen bei 4°C vorgelagert wurden. Nach den anfänglich erfassten 80% steigt die Nachweissicherheit auf 100%. Der Grund dafür kann bei dem durch die tiefe Temperatur gebremsten Metabolismus liegen. Die Aktivierung durch Rinditebehandlung erfolgt etwas verzögert, dafür aber umso heftiger.

- Nachweis an Knollen nach natürlich überwundener Keimruhe

Die Abbildung 28 zeigt die Nachweissicherheit von PLRV an Knollen der Sorten Bintje und Colmo nach 5 monatiger Lagerung bei 4°C. Bei diesem Knollenmaterial hatte bereits die natürliche Keimung eingesetzt, die durch die anschliessende Inkubation bei 22°C zusätzlich aktiviert wurde. Bereits am ersten Untersuchungszeitpunkt werden bei beiden Sorten mehr als 85% der virusinfizierten, unbehandelten Knollen erfasst. Bei Colmo zeigt eine zusätzliche Rinditebehandlung keinen Einfluss auf die Nachweissicherheit; sowohl bei unbehandelten wie auch bei behandelten Knollen werden ab zweitem Untersuchungszeitpunkt alle Infektionen erfasst. Einen positiven Effekt zeigt die künstliche Keimruhebrechung bei der Sorte Bintje, sie ermöglicht einen sofortigen und anhaltenden hundertprozentigen Virusnachweis (Abb. 28). An unbehandelten Vergleichsknollen schwankt die Nachweissicherheit bei der Untersuchung verschiedener Knollenmuster zwischen 85% bis 100%.

- Veränderungen in der Viruskonzentration

Wie schon erwähnt, ist die Nachweissicherheit von PLRV bei vergastem Knollen davon unabhängig, an welchem Knollenende die Untersuchung durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu gibt es gesicherte Unterschiede in den Viruskonzentrationen am Nabel- resp. Kronenende. Während der gesamten Beobachtungsperiode von sechs Wochen nach der Keimruhebrechung bleibt bei den beiden untersuchten Sorten und Verfahren der gemessene Virusgehalt am Nabel höher (Abb. 29-32).

In 1 bis 2 Wochen lang vorgelagerten Knollen erreicht die Viruskonzentration unmittelbar nach der Rinditebehandlung ihren Maximalwert (Abb. 29 und 30). In den folgenden zwei Wochen sinkt die Viruskonzentration bis auf ungefähr 50% ihres Maximums und bleibt auf diesem Niveau weiterhin

stabil. Die Kurven der Viruskonzentration am Nabel- und Kronenende zeigen einen ähnlichen, parallelen Verlauf. Es ist daher nicht anzunehmen, dass es sich bei der Konzentrationsabnahme um eine Virusverlagerung innerhalb der Knolle handelt. Vielmehr ist der Grund in der wechselnden physiologischen Aktivität der Knolle zu suchen. Erfolgt die Keimruhebrechung nach einer Vorlagerungszeit von vier Wochen, so schwanken die während der Beobachtungsperiode gemessenen Viruskonzentrationen unbedeutend. Wie bereits bei PVY, ist auch hier kein extremes Konzentrationsmaximum mehr feststellbar. Die Viruskonzentration bleibt ungefähr auf dem Endniveau der 1 bis 2 Wochen vorgelagerten Knollen stehen (Abb. 29 und 30).

Durch die Vorlagerung der Knollen bei 40°C wird keine wesentliche Aenderung der Viruskonzentration ausgelöst. Nur bei Palma werden am Nabelende gesichert höhere Werte gemessen (Abb. 29 und 30). Allgemein bleibt die Viruskonzentration sowohl bei Palma, wie auch Desiree am Nabel- gegenüber Kronenende höher. Der bereits kurz nach der Vergasung erreichte Maximalwert der Viruskonzentration nimmt während der ersten drei Wochen nach der Keimruhebrechung stetig ab und bleibt anschliessend annähernd konstant. Die gemessenen Werte erlauben immer eine problemlose Differenzierung zwischen "Gesund" und "Virusinfiziert".

5. VERTEILUNG VON PVY UEBER DIE KRONENHAELFTE UNTERSCHIEDLICH VORBEHANDELTER KNOLLEN

Einer der wichtigsten Faktoren für den erfolgreichen Virusnachweis an der Kartoffelknolle ist eine möglichst gute Virusverteilung über grössere Knollenbezirke. Da die Probeentnahme aus praktischen Ueberlegungen nur an einem Ort der Knolle erfolgen kann, genügt es nicht, wenn die Viruskonzentration nur an einzelnen Augen einen genügend hohen Wert aufweist. Bei einer unregelmässigen Virusverteilung wäre ein Anbohren der Knolle an

verschiedenen Orten unumgänglich. Dies würde eine rationelle Arbeit verhindern. Aus diesem Grund ist es vor allem für die ELISA-Anwendung in der Praxis von besonderem Interesse zu wissen, wann und wo die Nachweisgenauigkeit einen genügend hohen Wert erreicht. Mit ähnlicher Fragestellung haben sich auch Gugerli et al. (1980) befasst.

Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Virusnachweisbarkeit an sechs verschiedenen Augen der Kronenhälfte bei PVY-infizierten Knollen der Sorte Bintje. Dabei wurden ausgehend vom apikalen Kronenauge auch die fünf weiteren Nachbaraugen unterschiedlich vorbehandelter Knollen untersucht. Die Probenentnahme erfolgte wie üblich an der Basis der betreffenden Augen.

5.1. Nachweissicherheit

Die Abbildungen 33 bis 36 zeigen den Verlauf der Nachweissicherheit an unterschiedlich vorbehandelten Knollen in Abhängigkeit von der Strenge der gestellten Anforderungen. Dabei wurde eine Knolle dann als virusinfiziert beurteilt, wenn mindestens eine, zwei, drei, vier, fünf oder sechs der sechs untersuchten Proben positiv waren. Bei einer homogenen Virusverteilung über die gesamte Kronenhälfte, müssten die Resultate, unabhängig von den gestellten Anforderungen, die gleiche Nachweissicherheit aufweisen.

Betrachtet man die Viruserfassung an unbehandelten, bei 22°C vorgelagerten Knollen (Abb. 33), so ist die ungleichmässige Virusverteilung nicht zu übersehen, die Viren sind an einzelnen Augen lokalisiert. Bis zum 39. Tag nach der Ernte nimmt nicht nur die Nachweissicherheit ab, auch die Virusverteilung innerhalb der Knollen beschränkt sich zunehmend auf einzelne Augen. Die Zone um das apikale Auge zeigt in dieser Phase keine verbesserte Viruserfassung. Während der weiteren Inkubation ist eine Zunahme der Nachweissicherheit feststellbar, die sich erst jetzt vor

allem in der unmittelbaren Nachbarschaft des apikalen Auges bemerkbar macht. Nach 183 bis 216 Tagen nach der Ernte ist das Virus in der Gegend des apikalen Auges so gut nachweisbar, dass eine einzelne Probeentnahme an der Basis des apikalen Auges einen zuverlässigen Virusnachweis gewährleistet.

In unvergasteten Knollen kann eine Aenderung des Metabolismus durch Knollenvorlagerung bei 40°C erreicht werden (Abb. 34). Durch den Kälteschock wird der Stoffwechsel gebremst, als Folge davon ist in den ersten 28 Tagen nach der Ernte die Nachweissicherheit und die Virusverteilung gegenüber ungekühlten Knollen schlechter. Die ohne Kälteschock gelagerten Knollen erreichen ihre natürliche Keimruhe später. Zu diesem Zeitpunkt ist in den kalt vorgelagerten Knollen eine verbesserte Virusvermehrung feststellbar. In der Zeit zwischen dem 32. und 78. Tag nach der Ernte sind Nachweissicherheit und Virusverteilung in den vorgekühlten Knollen besser. Die Wirkung des Kälteschocks, ohne zusätzliche künstliche Keimruhebrechung, ist jedoch für die Praxis ungenügend. Die Nachweissicherheit ist zu gering und das Virus ist unregelmässig auf einzelne Augen verteilt. Erst nachdem die natürliche Keimruhe endgültig überwunden wurde, steigt in stark keimenden Knollen 183 bis 216 Tage nach der Ernte die Nachweissicherheit am apikalem Auge auf 90% bis 100%.

Der durch die künstliche Keimruhebrechung mit Rindite ausgelöste, sprunghafte Anstieg der Nachweissicherheit wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits mehrmals erwähnt. Die Abbildungen 35 und 36 zeigen nicht nur die bereits bekannte Verbesserung des Virusnachweises. Als neue Erkenntnis kommt die verbesserte Virusverteilung über die gesamte Kronenhälfte hinzu. Eine der Keimruhebrechung vorausgehende Kältebehandlung steigert diesen Effekt zusätzlich (Abb. 36). Kalt vorgelagerte und anschliessend mit Rindite vergaste Knollen zeigen im ELISA eine höhere Nachweissicherheit und vor allem eine gleichmässigeren Virusverteilung auf alle Kronenaugen während der ganzen Untersuchungsperiode. Für die

Untersuchungspraxis bedeutet dies eine bedeutende Steigerung der Testsicherheit, da das Verfehlen des apikalen Auges bei der Probeentnahme keine Auswirkung auf den Virusnachweis hat. Ein mehrmaliges Anbohren der Knollen führt in unbehandelten Knollen zur Verbesserung der Nachweissicherheit. Nach der künstlichen Keimruhebrechung erübrigt sich jedoch dieser Mehraufwand. Alle drei bis vier Augen im apikalen Bereich sind für die Probenentnahme gleich gut geeignet. Nicht reagierende Augen sind erst gegen die Knollenmitte feststellbar.

Der Einfluss der verschiedenen Knollenvorbehandlungen auf die Viruserfassung ist in den Abbildungen 37 bis 40 zusammengefasst. Zur Verdeutlichung der Unterschiede wurden für den erfolgreichen Nachweis zwei extreme Kriterien gewählt. In den Abbildungen 37 und 39 genügte für den Nachweis innerhalb der Knolle eine positive Reaktion, in den Abbildungen 38 und 40 mussten alle sechs Bohrproben reagieren.

Die Reaktion auf die Rinditebehandlung erfolgt bereits in den ersten fünf bis sechs Tagen (Abb. 37 und 38). Innerhalb dieser ersten Woche erreicht die Nachweissicherheit in der Gegend des apikalen Auges 90%, falls mehrere Bohrungen gemacht werden. Der Nachweis ist jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht genau auf das apikale Auge lokalisiert. Die Zunahme der Virusausbreitung über die Kronenhälfte manifestiert die Abbildung 38. Vier Wochen nach der Keimruhebrechung werden bei den kühl vorgelagerten Knollen nicht nur alle virusinfizierten Knollen erfasst (Abb. 37), zusätzlich haben sich die Viren über die ganze Kronenhälfte verteilt (Abb. 38). Im Vergleich dazu schneiden die ungekühlten, mit Rindite vergasten Knollen sichtbar schlechter ab. Im gleichen Zeitraum erreicht die Nachweissicherheit maximal 90% (Abb. 37) und die reagierenden Augen sind mehr auf die apikale Gegend beschränkt, die gegen die Mitte der Knolle gelegenen Augen reagierten nicht (Abb. 38).

Der Virusnachweis in unvergasten Vergleichsknollen

gestaltet sich viel schwieriger. Obwohl die kühle Vorlagerung in den ersten vier Vergleichswochen eine gewisse Verbesserung bewirkt, ist der Nachweis doch ungenügend und nur an einzelnen Augen möglich.

Der weitere Verlauf der Virusnachweisbarkeit und -verteilung bis zur 28. Woche nach der Vergasung ist in den Abbildungen 39 und 40 dargestellt. Nachdem die mit Rindite behandelten Knollen die hundertprozentige Nachweissicherheit erreicht haben, bleibt diese während der ganzen Beobachtungsperiode von 28 Wochen nach der Keimruhebrechung erhalten (Abb. 39). Auffallend ist jedoch die Verlagerung des Virus Richtung apikales Auge, dies vor allem bei ungekühlten Knollen (Abb. 40). An Knollen ohne künstliche Keimruhebrechung, erreichte man eine brauchbare Nachweissicherheit erst am Ende der Beobachtungsperiode (Abb. 39), dabei sind die Viren vor allem am apikalen Auge nachweisbar (Abb. 40).

5.2. Viruskonzentration

Die Auswirkung der Knollenvorbehandlung auf die Viruskonzentration am Kronenende wurde mit Hilfe der gemessenen Extinktionswerte beurteilt. In der Rechnung sind alle, zum gegebenen Zeitpunkt erfassten, virusinfizierten Proben berücksichtigt. Somit entsprechen die errechneten Werte einer mittleren Viruskonzentration über die gesamte Kronenhälfte der Knolle.

In der Abbildung 41 ist der Verlauf der Viruskonzentration während der ersten 28 Tage nach der Keimruhebrechung dargestellt. Die Abbildung 42 gibt einen Ueberblick über die ganze Untersuchungsperiode von 28 Wochen nach der Keimruhebrechung wieder.

Die höchsten Viruskonzentrationen werden an den kälte- und rinditebehandelten Knollen gemessen. Die stärkste Zunahmerate wird während der ersten fünf Tage nach der Keimruhebrechung beobachtet, die Viruskonzentration erreicht

annähernd den Maximalwert. Bis zu acht Wochen nach der Rinditebehandlung weichen die Extinktionswerte nur geringfügig vom Maximalwert ab, in den weiteren fünf Wochen sinkt der Virusgehalt um ca. 50%. Gegen Ende der Beobachtungsperiode steigt die Viruskonzentration erneut an (Abb. 42). Einen annähernd parallelen Kurvenverlauf zeigen auch die vergasteten, aber ohne Kühlung vorgelagerten Knollen. Die gemessenen Extinktionswerte erreichen ca. 50% der entsprechenden, vorgekühlten Vergleichsknollen. Wie bereits festgestellt, ist die Virusverteilung und Nachweissicherheit in Knollen ohne Keimruhebrechung ungenügend. Ungünstig sind auch die tiefen gemessenen Viruskonzentrationen. Erst während der natürlichen Keimung nach 6 bis 7 Monaten werden die gleichen Extinktionswerte, wie in vergasteten, bei 22°C vorgelagerten Knollen, erreicht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Auswirkungen verschiedener Faktoren, wie natürliche und künstliche Keimruhebrechung, Vorlagerungstemperatur und -dauer auf die Nachweisbarkeit der Kartoffelviren PVY und PLRV in primärinfizierten Knollen verschiedener Kartoffelsorten wurden mit Hilfe des ELISA-Verfahrens untersucht. Die untersuchten Viren zeigen ein recht unterschiedliches Verhalten. Während PVY in ruhenden Knollen sehr schlecht bis gar nicht und nur in geringen Konzentrationen nachweisbar ist, liefert der Nachweis von PLRV bedeutend bessere Resultate. Die natürliche Keimruhebrechung kann in den meisten Fällen die Erfassung von PLRV-infizierten Knollen weiterhin verbessern, der Nachweis von PVY bleibt schwierig und unzuverlässig. Erst nach sehr langer Lagerung (5-6 Monate) ist ein Anstieg der PVY-Nachweissicherheit und der Viruskonzentration feststellbar.

Für einen zuverlässigen Nachweis beider Viren (PVY und

PLRV) ist die künstliche Keimruhebrechung mit Rindite unerlässlich. Innerhalb weniger Wochen nach der Rinditebehandlung können alle virusinfizierten Knollen mit hoher Sicherheit erfasst werden. Die künstliche Keimruhebrechung verbessert nicht nur die Nachweissicherheit, zusätzlich steigt in den behandelten Knollen auch die Viruskonzentration und es findet eine Virusausbreitung über grössere Knollenbezirke statt. Die Nachweissicherheit von PLRV ist in behandelten Knollen davon unabhängig ob die Testierung am Nabel- resp. Kronenende durchgeführt wird. Allgemein werden aber auch nach künstlicher Keimruhebrechung am Nabel PLRV-Konzentrationen gemessen, die über den Werten am Kronenende liegen. In unbehandelten Knollen liefert der Nachweis von PLRV am Nabel- gegenüber dem Kronenende bessere Resultate.

Welche Inkubationszeiten nach der künstlichen Keimruhebrechung für einen sicheren Virusnachweis eingehalten werden müssen, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dabei muss vorausgeschickt werden, dass der Zeitpunkt der höchsten Viruskonzentration nicht immer mit dem der höchsten Nachweissicherheit korreliert. Jahresbedingte Unterschiede, sortenspezifisches Verhalten der Knollen, die untersuchten Viren und nicht zuletzt die Behandlung der Knollen nach der Ernte bis zur künstlichen Keimruhebrechung, müssen berücksichtigt werden. Das Erreichen der höchsten Nachweissicherheit kann durch tiefere Lagertemperatur und verlängerte Knollenvorlagerung beschleunigt werden. Während dem man nach der Behandlung mit Rindite bei PVY eine 4 bis 6 wöchige Wartefrist einhalten muss, ist der sichere Nachweis von PLRV bereits unmittelbar danach möglich. Das natürliche Auskeimen der Knollen darf nicht als Kriterium für den zuverlässigen Virusnachweis benützt werden. Auch nach 5-monatiger Knollenlagerung mit entsprechender Keimung bietet nur eine zusätzliche Rindite-Behandlung Gewähr für eine maximale Nachweissicherheit.

Als Schlussfolgerung für routinemässige Untersuchungen

unter Berücksichtigung eines minimalen Zeitaufwandes ergibt sich somit folgendes Vorgehen:

- Sofortiges Vergasen der Knollen mit Rindite; dabei müssen die Knollen unbedigt die Schalenfestigkeit erreicht haben, um Knollenfäulnis zu vermeiden. Eine vorgängliche Kälteschockbehandlung durch Knollenvorlagerung bei 4°C kann sich auf die Testbereitschaft positiv auswirken.
- Nach erfolgter Keimruhebrechung werden die Knollen bei 22°C während mindestens vier Wochen gelagert. Nur die strikte Einhaltung dieser Inkubationsdauer garantiert eine hohe Testsicherheit.
- Die Probensaftentnahme erfolgt am Kronenende der Knolle. An der Basis des apikalen Auges können beide Viren (PLRV und PVY) zuverlässig nachgewiesen werden.

Abbildung 25

Einfluss der Vorlagerungsdauer und -temperatur auf die Erfassung von PLRV Knollen der Sorte Desiree nach der Ernte bei 4°C resp. 22°C vorgelagert, anschliessend vergast und am Kronenende untersucht (Versuchsjahr 1982)

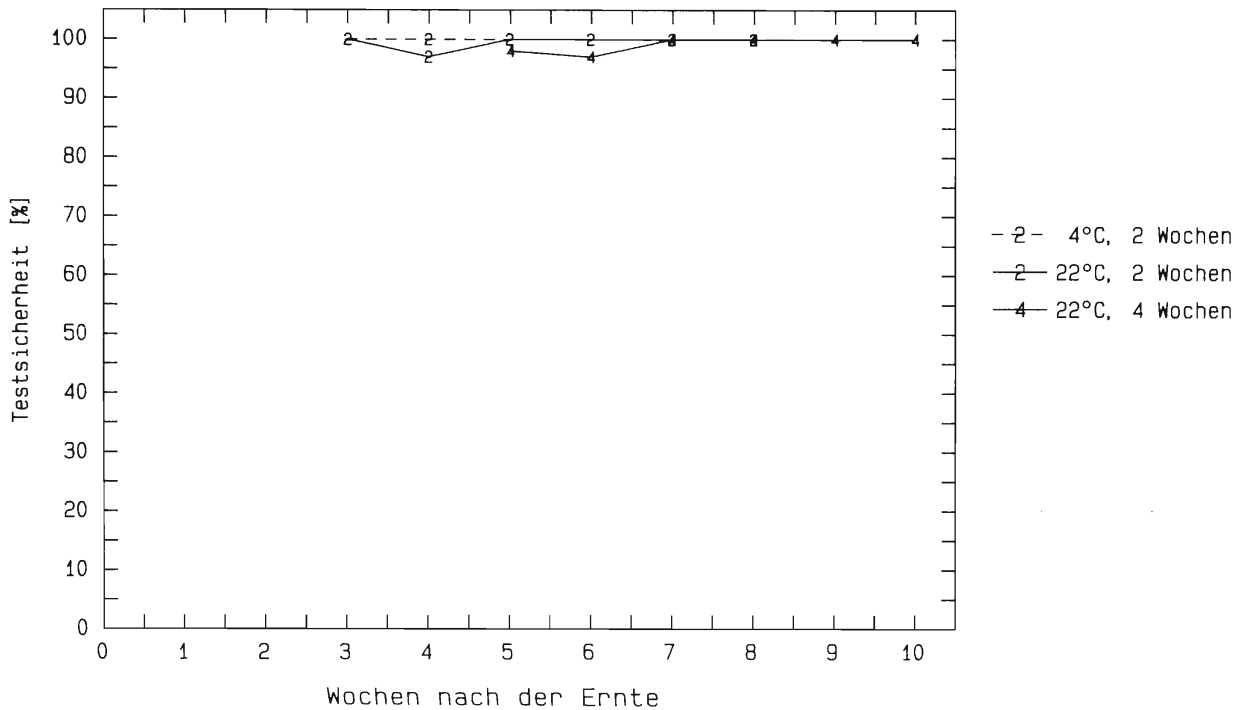


Abbildung 26

Einfluss der Vorlagerungsdauer auf die Erfassung von PLRV bei Palma Knollen nach der Ernte unterschiedlich lang bei 22°C gelagert, anschliessend vergast und am Kronenende untersucht (Versuchsjahr 1982)

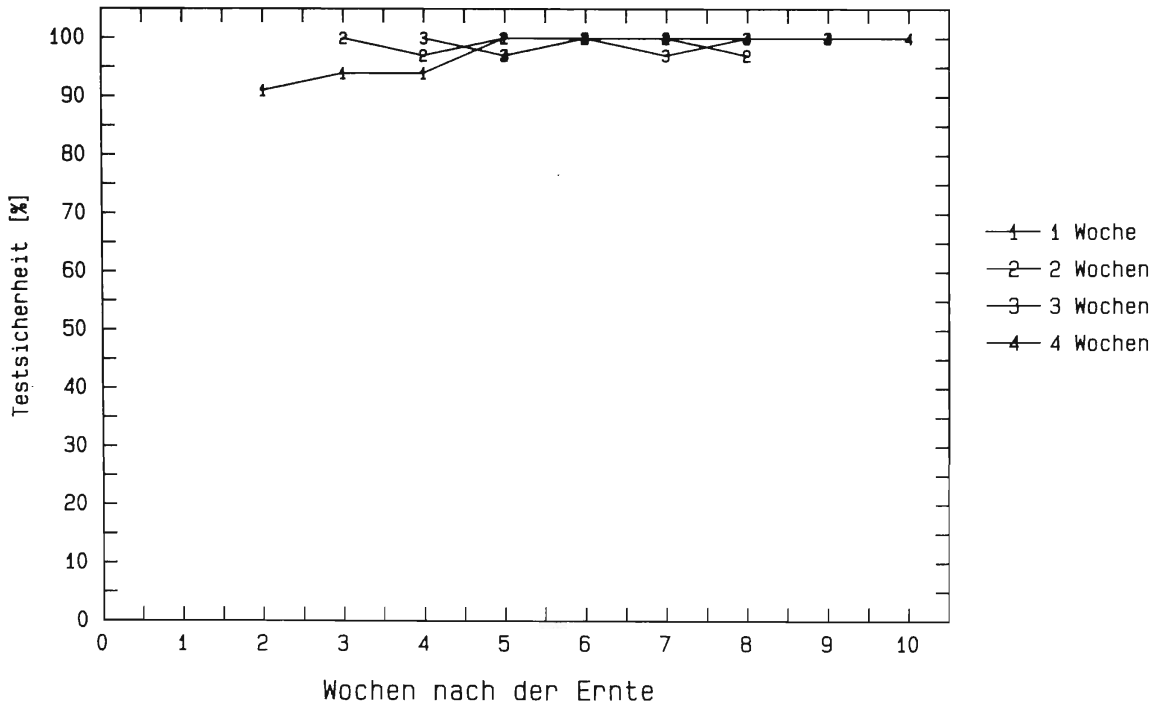


Abbildung 27

Einfluss der Vorlagerungstemperatur auf die Erfassung von PLAV bei Palma Knollen nach der Ernte bei 4°C resp. 22°C gelagert, anschliessend vergast und am Kronenende untersucht (Versuchsjahr 1982)

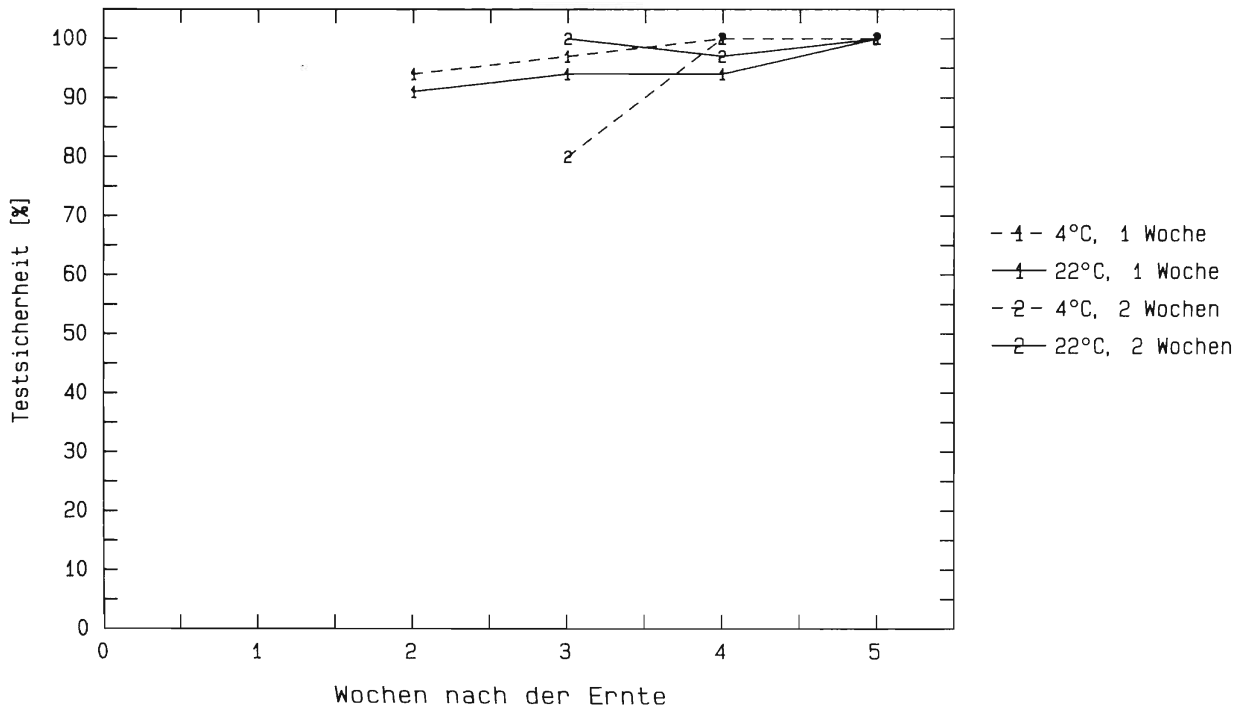


Abbildung 28

Erfassung von PLRV bei Bintje und Colmo nach langer Lagerung
Knollen nach der Ernte 5 Monate bei 4°C in Dunkelheit gelagert, an-
schliessend vergast und am Kronenende untersucht (Versuchsjahr 1983)

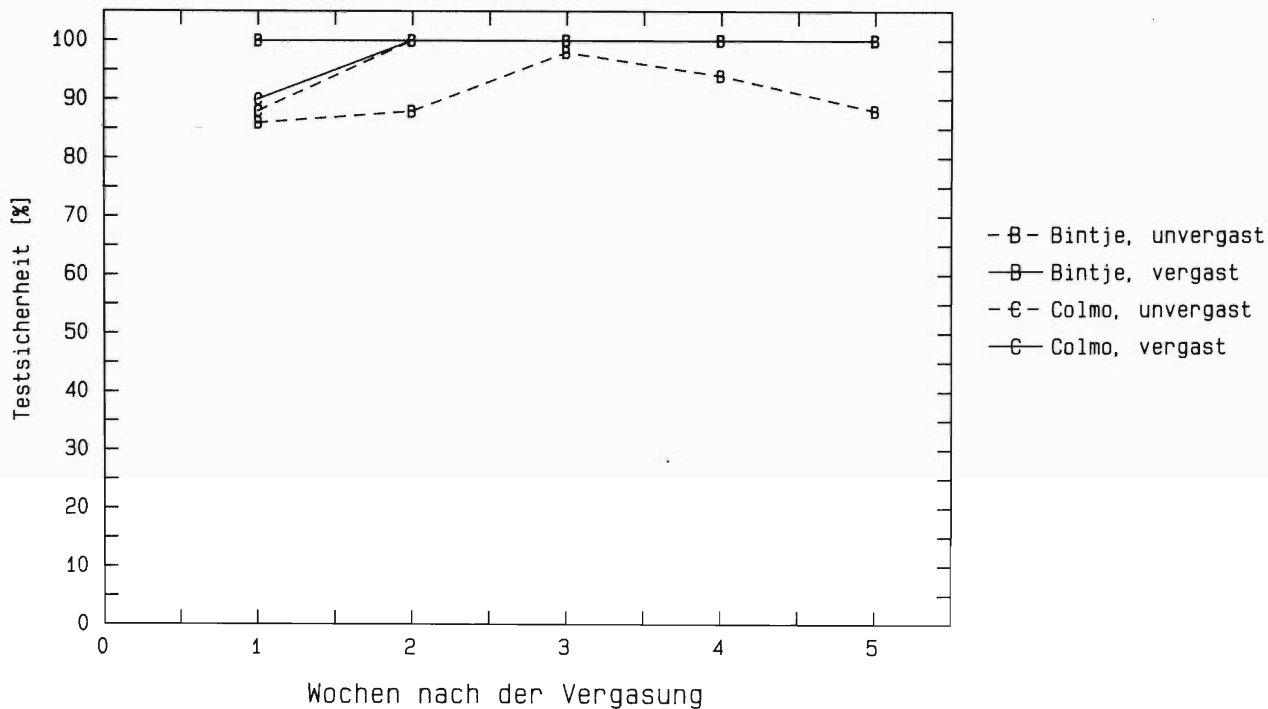


Abbildung 29

Einfluss der Vorlagerungsdauer auf die PLRV-Konzentration bei Palma Knollen nach der Ernte bei 22°C unterschiedlich lang vorgelagert, anschliessend vergast und am Nabel- resp. Kronenende untersucht (1982)

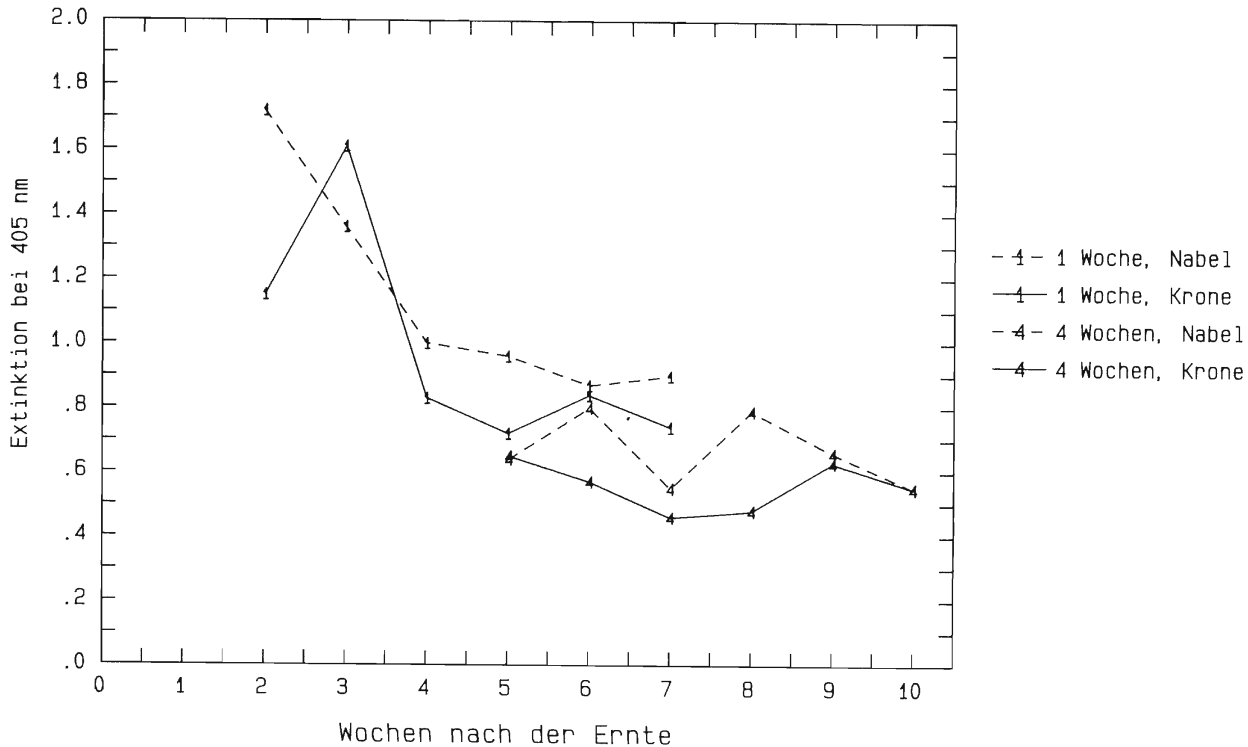


Abbildung 30

Einfluss der Vorlagerungsdauer auf die PLAV-Konzentration bei Desiree Knollen nach der Ernte bei 22°C unterschiedlich lang vorgelagert, anschließend vergast und am Nabel- resp. Kronenende untersucht (1982)

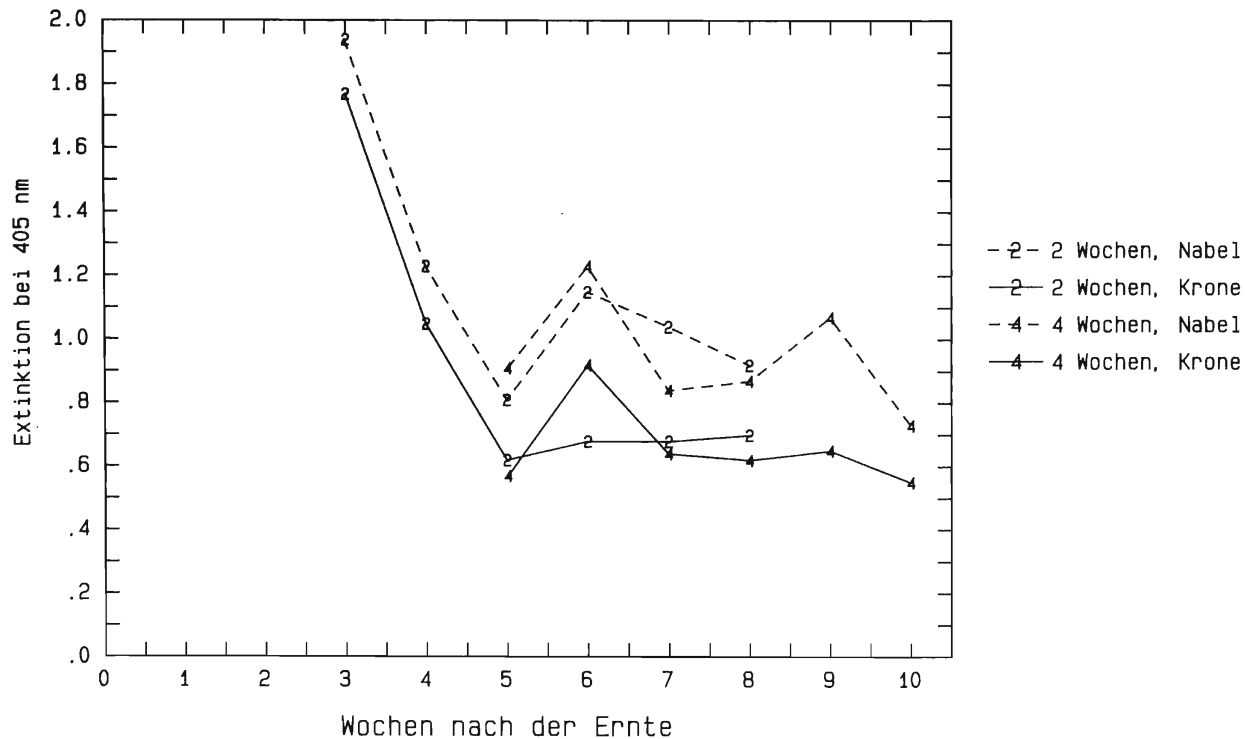


Abbildung 31

Einfluss der Temperatur auf die PLRV-Konzentration bei Palma Knollen nach der Ernte 2 Wochen bei 4°C resp. 22°C vorgelagert, anschliessend vergast und am Nabel- resp. Kronenende untersucht (1982)

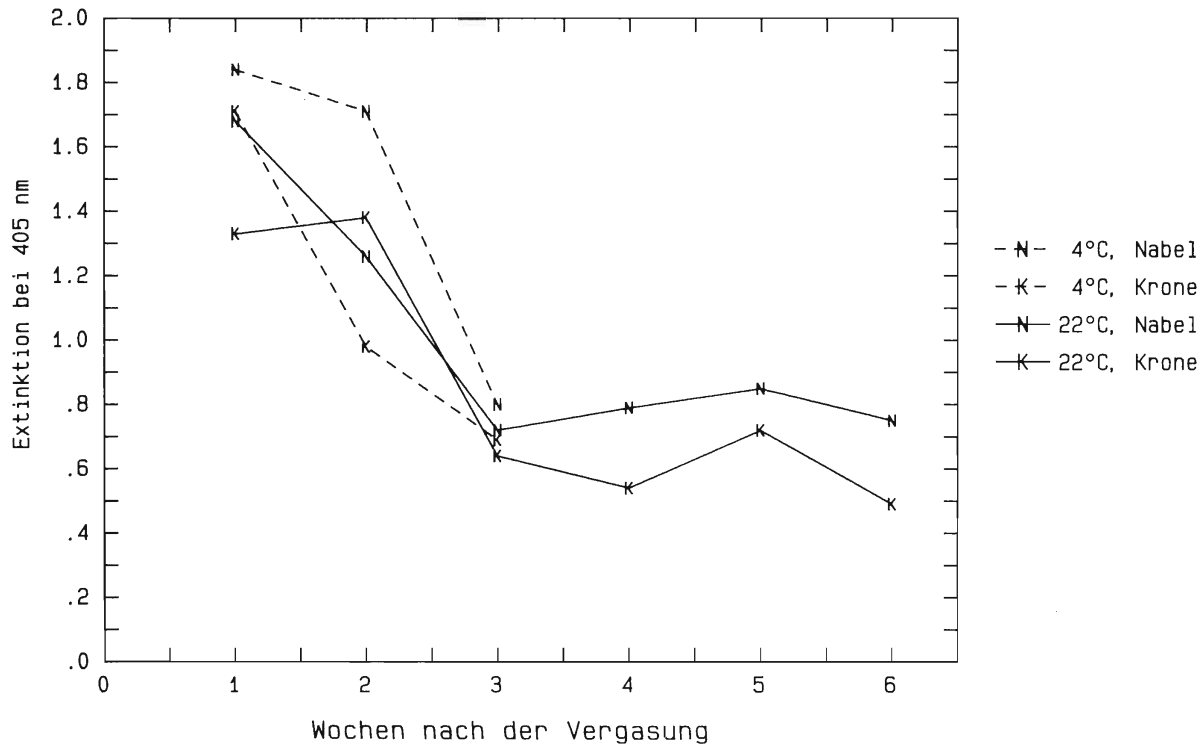


Abbildung 32

Einfluss der Temperatur auf die PLRV-Konzentration bei Desiree Knollen nach der Ernte 2 Wochen bei 4°C resp. 22°C vorgelagert, anschliessend vergast und am Nabel- resp. Kronenende untersucht (1982)

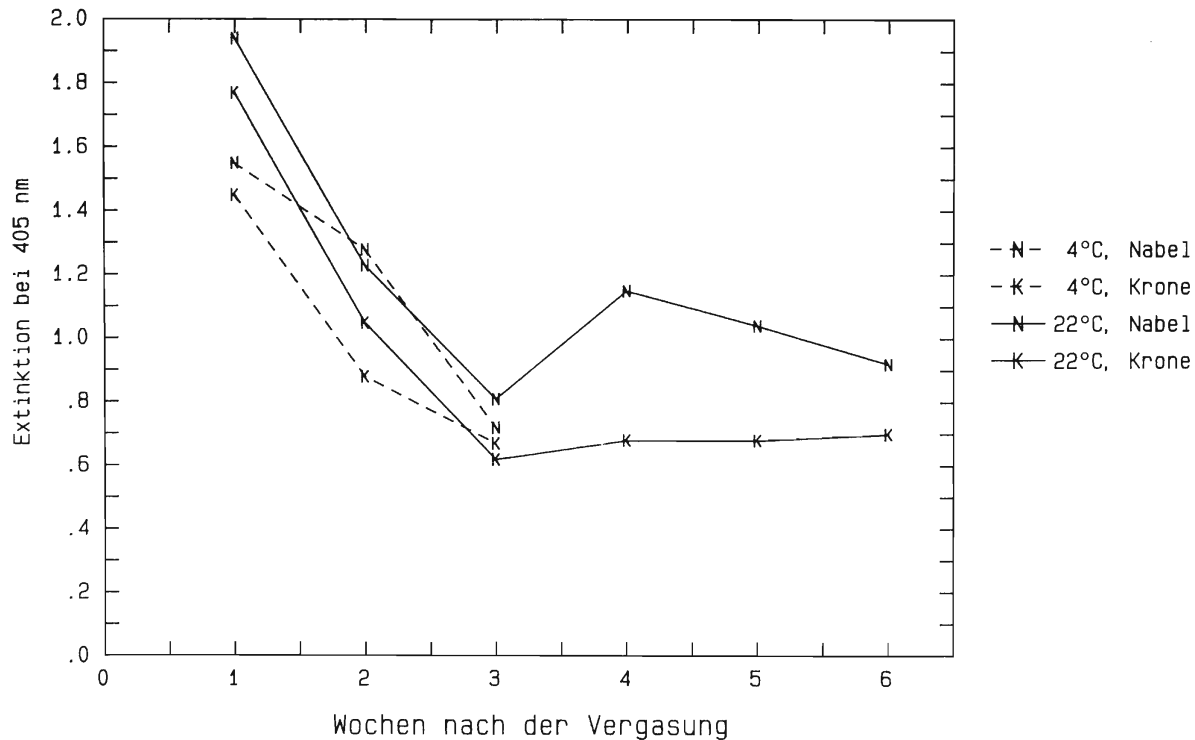


Abbildung 33

Verteilung von PVY ueber die Krone bei Bintje - unvergast, Versuchsjahr 1984
 Knollen nach der Ernte bei 22°C gelagert und regelmaessig an 6 verschiedenen
 Augen der Kronenhaelfte auf Virusbefall untersucht - Knolle positiv, wenn
 1, 2, 3, 4, 5 oder alle 6 Reaktionen positiv waren (Balken 1 - 6)

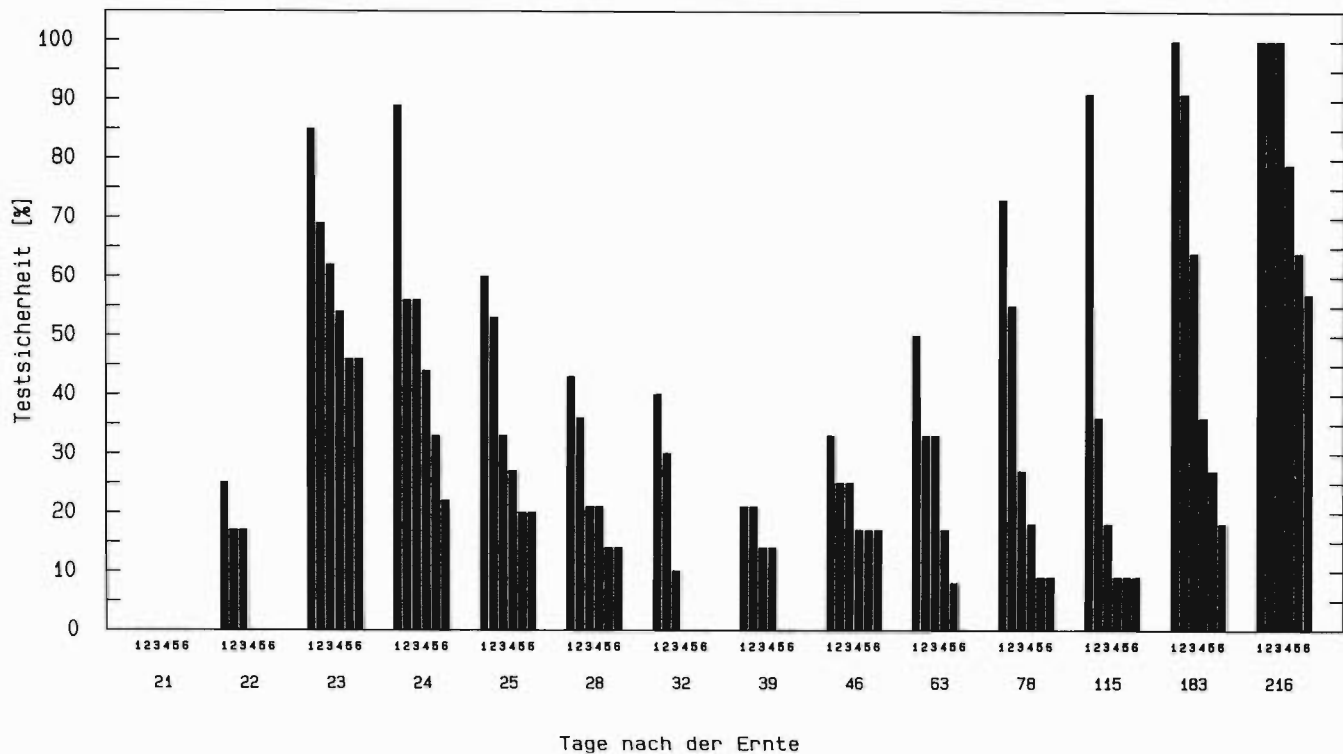


Abbildung 34

Verteilung von PVY ueber die Krone bei Bintje, 4°C, unvergast (1984)

Knollen nach der Ernte 2 Wochen bei 4°C vorgelagert, dann Lagerung bei 22°C

Jede Knolle an 6 verschiedenen Augen der Kronenhaelfte untersucht - Knolle positiv, wenn 1, 2, 3, 4, 5 oder alle 6 Reaktionen pos. waren (Balken 1 - 6)

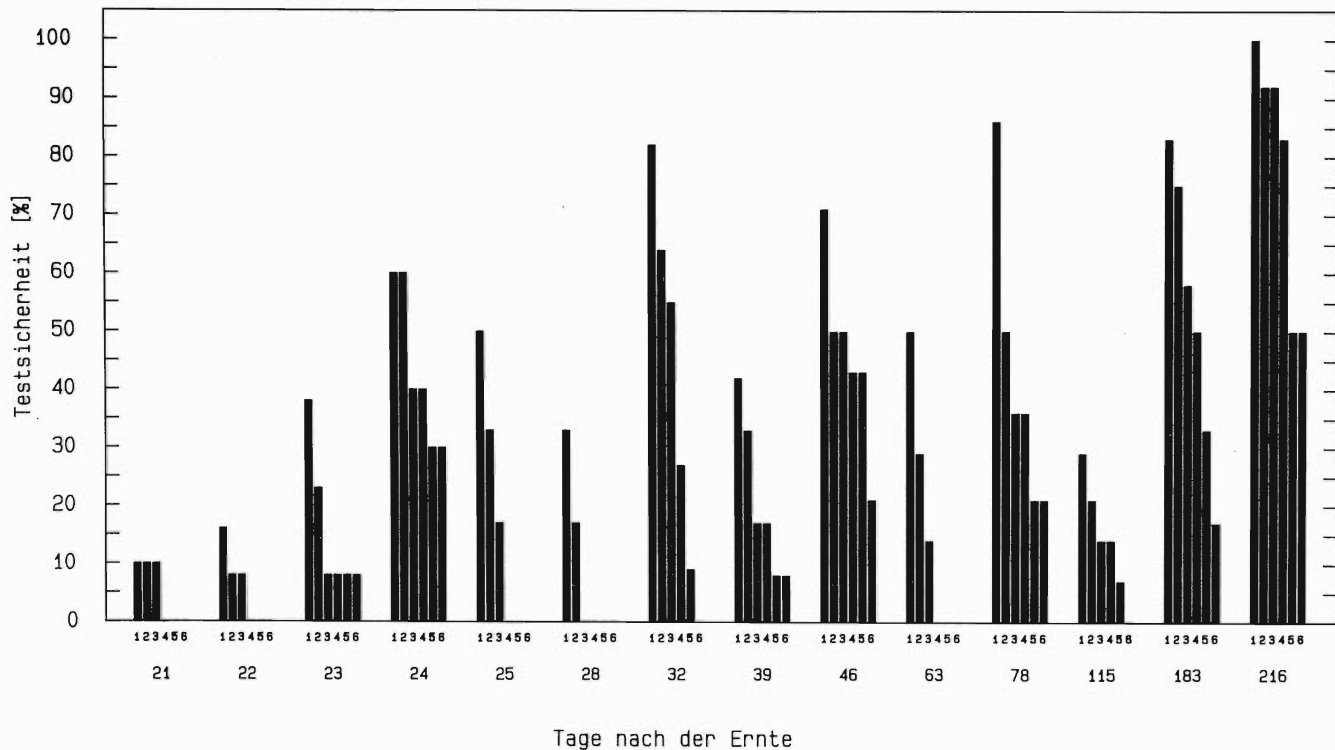


Abbildung 35

Verteilung von PVY ueber die Krone bei Bintje, 22°C, vergast (1984)

Knollen nach der Ernte bei 22°C gelagert und nach 2 Wochen vergast

Jede Knolle an 6 verschiedenen Augen der Kronenhaelfte untersucht - Knolle positiv, wenn 1, 2, 3, 4, 5 oder alle 6 Reaktionen pos. waren (Balken 1 - 6)

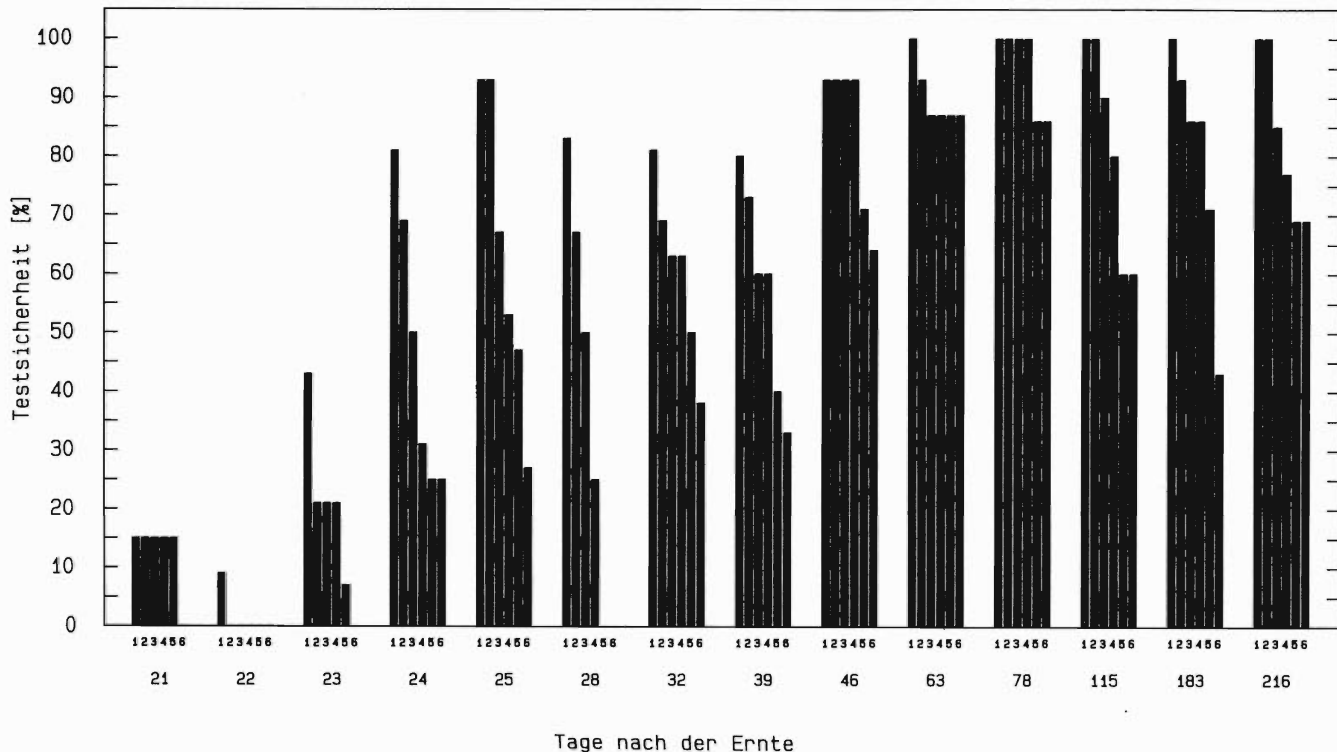


Abbildung 36

Verteilung von PVY ueber die Krone bei Bintje, 4°C, vergast (1984)

Knollen nach der Ernte 2 Wochen bei 4°C vorgelagert, nach der Vergasung 22°C

Jede Knolle an 6 verschiedenen Augen der Kronenhaelfte untersucht - Knolle

positiv, wenn 1, 2, 3, 4, 5 oder alle 6 Reaktionen pos. waren (Balken 1 - 6)

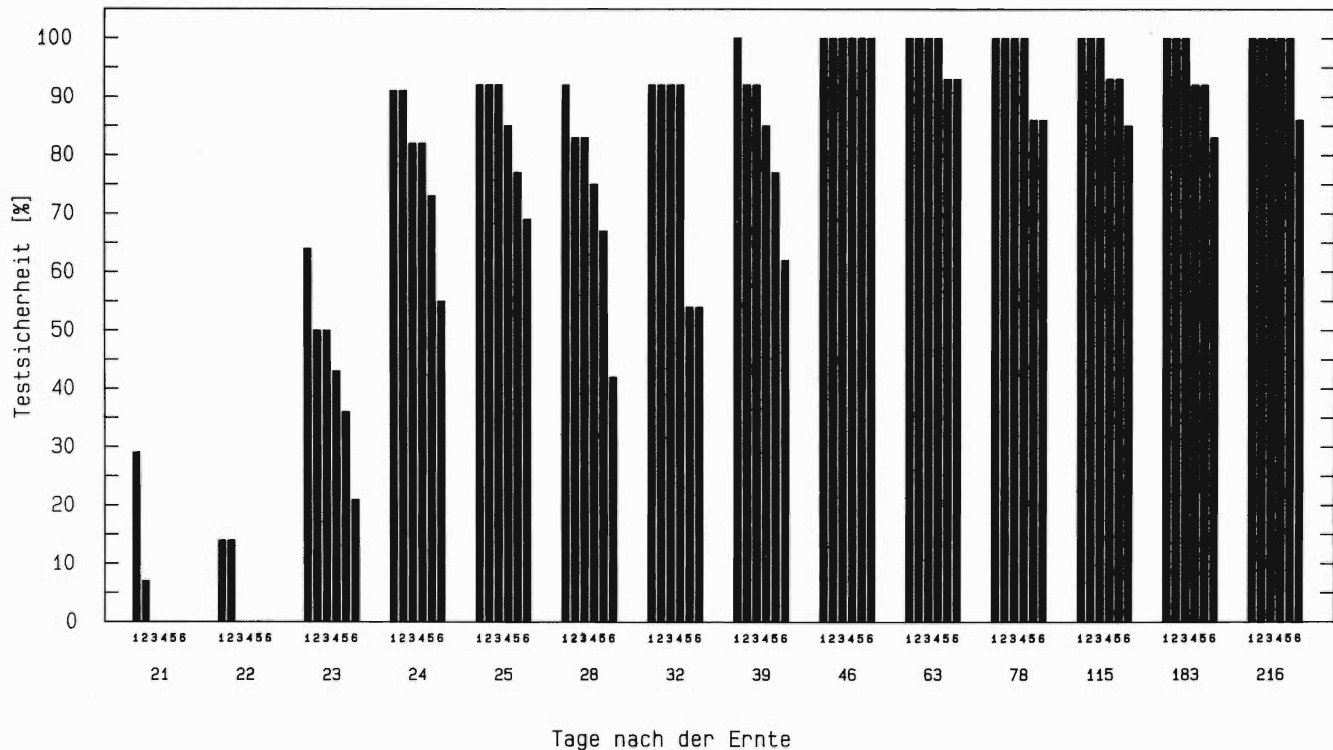


Abbildung 37

Erfassung von PVY an Knollen, die 6x angebohrt wurden, Versuchsjahr 1984

Einfluss der Vorlagerungstemperatur und der Keimruhebrechung (Rindite)

Knolle (Bintje) positiv, wenn mind. 1 von 6 Reaktionen positiv war

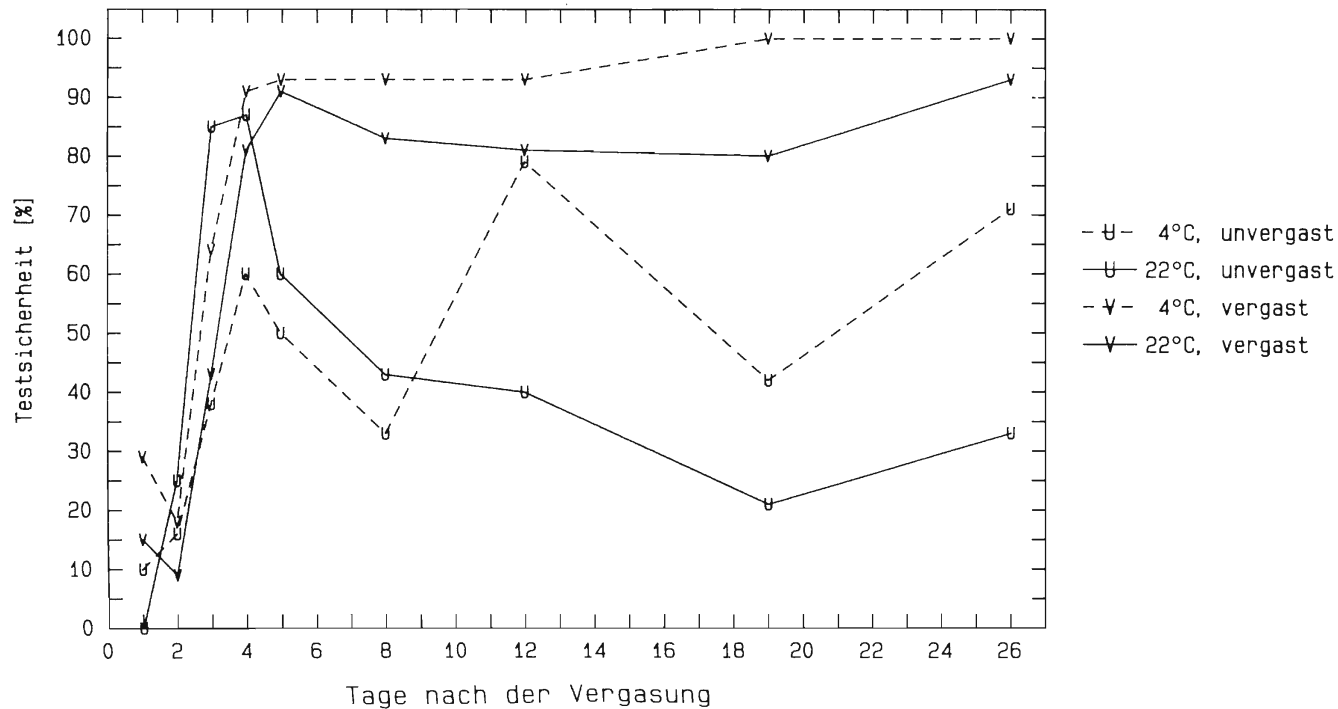


Abbildung 38

Erfassung von PVY an Knollen, die 6x angebohrt wurden, Versuchsjahr 1984

Einfluss der Vorlagerungstemperatur und der Keimruhebrechung (Rindite)

Knolle (Bintje) positiv, wenn alle 6 Reaktionen positiv waren

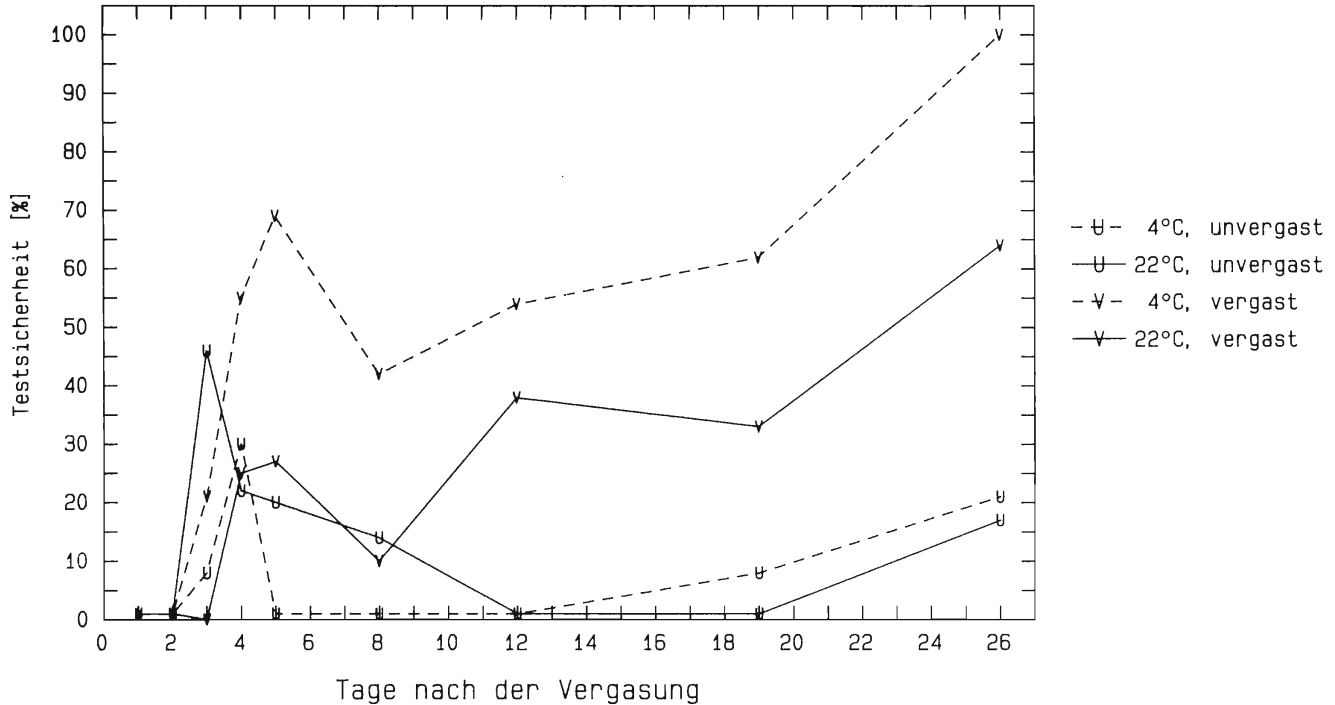


Abbildung 39

Erfassung von PVY an Knollen, die 6x angebohrt wurden, Versuchsjahr 1984
Einfluss der Vorlagerungstemperatur und der Keimruhebrechung (Rindite)
Knolle (Bintje) positiv, wenn mind. 1 von 6 Reaktionen positiv war
Beobachtungsdauer = 28 Wochen nach der Keimruhebrechung

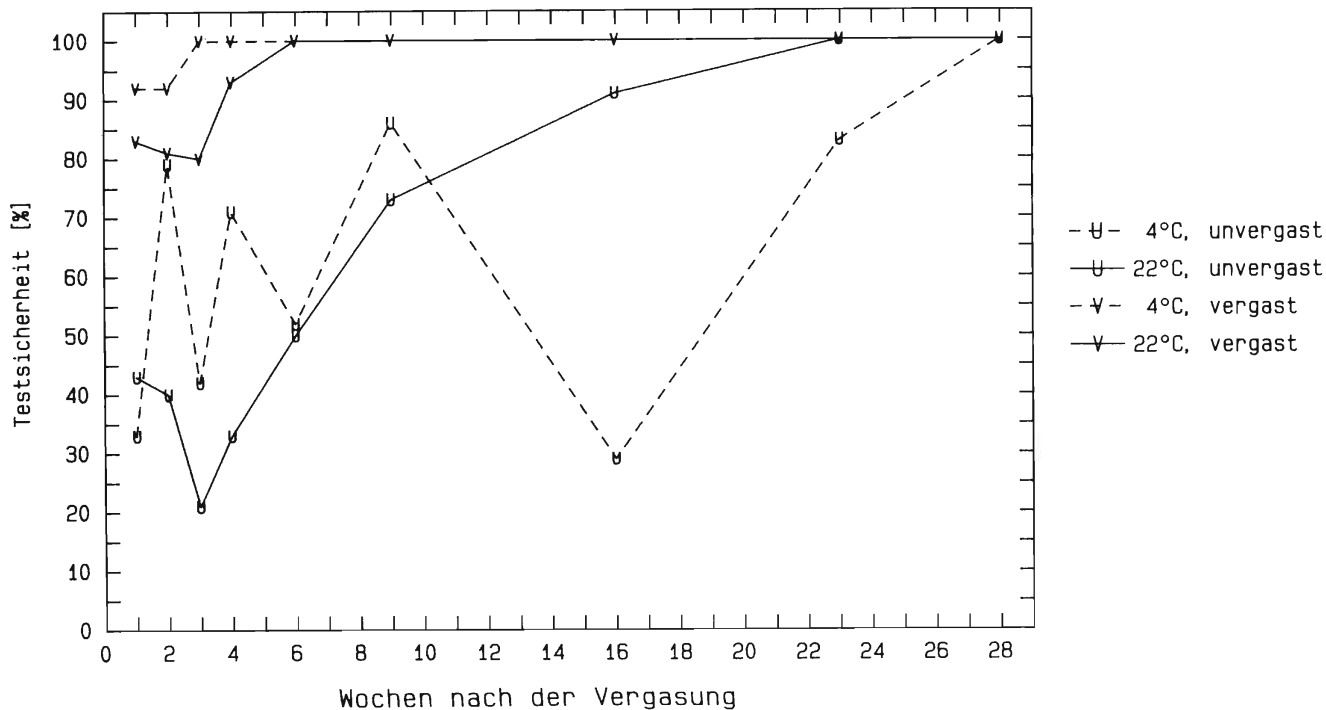


Abbildung 40

Erfassung von PVY an Knollen, die 6x angebohrt wurden, Versuchsjahr 1984

Einfluss der Vorlagerungstemperatur und der Keimruhebrechung (Rindite)

Knolle (Bintje) positiv, wenn alle 6 Reaktionen positiv waren

Beobachtungsdauer = 28 Wochen nach der Keimruhebrechung

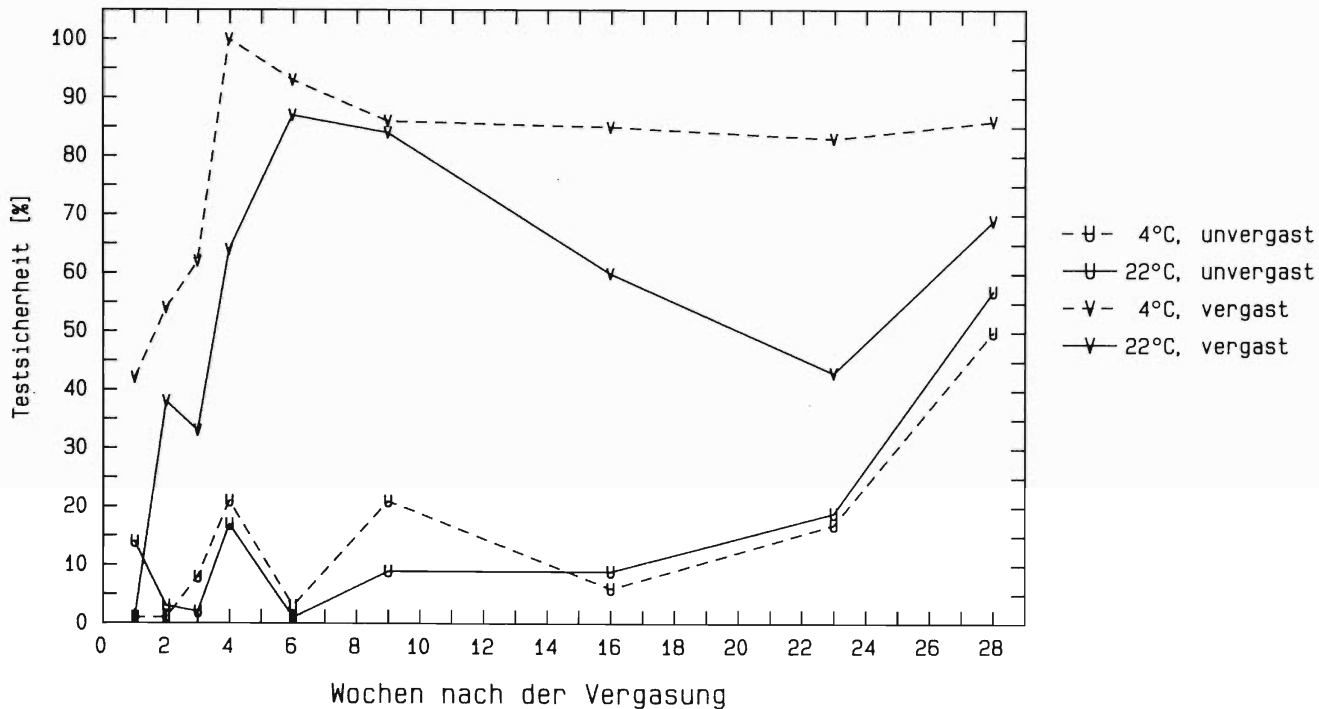


Abbildung 41

PVY-Konzentration in Knollen (Bintje), die 6x angebohrt wurden

Einfluss der Vorlagerungstemperatur und der Keimruhebrechung (Rindite)

Mittelwertrechnung aus allen positiven Reaktionen (Bintje)

Beobachtungsdauer = 26 Tage nach der Keimruhebrechung

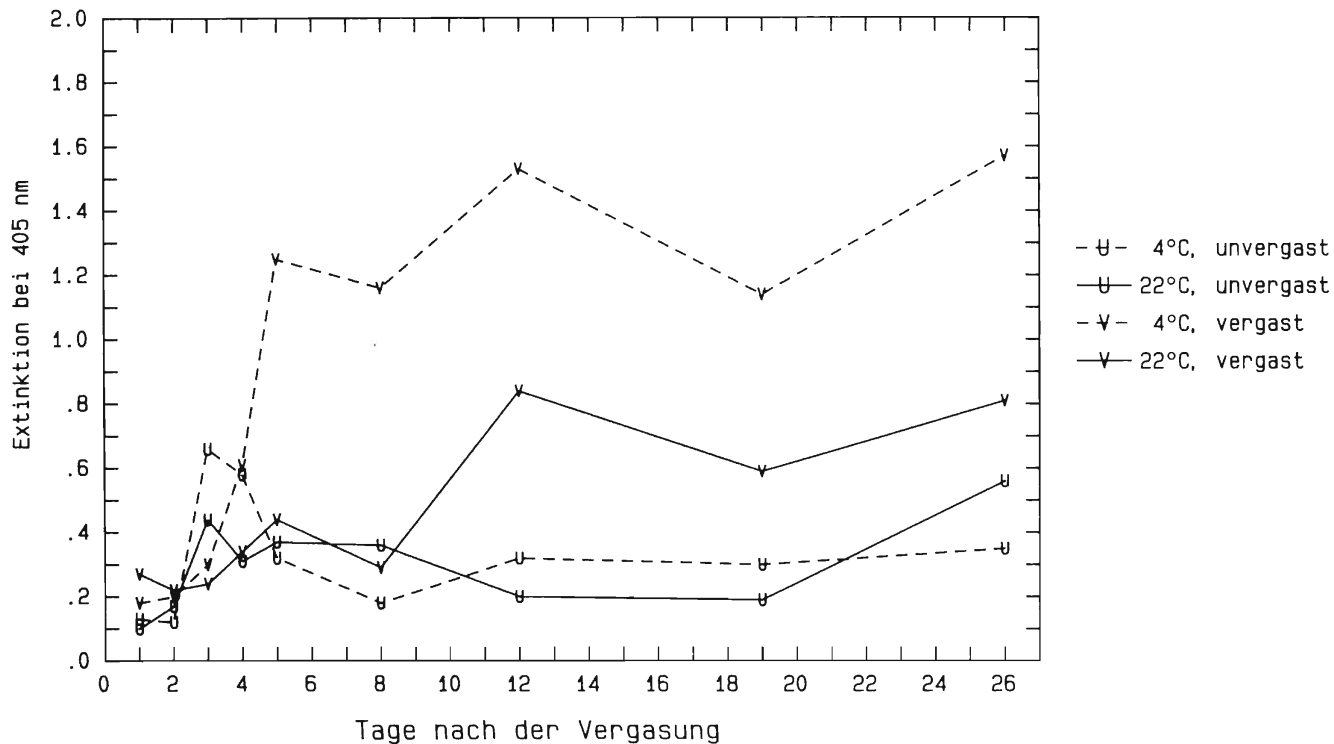
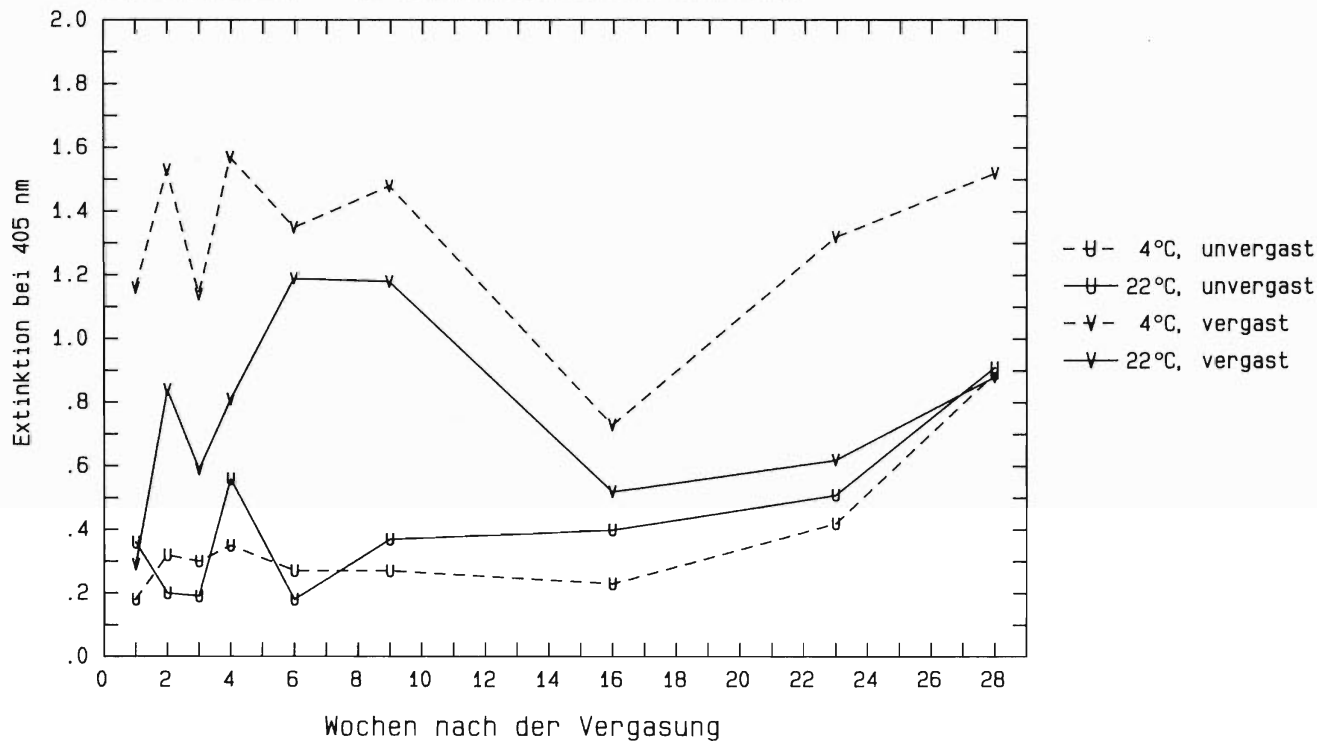


Abbildung 42

PVY-Konzentration in Knollen (Bintje), die 6x angebohrt wurden
Einfluss der Vorlagerungstemperatur und der Keimruhebrechung (Rindite)

Mittelwertrechnung aus allen positiven Reaktionen (Bintje)

Beobachtungsdauer = 28 Wochen nach der Keimruhebrechung



B) AUSWIRKUNGEN DES INFektionsZEITPUNKTES DER PFLANZEN AUF DEN NACHWEIS VON VIREN MITTELS ELISA

1. EINLEITUNG

Die im Abschnitt III/A vorgestellten Resultate zeigen deutlich, dass der zuverlässige Virusnachweis an Kartoffelknollen mit Hilfe von ELISA eine ganz bestimmte Knollenvorbehandlung erfordert. Der optimale Zeitpunkt der Untersuchung ist eng mit dem physiologischen Zustand der Knollen verbunden. Bei dem für die Untersuchungen verwendeten Material handelte es sich um natürliche Primärinfektionen, deren Infektionszeitpunkt im Feld nicht definiert war. Während der umfangreichen, mehrjährigen Experimente ist es immer wieder aufgefallen, dass es einzelne PVY resp. PLRV infizierte Knollen gab, die ohne jegliche Vorbehandlung, sofort nach der Ernte mit hoher Nachweissicherheit im ELISA erfasst wurden.

Bei der Suche nach einer möglichen Erklärung für dieses Verhalten drängte sich die Frage nach dem Einfluss des Infektionszeitpunktes auf.

Nachdem ein Gewächshausexperiment mit definierten Infektionszeitpunkten in kleinerem Rahmen ermutigende Resultate zeigte, haben wir uns entschlossen, die Rolle des Infektionszeitpunktes in einem Feldversuch zu untersuchen.

2. VERSUCHSANORDNUNG

2.1. Freilandversuch 1985

Der chronologische Aufbau des gesamten Experiments ist in der Abbildung 44 schematisch dargestellt. Die Bedeutung des Infektionszeitpunktes der Pflanzen für die Nachweisgenauigkeit von PVY und PLRV in verschiedenen

Pflanzenteilen, insbesondere in den Knollen, wurde 1985 unter natürlichen Bedingungen im Feld untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten gesunde und sekundär infizierte Knollen der Sorte Bintje. Die Versuchsanlage befand sich auf dem Betrieb der Forschungsanstalt Zürich-Reckenholz. Die Anzucht der Kartoffelpflanzen fand in acht vierreihigen Parzellen zu 25 Pflanzen pro Reihe statt. Die jungen Kartoffelpflanzen wurden sofort nach dem Auflaufen durch spezielle Gaze-Tunnels (Abb. 43) vor unkontrollierten Virusinfektionen geschützt. Die Untersuchungen über die Rolle des Infektionszeitpunktes wurden an vier verschiedenen Infektionsgruppen durchgeführt. Zum gegebenen Zeitpunkt infizierte man jeweils eine Parzelle mit PVY resp. PLRV. Für die primären Infektionen wurden drei verschiedene Zeitpunkte bzw. Wachstumsphasen gewählt (Abb. 44).

- 1. Infektionsgruppe: Kurz nach dem Auflaufen, zu Beginn der Blatt- und Stengelausbildung.
- 2. Infektionsgruppe: Knollenansatz
- 3. Infektionsgruppe: 2 Wochen vor der Frühernte, viele Knollen haben die Saatgutgrösse annähernd erreicht.
- 4. Infektionsgruppe: Sekundär infizierte Pflanzen.

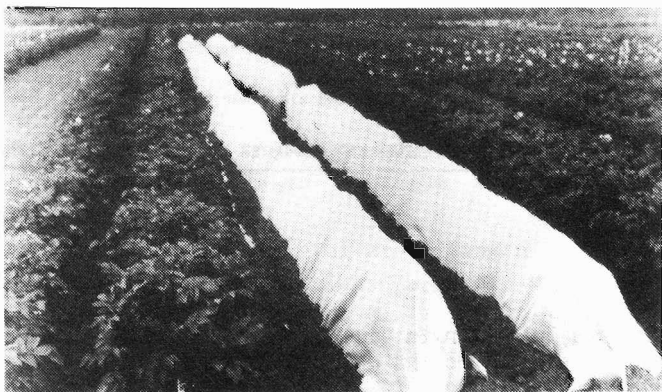


Abbildung 43: Gaze-Tunnels gegen unkontrollierte Infektionen

PARZELLE:	P1.-Y	P2.-Y	P3.-Y	Sek.-Y	P1.-R	P2.-R	P3.-R	Sek.-R
DATUM								
22.4.85	Gesundes resp. sekundaer infiziertes Ausgangsmaterial (Bintje) setzen.							
29.4.85	Alle Pflanzen gegen Infektionen durch Gaze-Tunnels schuetzen.							
24.5.85	1.Inf.PVY							
30.5.85	1.Inf.PLAV							
9.6.85	ELISA							
10.6.85	2.Inf.PVY							
12.6.85	ELISA ELISA							
19.6.85	ELISA 2.Inf.PLAV							
20.6.85	ELISA							
26.6.85	ELISA ELISA ELISA							
27.6.85	3.Inf.PVY 3.Inf.PLAV							
28.6.85	ELISA ELISA							
4.7.85	Kontrolle der Pflanzen auf Virusbefall im ELISA (2 Triebe à 3 Blaetter/Pflanze)							
12.7.85	FRUEHERNTE aller Pflanzen durch STAUDENZIEHEN							
30.7.85	ERNTE aller Pflanzen, d.h. Knollen pflanzenweise nummeriert graben							
5.8.85	ELISA ab Knolle, Untersuchung einer Knolle pro Pflanze (unvergast)							
16.8.85	KNOLLENVORLAGERUNG bei 4°C resp. 22°C							
20.8.85	Kuenstliche KEIMRUEBRECHUNG einzelner Knollenmuster mit Rindite							
AB 26.8.85	UNTERSUCHUNG DER VERSCHIEDENEN KNOLLENMUSTER IM ELISA IN EINWOECHIGEM ABSTAND							

Abbildung 44:

Auswirkungen des Infektionszeitpunktes der Pflanzen auf den Nachweis von Viren (Uebersicht ueber den Aufbau des Versuches)

Die künstliche Infektion mit PVY erfolgte mit Hilfe einer Spritzpistole (de Bokx, 1972a), die PLRV-Infektion durch Aussetzen infizierter Blattläuse. Die einzelnen Parzellen wurden vor der Infektion im ELISA ab Blatt auf den Gesundheitszustand untersucht. Der für die Infektion verwendete Presssaft stammte von PVYN-infizierten Pflanzen der Sorte Bona (latenter Träger des Rippenbräunevirus), die für die PLRV-Infektion benötigten Blattläuse wurden an sekundär infizierten Pflanzen der Sorte Desiree aufgezogen.

Um den Verlauf der Virusausbreitung während der Vegetationsperiode verfolgen zu können, wurden regelmässig folgende Proben einzelner Pflanzen im ELISA auf Virusbefall untersucht:

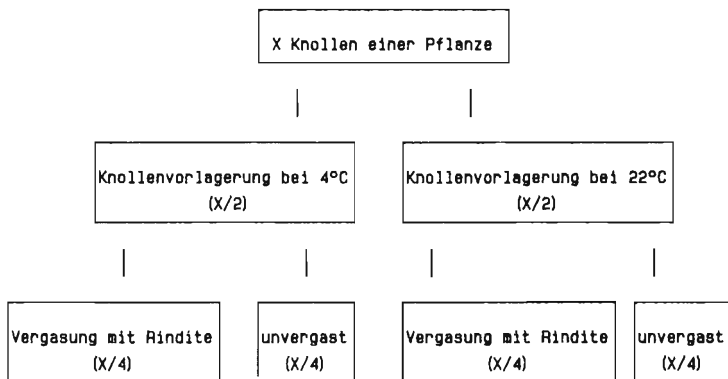
- Blätter:
 - a) 1. Blatt von oben
 - b) 3. Blatt von oben
 - c) 6. Blatt von oben
 - d) 3. Blatt von unten
 - e) 1. Blatt von unten
- Stengel:
 - a) Stengelspitze oberirdisch
 - b) Stengelmitte oberirdisch
 - c) Stengel 1cm über der Erde
 - d) Stengelmitte unterirdisch
 - e) Stengelbasis unterirdisch
- Stolonen
- Wurzeln

Im Alter von 81 Tagen erfolgte die Frühernte durch Staudenziehen.

Der Gesundheitszustand aller Pflanzen wurde vor der Frühernte mit Hilfe von ELISA überprüft. Von jeder Pflanze wurden zwei Triebe gezogen und jeweils das oberste, mittlere und unterste Blatt im ELISA auf Virusbefall untersucht.

Die Knollenernte erfolgte pflanzenweise, die Knollen wurden nummeriert. Je eine Knolle pro Pflanze wurde unmittelbar nach der Ernte unbehandelt im ELISA untersucht.

Für die weitere Behandlung erfolgte die Verteilung der restlichen Knollen jeder Pflanze nach folgendem Schema:



Die Untersuchung der unterschiedlich behandelten Knollennuster fand in einwöchigen Abständen mittels ELISA statt. Während des ganzen Experiments wurde die Knollenummerierung beibehalten.

An jedem Untersuchungszeitpunkt prüften wir im ELISA pro Behandlung und Variable 30 Knollen. Um auch den Virusnachweis innerhalb der Knolle verfolgen zu können, wurde jede Knolle an drei Stellen (Nabel, Mitte, Krone) angebohrt. Die Überprüfung der Resultate ab Knolle erfolgte im ELISA ab Augenstecklingsblatt.

2.2. Gewächshausversuch 1986, Viruswanderung in der Kartoffelpflanze

In einem Gewächshaus wurden 400 gesunde und je 100 sekundär infizierte (PVY und PLRV) Pflanzen der Sorte Bintje, eintriebzig, in 18cm-Töpfen angezogen. Die Auspflanzung erfolgte am 27.2.86 und die Pflanzen wurden bis zum Infektionszeitpunkt durch engmaschige Nylonsäcke vor ungewollten Infektionen geschützt.

Die Viruswanderung in der Pflanze wurde an primär (PVY) und sekundär (PVY und PLRV) infizierten Pflanzen verfolgt.

- 1. Infektionsgruppe : Infektion am 14.3.86, Pflanzenalter (PVY, 300 Pflanzen) 2 Wochen, Pflanzen mit durchschnittlich 5 Blättern.
- 2. Infektionsgruppe : Infektion am 25.4.86, Pflanzenalter (PVY, 100 Pflanzen) 8 Wochen, Pflanzen mit durchschnittlich 15 Blättern.
- 3. Infektionsgruppe : Je 100 sekundär infizierte (PVY und PLRV) Pflanzen.

Die Infektion der Gruppen 1 und 2 wurde immer am drittobersten Blatt angesetzt, dieses Blatt wurde zusätzlich markiert. Der zur Infektion verwendete Presssaft stammte von sekundär PVY-infizierten Pflanzen der Sorte Bona. Die zu infizierenden Blätter wurden angefeuchtet, mit Carborundum-Pulver bestäubt und mit dem Infektionspresssaft mittels Schaumgummi abgerieben (de Bokx, 1972b). Durch gründliches Duschen der Pflanzen mit Wasser konnten nach erfolgter Infektion alle Carborundum-Reste entfernt werden.

Die Virusuntersuchungen an je 10 Pflanzen erfolgten in einwöchigen Abständen nach der Infektion, mit Hilfe von ELISA. Jede Einzelpflanze zerlegten wir für die Probensaftgewinnung in folgende Teile:

- Blätter : Von allen Laubblättern wurden die Endfieder untersucht, insbesondere das markierte, infizierte Blatt.
- Stengel : 3 Teile; oberer, mittlerer und unterer Stengelbereich.
- Wurzel : 2 Teile; stengelnaher Bereich und Spitzenteil.
- Stolonen: Im jüngsten Stadium mit Knollenansatz zusammen.
- Knollen : Tochterknollen und so lange wie möglich auch die Mutterknolle.

3. FREILANDVERSUCH 1985

Die während dieses Versuches gesammelten Daten sollten mithelfen folgende Fragenkomplexe zu klären:

- Unterschiede zwischen PVY und PLRV
- Infektionszeitpunkt; Primärinfektion (1,2,3) und Sekundärinfektion
- Virusnachweis innerhalb der Knolle (Nabel, Mitte, Krone)
- Vorlagerungstemperatur der Knollen (4°C resp. 22°C)
- Künstliche Keimruhebrechung (Vergasung mit Rindite)
- Virusnachweis in infizierten Pflanzen während der Vegetationsperiode
- Infektionserfolg bei den Tochterknollen

3.1. Virusnachweis an Kartoffelpflanzen während der vegetativen Phase

3.1.1. Nachweis von PVY

In allen Infektionsgruppen konnte, unabhängig vom gewählten Infektionszeitpunkt, ein hoher Infektionserfolg erzielt werden. Bei den primären Infektionen betrug der Anteil PVY-infizierter Pflanzen in der ersten und zweiten Infektionsgruppe 98%. In der dritten Infektionsgruppe waren 91% der Pflanzen virusinfiziert. Die vierte Infektionsgruppe bestand aus 100% sekundär infizierten Pflanzen.

Der Nachweis von PVY in der Kartoffelpflanze ist während der vegetativen Phase massgeblich vom Infektionszeitpunkt abhängig. In sekundär infizierten Pflanzen war der Virusnachweis, vom Jugendstadium der Pflanzen bis zur Frühernte mit hundertprozentiger Sicherheit in allen Organen, ausgenommen der Wurzel, möglich. Sowohl die Blätter- und Stengelproben, als auch Stolonen und neu gebildete Knollen, eignen sich für die ELISA-Untersuchung

sehr gut. In der Wurzel konnten dagegen weder in der oberen (älteren), noch in der Spitzenzone, positive Reaktionen gemessen werden.

Ueber einen unzulänglichen, mit fortschreitendem Alter immer schlechter werdendem PVY-Nachweis in Wurzeln sekundär infizierter Pflanzen, berichtet auch Vulic (1963a). Seine Ergebnisse zeigen ab der 7. Alterwoche eine stark rückläufige Viruskonzentration. Bei Pflanzen im Alter von 43 bis 47 Tagen war in der ganzen Wurzel serologisch kein Virus nachweisbar. Die Nachweissicherheit im A6-Test ging in der ältesten Wurzelzone auf 64%, in den jüngsten Teilen der Wurzel auf 36% zurück. Diese Beobachtungen von Vulic entsprechen auch unseren Ergebnissen, bei denen die erste durchgeführte Wurzeluntersuchung im Alter von 51 Tagen stattgefunden hat.

Der Erfolg des Virusnachweises an gleich alten, primärinfizierten Kartoffelpflanzen wird entscheidend vom Entwicklungszustand der gesunden Pflanze zum Infektionszeitpunkt beeinflusst. Erfolgte die Infektion an jungen Pflanzen (Infektionsgruppe 1), so kann während der vegetativen Phase ein Teil der PVY-infizierten Pflanzen im ELISA erfasst werden (Tab. 1).

Tage nach Inf.	1. Blatt von oben	3. Blatt von oben	6. Blatt von oben	3. Blatt von unten	1. Blatt von unten	Stengel					Stolon	Wurzel
						oberirdisch oben	Mitte	unten	unterirdisch Mitte	Basis		
19	58%	54%	54%	42%	25%	54%	58%	54%	58%	54%	50%	0
33	53%	53%	53%	18%	0	53%	53%	53%	53%	18%	10%	0

Tabelle 1: Nachweis von PVY an Pflanzen der Infektionsgruppe 1 (Mittelwert von 30 Einzelpflanzen)

Innerhalb der reagierenden Pflanzen ist das Virus mehrheitlich in Organen lokalisiert, die erst nach der erfolgten Infektion gebildet wurden. Pflanzenteile, die bereits vor der Infektion ausgebildet waren (1. und 3. Blatt von unten, Stengelbasis, Stolonen) reagieren schlecht, die Viruskonzentration ist gegenüber neugebildeten Blättern viel

niedriger. Einige Pflanzen, die 19 Tage nach der Infektion positive Reaktionen lieferten, zeigten 33 Tage nach der Infektion weniger Reaktionen, dies vor allem in den unteren Pflanzenorganen (unterste Blätter, Stengelbasis, Stolonen). Dies lässt vermuten, dass das Virus mit den Assimilaten an Stellen der Zellneubildung, wo anschliessend auch die Virusvermehrung stattfindet, weitertransportiert wird. Wie bei sekundären Infektionen, ist bis zu der Frühernte in der Wurzel kein Virus nachweisbar.

Hat die Infektion an älteren Pflanzen stattgefunden (Infektionsgruppe 2 und 3), so ist der Virusnachweis, unabhängig vom untersuchten Organ, nicht oder gelegentlich an einzelnen Pflanzen erst sehr spät (bei der Frühernte) und nur bei geringer Viruskonzentration möglich.

In der Abbildung 45 ist die Nachweisbarkeit von PVY in Blättern gleich alter, kurz vor der Frühernte stehender Pflanzen dargestellt, die aber zu verschiedenen Zeitpunkten infiziert wurden. Unabhängig vom untersuchten Blatt, können alle sekundär infizierten Pflanzen erfasst werden. In primär infizierten Pflanzen ist dagegen der Nachweis an den obersten (=jüngsten), voll ausgebildeten Blättern am sichersten. Mit zunehmendem Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Infektion (Spätinfektionen) werden immer weniger virusinfizierte Pflanzen erfasst. In der dritten Infektionsgruppe war bis zu der Frühernte (=7 Tage nach der Infektion) kein Virus nachweisbar. Der ungenügende Nachweiserfolg deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren (Singh et al., 1983). Sie berichten über einen erfolgreichen Virusnachweis an im Feld gewachsenen PVY primär infizierten Pflanzen ab der sechsten Woche nach der erfolgten Infektion.

Bei der Saatkartoffelproduktion ist der Zeitpunkt der Infektion im Feld nicht bekannt. Obwohl ein grosser Teil der Pflanzen durch späte Infektionen befallen werden kann, sind diese Virussymptome bis zu der Frühernte an der Pflanze meist nicht sichtbar oder nachweisbar. Aus diesem Grund ist es in der Praxis sehr problematisch, die Resultate vom Test

an Pflanzen selbst für eine Prognose betreffend Virusbefall der Knollen zu verwenden. Knollen aus einem scheinbar gesunden Pflanzenbestand, können zu einem hohen Grad mit Virus befallen sein.

3.1.2. Nachweis von PLRV

Bis zu hohem Pflanzenalter (=Tage nach Pflanzung) konnte ein grosser Teil der gesunden Pflanzen im Feld mit PLRV infiziert werden:

- 1. Infektionsgruppe: Alter 38 Tage, Infektionserfolg = 96%
- 2. Infektionsgruppe: Alter 58 Tage, Infektionserfolg = 98%
- 3. Infektionsgruppe: Alter 66 Tage, Infektionserfolg = 85%
- 4. Infektionsgruppe: 100% sekundär infizierte Pflanzen

Eine Altersresistenz macht sich bei den Pflanzen der dritten Infektionsgruppe bemerkbar; der Anteil an virusinfizierten Pflanzen sinkt auf 85%.

Der Nachweis von PLRV in sekundär infizierten Pflanzen bietet keinerlei Probleme. An allen Untersuchungszeitpunkten bis zu der Frühernte können die Viren in allen Pflanzenorganen, ausgenommen der Wurzel, mit hundertprozentiger Sicherheit nachgewiesen werden.

Die Erfassung von primär infizierten Pflanzen ist dagegen während der gesamten Vegetationsperiode auf einen kleinen Teil der sehr früh infizierten Pflanzen beschränkt. In der Infektionsgruppe 1 werden kurz vor der Frühernte (=30 Tage nach der Infektion) 20% der Primärinfektionen erfasst. Für den Nachweis eignet sich am besten das oberste, ausgewachsene Blatt (Erfassung von 20% der virusinfizierten Pflanzen). Gegen den unteren Pflanzenbereich nimmt die Nachweissicherheit stark ab (mittleres Blatt=4%, unterstes Blatt=0%). Auffallend ist auch der unterschiedliche Virusbefall einzelner Pflanzentriebe, teilweise sind positive Reaktionen nur an einem Trieb feststellbar. An

allen früheren Untersuchungsterminen und bei den primär infizierten Pflanzen der Infektionsgruppen 2 und 3 ist es während der ganzen Vegetationsperiode in keinem der untersuchten Organe gelungen, das PLRV nachzuweisen.

Auch in der Arbeit von Ehlers et al. (1983) wird gezeigt, dass der Nachweiserfolg an mit PLRV primärinfizierten Pflanzen stark vom Infektionszeitpunkt abhängig ist. Frühe Infektionen können 4 Wochen nach der Infektion in jüngsten, voll ausgebildeten Blättern mit 55%-iger Sicherheit nachgewiesen werden, bei späten Infektionen beträgt die Erfolgsrate nur noch 20%.

3.2. Nachweis von PVY und PLRV an der Knolle

3.2.1. Nachweis an unbehandelten Knollen sofort nach der Ernte

Unmittelbar nach der Ernte wurden unbehandelte Knollen der vier Infektionsgruppen am Nabel, in der Knollenmitte und am Kronenende, zwecks Ermittlung der Nachweissicherheit, mit Hilfe von ELISA auf Virusbefall untersucht. Der Einfluss des Infektionszeitpunktes auf den Nachweiserfolg ist für PVY aus den Abbildungen 46 und 47 ersichtlich, die Resultate der PLRV-Infektionen sind in den Abbildungen 48 und 49 zusammengefasst.

Die Testierung von sekundär infizierten Knollen liefert zuverlässige Resultate. Sekundäre PVY und PLRV Infektionen können an frisch geernteten, unbehandelten Knollen mit hundertprozentiger Sicherheit nachgewiesen werden. Der zuverlässige Nachweis von Blattroll ist sowohl am Nabel, wie auch an der Krone möglich (Abb. 48), allerdings sind am Nabelende der Knolle gesichert höhere Viruskonzentrationen (Abb. 49) feststellbar. Beim Nachweis von Virus Y eignet sich für die Knollensaftentnahme das Kronenende der Knolle am besten. Während am Nabel nur 85% der mit PVY sekundär infizierten Knollen im ELISA erfasst werden, beträgt die

Nachweissicherheit am Kronenauge 100% (Abb. 46). Zusätzlich werden am Kronenende gegenüber dem Nabel stets höhere Viruskonzentrationen gemessen (Abb. 47), die die Testierung auf Virusbefall zusätzlich vereinfachen.

Unmittelbar nach der Ernte ist die Nachweisbarkeit von primären Infektionen an unbehandelten Knollen wesentlich vom Zeitpunkt der erfolgten Infektion der Pflanze abhängig. Je später die Infektion im Feld stattgefunden hat, umso schwieriger und unzuverlässiger wird der Nachweis von PVY und PLRV. Am deutlichsten machen sich die Unterschiede bei der Testierung von Virus Y bemerkbar. In Knollen sehr früh infizierter Pflanzen erreicht das Virus Y die höchste Konzentration (Abb. 47) und ist gleichmässig über die Knolle verteilt. Am Nabel, der für den Nachweis von Primärinfektionen am besten geeignet ist, werden 90% der am frühesten infizierten Knollen erfasst. Je später die Primärinfektion im Feld stattgefunden hat (Infektionsgruppe 2 und 3), umso schlechter wird die Testsicherheit, der Anteil an nachgewiesenen Infektionen verringert sich auf 50% bis 30% (Abb. 46). Der ungenügende Nachweiserfolg wird bei späten Primärinfektionen zusätzlich durch den Ort der Knollensaftentnahme merklich beeinflusst; am Kronenende und vor allem in der Knollenmitte nehmen Nachweissicherheit und Viruskonzentration weiter ab.

Weniger ausgeprägt als beim Virus Y, aber trotzdem gut erkennbar, sind die durch den Infektionszeitpunkt induzierten Unterschiede beim Nachweis von PLRV. Auch beim PLRV sind die Testresultate (Abb. 48 und 49) umso unzuverlässiger, je später die Primärinfektion stattgefunden hat. Der beste Nachweiserfolg und die höchsten Viruskonzentrationen werden wiederum am Nabelende festgestellt. Von den sehr früh infizierten Knollen können am Nabel 80% im ELISA nachgewiesen werden, bei späten PLRV-Infektionen verringert sich der Anteil an erfassten Knollen auf 70% (Abb. 48). An der Basis des Kronenauges erreicht die Nachweissicherheit, unabhängig vom Zeitpunkt der Primärinfektion, 70%. Die am Nabel gemessenen

Extinktionswerte im Bereich von 0.8 bis 1.1 sinken an der Krone auf 0.5 bis 0.6, die untersuchten Infektionsgruppen zeigen am Kronenende keinen signifikanten Unterschied in der Viruskonzentration (Abb. 49).

3.2.2. Nachweis an Knollen verschiedener Infektionsgruppen nach künstlicher Keimruhebrechung

Während der ersten 9 Wochen nach der Ernte wurde die Nachweisbarkeit der Infektionen an Knollen der verschiedenen Infektionsgruppen weiterverfolgt. Da der Virusnachweis an unbehandelten Knollen stark vom Infektionszeitpunkt abhängig ist, untersuchten wir während dieser Zeit, wie gut und schnell der Nachweiserfolg bei den sekundären und zeitlich gestaffelten, primären Infektionen durch künstliche Keimruhebrechung verbessert werden kann. Drei Wochen nach der Ernte wurde die Hälfte der Knollen jeder Infektionsgruppe mit Rindite vergast. Ein Teil der Knollen wurde vorgängig einer Kälteschockbehandlung ausgesetzt. Auf eine separate Auswertung der durch Kälteschock behandelten Knollen wurde im weiteren verzichtet, da im Rahmen dieses Versuches kein signifikanter Unterschied zu ungekühlten Knollen feststellbar war.

- Infektionen mit PVY

Der Virusnachweis an unbehandelten Knollen mit Hilfe von ELISA liefert vor allem bei späteren Primärinfektionen ungenügende Ergebnisse. Die durch den Infektionszeitpunkt induzierten Unterschiede bleiben während der gesamten Beobachtungsperiode erhalten (Abb. 50-52). Bei sekundären und sehr frühen primären Infektionen eignet sich für die Knollensaftentnahme das Kronenende der unbehandelten Knollen am besten. Späte Primärinfektionen werden jedoch mit grösserem Erfolg am Nabelende erfasst. Bei allen Infektionsgruppen kann man in unbehandelten Knollen mit

zunehmender Lagerdauer eine deutliche Abnahme der Nachweissicherheit und der Viruskonzentration beobachten. Von den anfänglich erfassten 90% bis 100% der frühen Primär-(Gruppe 1) und Sekundärinfektionen können nach 9 Wochen nur noch 40% bis 70% nachgewiesen werden. Bei späten Primärinfektionen (Gruppen 2 und 3) ist der Nachweiserfolg mit nur 5% bis 15% noch geringer. Bewegten sich die nach der Ernte gemessenen Absorptionswerte in unbehandelten Knollen, je nach Infektionsgruppe, im Bereich von 0.40 bis 1.10, so konnten nach 9 Wochen lediglich Werte zwischen 0.20 und 0.40 registriert werden.

Der erste Effekt der künstlichen Keimruhebrechung ist bereits eine Woche nach der Rinditebehandlung feststellbar (Abb. 50-52); bei allen untersuchten Proben wird der Nachweiserfolg verbessert. Vor allem bei späten Primärinfektionen steigt nicht nur die Nachweissicherheit sprunghaft an, auch die gemessenen Viruskonzentrationen sind gegenüber unbehandelten Vergleichsproben zwei bis drei Mal höher. In sekundär infizierten Knollen sind während der ersten 4 Wochen nach der Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der Viruskonzentration bei behandelten resp. unbehandelten Knollen feststellbar. Erst gegen das Ende der Beobachtungsperiode macht sich der Vorteil der Keimruhebrechung deutlich bemerkbar. Während dem die Viruskonzentration in unbehandelten Knollen deutlich rückläufig ist (Absorptionswert 0.4 - 0.8), können in mit Rindite behandelten Knollen Absorptionswerte von 1.3 - 1.5 gemessen werden.

In der ersten Woche nach der Vergasung mit Rindite variiert noch der Anteil an erfassten Infektionen stark in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt, bei späten Infektionen bleibt für die Knollensaftentnahme das Nabelende am besten geeignet (Verbesserung der Nachweissicherheit um 20% gegenüber Kronenende). Bei den Untersuchungen in den folgenden Wochen werden jedoch am Kronenende der behandelten Knollen durchwegs die besseren Ergebnisse erzielt. Am Nabel und in der Knollenmitte können auch nach achtwöchiger

Inkubationsdauer nicht alle Primärinfektionen erfasst werden.

Ab zweiter Woche nach der Behandlung kann der unterschiedliche Nachweiserfolg innerhalb der einzelnen Infektionsgruppen durch die künstliche Keimruhebrechung weitgehend ausgeglichen werden. Der Anteil an erfassten virusinfizierten Knollen beträgt in den Infektionsgruppen 1 und 2 über 90%. Bei sekundären Infektionen erreicht die Nachweissicherheit 100%. Auch nach der Rinditebehandlung bleibt der Nachweis von sehr späten Primärinfektionen (Gruppe 3) schwieriger. Eine genügende Testsicherheit wird erst in der fünften Woche nach der Behandlung erreicht. Trotz den Unterschieden in der Nachweissicherheit, weisen am Kronenende alle vergasteten Knollen, unabhängig vom Infektionszeitpunkt, immer hohe Viruskonzentrationen auf. Die gemessenen Extinktionswerte bewegen sich im Bereich von 1.0 bis 1.6 (am Nabel 0.5 - 1.0). Bei gesunden Vergleichsknollen übersteigen diese Werte die Grenze von 0.09 nicht.

- Infektionen mit PLRV

Entsprechend den Versuchen an PVY-infizierten Knollen wurden auch Infektionen mit PLRV untersucht. Während der neunwöchigen Untersuchungen an unbehandelten, bei 22°C gelagerten Knollen, verflachen die durch die gestaffelten Primärinfektionen verursachten Unterschiede in der Nachweisbarkeit von PLRV.

Unmittelbar nach der Ernte ist das Blattrollvirus in unbehandelten Knollen mit ziemlich gutem Erfolg (Primärinfektionen 70-80%, Sekundärinfektionen 100%) sowohl am Nabel-, wie auch am Kronenende nachweisbar (Abb. 48). Während der Lagerung erreichen die Knollen allmählich die volle Keimruhe, der Virusnachweis wird zunehmend unzuverlässiger (Abb. 53-55). Vor allem am Kronenende erfasst man immer weniger Infektionen (Abb. 55). Neun Wochen nach der Ernte können am Nabel 45% bis 55% der Primär- und

75% der Sekundärinfektionen nachgewiesen werden. Die Vergleichswerte an der Krone bewegen sich zwischen 25% und 45% bei den primär-, resp. 17% bei den sekundär- infizierten Knollen. Nicht nur die Nachweissicherheit wird schlechter, sondern auch die Viruskonzentration in den Knollen nimmt ab. Die anfänglich am Nabel stets höheren Absorptionswerte (0.8 - 1.1) sinken nach 9 Wochen auf das gleiche Niveau, wie an der Krone (0.2 - 0.3).

Nach künstlicher Keimruhebrechung können Blattrollinfektionen mit hoher Reproduzierbarkeit, während längerer Zeit sehr zuverlässig nachgewiesen werden. Die Verbesserung des Virusnachweises wird bereits eine Woche nach der Behandlung erreicht. Sowohl die Nachweissicherheit (Abb. 53-55), wie auch die Viruskonzentration nehmen deutlich zu. Die gemessenen Absorptionswerte sind gegenüber unbehandelten Knollen durchschnittlich zweimal höher (0.4 - 1.1); verglichen mit dem Kronenende werden am Nabel etwas höhere Extinktionen erreicht (Verbesserung um 20% - 30%). Mit zunehmender Inkubationsdauer (6 Wochen nach der Vergasung) ist auch in behandelten Knollen eine abnehmende Viruskonzentration, mit Absorptionswerten im Bereich von 0.4, feststellbar. Die Testsicherheit verschlechtert sich trotz dieser Konzentrationsabnahme nicht, da der Unterschied zu gesunden Knollen mit Absorptionswerten um 0.1 genügend gross bleibt.

Die geringsten Schwierigkeiten bietet der Nachweis von Sekundärinfektionen. Unabhängig vom Ort der Knollensaftentnahme können ab der ersten Woche nach der Rinditebehandlung immer alle infizierten Knollen erfasst werden.

Obwohl auch bei den Primärinfektionen an der ganzen Knolle gegenüber unbehandelten Vergleichproben bessere Resultate erzielt werden, liefert die Untersuchung am Kronenende die besten Testergebnisse. Von der ersten Woche an ist hier die Nachweissicherheit besser als 85% (am Nabelende 60%). Ab der vierten Woche können alle primärinfizierten Knollen zuverlässig nachgewiesen werden (Abb. 55).

Abbildung 45

Einfluss des Infektionszeitpunktes auf die Nachweisbarkeit von PVY in primär und sekundär infizierten Pflanzen (Bintje) ab Blatt, unmittelbar vor der Frühernte (Pflanzenalter = 73 Tage); Feldversuch 1985

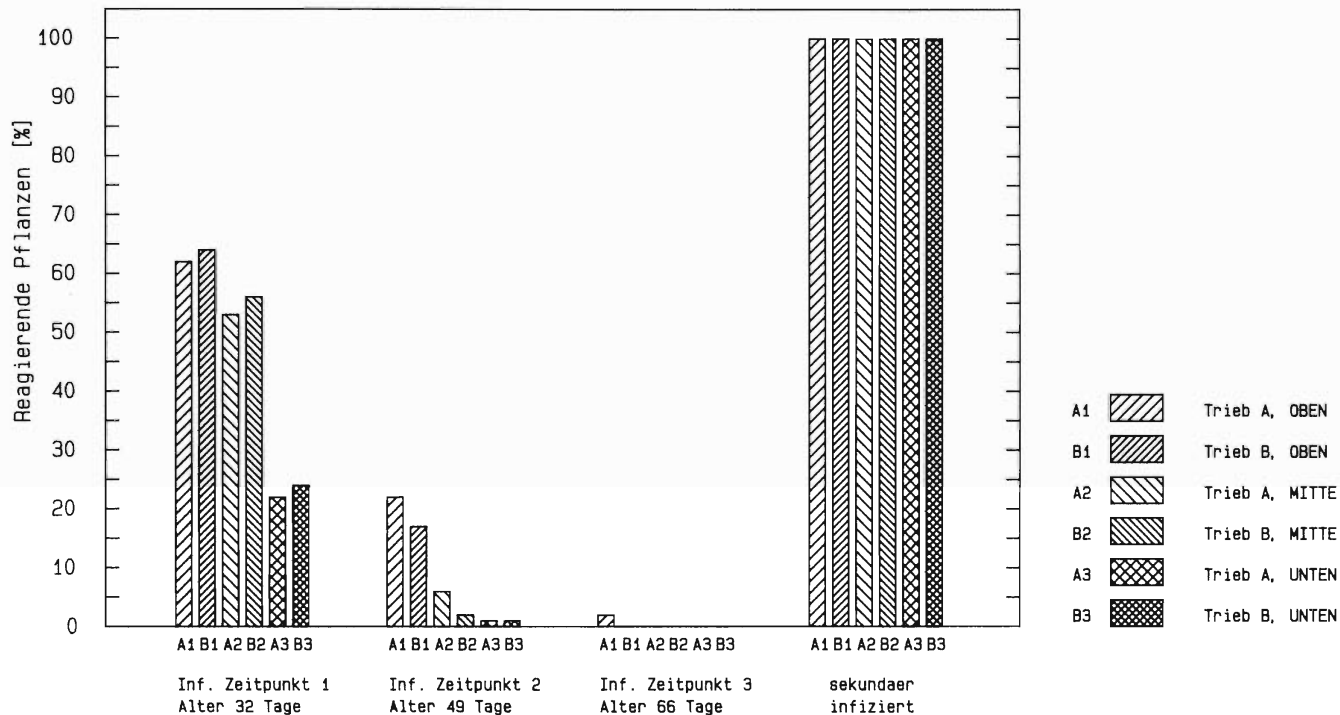


Abbildung 46

PVY-Nachweissicherheit an unbehandelten Knollen sofort nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

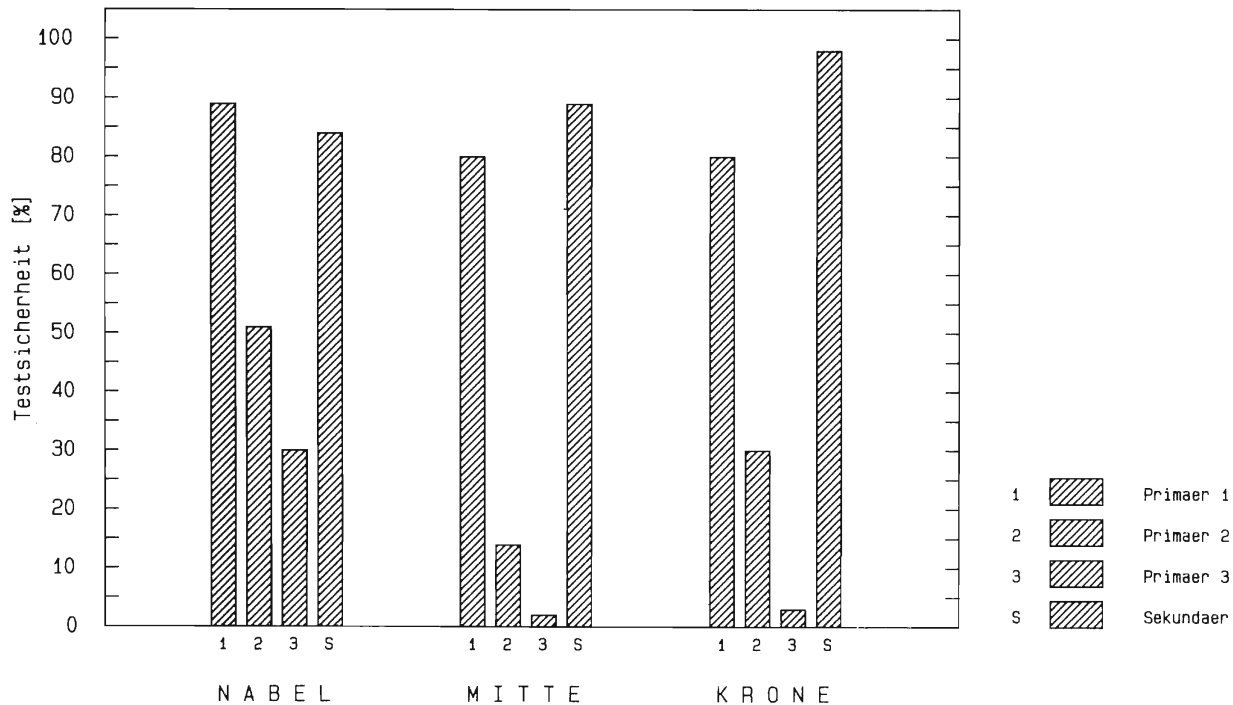


Abbildung 47

PVY - Konzentration in unbehandelten Knollen sofort nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

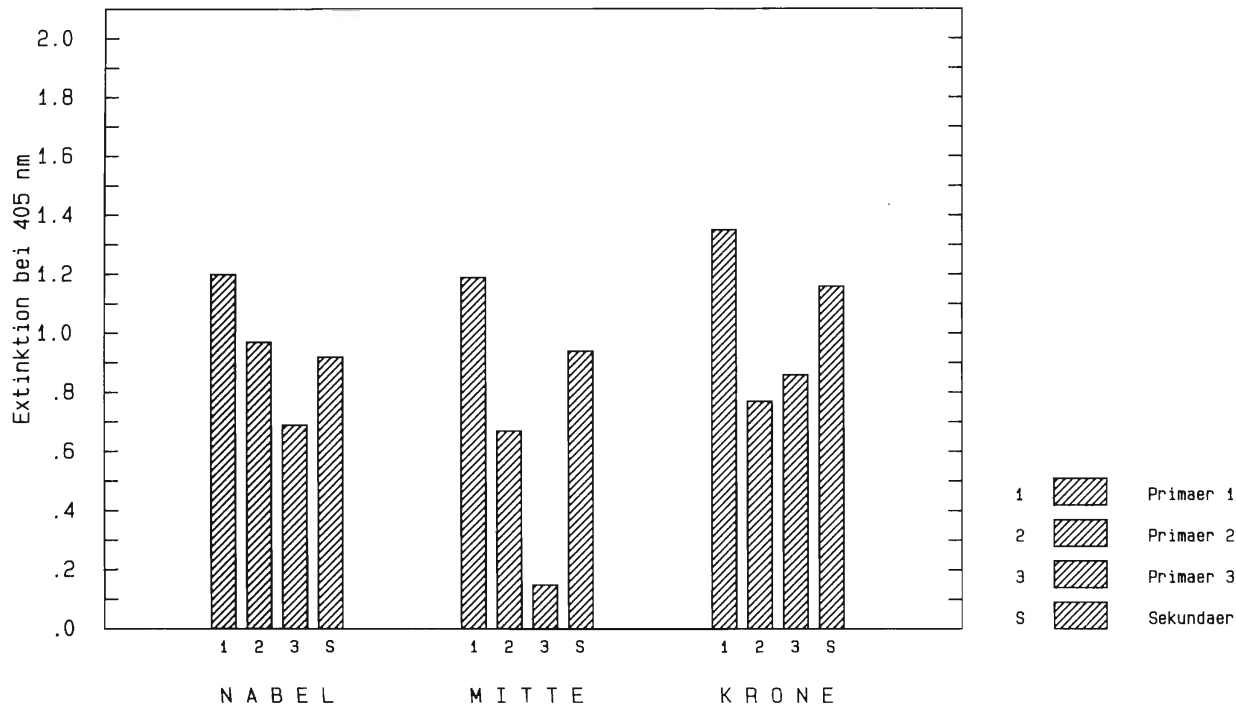


Abbildung 48

PLRV-Nachweissicherheit an unbehandelten Knollen sofort nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

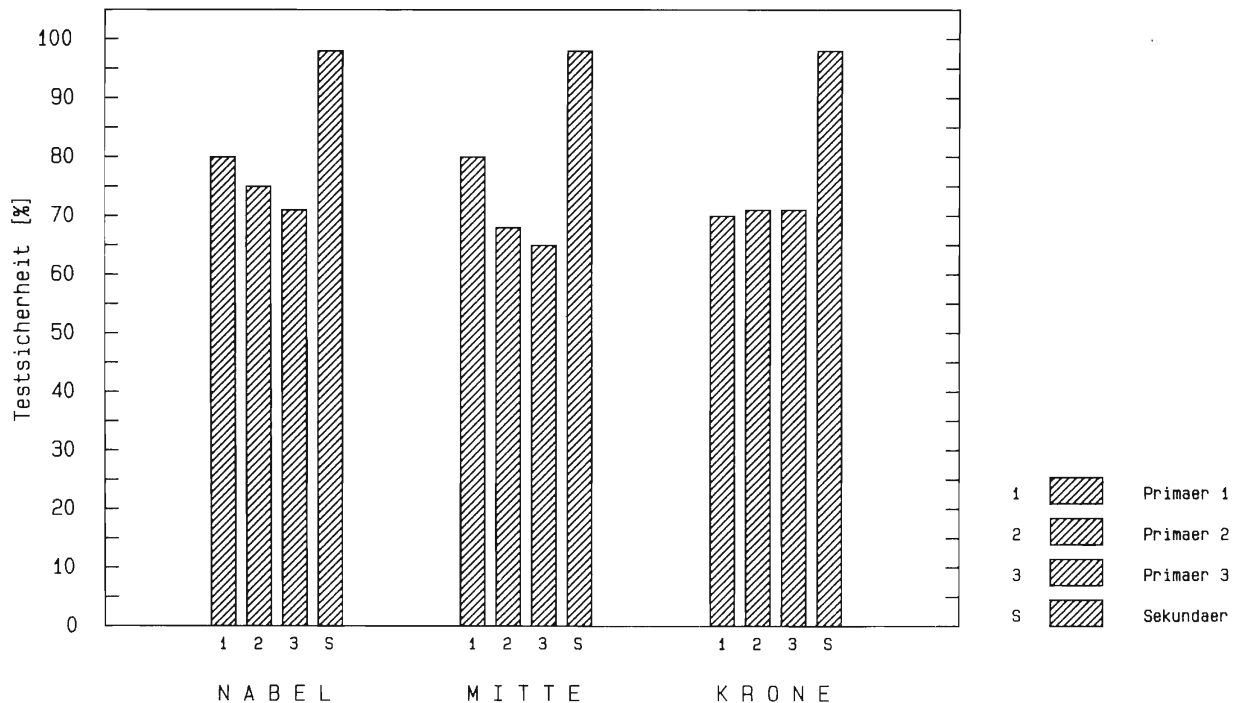


Abbildung 49

PLRV - Konzentration in unbehandelten Knollen sofort nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

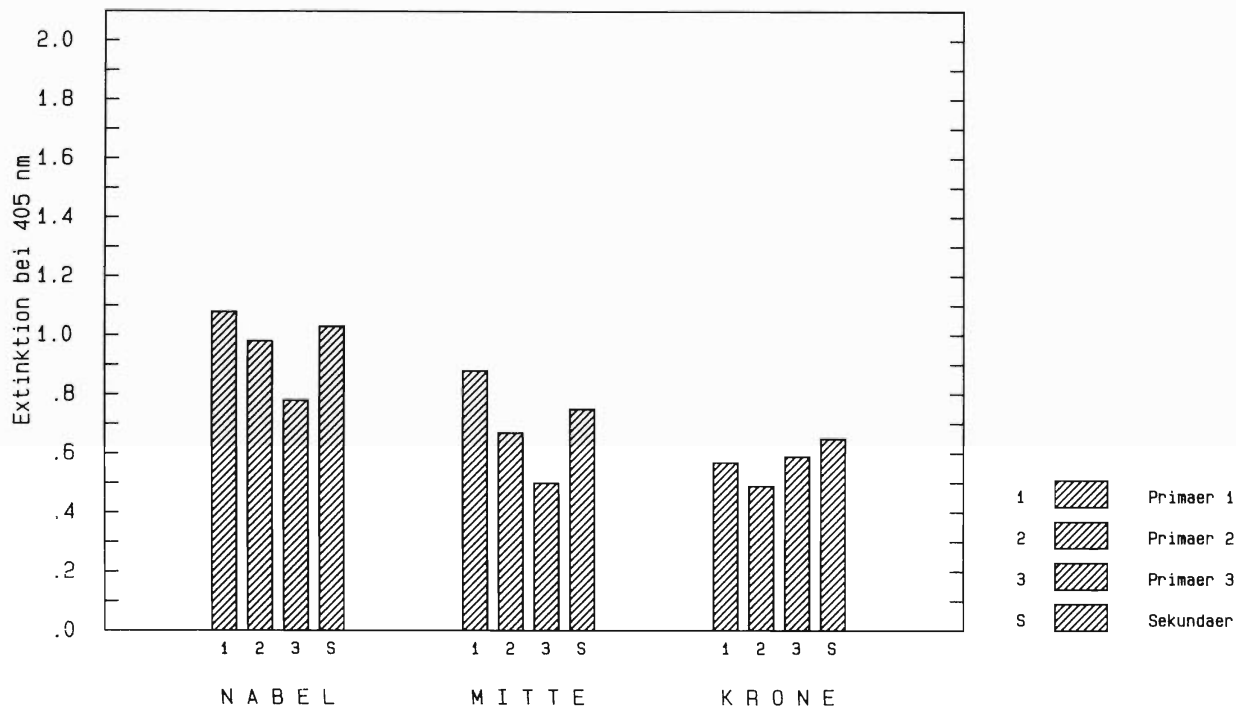


Abbildung 50

PVY-Erfassung am Nabel von vergastem und unvergastem Knollen (Bintje)

Einfluss des Infektionszeitpunktes (Prim. 1, 2, 3, Sek.), Feldversuch 1985

(schwarz = Nachweissicherheit an unvergastem Vergleichsknollen)

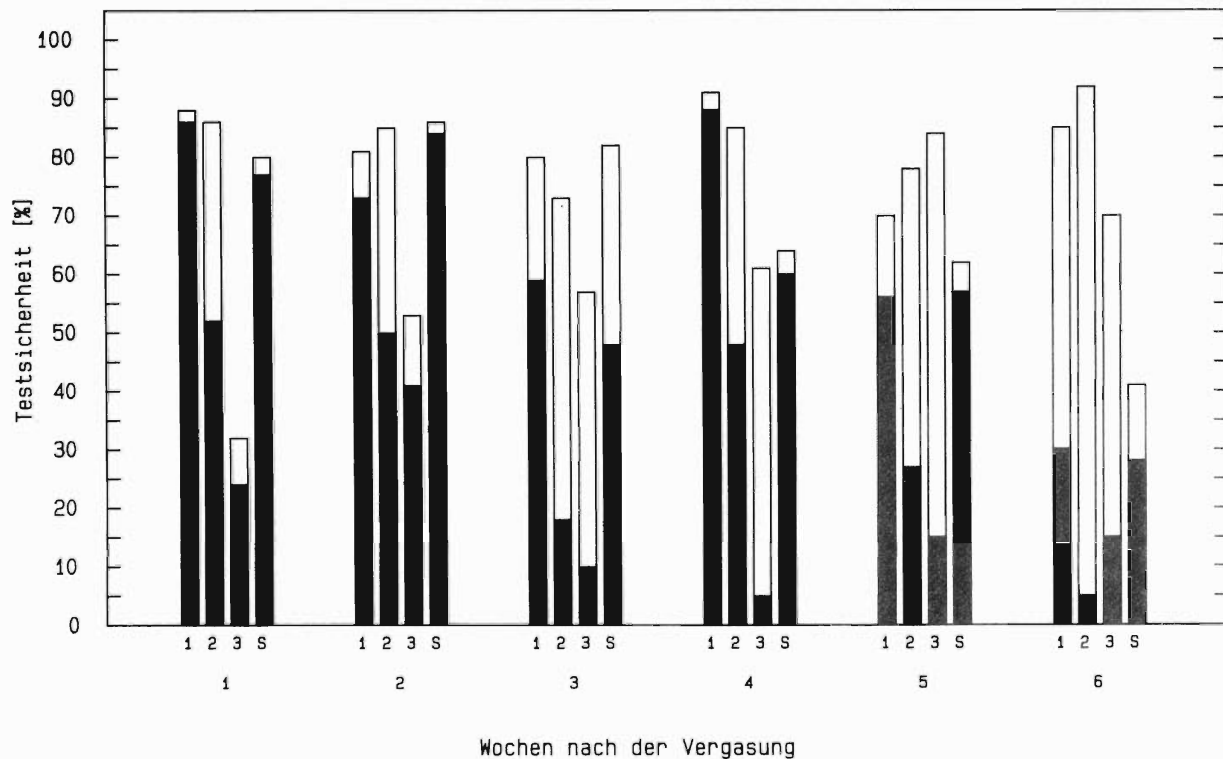


Abbildung 51

PVY-Erfassung in der Mitte von vergasten und unvergasten Knollen (Bintje)
 Einfluss des Infektionszeitpunktes (Prim. 1, 2, 3, Sek.), Feldversuch 1985
 (schwarz = Nachweissicherheit an unvergasten Vergleichsknollen)

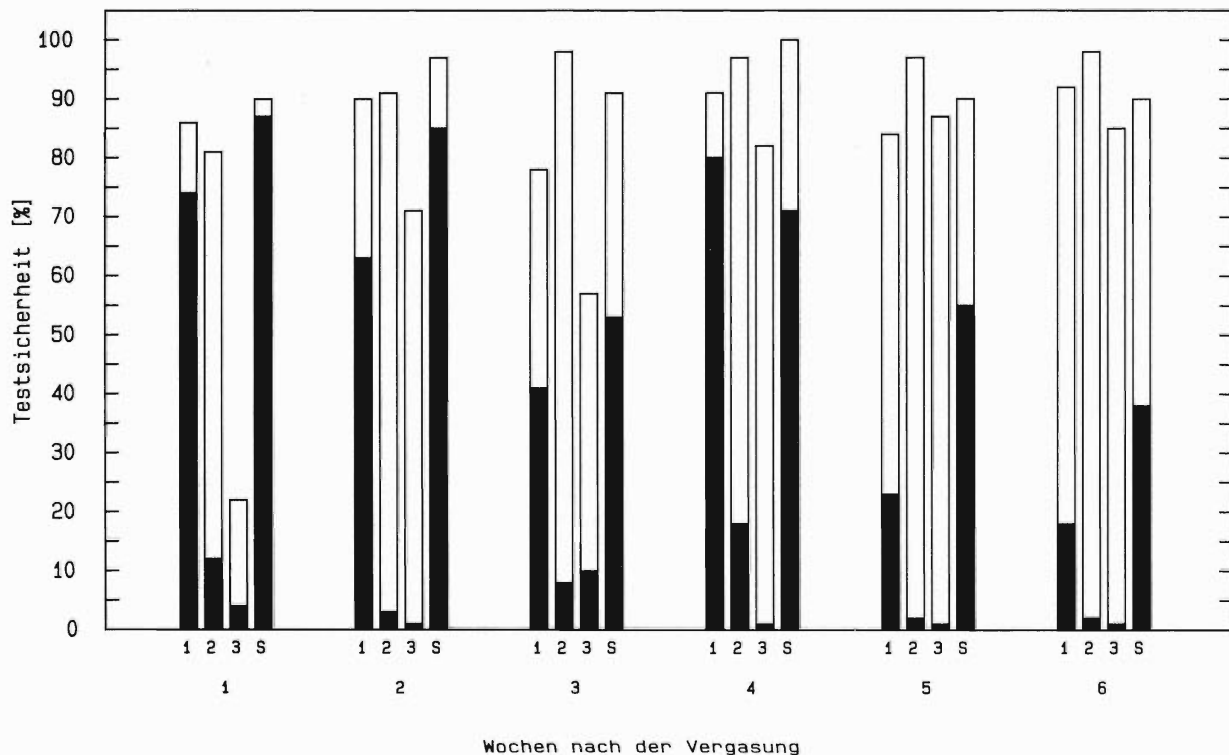


Abbildung 52

PVY-Erfassung an der Krone von vergasten und unvergasten Knollen (Bintje)

Einfluss des Infektionszeitpunktes (Prim. 1, 2, 3, Sek.), Feldversuch 1985

(schwarz = Nachweissicherheit an unvergasten Vergleichsknollen)

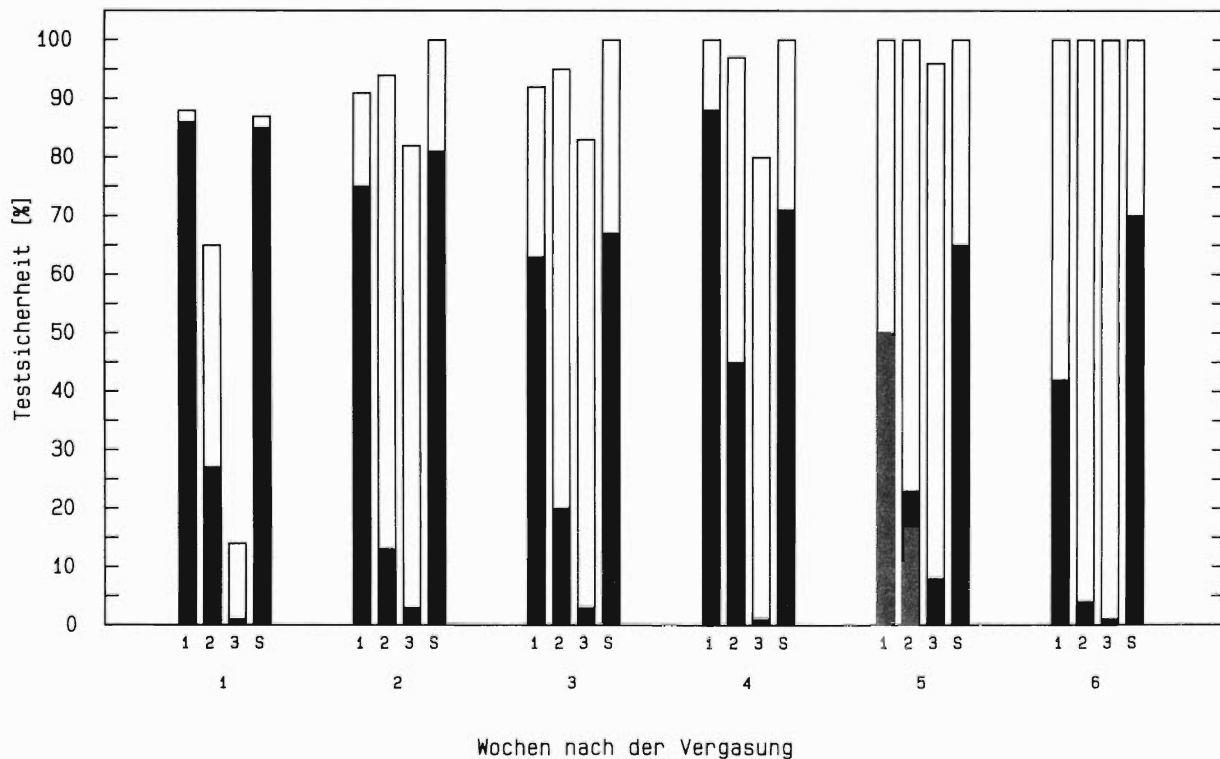


Abbildung 53

PLRV-Erfassung am Nabel von vergasten und unvergasten Knollen (Bintje)

Einfluss des Infektionszeitpunktes (Prim. 1, 2, 3, Sek.), Feldversuch 1985

(schwarz = Nachweissicherheit an unvergasten Vergleichsknollen)

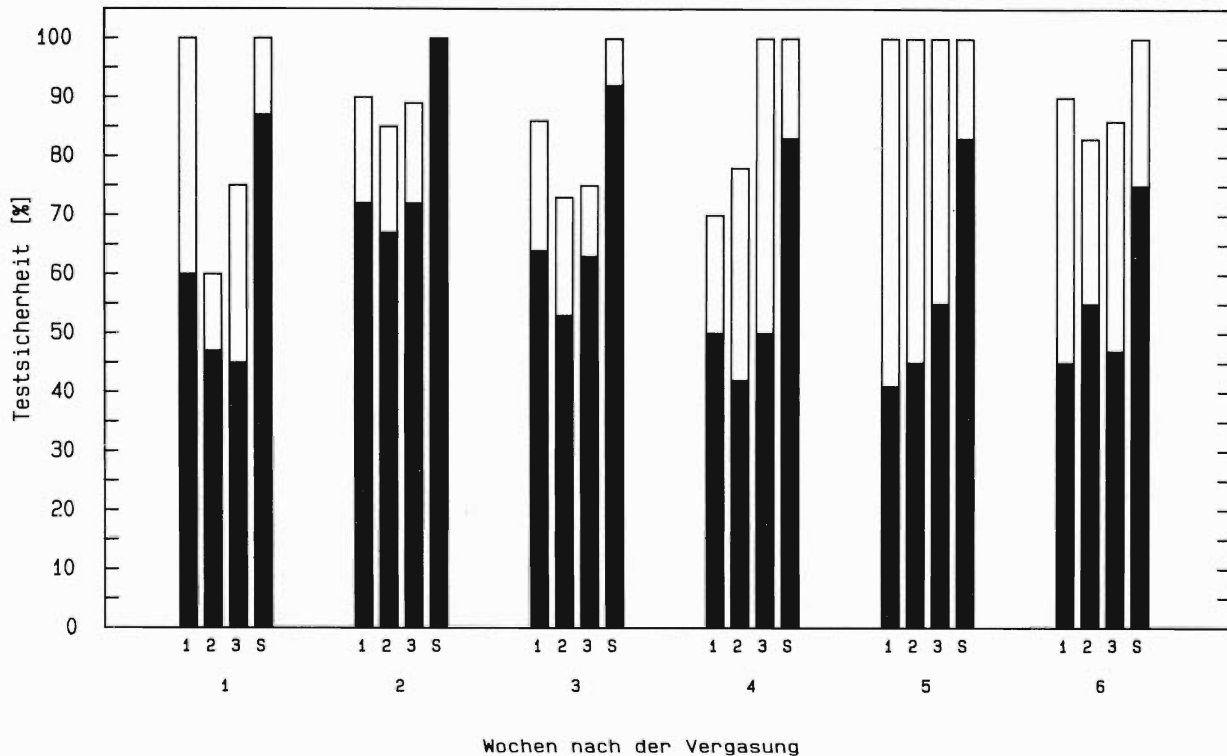


Abbildung 54

PLRV-Erfassung in der Mitte von vergastem und unvergastem Knollen (Bintje)
 Einfluss des Infektionszeitpunktes (Prim. 1, 2, 3, Sek.), Feldversuch 1985
 (schwarz = Nachweissicherheit an unvergastem Vergleichsknollen)

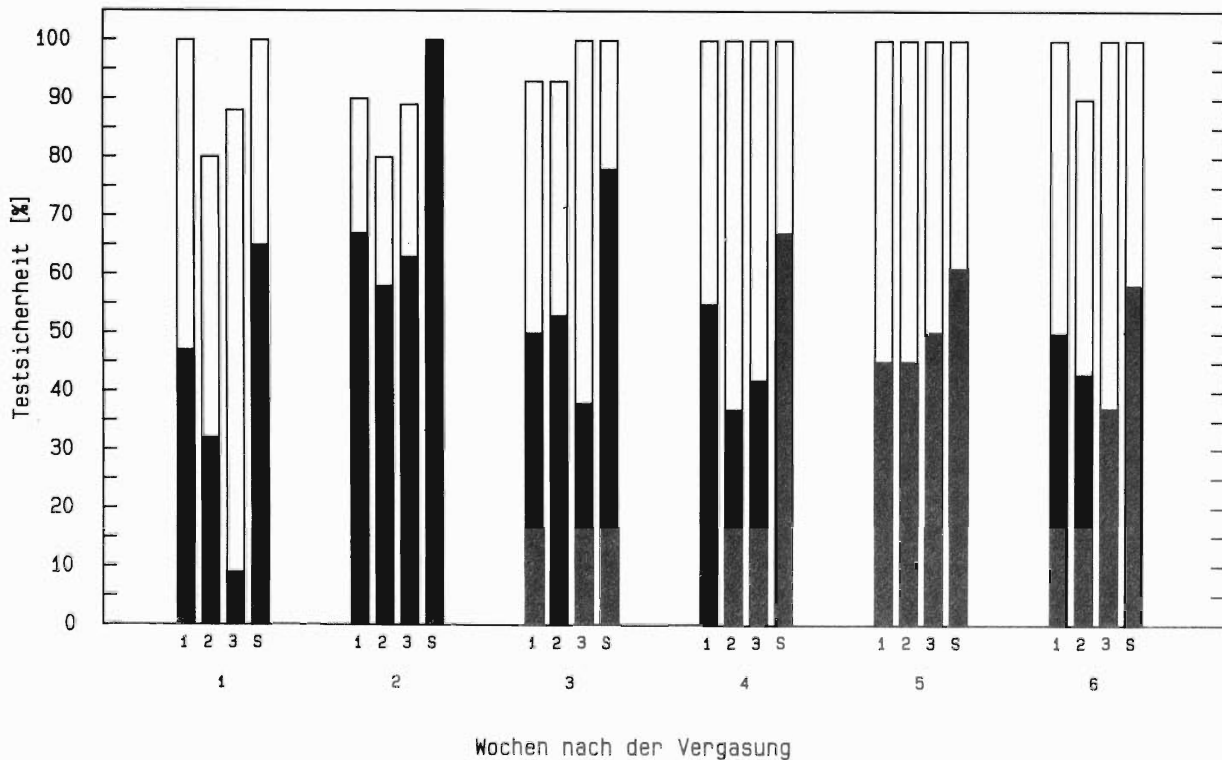
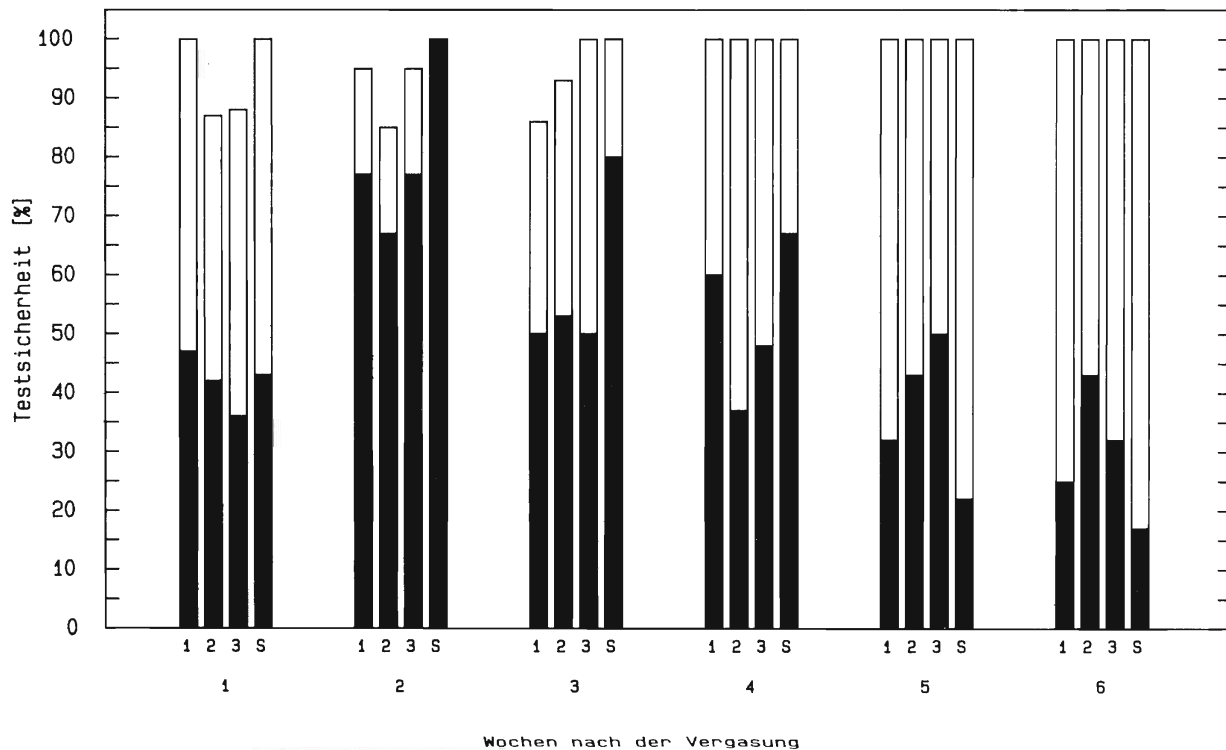


Abbildung 55

PLRV-Erfassung an der Krone von vergasten und unvergasten Knollen (Bintje)
Einfluss des Infektionszeitpunktes (Prim. 1, 2, 3, Sek.), Feldversuch 1985
(schwarz = Nachweissicherheit an unvergasten Vergleichsknollen)



3.2.3. Nachweissicherheit an natürlich keimenden Knollen verschiedener Infektionsgruppen

Nach der Loslösung von der Mutterpflanze bei der Ernte erreichen die Knollen allmählich die volle Keimruhe. Die Dauer der Keimruhe ist sehr unterschiedlich und wird durch Sorteneigenschaften, Reifegrad der Knollen, Lagertemperatur usw. stark beeinflusst. Durch tiefere Lagertemperaturen (4°C) kann die Keimruhe verlängert werden, nach gewisser Zeit gelingt es jedoch nicht mehr, die natürliche Keimung zu verhindern.

Im Rahmen dieses Versuchs wurde auch die Nachweisbarkeit von Infektionen an natürlich keimenden Knollen der verschiedenen Infektionsgruppen untersucht. Die erste Untersuchung erfolgte 160 Tage nach der Ernte. Zu diesem Zeitpunkt hat bei allen Knollenmustern die natürliche Keimung, trotz Lagerung bei 4°C, bereits deutlich eingesetzt.

Die Resultate des Virusnachweises mit Hilfe von ELISA zeigen wiederum das gewohnte Bild. Der Nachweis von PVY (Abb. 56 und 57) gestaltet sich gegenüber PLRV (Abb. 58 und 59) schwieriger, der Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen ist bei den PVY-Infektionen ausgeprägter.

Bei den Untersuchungen an mit Virus Y infizierten Knollen wird der beste Nachweiserfolg bei sekundären und sehr frühen primären Infektionen (Infektionsgruppe 1) registriert. Für die Probensaftentnahme eignet sich das Kronenende der Knolle am besten. An der Basis der Kronenaugen werden 85% der Sekundärinfektionen und 61% der frühen Primärinfektionen (Nachweissicherheit am Nabel beträgt 75% resp. 56%) mit gesichert höheren Viruskonzentrationen erfasst (Abb. 56 und 57). Deutlich schlechtere Testresultate liefern Knollen spätinfizierter Pflanzen. Am Nabel, der für den Nachweis von späten Primärinfektionen am besten geeignet ist, können nur 27% (Krone 15%) resp. 18% (Krone 0%) der infizierten Knollen nachgewiesen werden (Abb. 56).

Sekundäre Blattrollinfektionen können nach überwundener Keimruhe, unabhängig vom Ort der Knollensaftentnahme, hundertprozentig erfasst werden (Abb. 58). Bei der Untersuchung von primären Blattrollinfektionen erreicht man die beste Nachweissicherheit am Kronenende. Ueber 90% der mit Blattroll infizierten Knollen aus den Infektionsgruppen 1 und 2 können an der Basis von apikalen Augen nachgewiesen werden. Bei späten Pflanzeninfektionen (Infektionsgruppe 3) wird der Virusnachweis mit 67% deutlich schlechter (Abb. 58). Der signifikante Einfluss des Infektionszeitpunktes auf den Virusnachweis macht sich auch bei der Untersuchung am Nabelende bemerkbar. Späte Infektionen verursachen eine Abnahme der Testsicherheit (Abb. 58). Während in der Infektionsgruppe 1 75% der infizierten Knollen erfasst werden, sinkt die Nachweisrate in den Infektionsgruppen 2 und 3 auf 65% resp. 58%.

Nach der 160-tägigen Lagerung bei 4°C erfolgte eine zusätzliche Aktivierung der natürlichen Keimung durch die weitere Inkubation der Knollen bei 22°C. Zu Vergleichszwecken wurde gleichzeitig ein Teil der Knollen einer zusätzlichen Behandlung mit Rindite unterworfen. Nach einer vierwöchigen Inkubation bei 22°C haben die Keime aller Knollen, unabhängig von der Art der Keimruhebrechung, eine Länge von 12 bis 18 mm erreicht. Die Testierung mit Hilfe von ELISA zeigt, dass mit der fortschreitenden natürlichen Keimung und der damit verbundenen Aktivierung des Knollenmetabolismus zwar auch eine Verbesserung des Virusnachweises an Knollen aller Infektionsgruppen festgestellt werden kann, für einen zuverlässigen Virusnachweis reicht jedoch die natürliche Keimruhebrechung nicht aus. Vor allem für die vollständige Erfassung der späten PVY-Primärinfektionen ist eine zusätzliche künstliche Aktivierung mit Rindite unumgänglich.

In den Abbildungen 60 und 61 sind die Resultate des Virusnachweises an mit Rindite behandelten resp. unbehandelten PVY-infizierten Knollen, nach 4-wöchiger Inkubation bei 22°C im Anschluss an die Lagerung

während 160 Tagen dargestellt. In unbehandelten Knollen können trotz der deutlich verbesserten Nachweissicherheit nicht alle infizierten Knollen erfasst werden. Der Testerfolg bleibt weiterhin vom Ort der Knollensaftentnahme und vor allem vom Infektionszeitpunkt stark abhängig. Während an der Basis der apikalen Augen 90% der frühen primären und sekundären Infektionen erfasst werden, sinkt die Nachweissicherheit an spätinfizierten Knollen auf 38%. Durch die künstliche Keimruhebrechung mit Rindite wird der Virusnachweis vom Infektionszeitpunkt unabhängig. Vier Wochen nach der Behandlung können sowohl am Nabel- wie auch am Kronenende über 96% der Virusinfektionen nachgewiesen werden (Abb. 60). Die Testsicherheit wird dabei durch die erhöhten Viruskonzentrationen weiter verbessert (Abb. 61). Ungeachtet der Tatsache, ob die Keimruhe auf natürliche oder künstliche Art gebrochen wurde, zeigt die Untersuchung direkt am Keim die höchsten Viruskonzentrationen (Abb. 61). Die erhöhte Nachweissicherheit ist vor allem gegenüber der Testierung an unbehandelten Knollen von Bedeutung (Abb. 60).

Die Zuverlässigkeit des Nachweises von PLRV an bereits keimenden, infizierten Knollen kann durch eine zusätzliche künstliche Keimruhebrechung massgeblich verbessert werden (Abb. 62 und 63). In der zweiten Woche nach der Behandlung mit Rindite stellt man in allen Infektionsgruppen einen sprunghaften Anstieg der Nachweissicherheit und der Viruskonzentration fest. Nach 18-tägiger Inkubation können alle Blattrollinfektionen zuverlässig nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Testsicherheit erreicht man bei der Untersuchung an unbehandelten Knollen erst 2 Wochen später, wobei die gemessenen Extinktionswerte gegenüber behandelten Knollen deutlich tiefer bleiben.

Die Nachweisbarkeit von PLRV ist bei der direkten Verwendung der Keime ausgezeichnet. Unabhängig von der Art der Keimruhebrechung können dank der Herstellung des Probensaftes aus Keimen alle infizierten Knollen zuverlässig erfasst werden.

3.3. Infektionserfolg bei den Knollen primärer und sekundärer infizierter Pflanzen

Der Zeitpunkt der Pflanzeninfektion im Feld beeinflusst nicht nur die Nachweisbarkeit der Viren entscheidend. Auch der tatsächliche Virusbefall der einzelnen Pflanzen bzw. die Einwanderung der Viren in die Tochterknollen stehen in direkter Beziehung zum Infektionszeitpunkt. Dies überrascht nicht, wenn man bedenkt, dass die Virusaufnahme, Viruswanderung und die Virusvermehrung eng mit der physiologischen Aktivität der Pflanzen zusammenhängen. Der höchste Virusbefall ist bei frühen Infektionen zu erwarten. Einerseits verfügen die jungen Pflanzen über eine sehr hohe Stoffwechselaktivität, andererseits ist auch die Zeitspanne zwischen der Infektion und der Ernte am längsten; während dieser Zeit können sich die Viren optimal vermehren und in der ganzen Pflanze verteilen.

Die Verwendung nummerierter Pflanzen und Knollen der einzelnen Infektionsgruppen ermöglichte, dass nach Abschluss der Untersuchungen über die Virusnachweisbarkeit auch Schlussfolgerungen in Bezug auf den Infektionserfolg der Pflanzen und deren Tochterknollen gezogen werden konnten. Der Anteil erfolgreich infizierter Pflanzen und Knollen bei Sekundärinfektionen resp. gestaffelten Primärinfektionen ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

Infektionsgruppe	Infektionserfolg bei			
	PVY-Pflanzen	PVY-Knollen	PLRV-Pflanzen	PLRV-Knollen
Sekundär	100 %	98 %	100 %	91 %
Primär - 1	98 %	76 %	96 %	62 %
Primär - 2	91 %	81 %	98 %	67 %
Primär - 3	91 %	62 %	85 %	40 %

Tabelle 2: Einfluss des Infektionszeitpunktes auf den Infektionserfolg

Die Ergebnisse basieren auf einjährigen Erhebungen und sind daher nur als Tendenzen aufzufassen. Der Virusbefall und die Virusverteilung sind von verschiedenen Variablen, wie Datum der Infektion, Temperaturschwankungen, Pflanzenalter und Inkubationsdauer bis zu der Ernte, abhängig. Die Untersuchungen an der Sorte Bintje zeigen, dass in jungem Zustand praktisch alle Pflanzen erfolgreich infiziert werden können. Bei späten Primärinfektionen macht sich die Altersresistenz bemerkbar, es werden deutlich weniger Pflanzen von einem Virus befallen. Betrachtet man den Anteil an infizierten Tochterknollen innerhalb der jeweiligen Infektionsgruppen, so bemerkt man eine sehr ausgeprägte Abnahme der infizierten Knollen bei den Spätinfektionen. Mit zunehmendem Alter der Pflanzen ist also eine Infektion noch gut möglich, die Abwanderung der Viren in die Knollen wird aber bereits stark verlangsamt.

Informativer als die Angabe des Durchschnittbefalls der Knollen einer Infektionsgruppe ist die Betrachtung der Knolleninfektionen innerhalb jeder einzelnen Pflanze. In den Abbildungen 64 und 65 ist die Häufigkeitsverteilung des Anteils PVY- resp. PLRV-infizierter Knollen einer Staude der verschiedenen Infektionsgruppen dargestellt. In PVY- und PLRV-sekundär infizierten Pflanzen und bei mehr als 50% der mit PVY früh infizierten Stauden sind sämtliche Tochterknollen vom Virus befallen.

Späte PVY-Primärinfektionen führen zwar weiterhin bei mehr als 90% der infizierten Stauden zu Virusbefall an Tochterknollen, dabei wird jedoch nur noch ein kleiner Teil der Knollen einer Pflanze infiziert. Ein ähnliches Verhalten ist auch bei PLRV feststellbar, obwohl der Anteil an infizierten Tochterknollen allgemein geringer ist. Während die früh infizierten Stauden zu vorwiegend infizierten Knollen führen, variiert bei Spätinfektionen der Anteil an virusbefallenen Tochterknollen einer Pflanze gleichmässig zwischen 0% und 100%.

4. GEWAECHSHAUSVERSUCH 1986

Die Wanderung und Vermehrung der Viren wurde bei Sekundärinfektionen (PVY und PLRV) resp. bei zeitlich gestaffelten PVY-Primärinfektionen mit Hilfe von ELISA untersucht. Um eine Gesamtübersicht über die Virusausbreitung während der Vegetationsperiode zu erhalten, erfolgte der Virusnachweis in allen Organen der Pflanze. Die Untersuchungen an den im Gewächshaus einstengelig angezogenen Pflanzen wurde, von der 3. Woche an, in einwöchigen Abständen bis zu der 15. Alterswoche durchgeführt.

4.1. Verteilung von PVY und PLRV in sekundär infizierten Pflanzen

Unabhängig vom Pflanzenalter und vom untersuchten Organ können die Blattrollinfektionen bei sekundär infizierten Pflanzen bis zu der 15. Alterswoche vollständig (Nachweis-sicherheit immer 100%) und in hoher Viruskonzentration (Extinktionswerte Wurzel: 1.2 ± 0.5 ; Stengel: 1.3 ± 0.5 ; Blätter: 1.5 ± 0.5 ; Mutterknolle: 1.6 ± 0.5 ; Tochterknolle: 1.2 ± 0.5) nachgewiesen werden. Die PLRV-Erfassung ist also auch in Wurzel, Mutterknolle, Stolonen und neugebildeten Knollen sehr gut möglich.

PVY lässt sich während der gesamten Vegetationsperiode sehr sicher und bei unverändert hohen Extinktionswerten in Stolonen (1.5 ± 0.6), Stengeln (1.4 ± 0.6) und Blättern (1.8 ± 0.5) sekundär infizierter Pflanzen nachweisen. Lediglich in der 14. und 15. Alterswoche sank die Nachweissicherheit in Stolonen auf 80% bis 90%. Für die Durchführung des Tests ist es dabei unbedeutend, welcher Stengelabschnitt resp. welches Blatt für die Presssafterstellung verwendet wurde. Auch in der

Mutterknolle ist der Nachweis bis zum altersbedingten Knollenzerfall sehr zuverlässig. Bis zur achten Untersuchungswoche werden zwischen 80% bis 100% der infizierten Knollen erfasst.

Ab der 8. Woche konnten auch die neu gebildeten Tochterknollen, von Stolonen getrennt, untersucht werden. Im ELISA ab Knolle beträgt der Anteil an erfassten Virusinfektionen 80% bis 100%, bei grösseren Knollen stellt man bei der Untersuchung am Kronenende höhere Viruskonzentrationen (Extinktionwerte am Nabel: 1.0 ± 0.6 ; Krone: 1.4 ± 0.6) fest.

Der Nachweis von PVY in der Wurzel ist unregelmässig und stark vom Pflanzenalter und der untersuchten Wurzelzone abhängig. Die stengelnahen (=ältesten) Wurzelabschnitte zeigen die besten Ergebnisse und die höchsten Viruskonzentrationen. In den ersten sieben Wochen konnten bei den jungen Pflanzen in den ältesten Wurzelzonen bis zu 100% der Virusinfektionen nachgewiesen werden. Der entsprechende Virusnachweis in den Wurzelspitzen zeigte eine Abnahme der Testsicherheit um bis zu 50%. Ab der achten Alterswoche wurde der Nachweis von PVY in der Wurzel allgemein unzulänglich. Mit fortschreitendem Pflanzenalter machte sich vermehrt eine abnehmende Testsicherheit und Viruskonzentration bemerkbar. Im Gegensatz zu Blattrollinfektionen, bei denen der Nachweis in der Wurzel während der ganzen Vegetationsperiode hundertprozentig war, konnten von der 11. Woche an überhaupt keine PVY-Infektionen mehr in der Wurzel nachgewiesen werden.

4.2. PVY-Verteilung bei zeitlich gestaffelten Primärinfektionen

Die Untersuchungen über die Nachweisbarkeit von PVY in verschiedenen Organen wurden an zwei Pflanzengruppen durchgeführt, bei denen die künstliche Infektion mit PVY an

2 resp. 8 Wochen alten Pflanzen erfolgte. Zum Zeitpunkt der frühen Infektion hatten die Pflanzen durchschnittlich 5 Blätter, bei der Spätinfektion durchschnittlich 15 Blätter ausgebildet. In der Gruppe der früh infizierten Pflanzen betrug die weitere Zuwachsrate 10 bis 11 Blätter. Dagegen konnte bei späten Primärinfektionen altersbedingt nach der Infektion praktisch kein Zuwachs an Blättern mehr festgestellt werden. Die ELISA-Ergebnisse des Virusnachweises sind in den Tabellen 3 (frühe Primärinfektionen) und 4 (späte Primärinfektionen) zusammengefasst.

4.2.1. Frühe Primärinfektionen

In den ersten zwei Wochen nach der Infektion ist der Virusnachweis an der Pflanze unzulänglich. PVY ist vorläufig nur im inokulierten Blatt lokalisiert, ein Teil der Infektionen (35% - 85%) kann hier nachgewiesen werden.

In der dritten Untersuchungswoche macht sich eine starke Verbesserung des Virusnachweises bemerkbar. Im inokulierten Blatt erhöht sich die Nachweisrate auf 100%. Zusätzlich ist PVY auch in neu gebildeten Blättern (85%), Stengel (70% - 100%) und Stolonen (90%) gut nachweisbar. Vor der Inokulation bereits ausgewachsene Blätter, die sich in der unmittelbaren Nachbarschaft des infizierten Blattes befinden und auch die Wurzel sind zum grossen Teil virusfrei.

Von der vierten Woche nach der Infektion an bleibt der Virusnachweis während der ganzen Vegetationsperiode sowohl im inokulierten Blatt, wie auch in neu gebildeten Blättern, Stolonen und im Stengel hundertprozentig. Die zum ersten Mal von den Stolonen getrennt untersuchten Tochterknollen sind bereits zum grossen Teil (70%) vom Virus befallen. Mit fortschreitendem Pflanzenalter wird PVY in allen Tochterknollen nachweisbar, wobei sich für die Untersuchung stets das Nabelende der Knollen als besser geeignet erweist.

Test- Woche	Wurzel		Stol.	Mutter- knolle	Tochterknolle		Stengel			BLATT (Pos. von unten nach oben, I=inf. Blatt)					
	Oben	Unten			Nabel	Krone	Oben	Mitte	Unten	1	I	3	4	5	6-16
1	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	35	0	0	0	0
2	0	0	0	0	-	-	0	17	0	0	85	0	0	0	0
3	30	60	90	0	-	-	70	80	100	30	100	25	50	75	85
4	65	70	100	0	70	70	100	100	100	25	100	40	90	100	100
5	33	50	100	45	70	70	100	100	100	33	100	30	70	100	100
6	85	100	100	35	90	75	100	100	100	100	100	35	70	100	100
7	0	0	70	40	90	80	100	100	100	100	100	40	70	100	100
8	10	10	100	-	100	90	100	100	100	100	100	50	90	100	100
9	0	0	100	-	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	0	0	100	-	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11	0	0	100	-	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 3: Ausbreitung von PVY in der Pflanze bei fruehen Primaerinfektionen, Pflanzenalter bei der Infektion = 2 Wochen (% erfasster Infektionen im ELISA)

Test- Woche	Wurzel	Stol.	Knolle	Stengel			B L A T T (Position von unten nach oben, I = inf. Blatt)											
				Oben	Mitte	Unten	1	2	3-7	8	9	10	11	12	I	14	15	16
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	80	0	0	0
2	0	16	0	40	100	80	20	20	20	0	0	60	80	60	100	40	20	20
3	0	25	0	100	100	100	20	0	0	20	20	60	80	80	100	80	60	80
4	0	60	0	100	100	100	20	0	0	80	80	100	100	100	100	100	100	100
5	0	71	0	100	100	100	20	0	0	40	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0	84	0	100	100	100	20	20	0	40	80	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 4: Ausbreitung von PVY in der Pflanze bei späten Primaerinfektionen, Pflanzenalter bei der Infektion = 8 Wochen (% erfasster Infektionen im ELISA)

Die Einwanderung der Viren in die Knollen kann auch an den ursprünglich gesunden Mutterknollen festgestellt werden. In der fünften bis siebten Untersuchungswoche zeigen durchschnittlich 40% der Mutterknollen im ELISA positive Ergebnisse; der fortschreitende Zerfall der Knollen verunmöglichte weitere Aussagen über den Verlauf der Infektion.

Betrachtet man die Einwanderung der Viren in die bereits vor der Inokulation ausgebildete Blätter, so stellt man eine Virusausbreitung in beide Richtungen fest; sowohl ein Teil (ca. 30%) der oberen, wie auch der unteren Nachbarblätter wird ab der dritten Woche vom Virus befallen. Bei den weiteren Untersuchungen fällt jedoch die schnellere Viruseinwanderung in die unteren Nachbarblätter auf: 6 Wochen nach der Infektion hat PVY alle unteren Blätter befallen. Die oberen, bereits vor der Infektion ausgebildeten Nachbarblätter, reagieren im gleichen Ausmass erst 3 Wochen später; von der neunten Untersuchungswoche an ist der Nachweis von PVY in allen Pflanzenorganen, ausgenommen der Wurzel, zu 100% möglich.

In der Wurzel erreicht die Virusnachweisbarkeit 6 Wochen nach der Infektion ihren Höhepunkt. Im unteren Wurzelteil, der für den Virusnachweis stets besser geeignet ist, kann hundertprozentiger Virusbefall festgestellt werden. Nach dem Erreichen dieses Maximums geht die Nachweisbarkeit schlagartig zurück, der Nachweis in der Wurzel fällt bis zum Ende der Vegetationsperiode negativ aus.

4.2.2. Späte Primärinfektionen

Zum Zeitpunkt der späten Infektion haben die Pflanzen ihr Wachstum praktisch abgeschlossen, alle Organe waren bereits gut ausgebildet. Eine Woche nach der Infektion ist der Virusnachweis nur im inokulierten Blatt möglich. Die Nachweissicherheit am infizierten Blatt beträgt 80%, sie ist also verglichen mit den frühen Primärinfektionen

(Nachweissicherheit=35%) bedeutend höher.

Ab der zweiten Woche nach der Infektion erreicht die Nachweissicherheit am infizierten Blatt 100% und das Virus ist zum ersten Mal ausserhalb des inokulierten Blattes nachweisbar. Vor allem unterhalb der Infektionsinsertion kann das PVY in Blättern (60% - 80%) und im Stengel (80% - 100%) gut erfasst werden.

Während der weiteren Wochen dringt das Virus in entferntere Teile der Pflanze vor, dies sowohl oberhalb wie auch unterhalb der Infektionsstelle. Drei Wochen nach der Infektion ist der Virusnachweis im ganzen Stengel, eine Woche später auch in den 6 bis 7 obersten Blättern (Zentrum = inokuliertes Blatt), hundertprozentig. Ein Vordringen des Virus in die weit entfernten unteren Blätter (Blattposition 1-7), sowie in die unterirdischen Pflanzenteile, ausgenommen der Stolonen, konnte jedoch bis zur Pflanzenabreife mit Hilfe von ELISA nicht nachgewiesen werden.

Die Einwanderung der Viren in die Stolonen ist bereits ab der zweiten Untersuchungswoche zu beobachten. Bis zum Abschluss des Versuches steigt die Nachweissicherheit in Stolonen kontinuierlich von 16% auf 84%. Trotz der Viruseinwanderung in die Stolonen zeigt die ELISA-Untersuchung an den Tochterknollen immer negative Resultate; genauso gelingt es bis zur letzten Untersuchungswoche nicht, in der Wurzel das PVY nachzuweisen.

4.2.3. Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass für die Ausbreitung der Viren nach erfolgter Primärinfektion vor allem der Entwicklungszustand der Pflanzen zum Zeitpunkt der Infektion von grosser Bedeutung ist. Der beste Nachweis ist in ober- und unterirdischen Organen möglich, die erst nach der erfolgten Infektion neu gebildet wurden oder zumindest noch im weiteren Aufbau standen. So konnte PVY immer zuverlässig

bei neu gebildeten Blättern, wie auch in Stolonen und Knollen, die erst nach der Infektion ausgebildet wurden (frühe Primärfektionen), nachgewiesen werden. Bei späten Infektionen blieben die gleichen Organe ganz oder zumindest während längerer Zeit weitgehend virusfrei, sofern sie bereits vor der Infektion ausgebildet waren. Diese Unterschiede überraschen nicht, wenn man bedenkt, dass die Viren nicht in ruhenden, sondern in stoffwechselaktiven, wachsenden Geweben vermehrt werden.

Zu grundsätzlich gleichen Schlussfolgerungen kam auch Vulic (Vulic et al., 1963b), der die Ausbreitung und die Konzentration von PVY bei zeitlich gestaffelten Primärfektionen mit Hilfe von A6-Test und Serologie untersuchte. Der beim genannten Autor geschilderte unzulängliche Virusnachweis in der Serologie (Präzipitationstest) konnte durch die Anwendung der hochempfindlichen ELISA-Methode widerlegt werden. Die bedeutend höhere Empfindlichkeit gegenüber herkömmlicher Serologie und A6-Test wird auch durch die Arbeit von Gugerli (Gugerli, 1979b) bestätigt. In seiner Arbeit berichtet Gugerli über eine 10-tägige Zeitspanne zwischen Inokulation und Untersuchungszeitpunkt, die benötigt wird, bis die minimale Viruskonzentration für den Nachweis mit ELISA in nicht inokulierten Organen der jungen Pflanze erreicht wird. Die Resultate von Gugerli zeigen im weiteren, dass der PVY-Nachweis in primärinfizierten jungen Knollen zum Zeitpunkt der Ernte ungenügend sein kann.

Mit dem Nachweis von Viren in Kartoffelpflanzen haben sich auch andere Autoren beschäftigt. In einem Gewächshausversuch mit eintriebigen Pflanzen stellt Munzert (Munzert et al., 1981) in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen eine sichere Nachweisbarkeit von PVY in Blättern, Stengel, Stolonen und Tochterknollen fest. Während unsere Untersuchungen auch an Mutterknollen bis zum altersbedingten Knollenzerfall gute Nachweissicherheit zeigen, gelingt Munzert der PVY-Nachweis an Mutterknollen nicht. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen berichtet Munzert im

weiteren über altersbedingte Wechsel in der Viruskonzentration. Mit zunehmendem Pflanzenalter steigt die Viruskonzentration und nimmt nach dem Erreichen eines Maximums in der 5. bis 6. Alterswoche wieder deutlich ab. Bei unseren Versuchen konnten wir während 15 Wochen keine signifikante altersbedingte Aenderungen der Extinktionswerte in den verschiedenen untersuchten Organen, ausgenommen der Wurzel, feststellen. Obwohl auch bei uns die höchsten Viruskonzentrationen in Blättern gemessen wurden, sind die Unterschiede zu Stengel, Stolonen und Tochterknollen nicht so deutlich. Lediglich in der Wurzel zeigen auch unsere Ergebnisse mit zunehmendem Pflanzenalter eine deutliche Abnahme der Viruskonzentration. Ab der 8. Alterswoche konnte PVY in der Wurzel nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Untersuchungsergebnisse von Daniel (Daniel et al., 1982) bestätigen unsere Beobachtungen und zeigen, dass PLRV mit ELISA an allen sekundärinfizierten Pflanzenteilen nachgewiesen werden kann. Die bei unseren Versuchen in den verschiedenen Pflanzenteilen festgestellten Viruskonzentrationen zeigen während der ganzen Vegetationsperiode keine deutlichen Konzentrationsverschiebungen, was im Widerspruch zu den Befunden von Daniel steht. In der Arbeit von Daniel sind die Extinktionswerte stark vom verwendeten Pflanzenteil und vom Untersuchungszeitpunkt abhängig. Ueber unterschiedliche Viruskonzentrationen berichten auch andere Autoren (Tamada et al., 1980; Casper, 1977b). Ihre Beobachtungen stehen jedoch zueinander teilweise im Widerspruch.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Unter natürlichen Bedingungen können im Feld laufend unkontrollierte Primärinfektionen der Pflanzen stattfinden. Der Zeitpunkt der Infektion und das infizierte Blatt bleiben dabei unbekannt. Der routinemässige Nachweis einer erfolgten Primärinfektion ist am sichersten, wenn für die Herstellung

des Presssaftes die obersten, voll ausgebildeten Blätter verwendet werden. Eine zusätzliche Untersuchung an den Stolonen gibt Auskunft, wie weit das Virus bereits in die Pflanze vorgedrungen ist.

Die Virusverteilung und Vermehrung ist ein zeitabhängiger Prozess. Die grössten Konzentrationen findet man dort, wo neue Zellen und Gewebe gebildet werden. Beim Nachweis von späten Primärinfektionen an der Pflanze muss man daher berücksichtigen, dass es wegen der geringen Viruskonzentration vereinzelt zum Versagen des ELISA-Verfahrens führen kann. Einerseits ist die Zeitspanne zwischen dem Infektions- und Untersuchungszeitpunkt zu kurz. Andererseits sind die Stoffwechselaktivität und damit auch die Virusvermehrung am Ende der Vegetationsperiode reduziert.

Am sichersten und während der ganzen Vegetationsperiode unverändert ist der Virusnachweis bei sekundär infizierten Pflanzen; das Virus kann in allen Organen, ausgenommen der Wurzel, hundertprozentig nachgewiesen werden.

Die Bedeutung des Infektionszeitpunktes für den Virusnachweis wird bei der Testierung von unvergasteten Knollen deutlich. Während die sekundär infizierten Knollen immer zu positiven ELISA-Ergebnissen führen, nimmt die Nachweissicherheit bei späten Primärinfektionen stark ab. Diese ausgeprägten Unterschiede bleiben auch nach der natürlich überwundenen Keimruhe bestehen. Erst die künstliche Keimruhebrechung mit Rindite gewährleistet eine hundertprozentige Viruserfassung, wobei die Testbereitschaft bei frühen Primärinfektionen schneller erreicht wird.

Bei späten Primärinfektionen erlauben die negativen ELISA-Ergebnisse der Blatt-Testierung im Feld kurz vor der Ernte nicht, ohne weitere Abklärungen, zuverlässige Rückschlüsse auf den Virusbefall der Knollen zu ziehen. Trotz vermeintlich geringem Virusbefall der Pflanzen, können sich die Knollen im Nachbau als infiziert erweisen.

Die unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus durchgeführten Untersuchungen an sekundär sowie gestaffelt primär infizierten Pflanzen erlauben ein Studium über die

Ausbreitung und Vermehrung von Viren in der Pflanze. Die Resultate des Virusnachweises bei Sekundärinfektionen sind gut reproduzierbar und stimmen mit den Beobachtungen im Feld überein.

Der Nachweis der Viren in verschiedenen Organen primär infizierter Pflanzen ist von mehreren Faktoren abhängig. Die Gewächshausergebnisse sind daher nur als Tendenzen zu verstehen und dürfen nicht ohne weiteres auf unter natürlichen Bedingungen im Feld gewachsene Pflanzen übertragen werden. Für den Nachweiserfolg ist das Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Infektion, die Zeitspanne zwischen Infektions- und Untersuchungszeitpunkt, die Entfernung des untersuchten Organs vom Ort der Infektion sowie der physiologische Zustand der Pflanze von grosser Bedeutung.

Abbildung 56

PVY-Nachweissicherheit an unbehandelten Knollen 160 Tage nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

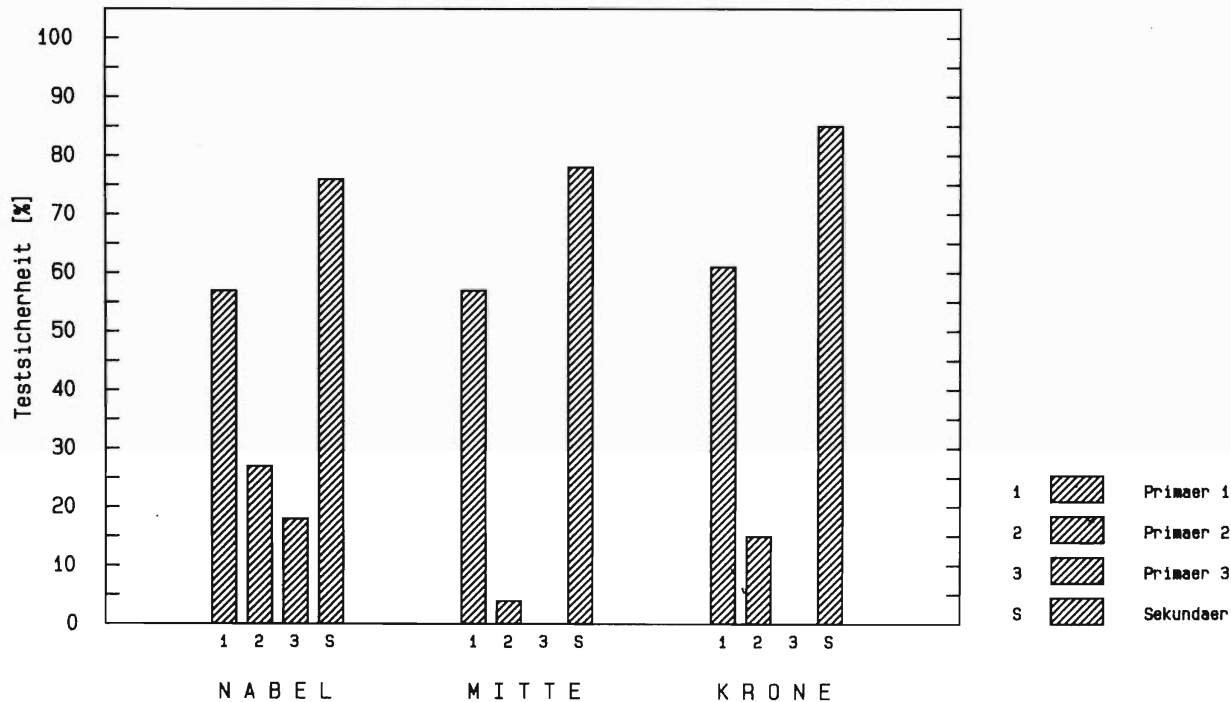


Abbildung 57

PVY - Konzentration in unbehandelten Knollen 160 Tage nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

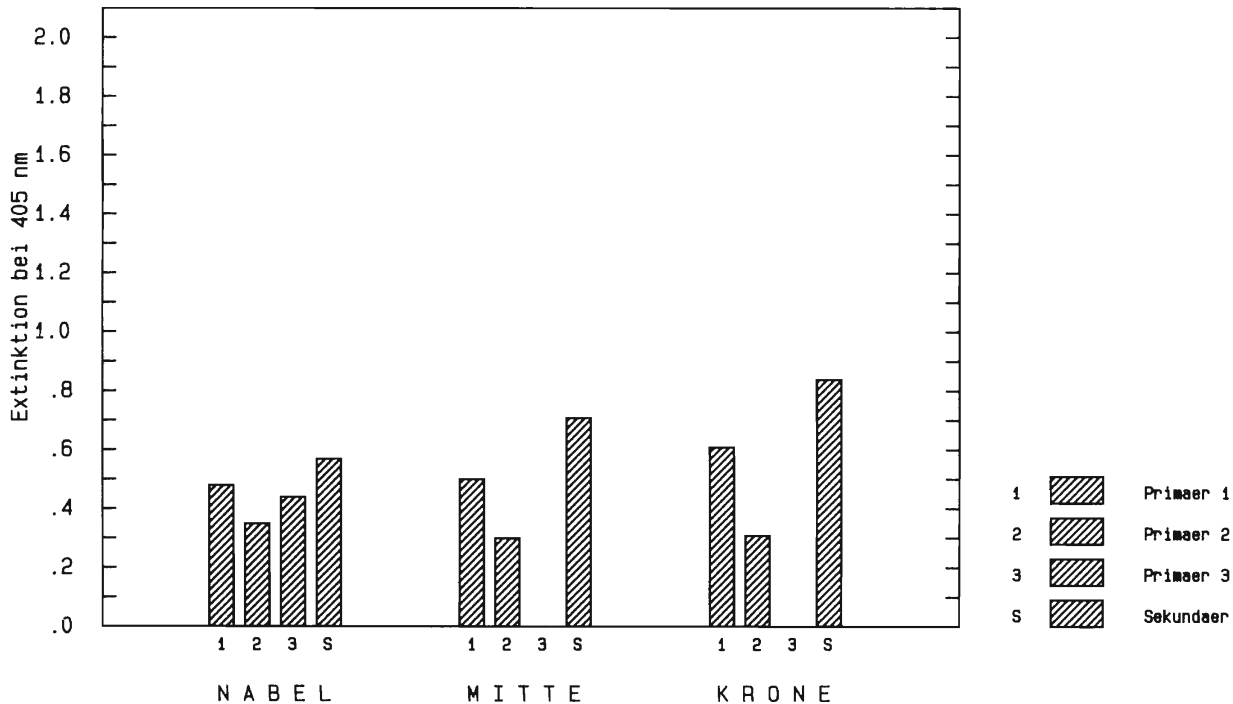


Abbildung 58

PLRV-Nachweissicherheit an unbehandelten Knollen 160 Tage nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

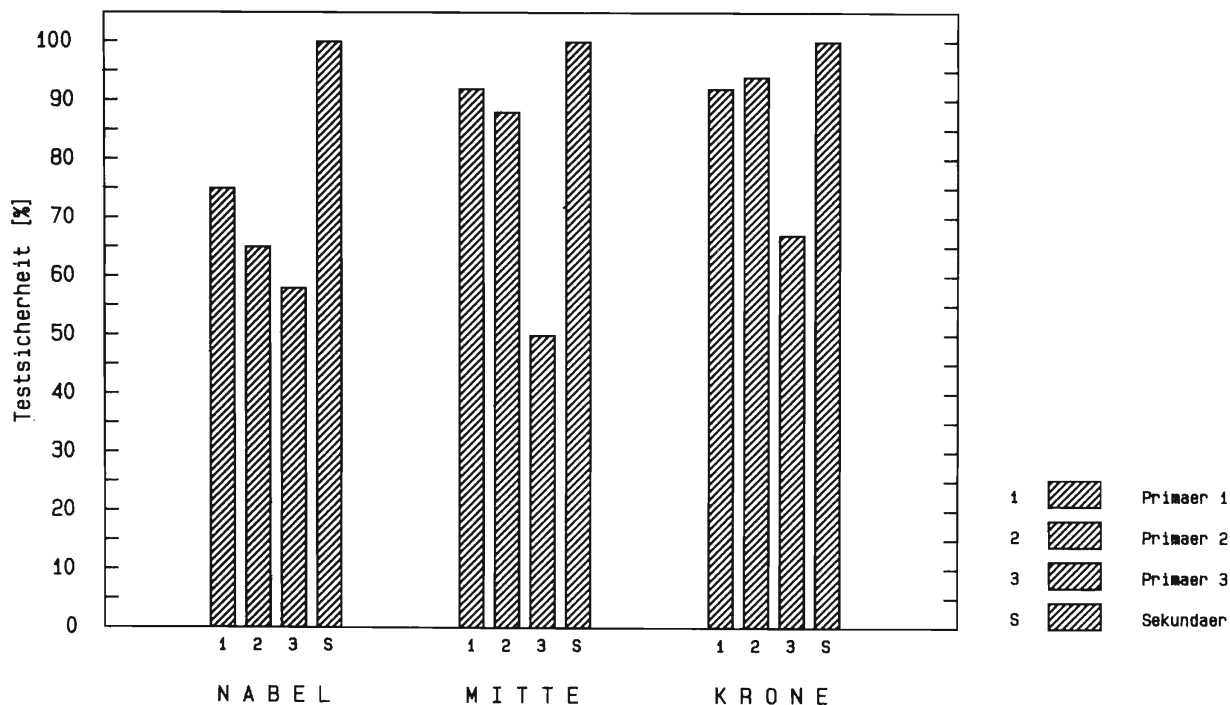


Abbildung 59

PLRV - Konzentration in unbehandelten Knollen 160 Tage nach der Ernte
Untersuchung bei Bintje am Nabel, in der Knollenmitte und an der Krone
Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

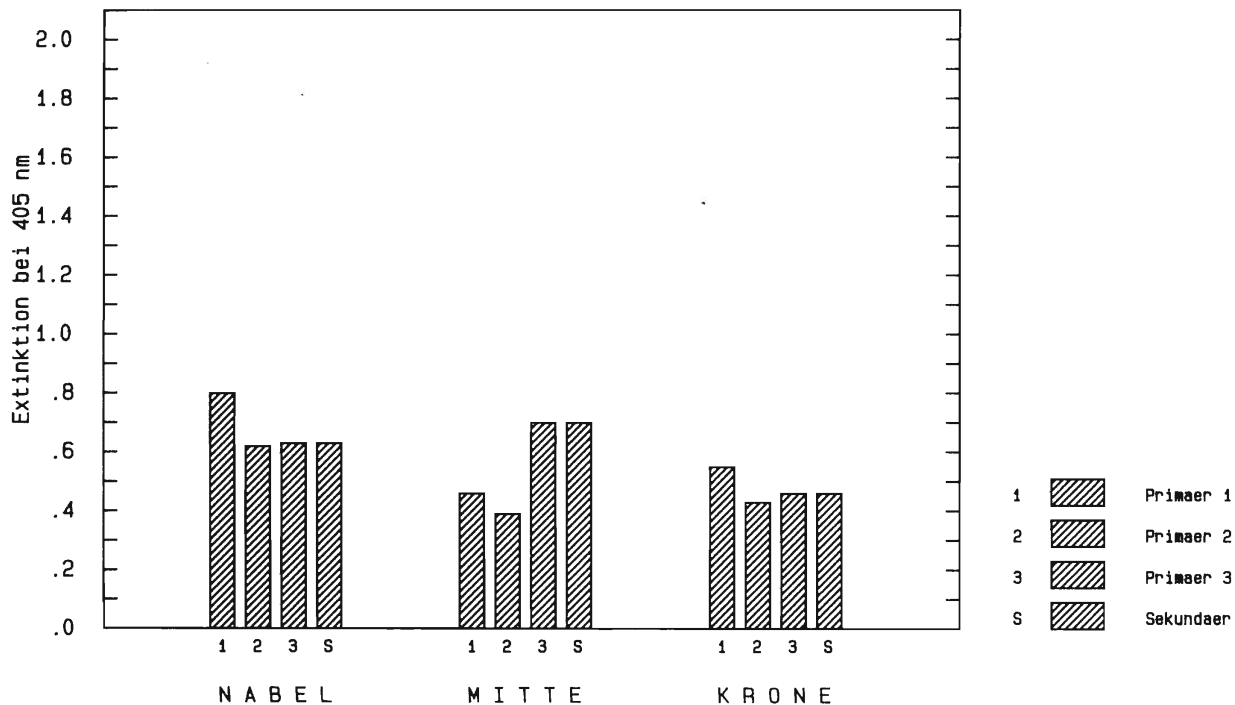


Abbildung 60

PVY-Nachweissicherheit, Einfluss des Infektionszeitpunktes, Feldversuch 1985
Knollen (Bintje) 160 Tage gekuehlt gelagert, vergast und bei 22°C inkubiert
ELISA am Nabel, Knollenmitte, Krone und ausgebildetem Keim nach 4 Wochen
(schwarz = Nachweissicherheit an unvergasten Vergleichsknollen)

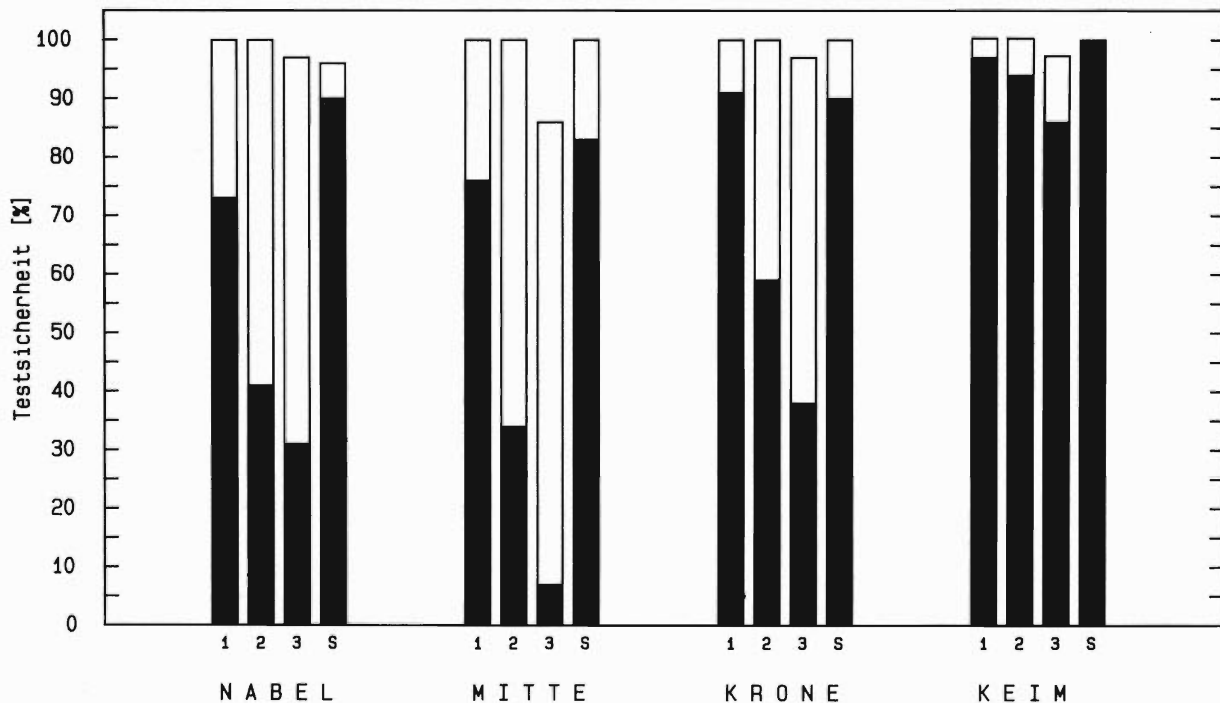


Abbildung 61

PVY - Konzentration, Einfluss des Infektionszeitpunktes, Feldversuch 1985
Knollen (Bintje) 160 Tage gekuehlt gelagert, vergast und bei 22°C inkubiert
ELISA am Nabel, Knollenmitte, Krone und ausgebildetem Keim nach 4 Wochen
(schwarz = Viruskonzentration in unvergasten Vergleichsknollen)

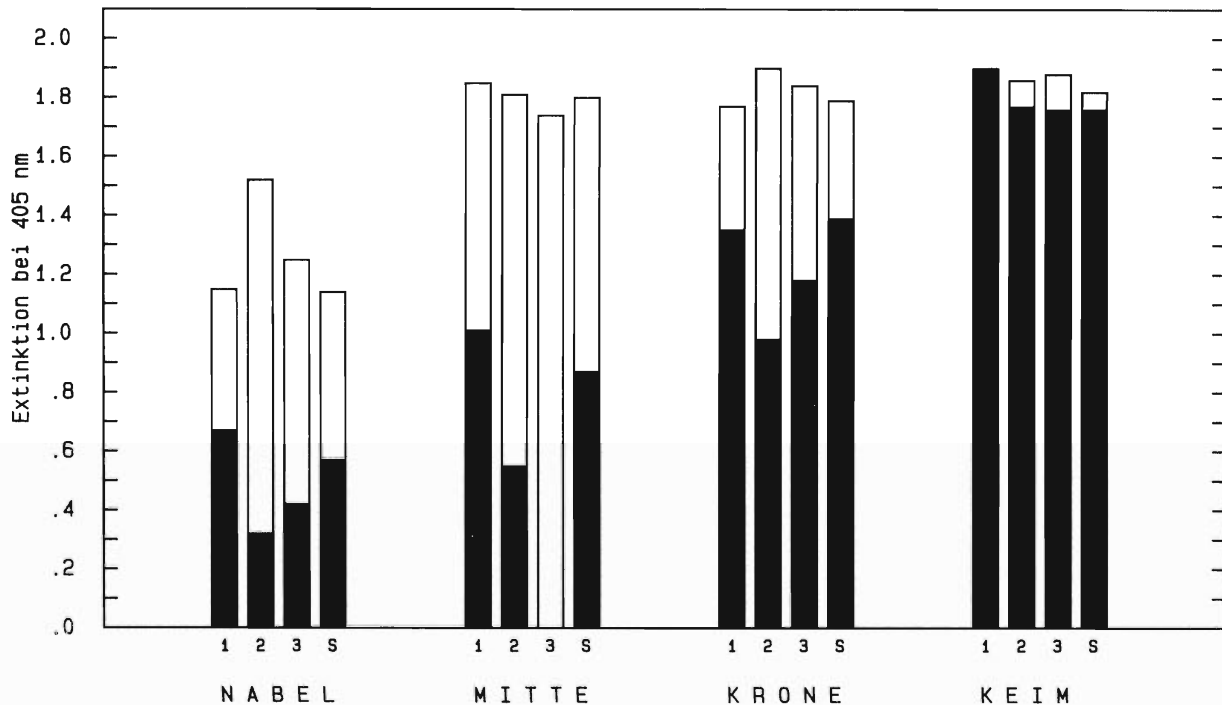


Abbildung 62

PLRV Nachweissicherheit, Einfluss des Infektionszeitpunktes, Feldversuch 1985
Knollen (Bintje) 160 Tage gekuehlt gelagert, vergast und bei 22°C inkubiert
ELISA am Nabel, Mitte und Krone 18 resp.32 Tage nach der Keimruhebrechung
(schwarz = Nachweissicherheit an unvergasten Vergleichsknollen)

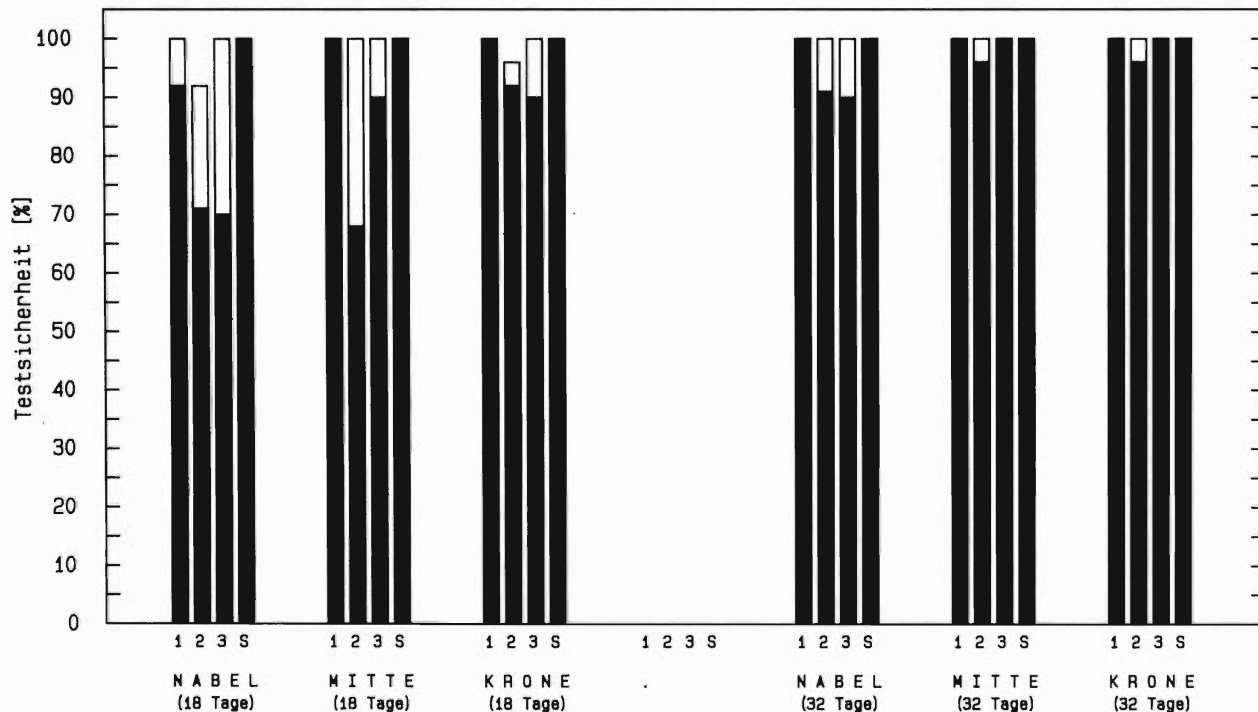


Abbildung 63

PLRV-Konzentration, Einfluss des Infektionszeitpunktes, Feldversuch 1985
Knollen (Bintje) 160 Tage gekuehlt gelagert, vergast und bei 22°C inkubiert
ELISA am Nabel, Mitte und Krone 18 resp. 32 Tage nach der Keimruhebrechung
(schwarz = Viruskonzentration in unvergasten Vergleichsknollen)

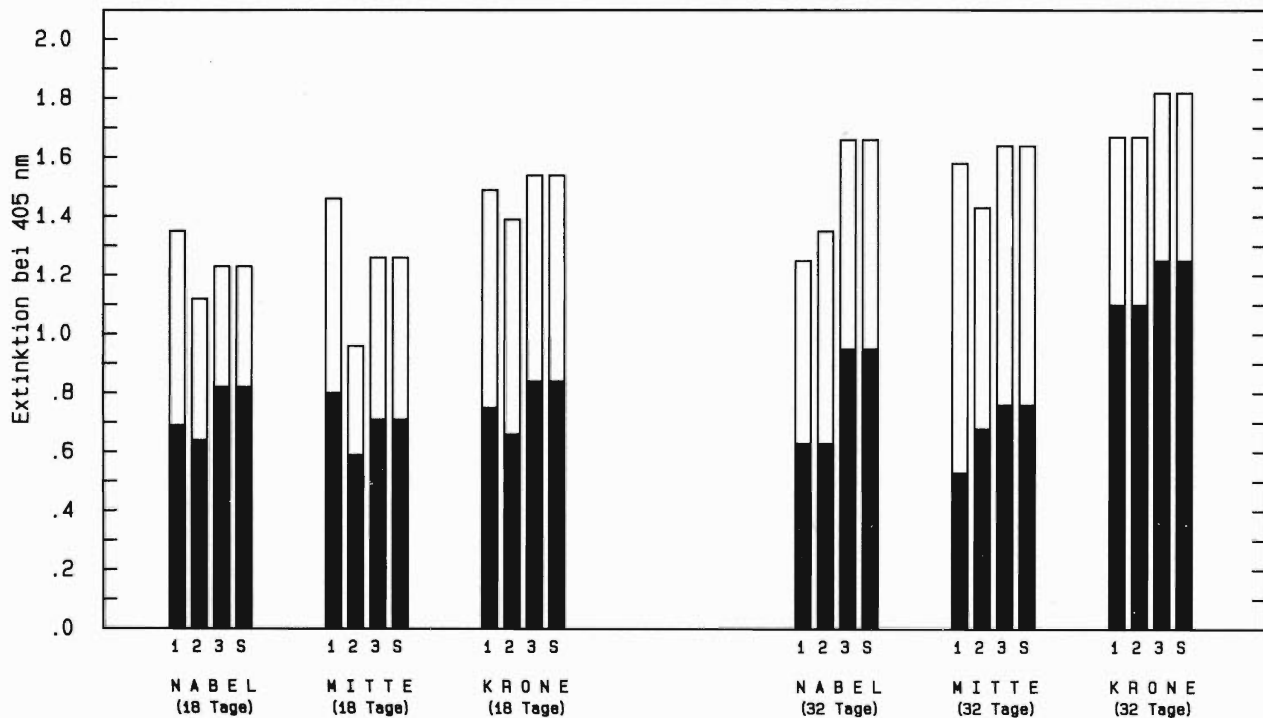


Abbildung 64

Anteil infizierter Knollen in PVY - Infizierten Pflanzen

Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

Häufigkeitsverteilung bei Bintje

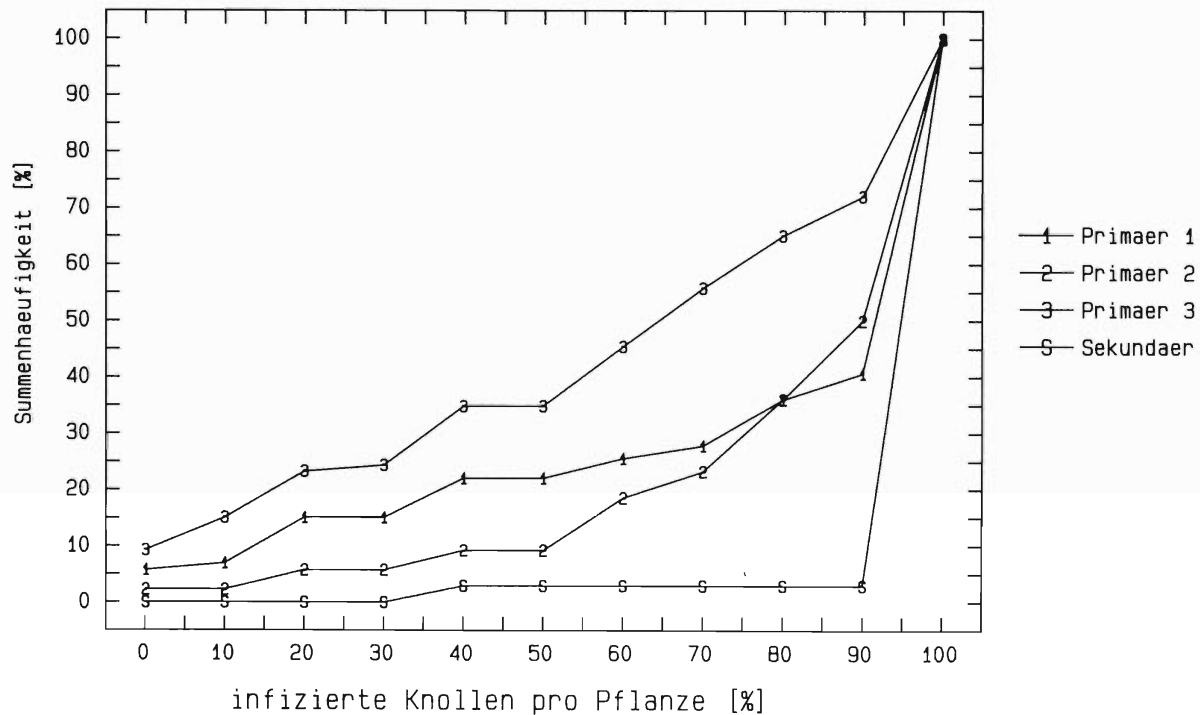
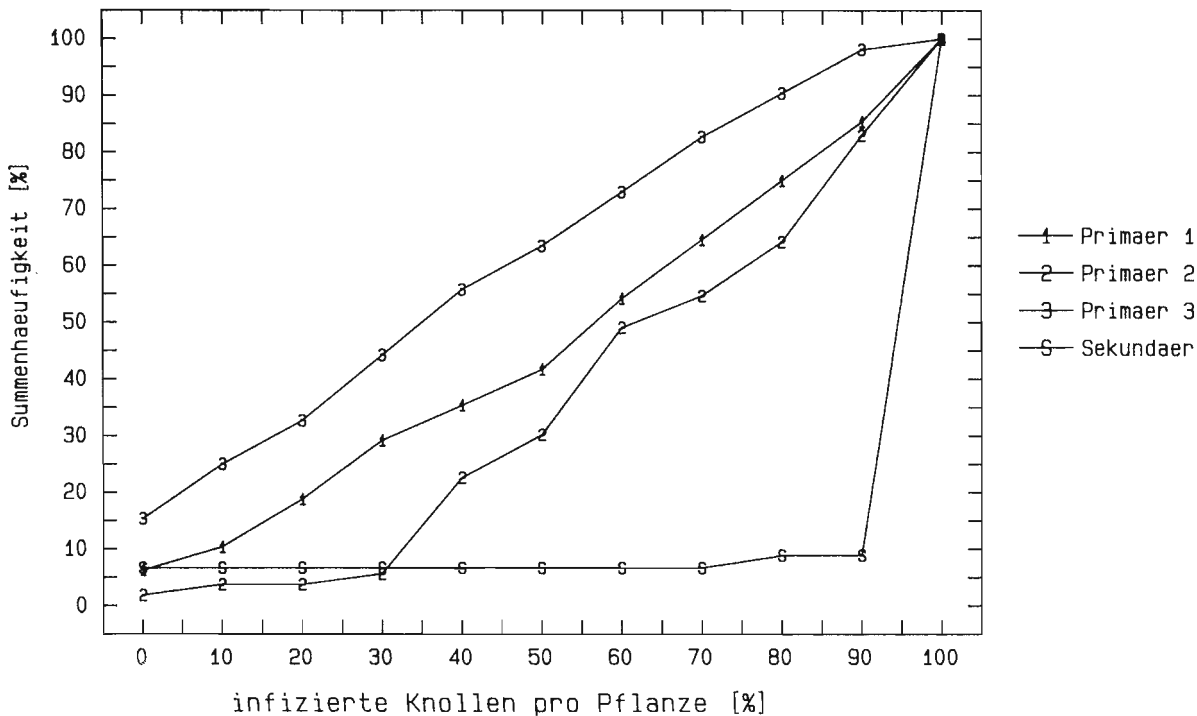


Abbildung 65

Anteil infizierter Knollen in PLRV - infizierten Pflanzen

Einfluss des Infektionszeitpunktes der Pflanzen, Feldversuch 1985

Häufigkeitsverteilung bei Bintje



C) ANWENDUNG VON MISCHSERUM R/Y IM RAHMEN DER ZERTIFIZIERUNG VON PFLANZKARTOFFELN SOWIE ZUVERLAESSIGKEIT IN ROUTINEUNTERSUCHUNGEN

1. EINLEITUNG

Im Rahmen der Zertifizierung von Saatkartoffeln wird der weitaus grösste Teil der anfallenden Proben auf PLRV- resp. PVY-Befall untersucht. In den meisten Fällen genügt es zu wissen, ob das untersuchte Knollenmaterial virusinfiziert ist oder nicht. Nur bei einem Virusbefall zwischen 1% und 2% erfolgt eine genaue Bestimmung des Virus, da für die Weitervermehrung die Grenze von 1% für PVY resp. 2% für PLRV und PVY nicht überschritten werden darf. Neben dem Vorteil, dass durch die "Mischserum"-Variante der Verbrauch an Mikrotitrationsplatten und Serum stark vermindert wird, kann auch eine grosse Arbeitersparnis erzielt werden.

2. VERSUCHSANORDNUNG

Grundsätzlich gelten die im Abschnitt "II" (MATERIAL UND ALLGEMEINE VERSUCHSMETHODIK) aufgeführten Vorschriften. Für die Untersuchung über die Eignung von Mischserum zum Nachweis von PLRV bzw. PVY haben wir den gleichen Knollensaft in gleicher Reihenfolge sowohl auf "Einzelserum-Platten", wie auch auf "Mischserum-Platten" aufgetragen. Bedingt durch den gleichzeitigen Nachweis beider Viren mussten die ELISA-Schritte "Beschichtung der Platten mit Antikörpern" sowie "Konjugatzugabe" leicht verändert werden. Die beschriebenen Antikörperkonzentrationen und Mischungsverhältnisse wurden auf Grund unserer Experimente mit Verdünnungsreihen ausgewählt.

2.1. Die Beschichtung der Platten mit Antikörpern

Für die Beschichtung werden die beiden verwendeten Seren im Verhältnis 1:1 in der Pufferlösung gemischt (Endkonzentration 1:1'000) und in die Testplatte pipettiert. Die Anlagerung der Antikörper erfolgt wie üblich im Kühlschrank (6°C) über Nacht.

2.2. Die Konjugatzugabe

Beim gleichzeitigen Nachweis beider Viren werden die Platten in einem Schritt mit den entsprechenden PVY und PLRV enzymgebundenen Antikörpern beschichtet und während mindestens 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Das Mischungsverhältnis der PVY- resp. PLRV-Antikörper beträgt 1:2, die Endkonzentration im Konjugatpuffer 1:750.

3. DIE VERWENDUNG VOM MISCHSERUM R/Y

Dass der Einsatz von Mischserum R/Y eine brauchbare Lösung für den gleichzeitigen Nachweis beider Viren darstellt, ohne dass damit eine Abnahme der Nachweissicherheit verbunden wäre, ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Ergänzend zu diesen Resultaten muss erwähnt werden, dass alle bei der Verwendung von "Einzelserum" erzielten positiven Ergebnisse auch durch die "Mischserum"- Variante bestätigt werden konnten.

Ueber gelungene Mischserum-Versuche berichten auch Grimm und Daniel (1984). In ihren Untersuchungen an Kartoffelblättern vergleichen die beiden Autoren die Mischserum-Ergebnisse von zwei bis sechs Antiseren mit Einfachseren.

Der schlechte Nachweis der reinen PVY-Infektionen beim Verfahren A ist nicht überraschend; eine zweiwöchige Zeitspanne zwischen der künstlichen Keimruhebrechung und dem

Verfahren	Anzahl inf. Knollen	Anteil an Knollen mit			erwartete/aufgetretene Anz. Reakt. bei			Nachweissicherheit bei		
		PVY-Infekt.	PLRV-Infekt.	PVY+PLRV Mischinf.	Einzelserum PVY	Einzelserum PLRV	Mischerum PVY + PLRV	Einzelserum PVY	Einzelserum PLRV	Mischerum PVY + PLRV
A	52	21	16	15	36/24	31/31	52/46	67 %	100 %	88 %
B	52	21	16	15	36/33	31/31	52/49	92 %	100 %	94 %
C	58	24	18	16	40/37	34/33	58/55	93 %	97 %	95 %

Tabelle 5: Nachweis von PLRV und PVY mit Mischerum (PLRV+PVY).

Vergleich der Nachweissicherheit bei der Einzeltestung mit PLRV- resp. PVY-Antikörpern und bei der Verwendung von Mischplatten (gleichzeitige Beschichtung mit Antiserenkombination PLRV + PVY).

Im Experiment wurden je 100 nummerierte Knollen der Sorte Bintje untersucht:

- A) Knollen 2 Wochen bei 22°C vorgelagert, ELISA 2 Wochen nach der Keimruhebrechung
- B) Knollen 2 Wochen bei 22°C vorgelagert, ELISA 4 Wochen nach der Keimruhebrechung
- C) Knollen 4 Wochen bei 22°C vorgelagert, ELISA 4 Wochen nach der Keimruhebrechung

Untersuchungszeitpunkt mit ELISA ist für den zuverlässigen Nachweis von PVY nicht ausreichend. Die gute Erfassung der Mischinfektionen auf der "Mischplatte" ist dem Blattrollanteil der Infektion zu verdanken, da der Nachweis von PLRV praktisch unmittelbar nach der Rindite-Behandlung möglich ist.

Bei den Verfahren B und C entspricht die erreichte hohe Nachweissicherheit den Erwartungen. Vier Wochen nach der Keimruhebrechung können sowohl PLRV-, wie auch PVY-Infektionen sicher erfasst werden.

Gegenwärtig ist beim Einsatz von Mischserum der einzige Nachteil die Tatsache, dass man auf Grund der positiven Reaktion nicht weiss, um welches der zwei möglichen Viren es sich handelt. Benötigt man eine genaue Virusbestimmung, so muss die entsprechende Probe noch einmal mit "Einzelserum" untersucht werden.

Die Verwendung von unterschiedlich konjugierten Antikörpern könnte diesen Nachteil bald beseitigen. Entsprechende Versuche wurden bereits durch Gugerli (pers. Mitteilung 1986) mit Erfolg durchgeführt. Bei diesem modifizierten ELISA-Verfahren wird die Mikrotitrationsplatte gleichzeitig mit zwei unterschiedlich markierten Antikörpern (Peroxydase für PVY resp. Phosphatase für PLRV) beschichtet und inkubiert. Nach der Auswaschung des ungebundenen Konjugats werden die entsprechenden Reaktionen nacheinander mit Hilfe der zwei verschiedenen enzyme-spezifischen Substrate ausgelöst. Dabei wird die Phosphatase-Reaktion durch die vorausgegangene Peroxydase-Substrat-Reaktion um ca. 10% erniedrigt.

4. DIE ZUVERLÄSSIGKEIT VON ELISA UND DER VERGLEICH MIT ANDEREN TESTMETHODEN

Für den erfolgreichen Einsatz des ELISA-Verfahrens in der Praxis genügt es nicht, wenn man nur mit kleinen Serien unter sehr guten Laborverhältnissen zuverlässig arbeiten

kann. Die serienmässigen Massenuntersuchungen mit ELISA, wie wir sie im Rahmen der Saatkartoffelzertifizierung benötigen, müssen auch dann zuverlässige Resultate liefern, wenn maximale Tagesleistungen mit angelerntem Aushilfspersonal verlangt sind.

Während der Herbstuntersuchungen 1982 sind wir erstmals der Frage der Testsicherheit im Rahmen der praktischen Anerkennung nachgegangen. Zu diesem Zweck wurde eine gewisse Zahl von Saatgutproben 5 bis 6 Wochen nach der künstlichen Keimruhebrechung mit Rindite parallel zu Igel-Lange- und A6-Test in ELISA überprüft. Die Resultate der Testverfahren (Tab. 6) wurden miteinander verglichen und bei vorhandenen Differenzen im ELISA ab Augenstecklingsblatt zusätzlich überprüft. Die Kontrolle der Proben im Augenstecklingstest bestätigte dabei die hohe Nachweissicherheit und die grössere Empfindlichkeit des ELISA-Verfahrens gegenüber den bisherigen Testmethoden. In einigen Fällen konnte zwar im ILT und A6-Test ein scheinbar höherer Virusbefall festgestellt werden, dies ist jedoch unter Umständen auf PVA-Symptome im A6-Test resp. physiologische Kallosebildung im ILT zurückzuführen.

Auch nach dem endgültigen Einbezug des ELISA-Verfahrens in die praktische Anerkennung erfolgte im Anschluss an ELISA eine weitere, regelmässige Ueberprüfung grösserer Stichproben im Augenstecklingstest. Die Proben wurden rein zufällig oder bei sehr hohem Virusbefall gezielt ausgewählt. Die in der Tabelle 6 zusammengefassten Ergebnisse zeigen deutlich, dass mit dem ELISA-Verfahren, bei konsequenter Einhaltung der experimentell festgestellten Wartefristen, zuverlässige Resultate gewonnen werden können.

Sorte und Testjahr	Anzahl unters. Knollen	Anzahl Reaktionen im			T e s t s i c h e r h e i t		
		ELISA Augenst.	ELISA Knollen	ILT und A6-Test	ELISA Augenst.	ELISA Knollen	ILT und A6-Test
AULA/1982	1100	-	11	4	-	100 %	38 %
BINTJE/1982	9670	494	494	412	100 %	100 %	83 %
EBA/1982	3190	47	47	27	100 %	100 %	57 %
OSTARA/1982	3420	-	27	37	-	100 %	138 %
SIRTEMA/1982	2320	252	235	191	100 %	93 %	76 %
URGENTA/1982	1850	-	10	14	-	100 %	140 %
ANDERE/1982	5890	-	72	40	-	100 %	56 %
TOTAL/1982	26340	-	885	721	-	100 %	81 %
BINTJE/1983	7700	1292	1272	-	100 %	98 %	-
PALMA/1983	1050	28	28	-	100 %	100 %	-
URGENTA/1983	1100	41	41	-	100 %	100 %	-
ANDERE/1983	3660	111	100	-	100 %	90 %	-
TOTAL/1983	13510	1472	1441	-	100 %	98 %	-
BINTJE/1984	11890	1750	1698	-	100 %	97 %	-
DESIREE/1984	1440	39	39	-	100 %	100 %	-
SIRTEMA/1984	1120	242	219	173	100 %	90 %	71 %
ANDERE/1984	2860	195	193	-	100 %	99 %	-
TOTAL/1984	17310	2226	2140	-	100 %	97 %	-

Tabelle 6: Ueberpruefung der Zuverlaessigkeit von ELISA im Rahmen der Zertifizierung von Saatkartoffeln mit Mischserum R/Y

IV. SCHLUSSFOLGERUNGEN FÜR DIE SERIENUNTERSUCHUNGEN

1. EINLEITUNG

Besonderes Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die Einführung des ELISA-Verfahrens zum sicheren, rationellen und kostengünstigen Nachweis von Viruskrankheiten im Anerkennungssystem für Saatkartoffeln. Für die praxisorientierte Anwendung galt es dabei nicht nur die biologischen Aspekte wie z.B. Zeitpunkt der Untersuchung im Zusammenhang mit dem physiologischen Zustand der Knolle, Einfluss des Pflanzenalters bei der Infektion, Virusverteilung in der Knolle, Sortenunterschiede, Zuverlässigkeit des Testes, Einsatz von Mischseren usw. in mehrjährigen Versuchen zu überprüfen. Auch die Suche nach zuverlässigen technischen Einrichtungen für den serienmässigen Einsatz von ELISA und die Standardisierung der Methode bildeten einen wichtigen Bestandteil unserer Experimente. Immerhin gilt es an der Forschungsanstalt Zürich - Reckenholz im Rahmen der Saatkartoffelzertifizierung jährlich zwischen Mitte August und Mitte Oktober rund eine halbe Million Knollen zu untersuchen.

Mit den während der Forschungsarbeiten gesammelten Erfahrungen haben wir das neue Verfahren den Erfordernissen soweit angepasst, dass der Einbezug in die praktische Anerkennung gewagt werden konnte. Nach der erfolgreichen Bewährungsprobe während der Testsaison 1983 kam das ELISA-Verfahren im Jahre 1984 vollends als Entscheidungsgrundlage für die Saatkartoffelzertifizierung gesamtschweizerisch zum Einsatz.

Basierend auf unseren Erkenntnissen wird im folgenden Abschnitt eine genaue Anleitung für den qualitativen Virusnachweis angegeben, so wie er in unserem ELISA-Labor im Rahmen von serienmässigen Massenuntersuchungen durchgeführt

wird. Für die standardisierte ELISA-Durchführung haben wir solche Bedingungen (Serumkonzentration, Inkubationszeit und -temperatur, Knollenvorbehandlung usw.) gewählt, die auch unter ungünstigsten probenbedingten Verhältnissen (geringe Viruskonzentration, späte Primärinfektionen usw.) ein Maximum an Testsicherheit garantieren. Um Wiederholungen zu vermeiden, wird auf die bereits im Abschnitt "II" (MATERIAL UND ALLGEMEINE VERSUCHSMETHODIK) beschriebenen Details betreffend Geräte, Reagenzien und Vorschriften hingewiesen. Die folgenden Präzisierungen beschränken sich auf die, für die serienmässige Anwendung von ELISA notwendigen Ergänzungen.

2. GERAETE

An der Forschungsanstalt Zürich - Reckenholz werden die serienmässigen Untersuchungen in einem hierfür speziell eingerichteten modernen ELISA-Labor durchgeführt. Für rationelles Arbeiten stehen zur Bewältigung der täglich anfallenden rund 150 Testplatten folgende Geräte im Einsatz:

- Tecan Sampler 505, ausgerüstet mit einem 8-Kanal manifold (Abb. 4 und 4B), für das Einfüllen der Lösungen in die Mikrotitrationsplatten.
- Waschmaschine SLT 220 (Abb. 5 und 5A), die das automatische Auswaschen aller freien Komponenten aus den Plattenkavitäten besorgt.
- Knollensaftextraktor nach Dr. Gugerli (Abb. 7), ermöglicht die Saftgewinnung und -verteilung aus 300 bis 400 Knollen in der Stunde.
- Photometer-Anlage MR-600 (Abb. 8), mit der die Farbreaktionen gemessen und über Nacht automatisch ausgewertet werden.

3. VORARBEITEN FUER DAS ELISA - VERFAHREN

3.1. Reagenzien und Puffer

Die bei der Durchführung von ELISA benötigten fünf verschiedenen Puffer bleiben bei der Lagerung im Kühlschrank (4°C) während mehrerer Monate stabil. Sie können daher ohne Bedenken für die ganze Testsaison ausreichend auf Vorrat zubereitet werden; vor der Verwendung müssen jedoch die benötigten Puffer-Aliquoten auf die Zimmertemperatur gebracht werden. Bei der Testdurchführung kann man den Verwechslungen und Kontaminationen durch die Verwendung der immer gleichen, mit unterschiedlichen Farben etikettierten Flaschen vorbeugen.

Da der Waschpuffer immer in sehr grossen Mengen verbraucht wird, ist es zweckmässig die Kühlagerung durch die Pufferzubereitung in 10-facher Konzentration zu umgehen.

Eialbumin hat die Eigenschaft, im Probenpuffer zu präzipitieren. Daher erfolgt dessen Zugabe in die Lösung erst kurz vor der Verwendung. Die fertige Pufferlösung bleibt mehrere Stunden aktiv. Sie wird zweimal am Tag frisch angesetzt.

Der im letzten Schritt verwendete Substratpuffer muss in dunkelglasigen Flaschen aufbewahrt werden. Die Substratzugabe (p-Nitrophenylphosphat) hat unmittelbar vor der Verwendung zu erfolgen, da auch durch nichtenzymatische Zersetzung des Substrates unerwünschte Gelbfärbungen auftreten können.

Unverdünnte Antikörper und Enzym-Antikörper Konjugate können bei 4°C länger als ein Jahr ohne bedeutenden Aktivitätsverlust gelagert werden. Die Verdünnung auf die benötigte Konzentration mit Puffer erfolgt unmittelbar vor der Verwendung, so dass der ganze Ansatz innerhalb 1 bis 2 Stunden verbraucht werden kann. Während der ganzen Testsaison werden Antikörper vom gleichen Batch, der vor dem Einsatz auf Qualität und Stabilität sorgfältig geprüft wird, verwendet.

3.2. Die Beschichtung der Platten mit Antikörpern

Die Beschichtung der Platten mit Antikörpern kann ohne Qualitätseinbusse vor Beginn der Testperiode auf Vorrat (ca. 5'000 Mikrotitrationsplatten) erfolgen. Der gleichzeitige Nachweis von PLRV und PVY ist durch den Einsatz von Mischserum möglich (vgl. Abschnitt III/C). Zwecks Verhinderung von unspezifischen Reaktionen wird für die Beschichtung mit Antikörpern das grösste Volumen (220 μ l/Kavität) gewählt. Durch diese Massnahme kann der unerwünschte Kontakt des Probensaftes sowie des Enzym-Antikörper Konjugats mit unbeschichteter Polystyrol-oberfläche der Kavitätenwand vermieden werden.

In unseren Versuchen haben wir die besten Resultate durch die Inkubation der dicht verschlossenen Platten bei 6°C während mindestens 16 Stunden erreicht. Eine Ausdehnung der Inkubationsdauer auf 72 Stunden (Einstellung des Arbeit am Wochenende) ist ohne Nachteil möglich.

Die beschichteten Platten können nach der Inkubation sofort verwendet werden. Sie bleiben jedoch im trockenen Zustand bei -22°C gelagert mindestens ein Jahr voll aktiv. Für die praktische Arbeit bedeutet dies eine willkommene Möglichkeit der Verlagerung dieses Arbeitsschrittes in eine weniger arbeitsbelastete Zeit.

3.3. Die Vorbereitung der Knollen

Eine richtige Knollenvorbereitung ist für die sichere Durchführung von ELISA unerlässlich. Ab Knolle erlaubt der Test nur dann zuverlässige Ergebnisse, wenn die Keimruhe vorgängig künstlich gebrochen wurde. Bevor Ende Juli/Anfang August mit der Rinditebehandlung (vgl. Abschnitt II/2.3.) begonnen werden kann, müssen die eintreffenden Proben bis zum Erreichen der Schalenfestigkeit bei 15°C gelagert werden, um Fäulnis durch Rinditeschaden zu vermeiden. Für eine sichere Testdurchführung ist die künstliche Aktivierung

mit Rindite auch dann angebracht, wenn bei physiologisch alten Knollen die natürliche Keimung bereits eingesetzt hat. Eine zusätzliche Verbesserung des Nachweises von PVY und PLRV kann man durch eine Kältevorlagerung der Knollen erreichen.

In einer Reihe von Versuchen stellten wir fest, dass die Wartezeit zwischen Keimruhebrechung und Knollensaftentnahme von vielen Faktoren (Virus, physiologischer Zustand der Knolle, Zeitpunkt der Infektion, Zeitraum der Lagerung nach der Ernte), die bei der Untersuchung von Saatkollen meistens unbekannt sind, abhängig ist. Bei wiederholten Versuchen hat sich jedoch gezeigt, dass auch unter ungünstigsten Bedingungen (schwierigerer Nachweis von PVY, sehr späte Infektion usw.) diese Wartezeit die Dauer von 5 Wochen nicht überschreitet. Für den gleichzeitigen Nachweis von PLRV und PVY mit Mischserum R/Y bedeutet dies, dass die Knollen vom Zeitpunkt der Rinditebehandlung bis zum Testbeginn während mindestens 4 bis 5 Wochen bei 22°C gelagert werden müssen, für den Nachweis von nur PLRV kann die Lagerdauer auf 2 Wochen verkürzt werden.

4. UNTERSUCHUNG DER PROBEN

4.1. Massnahmen zur Vermeidung von unspezifischen Reaktionen

Die Testsicherheit des ELISA-Verfahrens kann durch das Auftreten unspezifischer Reaktionen (Gelbfärbung der Substratlösung ohne Vorhandensein von Viruspartikeln) negativ beeinflusst werden. Eine saubere Trennung zwischen virusnegativen und viruspositiven Proben wird dadurch erschwert. Für die standardisierte ELISA-Durchführung müssen daher Massnahmen getroffen werden, die diese Gefahr auf ein Minimum reduzieren.

Bei der Untersuchung von Knollenmaterial gibt es für unspezifische Reaktionen verschiedene Ursachen (Gugerli, 1986), wovon ein Teil direkt auf die verwendeten Seren und

Puffer zurückzuführen ist. Nur qualitativ hochstehende, mit Vorteil monoklonale Antikörper führen zu der erwünschten, hoch spezifischen Reaktion mit dem untersuchten Antigen; daher gehört die vor der Testsaion durchgeführte Qualitätsprüfung des vorgesehenen Serums zu den wichtigsten Voraussetzungen für einen sicheren Virusnachweis. Der zusätzliche Einsatz geeigneter Pufferreagenzien (z.B. Eialbumin) verhindert die unspezifische Antigen-Antikörper Bindung durch die im Knollensaft vorhandenen Lektine.

Die unerwünschte Verfälschung der Lösungskonzentration und vor allem die irreversible Bindung des Konjugates an die feste Phase durch partielle Verdampfung der Flüssigkeit während der Inkubation müssen durch das unmittelbare Verschliessen der gefüllten Platten mit abgedichteten Plastikdeckeln verhindert werden (Abb. 66).



Abbildung 66: Inkubation der dicht verschlossenen Platten

Zu weiteren Vorsichtsmassnahmen gehört auch die Beladung der einzelnen Kavitäten mit je nach ELISA-Schritt verschiedenen Lösungsmengen (Antikörperbeschichtung = 220 μ l, Proben- und Konjugatzugabe = 190 μ l, Substratzugabe = 160 μ l). Das erhöhte Volumen während der Antikörperbeschichtung verhindert den gefährlichen Kontakt des Antigens resp. des Konjugates mit der unbeschichteten

Polystyroloberfläche.

Nicht zuletzt soll auch auf die Wichtigkeit des Plattenwaschens hingewiesen werden. Nur das sorgfältige Auswaschen aller freien Komponenten garantiert die hohe Reproduzierbarkeit des Tests. Während den serienmässigen Untersuchungen hat sich eine zweistufige Waschung der Platten bewährt. In einer ersten Stufe wird die Mikrotitrationsplatte ca. 4 Sekunden lang von Hand, unter Verwendung eines "96-Düsen-Kopfes", mit Leitungswasser durchgespült. Dieses "Vorwaschen" dient zwar hauptsächlich der Auswaschung gröberer Knollensaftpartikel. Unsere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, dass diese einfache Waschung mit Leitungswasser bereits voll befriedigen würde. Trotzdem erfolgt wegen der angestrebten hohen Testsicherheit in einem nachfolgenden Schritt die maschinelle (SLT 220) Plattenwaschung mit PBS-Tween. Dabei wird die Platte in zwei sich wiederholenden Arbeitszyklen je fünf Sekunden lang mit Waschpuffer durchgespült und während je einer Sekunde mit Pressluft getrocknet.

4.2. Die Beschichtung der Platten mit Knollensaft

Die Gewinnung des Knollensaftes bildet den zeitaufwendigsten Teil des Virusnachweises ab Knolle. Um den Anforderungen der Serienarbeit gerecht zu werden, haben wir während der Serienuntersuchungen 6 Knollenbohrer nach Dr. Gugerli (Abb. 67) eingesetzt. Die Testbohrer sind dabei auf speziellen, nach unseren Erkenntnissen gebauten Tischen montiert, die ein rationelles und möglichst ermüdungsfreies Arbeiten ermöglichen.

Damit sich die Abnahme der Konzentration des Personals nicht nachteilig auf die Testsicherheit auswirkt, erfolgt die Bohrarbeit in halbtägiger Schicht. Die so erreichte Tagesleistung (ca. 9 Arbeitsstunden) beträgt 25 bis 30 Mikrotitrationsplatten pro Arbeitsplatz; unser ELISA-Labor kann somit täglich rund 15'000 Knollen auf Virusbefall untersuchen.

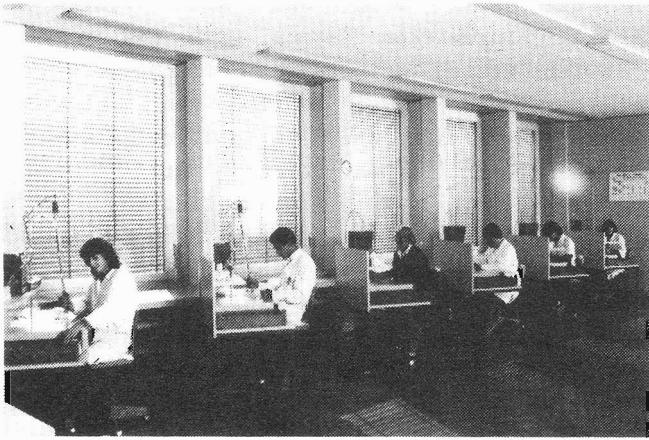


Abbildung 67: Serienarbeit am Knollenbohrer nach Dr. Gugerli

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen und Kontaminationen innerhalb des Dilutorsystems ist es sinnvoll, eine nicht unnötig grosse Knollensaftkonzentration zu wählen. Wiederholte Versuche haben gezeigt, dass eine Saftverdünnung von ca. 1:20 (10 μ l Saft + 180 μ l Probenpuffer) für einen sicheren Virusnachweis voll ausreicht. Die Nachweissicherheit wurde sogar bis zu einer Verdünnung von 1:40 überhaupt nicht beeinflusst.

Nach abgeschlossener Beschichtung mit Knollensaft werden auf jede Platte positive Referenzen aufgetragen. Anschliessend erfolgt die Inkubation der dicht verschlossenen Platten bei 60°C über Nacht. Nach einer Inkubationsdauer von mehr als 16 Stunden können am darauffolgenden Tag alle Platten des Vortages weiter entwickelt werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit bis zu 72 Stunden verursacht keine nachteilige Wirkung auf das Untersuchungsergebnis. Dies bedeutet für die Praxis, dass Proben, die am Freitag gewonnen und in die Platten einpipettiert wurden, bis am Montag im Kühlschrank verbleiben können, um dann weiter verarbeitet zu werden.

4.3. Die Konjugatzugabe

Im Gegensatz zu den ersten zwei ELISA-Schritten ist die Nachweissicherheit stark von den Inkubationsbedingungen bei der Konjugatreaktion abhängig. Während unserer Serienuntersuchungen haben wir durch eine vierstündige Inkubation der dicht verschlossenen Platten bei 30°C optimale Resultate erzielt. Auf höhere Inkubationstemperaturen wurde verzichtet, da sie gelegentlich zu unspezifischen Reaktionen geführt haben. Dagegen ist es bei geringen Viruskonzentrationen möglich, die Testergebnisse durch verlängerte Inkubationszeit (5-6 Stunden) erheblich zu verbessern. Eine Inkubationsdauer unter 4 Stunden verursacht eine Erniedrigung der Extinktionswerte, was eine sichere Trennung zwischen virusnegativen und viruspositiven Proben erschwert.

Zur Bewältigung der grossen Anzahl Mikrotitrationsplatten wird der Arbeitsablauf im Labor, von der Konjugatzugabe bis zur photometrischen Plattenmessung, fließbandmässig organisiert. Dabei bestimmt der langsamste Schritt in der Arbeitskette, bei uns die Messung der Farbreaktionen, den Arbeitsrhythmus. Die Fließbandarbeit ermöglicht nicht nur die volle Ausnützung der Laborkapazität, der gestaffelte Ablauf garantiert auch die Einhaltung vorgeschriebener Inkubationszeiten.

4.4. Die Messung und Auswertung der Ergebnisse

Die Möglichkeit der automatischen Datenanalyse ist ein nicht unwichtiger Vorteil der ELISA-Methode gegenüber früheren Virusnachweisverfahren. Der Einsatz des Computers erlaubt eine sekundenschnelle Grenzwertbestimmung zur Unterscheidung zwischen negativen und positiven Reaktionen. Zugleich können die Testergebnisse schriftlich in Form eines

Beleges festgehalten werden.

Das Prinzip der bei uns angewandten plattenspezifischen Grenzwertbestimmung wurde bereits im Abschnitt II/1.2.5. ausführlich behandelt. Bei der Programmierung der Auswertungsanlage haben wir die Anforderungen der serienmässigen Massenuntersuchungen mitberücksichtigt. Damit die Messung der Reaktionen ohne Verzögerung möglichst schnell erfolgen kann, werden im ersten Programmschritt zuerst alle Platten gemessen und die Extinktionswerte gespeichert. Ein vorheriges Abstoppen der Substratreaktion erübrigt sich, da die bereits erwähnte fließbandmässige Durchführung der Konjugat- und Substratreaktion im Messrhythmus des Photometers die Einhaltung der einstündigen Substratinkubation garantiert. Dies ist sehr wichtig, weil mit verlängerter Inkubationsdauer störende unspezifische Reaktionen zunehmen. Die auf jeder Platte mitgeführten Referenzen dienen dabei nicht der Grenzwertbestimmung, sondern nur der Kontrolle der Arbeitsqualität. Die Analyse der gemessenen Extinktionswerte und das Drucken der Probenresultate erfolgt in einem zweiten Programmschritt vollautomatisch während der Nacht.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Virusbefall an Kartoffelpflanzen kann sowohl qualitative wie auch quantitative Auswirkungen haben. Da die Vermehrung der Kartoffel auf vegetativem Weg erfolgt, ist die Verwendung von gesundem, zertifiziertem Ausgangsmaterial eine der wichtigsten Voraussetzungen für einen wirtschaftlichen Ertrag. Seit Jahrzehnten wird die schweizerische Saatkartoffelproduktion vor der definitiven Anerkennung auf das Vorkommen von Viruskrankheiten untersucht. Trotz der guten Qualität der Testergebnisse hat man vor allem aus arbeitstechnischen Ueberlegungen nach neuen Wegen in der Testierung gesucht. Die Hoffnung auf den serienmässigen Einsatz der Serologie eröffnete sich erst mit der sehr empfindlichen ELISA-Variante. Bedeutende Vorteile (hohe Spezifizität, grosse Empfindlichkeit und Leistungsfähigkeit) haben zu Anstrengungen geführt, die bisherigen Testverfahren (Igel-Lange-Test und A6-Test) durch ELISA abzulösen.

Unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Aussagen verschiedener Autoren haben jedoch gezeigt, dass die Anwendung von ELISA zum Nachweis von Kartoffelviren, vor allem die Testierung ab Knolle, mit einigen Problemen verbunden ist. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit verschiedenen pflanzenphysiologischen Fragen, die mit der Eignung von ELISA zum Nachweis von Viren bei der Kartoffel zusammenhängen. Zur Zielsetzung gehört auch die Charakterisierung von Bedingungen, die es ermöglichen, ELISA als sicheres, rationelles und kostengünstiges Virusnachweisverfahren ab Knolle einzusetzen.

Der experimentelle Teil umfasst mehrjährige Versuche, die den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Nachweissicherheit mit ELISA prüfen. Zu den wichtigsten Themen zählen die folgenden:

- Bedeutung des physiologischen Zustandes der Kartoffelknolle zum Zeitpunkt des Virusnachweises (Vorlagerungsbedingungen, künstliche Keimruhebrechung, jahresbedingte Unterschiede, Sorte usw.).
- Auswirkungen des Infektionszeitpunktes auf den Nachweis von Viren in verschiedenen Pflanzenorganen, insbesondere in den Kartoffelknollen (Sekundärinfektionen, Primärinfektionen, Pflanzenalter bei der Infektion).
- Technische Aspekte für den Einsatz im Rahmen der Zertifizierung von Saatkartoffeln (Einsatz vom Mischserum, Verwendung geeigneter Geräte, Computer usw.).

Für den Virusnachweis ab Knolle können die wichtigsten Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden:

Die Testsicherheit variiert stark in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Knolle, vom Pflanzenalter bei der Infektion und nicht zuletzt vom untersuchten Virus selbst. In unbehandelten, ruhenden Knollen ist der Virusnachweis am schwierigsten; lediglich Sekundärinfektionen können unmittelbar nach der Ernte zuverlässig erfasst werden. Bei der Untersuchung von Primärinfektionen ist mit zunehmendem Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Infektion eine starke Abnahme der Nachweissicherheit festzustellen. Während PVY in ruhenden Knollen sehr schlecht bis gar nicht und nur in geringen Konzentrationen nachweisbar ist, liefert der Test von PLRV bedeutend bessere Resultate. Auch während der weiteren mehrmonatigen Lagerung der Knollen bleibt die Erfassung der Viren ungenügend. Auffallend sind die starken musterbedingten Schwankungen in der Nachweissicherheit. Mit der einsetzenden natürlichen Keimung kann zwar eine deutliche Verbesserung der Testergebnisse festgestellt werden, der Virusnachweis bleibt trotzdem weiterhin ungenügend. Nur bei der Verwendung des Presssaftes aus Keimen können alle Infektionen sicher erfasst werden.

Langfristige Beobachtungen während mehrerer Jahre haben gezeigt, dass für einen zuverlässigen Nachweis beider Viren

(PLRV und PVY) die künstliche Keimruhebrechung mit Rindite unerlässlich ist. Eine zusätzliche Nachweisverbesserung kann durch Kälteschock an den Knollen erzielt werden. Die Rinditebehandlung ist auch dann notwendig, wenn nach langer Lagerung bereits die natürliche Keimung der Knollen eingesetzt hat. Für die Saftentnahme hat sich die Basis von apikalen Augen als besonders günstig erwiesen. Unabhängig von untersuchter Sorte und Infektionszeitpunkt ist der Nachweis von PVY fünf Wochen, der Nachweis von PLRV zwei Wochen nach der Rinditebehandlung mit hundertprozentiger Sicherheit möglich. Dabei muss erwähnt werden, dass der Zeitpunkt der höchsten Viruskonzentration nicht immer mit dem der höchsten Nachweissicherheit korreliert.

Für den gleichzeitigen Nachweis beider Viren im Rahmen der Zertifizierung von Saatkartoffeln hat sich der Einsatz von Mischserum R/Y bewährt. Auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse konnten an der Forschungsanstalt Zürich-Reckenholz die bisherigen Testverfahren im Herbst 1984 vollumfänglich durch ELISA abgelöst werden.

Bei späten Primärinfektionen sind an den Pflanzen bis zur Frühernte meistens keine Virussymptome sichtbar oder nachweisbar, obwohl sich die Knollen im Nachbau als infiziert erweisen. Aus diesem Grund ist es sehr problematisch, die Resultate vom Test an Pflanzen selbst für eine Prognose betreffend Virusbefall der Knollen zu verwenden.

SUMMARY

Viral infections of potatoes affect both quality and quantity. Since potatoes are vegetatively propagated the use of healthy, certified seed material is critical for good yields. In Switzerland seed potatoes are tested for viral infections before final certification. The tests used in the past (ILT and A6-Test) are accurate but labor-intensive, therefore we investigated new methods for detection of viral infections. The introduction of serology for use in large-scale testing came with modern immunoassays such as ELISA. Important advantages (high specificity, sensitivity and cost-effectiveness) lead to efforts to replace the "old" tests with ELISA.

In the literature there are reports about problems when using ELISA to detect viral infections in tubers. This thesis deals with plantphysiological issues concerning viral detection in potatoes by ELISA. It also characterizes the conditions needed for a reliable and cost-effective use of ELISA for large-scale detection of viruses in potato tubers.

The experimental part contains investigations over several years on the influence of different factors on the reliability of ELISA:

- Importance of physiological state of tuber at time of test (storage conditions, artificial interruption of tuber dormancy, seasonal differences, cultivars etc.).
- Effect of time of infection on virus detection in different plant organs, especially tubers (secondary and primary infections, age of plant at infection).
- Technical aspects of the test procedure (application of a mixture of antibodies to PVY and PLRV; instrumentation, computer etc. for automation of ELISA).

The most important results can be summarised as follows:

The reliability of viral detection varies with physiological age of tuber, plant age at infection and different viruses. The detection of virus in untreated, dormant tubers is very difficult, only secondary infections are detected right after harvest. In the case of primary infections the test reliability decreases as plant age at infection time increases. In dormant tubers PVY was rarely detected, whereas for PLRV the test was more reliable. Also after several months of storage the detection of virus remains unreliable and variability between the different lots of tubers adds uncertainty to the test results. Natural sprouting improves test reliability, but the results remain unsatisfactory. Only the use of sap extracted directly from sprout tissue allows detection of all virus-infections.

Long-term observations have indicated, that for a reliable detection of PLRV and PVY in tubers, the dormancy has to be broken artificially by a treatment with Rindite. An additional improvement of the test can be achieved by cold-shock. Rindite treatment is necessary even if natural sprouting is in progress. The tissue below the dominant sprouts is most suitable for sap extraction. Independent of cultivar and time of infection, PVY- and PLRV-detection is 100% reliable five respectively two weeks after Rindite-treatment. Time of highest reliability is not always correlated with time of highest virus concentration. In routine application of ELISA a mixture of antibodies to PVY and PLRV can be successfull used to detect the two viruses in the same assay. Based on results of this thesis, ELISA has been used for routine virus-detection in seed potato certification since fall of 1984.

Late primary infections do not lead to visible or evident symptoms at early harvest time, although tubers are infected. Therefore it is very problematic to use the results from virus-detection in leaves for a reliable prediction concerning infection of tubers.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Bar-Joseph, M., S.M. Garnsey, D. Gonsalves, M. Moscovitz, D.E. Purcifull, M.F. Clark und G. Löbenstein, 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69: 190-194.

Bar-Joseph, M. and R. Salomon, 1980. Heterologous reactivity to tobacco-mosaic virus strains in ELISA. *J. gen. Virol.* 47: 509-512.

Bärecke, M.L., 1961. Erfahrungen mit einjährigen Kartoffelabbauversuchen unter starken Blattrollinfektionsbedingungen. *Parey, Berlin und Hamburg* 45: 225-253.

Beguin, N., P. Gugerli, O. Cazelles, 1984. Detection d'*Erwinia carotovora* var. *carotovora* et var. *atroseptica* dans les tubercules de pomme de terre par le test ELISA. Abstracts of Conference Papers, 9. Dreijahrestagung der EAPR: 261.

Berces, S., E.R. Keller, 1966. Ueber Arbeitsmethodik und Erfahrungen mit dem Igel-Lange-Test. *Mitteilungen für die Schweizerische Landwirtschaft* 9: 166-172.

Berces, S., E.R. Keller und F.A. Winiger, 1972. Erfahrungen mit qualitätsbeeinflussenden Massnahmen in der Saatkartoffelproduktion. *Mitteilungen für die Schweizerische Landwirtschaft* 5: 98-108.

Berces, S. und W. Maag, 1984. Einfluss des Blattroll- und Y-Virusbefalls auf Stärkeertrag und Chipsfarbe. Abstracts of Conference Papers, 9. Dreijahrestagung der EAPR: 212-213.

de Bokx, J.A., 1972a. Viruses of potatoes and seed-potato production. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen: 182.

de Bokx, J.A., 1972b. Viruses of potatoes and seed-potato production. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen: 105.

de Bokx, J.A. and D.Z. Maat, 1979. Detection of potato virus Y in tubers with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 44/2: 635-644.

Casper, R., 1977a. Testung von Prunus-avium-Samen auf Prune-dwarf-Virus mit dem ELISA-Verfahren. Phytopathol. Z. 90: 91-94.

Casper, R., 1977b. Detection of potato leafroll virus in potato and in *Physalis floridana* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Phytopath. Z. 90: 364-368.

Casper, R. and K. Mendgen, 1979. Quantitative serological estimation of a hyperparasite: detection of *Verticillium lecanii* in Yellow Rust infected wheat leaves by ELISA. Phytopath. Z. 94: 89-91.

Casper, R. und S. Meyer, 1981. Die Anwendung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis pflanzenpathogener Viren. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 33: 49-54.

Clark, M.F., A.N. Adams, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. gen. Virol. 34: 475-483.

Clark, M.F., C.L. Flegg, M. Bar-Joseph and S. Rottem, 1978. The detection of *Spiroplasma citri* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Phytopath. Z. 92: 332-337.

Clarke, R.G., R.H. Converse and M. Kojima, 1980. ELISA to detect potato leafroll virus in potato tubers and viruliferous aphids. *Plant Dis.* 64: 43-45.

Cother, E.J. and H. Vrugink, 1980. Detection of viable and nonviable cells of *Erwinia* var. *atroseptica* in inoculated tubers of var. Bintje with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Potato Res.* 23: 133-135.

Daniel, G. und M. Munzert, 1982. Nachweis des Blattrollvirus an sekundärinfizierten Kartoffelpflanzen mit ELISA. *Nachrichtenbl. Dent. Pflanzenschutzd.* 34: 51-54.

Ehlers, U., H.J. Vetten and H.L. Paul, 1983. Detection of potato leafroll virus in primarily infected tubers by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopath. Z.* 107: 37-46.

Engvall, E. und P. Perlmann, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874.

Engvall, E. und P. Perlmann, 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal of Immunology* 109: 129-135.

Gera, A., G. Löbenstein and B. Raccach, 1978. Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Virology* 86: 542-545.

Gonsalves, D., 1979. Detection of tomato ringspot virus in grapevines: A comparison of *Chenopodium quinoa* and ELISA. *Plant Dis. Repr.* 63: 962-965.

Grimm, F. und G. Daniel, 1984. Zum Einsatz von Mischseren im ELISA-Verfahren: ein Ergebnisvergleich mit Einfachseren bei Untersuchungen an Kartoffelblättern. *Potato Res.* 27: 13-23.

Gugerli, P., 1978. The detection of two potato viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopath. Z.* 92: 51-56.

Gugerli, P., 1979a. Potato virus A and potato leafroll virus: Purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopath. Z.* 96: 97-107.

Gugerli, P., 1979b. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour le diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre. *Revue suisse agric.* 11: 253-260.

Gugerli, P., 1980a. Potato leafroll virus concentration in the vascular region of potato tubers examined by ELISA. *Potato Res.* 23: 137-141.

Gugerli, P., 1980b. Serology of Plant Viruses by ELISA. Strategy for Virus Management in Potatoes, Report of Planning Conference at CIP/Lima: 144-151.

Gugerli, P. and W. Gehriger, 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers after artificial break of dormancy. *Potato Res.* 23: 353-359.

Gugerli, P., 1981. Virus detection in potato tubers by ELISA: conditions and new technical facilities for sample extraction and processing. Abstracts of a paper presented at the meeting of the virology section of EAPR, Rennens, 16.-20. September 1980. *Potato Res.* 24: 238.

Gugerli, P., 1982. Improvements of routine tests for potato virus identification. Proceedings, Tenth anniversary CIP/Lima: 91-92.

Gugerli, P. and P. Fries, 1983. Charakterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* 64: 2471-2477.

Gugerli, P., 1984a. Improved detection of potato leafroll virus and potato virus Y in crude extracts of single aphids. Abstracts of Conference Papers, 9. Dreijahrestagung der EAPR: 260.

Gugerli, P., 1984b. Der Einsatz des ELISA-Verfahrens für den Virusnachweis bei Saatkartoffeln. *Die Grüne* 13: 19-22.

Gugerli, P., 1986. Potato Viruses. Reprint from Bergmeyer's *Methods of enzymatic Analysis* XI:430-446.

Keller, E.R., 1959. Die Bedeutung des Virusnachweises für den Saatkartoffelbau. *Schweiz. Landw. Monatshefte* 37: 184-191.

Keller, E.R. und S. Berces, 1962. Der A6-Test, ein Verfahren zum Nachweis von Viruskrankheiten bei Kartoffeln. *Mitteilungen für die Schweizerische Landwirtschaft* 1: 10-16.

Kerlan, C., Ch. Valade, A. Deltour, 1984. Detection of PVY and PLRV in potato tubers. Use of ELISA and Immune Electron Microscopy. Abstracts of Conference Papers, 9. Dreijahrestagung der EAPR: 222-223.

Lister, R.M., 1978. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting viruses in soybean seed and plants. *Phytopathology* 68: 1393-1400.

Lister, M.R., W.F. Rochow, 1979. Detection of barley yellow Dwarf Virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69: 649-654.

Maat, D.Z., J.A. de Bokx, 1978a. Potato leafroll virus: antiserum preparation and detection in potato leaves and sprouts with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Neth. J. Pl. Path. 84: 149-156.

Maat, D.Z., J.A. de Bokx, 1978b. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato viruses A and Y in potato leaves and sprouts. Neth. J. Pl. Path. 84: 167-173.

Matthews, R.E.F., 1957. Plant virus serology. Cambridge university press.

McLaughlin, M.R. et al, 1978. Bean yellow mosaic virus and yellow vein virus. Phytopathol. News 12: 198.

Mehrad, M., H. Lapiere, Y. Maury, 1978. Le virus de l'enroulement de la pomme de terre: purification, detection serologique et dosage dans la plante. C.R. Acad. Sc. Paris 286: 1179-1182.

Müller, H., 1984. Die Kartoffelwirtschaft in der Schweiz. Proceedings, 9. Dreijahrestagung der EAPR: 19-27.

Münster, J., G. Mayor, 1954. Contribution a l'etude de la detection des maladies a virus de la pomme de terre par indexage (tubercule-test). Landw. Jahrb. Schweiz 68: 937-948.

Münster, J., P. Cornu, 1973. La preculture, methode de controle virologique des plants de pommes de terre. Revue suisse d'agriculture, V(2), 1973.

Munzert, M., G. Daniel und W. Hunnius, 1981. Nachweis des Kartoffel-Y-Virus (PVY) in sekundärinfizierten Kartoffelpflanzen mit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Potato Res. 24: 245-254.

Munzert, M. und G. Daniel, 1983. Erfahrungen mit ELISA in der Testsaison 1982/83. Der Kartoffelbau 34: 96-98.

Munzert, M. und R. Heinlein, 1984. Hinweise zur fehlerfreien Durchführung des ELISA-Tests. Der Kartoffelbau 35: 366-368.

Reeves, J.T., A.O. Jackson, J.D. Paschke and R.M. Lister, 1978. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of two maize viruses. Plant Dis. Rep. 62: 667-671.

Rek, J. und F.A. Winiger, 1984. ELISA ab Knolle: Erfahrungen bei der routinemässigen Anwendung im Rahmen der Zertifizierung von Pflanzkartoffeln. Abstracts of Conference Papers, 9. Dreijahrestagung der EAPR: 220-221.

Rochow, W.F. and L.E. Carmichael, 1979. Specificity among barley yellow dwarf viruses in enzyme immunosorbent assays. Virology 95: 415-420.

Salzmann, R., E.R. Keller, 1969. Krankheiten und Schädlinge der Kartoffel. Lehrmittelzentrale, Zollikofen: 150.

Schöber, B. und E.R. Keller, 1984. Kartoffelbau im Rahmen eines integrierten Produktionssystems. Proceedings, 9..Dreijahrestagung der EAPR: 37-50.

Shepard, J.F., 1972. Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S and M. Montana State University, Bulletin 662.

Singh, R. P. and J. Santos-Rojas, 1983. Detection of potato virus Y in primarily infected mature plants by ELISA, indicator host, and visual indexing. Canadian Plant Disease Survey 63: 34-44.

Solms, J., R. Genner-Ritzmann, 1984. Der Ernährungswert von Kartoffeln. Proceedings, 9. Dreijahrestagung der EAPR: 51-69.

Stevens, W.A. and J. Tsiantos, 1979. The use of ELISA for the detection of *Corynebacterium michiganense* in tomatoes. Microbios Letters 10: 29-32.

Tamada, T. and B.D. Harrison, 1980. Factors affecting the detection of potato leafroll virus in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. Ann. appl. Biol. 95: 209-219.

Uyemoto, J.K., 1980. Detection of maize chlorotic mottle virus serotypes by ELISA. Phytopath. 70: 290-292.

Vetten, H.J., U. Ehlers and H.L. Paul, 1983. Detection of potato viruses Y and A in tubers by enzyme-linked immunosorbent assay after natural and artificial break of dormancy. Phytopath. Z. 108: 41-53.

Voller, A., D. Bidwell, G. Huldt, E. Engvall, 1974. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to Malaria. Bulletin of the World Health Organization 51: 209-211.

Voller, A., A. Barlett, D.E. Bidwell, M.F. Clark and A.N. Adams, 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Gen. Virol. 33: 165-167.

Vulic, M. und B. Arenz, 1963a. Die Nachweisbarkeit des Y-Virus in den verschiedenen Pflanzenteilen sekundär infizierter Kartoffelpflanzen (Methodischer Vergleich von Serologie und A-6-Test). Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch 40: 151-159.

Vulic, M. und B. Arenz, 1963b. Ausbreitung und Konzentration des Y-Virus in der Kartoffelpflanze bei zeitlich gestaffelten Primärinfektionen. Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch 40: 387-411.

Walter, C. und E. Sander, 1979. Comparison of the ELISA with conventional bioassay on *Solanum demisum* A6 for detection of potato virus Y. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 86: 662-666.

Weidemann, H.-L., 1981. Der Nachweis von Kartoffelviren mit Hilfe der Immunofloreszenstechnik. Potato Res. 24: 255-266.

Weidemann, H.-L., 1982. Wo befinden sich die Viren in der Kartoffelknolle? Der Kartoffelbau 33: 148-151.

Weidemann, H.-L. und R. Casper, 1982. Immunohistologische Untersuchungen über das Vorkommen von Kartoffelblattrollvirus in Knolle und Spross der Kartoffelpflanze. Potato Res 25: 99-106.

Weidemann, H.L., 1984. Die Kartoffel-Virus-Y (PVY) Konzentration in Knollen verschiedener Kartoffelsorten. Nachrichtenbl. Dent. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 36: 25-27.

Wigger, E.A., 1983. Einsatz von ELISA bei der Virustestung von Pflanzkartoffeln. Der Kartoffelbau 34: 275-279.

Wigger, E.A., 1984. Y-Virusnachweis mit ELISA in Pflanzkartoffelproben. Der Kartoffelbau 35: 206-209.

Winiger, F.A., S. Berces, 1974. Ueber einige Zusammenhänge zwischen Virusbefall und Ertrag bei Kartoffelsorten des schweizerischen Richtsortimentes. Schweiz. landw. Forschung 13: 26-285.

Winiger, F.A., J. Rek und S. Berces, 1983. Der ELISA-Test, ein neues Verfahren zum serienmässigen Virusnachweis in Kartoffeln. Mitteilungen für die Schweizerische Landwirtschaft 8: 181-189.

Winiger, F.A., W. Maag, S. Berces und E. Meister, 1987. Einfluss von Virusinfektionen auf Chipsfarbe und Stärkegehalt bei Kartoffeln. Schweiz. landw. Forschung (im Druck).

LEBENS LAUF

24. März 1954 Geboren in Bratislava (CSSR) als Sohn von
Jan und Katarina Rek
- 1960 - 1968 Besuch der neunjährigen Grundschule in
Bratislava (CSSR)
- 1968 Wohnortswechsel in die Schweiz
- 1968 - 1971 Sekundarschule in Thalwil (ZH)
- 1971 - 1974 Vorbereitung auf die Matura am Institut
Minerva in Zürich
- 1974 Abschluss mit Eidg. Matura Typus C
- 1974 - 1980 Studium an der Abteilung für
Naturwissenschaften der ETH Zürich
- 1978, 1979,
1981 Praktikant bei der Saatgutzertifizierung
mit ILT und A6-Test an der Eidgenössischen
Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen
Pflanzenbau in Zürich
- 1980 Diplom als dipl. Naturwissenschaftler ETH,
Fachrichtung Biochemie
- 1982 Erlangung der Schweizer Bürgerschaft
- seit 1982 Mitarbeiter an der Eidgenössischen
Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen
Pflanzenbau in Zürich

VERDANKUNGEN :

Herzlich danken möchte ich an dieser Stelle:

- Herrn Dir. Dr. A. Brönnimann für die Erlaubnis, die praktischen Arbeiten an der Eidgenössischen Forschungsanstalt Zürich-Reckenholz durchzuführen.
- Herrn Prof. Dr. E.R. Keller dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, das vorliegende, den Bedürfnissen der Praxis entsprungene Thema zu bearbeiten. Sein Vertrauen, das er mir durch die grosse Freiheit bei der Ausführung der Arbeit bezeugte, sowie seine entgegenkommende und kompetente Betreuung wusste ich sehr zu schätzen.
- Herrn Dr. P. Gugerli und Dr. F.A. Winiger für die kritischen Anmerkungen und Diskussionen während meiner Arbeit, für die speditive und genaue Durchsicht des Manuskriptes und für die Uebernahme des Korreferates. Die freundliche Aufnahme in das Team von Dr. Winiger, das grosse Verständnis und Entgegenkommen aller Kollegen und Kolleginnen haben massgebend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.
- Herrn S. Berces, von dessen langjähriger Erfahrung und den vielen Vorarbeiten ich täglich profitieren durfte. Seine freundliche Begleitung während meiner Arbeit mit vielen fachlichen Anregungen und Ratschlägen erwies sich stets als höchst nützlich.
- Frau U. Meier-Eichholzer für die engagierte Mitarbeit im ELISA-LABOR, die wesentlich zum raschen Erarbeiten des methodischen "Know-how's" beigetragen hat.
- Frä. S. Hofer, die mir mit grosser Geduld das Schreiben des Manuskriptes abgenommen hat. Die vielen Stunden am Bildschirm des Textverarbeitungssystems haben die termingerechte Abgabe des Prüfungsexemplares ermöglicht.
- Speziell der Schweizerischen Kartoffelunion (SKU) und der Schweizerischen Vereinigung für Kartoffelsorten (SVK), die durch die Uebernahme eines Teils der Kosten die Realisierung der vorliegenden Arbeit ermöglichten.