

Anreicherungsmethode für den serologischen Nachweis von Virus in Rebblättern

von

R. BLAICH und R. WIND

Preparation of extracts for the serological assays of virus in grapevine leaves

Summary. — The use of native leaf tannins allows a selective isolation of virus from infected grapevine leaves. The virus particles are first precipitated by the tannins and then resoluted by the use of a buffer containing polyethylene glycol.

Nachweise von Virusinfektionen mit serologischen Methoden, wie dem Latextest (Literatur bei QUERFURTH und PAUL 1979) und dem ELISA-Test (VOLLER *et al.* 1976) sind als Routinemethoden in der Praxis gut eingeführt und für die meisten Pflanzen ohne Komplikationen gut anzuwenden.

Bei der Rebe bieten sich jedoch Schwierigkeiten: Der hohe Tanningehalt und der niedrige pH-Wert des Zellsaftes führen bei der Aufarbeitung zu einer unkontrollierten Ausfällung der Proteine, wenn nicht besondere Vorkehrungen getroffen werden (GEBBING 1968, SCHÄFER 1969, BRÜCKBAUER und RÜDEL 1971, PERI und POMPEI 1971).

Für den Latextest (PAUL, persönliche Mitteilung) werden die Blätter mit Ammoniak vorbehandelt und in einem Puffer homogenisiert, der u. a. einen Zusatz von 1 % Coffein enthält. Die Dauer der Vorbehandlung richtet sich nach der Konsistenz der Blätter und beruht auf der Erfahrung des Testers. Die Aufarbeitung soll mit wenig Puffer erfolgen, um die Probe nicht unnötig zu verdünnen, da der Überstand nach anschließender Zentrifugation weiterverwendet wird. Deshalb kann der für den Test erforderliche pH-Wert (um 7,2) nicht durch ausreichende Pufferung erzielt, sondern muß durch Zusatz von Säure oder Lauge eingestellt werden. Wie Versuche mit Tabakmosaikvirus-Zusätzen zu virusfreien Rebblatthomogenisaten sowie mit Material aus kranken Pflanzen zeigten, bleibt trotz des Coffeinzusatzes ein Teil des Virus im Niederschlag zurück (Tabelle).

Um diese Schwierigkeiten zu beseitigen, wurde nun eine Methode erarbeitet, die auf einem ursprünglich bei der Gewinnung von Enzympräparaten versuchten Prinzip beruht (Literatur bei GEBBING 1968). Das Ausfällen der Proteine durch rebeigene Tannine wird dabei nicht zu verhindern versucht, sondern ausgenutzt, indem — im Gegensatz zur üblichen Methode — der Überstand verworfen und die Proteine aus dem Niederschlag durch Coffeinextraktion zurückgewonnen werden. WOLFE (1976) benutzte statt Coffein Polyäthylenglycol, was den Vorteil hat, daß der entstehende Tanninkomplex abzentrifugiert werden kann, während es bei der Coffeinmethode neben den freigesetzten Proteinen je nach Konzentration zum Teil in Lösung bleibt.

Als bisher beste Methode wird bei uns derzeit das in der Übersicht geschilderte Verfahren angewandt.

Die beim Homogenisieren ohne Coffeinzusatz eintretende Tanninfällung der Viruspartikel führt zu deren Anreicherung, so daß bei der Zerkleinerung der Blätter mit

Methodenvergleich: Analyse von Blattproben reisigkranker Reben aus dem Gewächshaus und aus dem Freiland · Es konnte nur Arabismosaik-Virus nachgewiesen werden

Comparison of methods: Analysis of leaf samples from fanleaf infected field and greenhouse-grown grapevines · Only arabismosaic virus could be found

	Weißburgunder (Gewächshaus)				Morio-Muskat (Freiland)			
	Latextest-Verdünnung							
	1	1/4	1/16	1/64	1	1/4	1/16	1/64
Standardmethode ¹⁾								
Überstand	+	+	-	-	+	+	-	-
Pellet (mit 2% PEG 4000 zerlegt)	+	(+)	-	-	+	(+)	-	-
Pelletmethode (ohne Tanninzusatz)								
Überstand	+	(+)	-	-	(+)	-	-	-
Pellet	+	+	(+)	-	+	+	(+)	-
Pelletmethode (mit 1% Tanninzusatz)								
Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-
Pellet	+	+	(+)	-	+	+	(+)	-

¹⁾ Bei der Standardmethode wird normalerweise nur der Überstand zum Test benutzt; das Pellet wurde in 20 % des Ausgangsvolumens einer 2%igen Lösung von Polyäthylenglycol (PEG) in Wasser aufgelöst, abzentrifugiert und der Überstand mit dem Latextverfahren getestet.

relativ großen Puffermengen gearbeitet werden kann, die ausreichen, um den sauren pH-Wert des Zellsaftes ohne weitere Maßnahmen zu kompensieren.

Die Anreicherung konnte durch den folgenden Versuch direkt nachgewiesen werden: Zu 20 ml Homogenisat von gesunden Rebblättern und zu 20 ml Extraktionspuffer wurde jeweils die gleiche Menge Tabakmosaikvirus zugegeben. Nach Abzentrifugieren des Homogenisats und Wiederauflösung des Zentrifugats in 2 ml Puffer war darin eine

Aufarbeitung von Rebblättern zur Herstellung der Testlösung für den Latextest

Processing of grapevine leaves for the preparation of test solutions for the latex assay

1. 3 g Blätter in 1-2 mm breite Streifen schneiden und locker in ein Reagenzglas stopfen.
2. Mit Puffer¹⁾ so weit auffüllen, daß Blätter eben bedeckt sind.
3. Im Ultraturrax 1 min homogenisieren.
4. Abseihen grober Bestandteile.
5. 10 min bei 20 000 g zentrifugieren.
6. Überstand verwerfen.
7. Schleimigen Niederschlag in 2 ml Extraktionslösung²⁾ auflösen.
8. 1 min bei 20 000 g zentrifugieren.
9. Niederschlag verwerfen.
10. Überstand dient als Testlösung für Latextest.

¹⁾ 2,5% NaHCO₃ und 0,5% Ascorbinsäure in H₂O, für Gewächshausreben ggf. 1% Tannin.

²⁾ 2% Polyäthylenglycol 4000 in H₂O.

höhere Viruskonzentration als in der Kontrollösung vorhanden, wie ein Vergleich von Verdünnungsreihen sowohl im Latex- als auch im ELISA-Test zeigte.

Vergleichsversuche der klassischen Aufarbeitungsmethode mit dem Fällungsverfahren ergaben stets identische Resultate, jedoch war die Verdünnungsfähigkeit der erhaltenen Proben — entsprechend der Anreicherung während der Aufarbeitung — bei letzterem etwas höher.

Eine Beeinträchtigung der Virusnachweise durch die Tanninfällung wurde nicht beobachtet. Die rebspezifisch unterschiedlichen Tanninmengen in den Blättern reichen bei Freilandreben stets zur Fällung der Viren aus. Bei Blättern tanninarmer Gewächshausreben konnte der Nachweis durch Zusatz von 1 % Rebtannin (Präparation s. BACHMANN und BLAICH 1979) zum Blattextrakt verbessert werden (Tabelle).

Zusammenfassung

Virus aus kranken Reben läßt sich ohne apparativen Aufwand anreichern, indem die rebeigenen Tannine zur Proteinfällung benutzt werden und das Virus anschließend durch polyäthylenglycolhaltigen Puffer wieder freigesetzt wird.

Wir danken Herrn Prof. Dr. PAUL, BBA Braunschweig, für die Unterweisung im Latextest-Verfahren und für die Überlassung von latexgekoppelten Antiseren.

Literatur

- BACHMANN, O., und BLAICH, R., 1979: Vorkommen und Eigenschaften kondensierter Tannine in Vitaceen. *Vitis* **13**, 106-116.
- BRÜCKBAUER, H., und RUDEL, M., 1971: Die Viruskrankheiten der Rebe. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- GEBBING, H., 1968: Über pflanzliche Polyphenoloxidasen. Diss. TH Karlsruhe.
- PERI, C., and POMPEI, C., 1971: Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts. *Phytochemistry* **10**, 2187-2189.
- QUERFURTH, G., and PAUL, H. L., 1979: Protein A-coated latex-linked antisera (PALLAS): New reagents for a sensitive test permitting the use of antisera unsuitable for the latex test. *Phytopathol. Z.* **94**, 282-285.
- SCHAEFER, H., 1969: Untersuchungen zur Methodik der Extraktion und Disk-Elektrophorese der Blatteiweiße der Gattung *Vitis*. *Wein-Wiss.* **24**, 205-232.
- VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E., CLARK, M. F. and ADAMS, A. N., 1976: The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* **33**, 165-167.
- WOLFE, H.W., 1976: Identification of grape varieties by isoenzyme banding pattern. *Amer. J. Enol. Viticult.* **27**, 68-73.

Eingegangen am 20. 10. 1981

Priv.-Doz. Dr. R. BLAICH
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
D-6741 Siebeldingen