

Botrytis-Tests bei der Traubenannahme

Mit Graufäule (*Botrytis*) infiziertes Lesegut führt immer wieder zu unerfreulichen Diskussionen bei der Traubenannahme. Es besteht ohne Zweifel ein ausgewiesener Bedarf für ein verlässliches und schnelles Diagnoseverfahren zur Erfassung des Befallsgrades. Auf der Basis von *Botrytis*-spezifischen Antikörper-Reaktionen wurden zwei neue Testsysteme entwickelt, die je nach Verfügbarkeit von Geräten und Zeit eine etwas aufwendigere, genaue Bestimmung des Fäulnisanteils oder dann eine rasche Abschätzung auf Teststreifen erlauben. Gemäss den Angaben der Autoren haben beide Verfahren ihre Praxistauglichkeit bewiesen.

MICHAEL FISCHER UND HANNS-HEINZ KASSEMAYER,
STAATLICHES WEINBAUINSTITUT FREIBURG, FREIBURG (D)
ANDREA WOSNITZA, CAROLINE FREYE-MINKS UND RENATE LOEWE,
LOEWE BIOCHEMICA GMBH, SAUERLACH (D)
Michael.Fischer@wbi.bwl.de

Der Grauschimmel, *Botrytis cinerea*, befällt eine Vielzahl von Kulturpflanzen, darunter Beerenobst, Gemüse und Zierpflanzen. Auf geeignetem Gewebe wie der Oberfläche von Weinbeeren verbreitet sich der Pilz rasch mit Hilfe ungeschlechtlich gebildeter Konidien (Abb. 1, 2). *Botrytis* bildet unter natürlichen Bedingungen sogenannte extrazelluläre Phenoloxidasen aus, die ins Medium abgegeben werden. Der Hauptvertreter dieser Enzymgruppe, die Laccase, ist verantwortlich für die unerwünschte Oxidation und damit das Braunwerden des Mosts. Vor allem Trauben roter Rebsorten müssen wegen der verlängerten Kontaktzeit weitestgehend frei von *Botrytis*-Befall sein. Ein schneller und gezielter Nachweis des Pilzes bei der Traubenannahme ist aber nicht ohne weiteres möglich.

Seit Jahren ist es erklärtes Ziel der Weinwirtschaft, eine prozessbegleitende Kontrolle der Laccase- beziehungsweise der *Botrytis*-Konzentration über alle Phasen der Weinkelterung zu gewährleisten. In einem gemeinsamen Forschungsprojekt des Staatlichen Weinbauinstituts Freiburg mit der Firma LOEWE Biochemica wurden nun zwei serologische Testverfahren (ELISA und Lateral Flow Schnelltest) entwickelt, die eine schnelle und zuverlässige Beurteilung des Leseguts bei der Traubenannahme und sogar im Weinberg erlauben.

Ein Befall der Beeren durch *Botrytis cinerea* war bislang ungenau oder nur durch bezüglich Gerätschaften und vom Arbeitseinsatz her aufwendige Analysen nachweisbar:

- Hervorzuheben ist vor allem die weithin geübte Erfassung mittels Bonitur (Schadensausmass wird visuell abgeschätzt); dabei wird aber nur der äusserlich sichtbare Befall erfasst, Aussagen über Enzymaktivitäten sind nicht möglich.

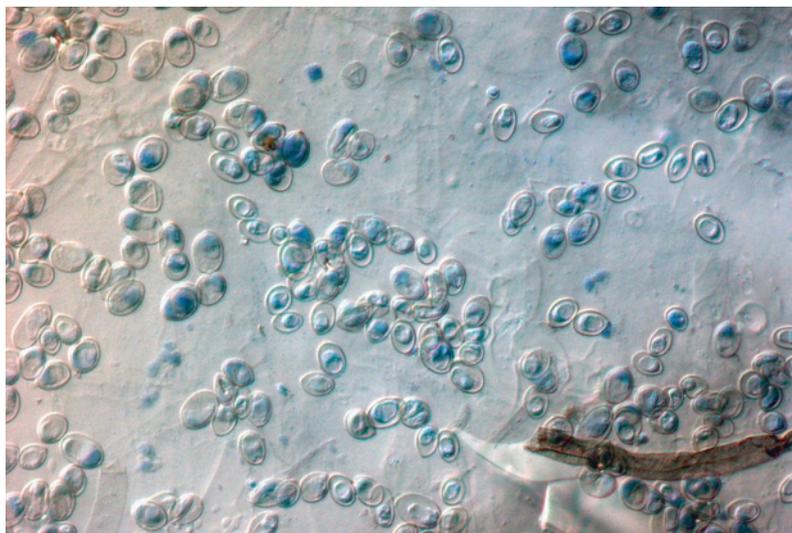


Abb. 1: *Botrytis cinerea*, Versuchsprobe: zahlreiche eiförmige Konidien.

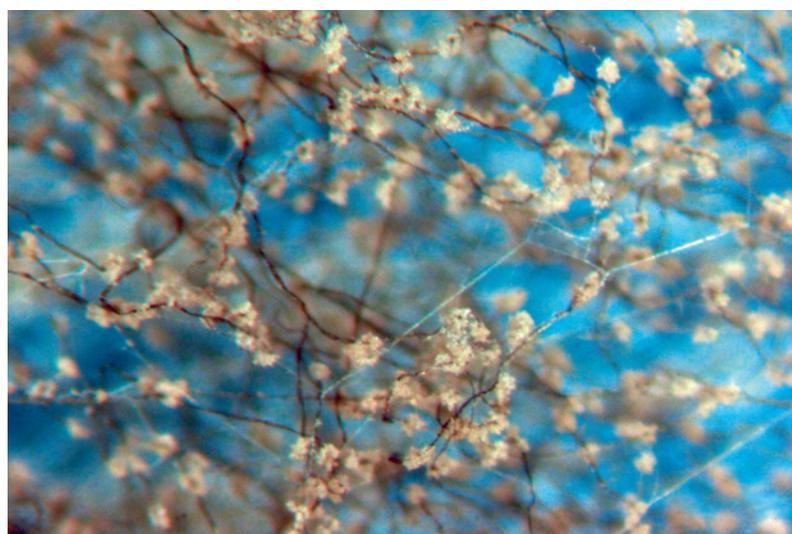


Abb. 2: *Botrytis cinerea*, befallene Beere: dunkle Hyphenstränge und zahlreiche helle Konidienköpfchen.

- Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis über die Bestimmung der Laccase-Aktivität («Syringaldazintest») in den Proben. Das gelbe Substrat Syringaldazin wird dabei von der Laccase (wenn vorhanden) zum rötlichen Chinon oxidiert. Die Messung erfolgt photometrisch über die Extinktionszunahme bei 530 nm.
- Der Nachweis über die Infrarot-Spektroskopie («GrapeScan»). Nach aufwendiger Kalibrierung des Geräts können im Most Inhaltsstoffe wie Glucose, Fructose oder auch Glycerin erfasst werden; die genaue Korrelation mit dem tatsächlichen Befallsgrad durch *Botrytis* ist aber umstritten.

Serologische Testverfahren

Serologische Testverfahren (das sind Verfahren, die auf Immunreaktionen beruhen) gelten als zuverlässige Methoden zur Diagnostik einer Vielzahl von Pflanzenpathogenen (Viren, Pilze, Bakterien). Die hier vorgestellten Tests basieren auf einem neuen und spezifischen Antiserum gegen *Botrytis cinerea*. Das Prinzip des Nachweises beruht auf der stabilen Wechselwirkung zwischen Antigen (hier *Botrytis cinerea*; Mycel, Konidien, Proteinen) und dem homologen Immunglobulin (IgG, Antikörper). Das Antigen in der befallenen Probe bildet dabei eine Brücke zwischen dem an eine Festphase gebundenen Immunglobulin und einem Enzym-markierten Antikörper. Dieses Konjugat ermöglicht über eine nachgeschaltete Farbreaktion den quantitativen Nachweis und damit die Beurteilung der Befallsstärke (Abb. 3).

Im Lauf der Arbeiten kristallisierten sich zwei Testmethoden zum *Botrytis*-Nachweis heraus:

Cocktail-ELISA

Dieses klassische Testverfahren ermöglicht zuverlässig und dokumentierbar eine quantitative Abschätzung des *Botrytis*-Befalls. Es ist für die Beurteilung des Leseguts nach der Ernte oder aber auch für die Abschätzung eines latenten Befalls schon im Weinberg geeignet und bietet sich damit als Werkzeug für das Qualitätsmanagement an.

Der Test kann in einem ELISA-Labor mit der vorhandenen Ausstattung durchgeführt werden. Als erster Arbeitsschritt wird der *Botrytis*-spezifische Antikörper auf

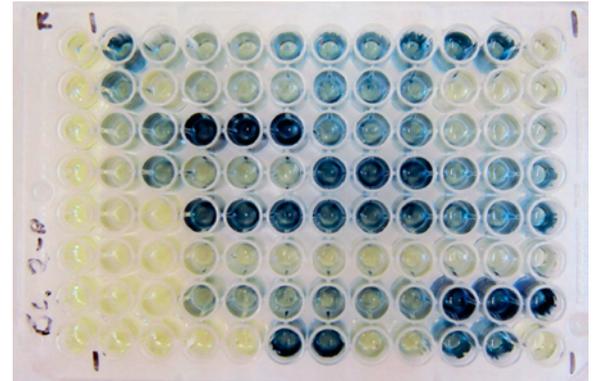


Abb. 4: Farbentwicklung des *Botrytis cinerea* ELISA nach 30 Min. Reaktionszeit. Blaue Positionen zeigen Befall an – eine visuelle Beurteilung ist leicht möglich.

eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gebunden und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Most- oder Maischeproben zusammen mit dem Enzym-markierten Antikörper aufgetragen. Am nächsten Morgen wird die farblose Substratlösung zugegeben, die bei Vorhandensein des Antigens in einen blauen Farbstoff umgewandelt wird. Nach etwa ½ bis 1 Stunde kann der Farbumschlag spektrofotometrisch gemessen oder visuell bewertet werden. Je intensiver die Blaufärbung, desto höher ist der Befall mit *Botrytis* (Abb. 4). Das Verfahren eignet sich besonders für Massentests, da gleichzeitig 96 Proben (oder nacheinander ein Vielfaches davon) analysiert werden können. Bei Auftrag der Proben am Abend liegen die Ergebnisse im Verlauf des nächsten Morgen vor.

Lateral Flow Schnelltest

Der Lateral Flow Test ermöglicht eine Beurteilung des *Botrytis*-Befalls innerhalb weniger Minuten. Der Test kann ohne Vorkenntnisse und Laborausstattung vor Ort durchgeführt werden. Auch bei diesem Testverfahren werden *Botrytis*-spezifische Antikörper eingesetzt. Die Basis des Lateral Flow Tests bildet eine Nitrocellulosemembran, die zum Schutz vor mechanischen Einflüssen in eine Plastikkassette eingebracht ist (Abb. 5). Dieses Design erweist sich als besonders robust in der praktischen Anwendung unter Arbeitsbedingungen in der Weinkellerei oder im Weinberg.

Die vorbereitete Probe (aus Trauben, Most, Maische) wird durch die Probenauftragsöffnung pipettiert und bringt den rot gefärbten *Botrytis*-spezifischen Antikörper in Lösung. Bei *Botrytis*-Befall entsteht ein Immunkomplex aus Antigen und Antikörper, der zur Testlinie wandert. Er wird dort festgehalten (immobilisiert) und bildet eine scharfe rote Bande aus. Ist in der Probe kein Antigen enthalten, bildet sich kein Komplex und es kann keine rote Testlinie entstehen. Abbildung 5 illustriert die einfache Durchführung des Tests.

Obwohl eine quantitative Auswertung des Lateral Flow Tests derzeit nicht möglich ist, kann mit einiger Erfahrung der Befallsgrad doch abgeschätzt werden: Erscheint eine starke Testlinie innerhalb einer Minute, ist von einem starken Befall auszugehen. Erscheint sie innerhalb von zwei bis fünf Minuten, ist ein mittlerer Befall wahrscheinlich. Ist nach zehn Minuten nur eine

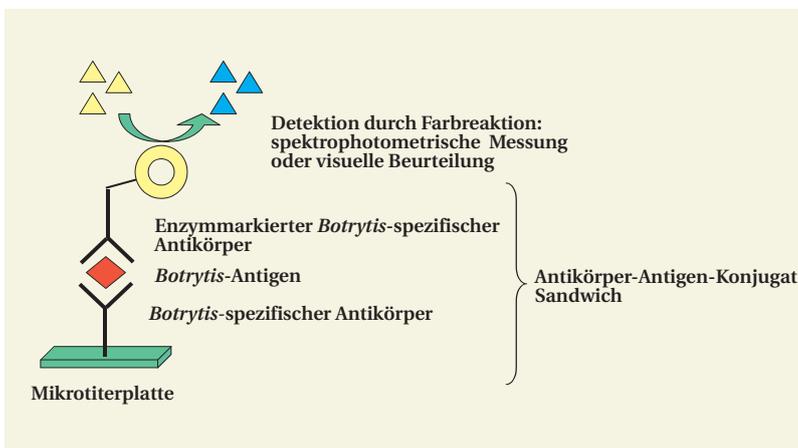


Abb. 3: Prinzip des ELISA zum Nachweis von *Botrytis cinerea*.

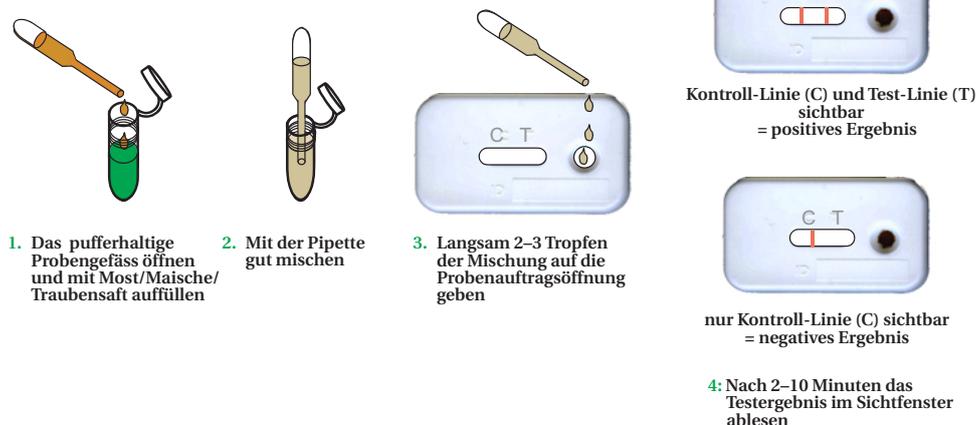


Abb. 5: Design und Durchführung des *Botrytis cinerea* Lateral Flow Schnelltests.

schwache Linie zu erkennen, liegt der Befall wohl unter 10%. Abbildung 6 zeigt eine Versuchsreihe mit bonitieren Trauben, die eine «halbquantitative» Aussage über den Befallsgrad zulässt.

Korrelation zwischen Bonitur und Nachweis

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die hauptsächlichsten Ausbreitungseinheiten des Pilzes, die Konidien, bis zu sehr niedrigen Konzentrationen fotometrisch nachweisen lassen (etwa 1000/ml; Abb. 7); dies gilt auch für das zugehörige Mycel. Mit Einführung eines internen Proteinstandards ergeben sich erfolgversprechende Möglichkeiten zur Quantifizierung des Nachweises.

Zur weiteren Abklärung wurden Versuchsreihen mit Befallsstärken zwischen 0% und 100% durchgeführt (Befallsgrad bestimmt aus ausgezählten gesunden und befallenen Trauben). Die Proben mit definiertem *Botrytis*-Befall wurden im ELISA, im Lateral Flow und im Laccase-Enzymassay getestet. Dabei zeigt sich für alle getesteten Rebsorten (Blauburgunder, Riesling, Müller-Thurgau, Ruländer) eine gute Korrelation zwischen Bonitur und serologischem Nachweis (Abb. 8).

Der Test in der Praxis

Das neu entwickelte serologische Verfahren wurde in den letzten Jahren bei der Lese an verschiedenen Standorten in Deutschland und Frankreich in der Praxis erprobt. Von mehreren Hundert weissen und roten Sortenproben erwiesen sich etwa 30% als nachweisbar mit *Botrytis* belastet. Nicht unerwartet war ein Befall von weissen Sorten deutlich häufiger. Grundsätzlich waren alle Sorten betroffen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmass. Der Bedarf für einen empfindlichen *Botrytis*-Nachweis ist demnach belegt.

Spezifität der Testmethoden

Beide Testmethoden – Cocktail-ELISA sowie Schnelltest – wurden intensiv auf ihre Spezifität für *Botrytis cinerea* untersucht. Dazu wurde das Antiserum einerseits auf

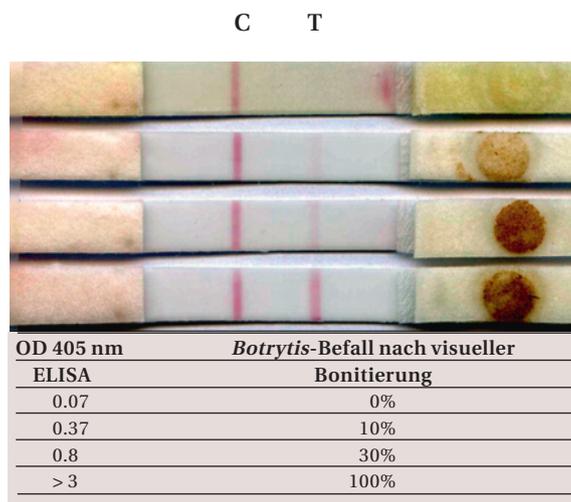


Abb. 6: Unterschiedlich stark befallene Trauben im Lateral Flow Test (Streifen aus der Testkassette entfernt). Im Vergleich sind die Messergebnisse der ELISA Analyse angegeben.

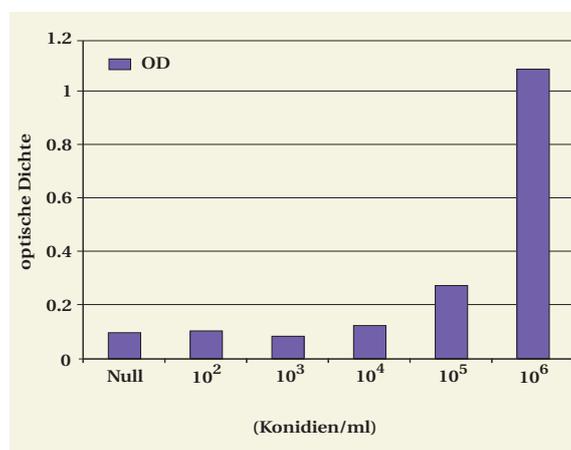


Abb. 7: Gute Korrelation zwischen Konidienkonzentration und serologischem Nachweis.

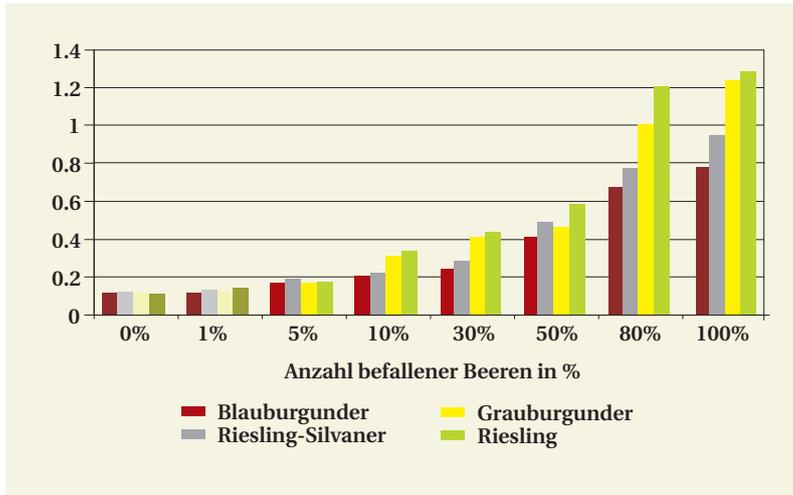


Abb. 8: Gute Korrelation zwischen «ausgezähltem» Befallsgrad und optischer Dichte in verschiedenen Rebsorten.

seine Reaktion mit anderen Botrytis-Isolaten und nahe verwandten Pilzen, andererseits auf zahlreiche rebenrelevante Pathogene und Saprophyten (Bakterien, Pilze, Hefen, die auf abgestorbenem Material leben) sowie auf die gängigsten im Weinbau verwendeten Spritzmittel (inkl. Botrytizide) getestet. Wir konnten in keinem Fall falsch-positive Neben- beziehungsweise Kreuzreaktionen beobachten.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze beider Testverfahren liegt sehr niedrig: Wir haben einen Positivstandard aus *Botrytis cinerea*-Myzel hergestellt und die Menge an löslichen Pilzproteinen quantitativ bestimmt. Der Cocktail-ELISA zeigte noch bei 150 µg/ml Pilzprotein eine positive Reaktion. Beim Lateral Flow Test liegt sie etwas höher, bei zirka 300 µg/ml. Werden visuell bonitierte Trauben für den Nachweis herangezogen, ergibt sich für beide Testverfahren eine Nachweisgrenze, die zwischen < 1 und 5% Botrytis-Befall liegt. ■

Dépistage de la pourriture grise à la réception du raisin

Nos expériences ont confirmé que les nouveaux tests sérologiques qui ont été développés pour le dépistage de la pourriture grise pouvaient tous sans exception convenir pour le contrôle de la qualité du moût. Ils affichent en effet une grande robustesse à l'encontre des résidus de produits phytosanitaires et il ne se produit pas de réactions croisées avec d'autres micro-organismes présents dans le raisin. Le procédé ELISA est nettement plus précis que les contrôles de qualité conventionnels et il permet de dépister même les quantités infimes du champignon.

Les avantages des tests résident 1) dans la possibilité de définir le degré d'infestation, 2) la capacité de traite-

ment élevée et 3) la spécificité et la sensibilité du dépistage. Un bémol dans l'optique de l'application pratique réside dans le fait qu'entre le prélèvement des échantillons et le résultat, il s'écoule plusieurs heures avec le test au cocktail ELISA. Le test express permet cependant de formuler un résultat semi-quantitatif en l'espace de quelques minutes.

Les deux procédés de test sont mûrs pour la pratique. Ils se trouvent dans le commerce et peuvent être obtenus auprès de la maison LOEWE Biochemica GmbH, Mühlweg 2a, 82054 Sauerlach (D, Fax +49 (0)8104- 61648).

R É S U M É