

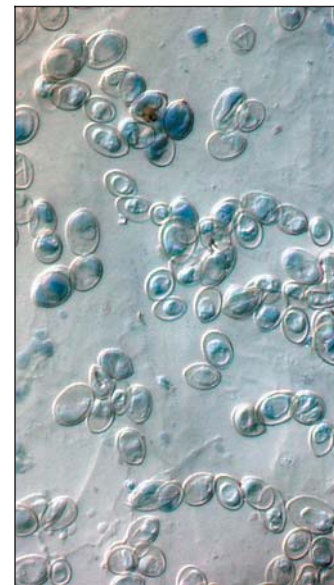
Botrytis-Test bei der Traubenannahme

Michael Fischer und Hanns-Heinz Kassemeyer, Staatliches Weinbauinstitut Freiburg; Andrea Wosnitzer, Caroline Freye-Minks und Renate Loewe, Fa. Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach

In einem gemeinsamen Forschungsprojekt des Staatlichen Weinbauinstitutes Freiburg mit der Fa. Loewe ist es gelungen, zwei serologische Testverfahren zu entwickeln, die eine schnelle und gleichzeitig empfindliche, spezifische und zuverlässige Beurteilung des Lesegutes hinsichtlich Botrytis bei der Traubenannahme und im Weinberg erlauben.



Botrytis cinerea, Beere: dunkle Hyphenstränge und zahlreiche helle Konidienköpfchen.



Botrytis cinerea, Versuchsprobe: zahlreiche eiförmige Konidien. Bilder: Fischer

Botrytis cinerea, der Grauschimmel, verbreitet sich an der Oberfläche von Trauben rasch mit Hilfe ungeschlechtlich gebildeter Konidien. Der Pilz bildet unter natürlichen Bedingungen extrazelluläre Phenoloxidasen aus, deren Hauptvertreter, die Laccase, bei unerwünschter Oxidation für das Braunwerden des Mostes verantwortlich ist. Vor allem Trauben roter Sorten sollten weitestgehend frei von Botrytis-Befall sein, ein gezielter Nachweis im Rahmen der Traubenannahme war bisher aber nicht ohne weiteres möglich.

Bislang verfügbare Nachweismethoden

Ein qualitativer und/oder quantitativer Beeren-Befall durch Botrytis cinerea ließ sich bislang nur auf ungenauem oder aber apparativem und arbeitsaufwendigem Weg nachweisen: → Weithin üblich ist die optische Bonitur, das heißt, das Schadensausmaß wird visuell abgeschätzt; dabei wird nur der äußerlich sichtbare Befall erfasst, mit allen damit verbundenen Unwägbarkeiten. → Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis über die Bestimmung der Laccase-Ak-

tivität („Syngaldazintest“). Das gelbe Substrat Syngaldazin wird dabei von der gegebenenfalls vorhandenen Laccase zum rötlichen Chinon oxidiert. Die Messung erfolgt photometrisch über die so genannte Extinktionszunahme bei 530 nm. → Als dritte Möglichkeit gibt es den Nachweis über die Infrarot-Spektroskopie („GrapeScan“). Nach einer Kalibrierung des Geräts können im Most Inhaltsstoffe wie Glucose, Fructose oder

auch Glycerin gemessen werden, wobei eine genaue Korrelation mit dem tatsächlichen Befallsgrad mit Botrytis aber umstritten ist.

Neue serologische Testverfahren

Serologische (immunologische) Testverfahren gelten seit langem als zuverlässige und anerkannte Methoden zur Diagnostik einer Vielzahl von Krankheitserregern



Für diesen Botrytisbefall – hier an Ruländer-Trauben – benötigt man kein spezielles Nachweisverfahren. Bild: WBI

(Viren, Pilze, Bakterien). Die durch das Staatliche Weinbauinstitut Freiburg und die Fa. Loewe entwickelten Testmethoden basieren auf einem neuen, spezifischen Anti-Serum gegen Botrytis cinerea. Das Prinzip der vorgestellten Tests beruht auf der stabilen Wechselwirkung zwischen Antigen (hier Botrytis cinerea Mycel, Konidien, Proteine) und dem homologen Immunglobulin (IgG, Antikörper). Das Antigen in der befallenen Probe bildet dabei eine Brücke zwischen dem Festphasengebundenen IgG und einem enzymmarkierten Antikörper (Konjugat), das über eine nachgeschaltete Farbreaktion die Detektion und damit die Beurteilung der Befallsstärke ermöglicht.

Im Laufe des Forschungsprojektes 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 Qualitätsbeurteilung des Lesegutes nach der Lese oder aber auch für das Monitoring latenten Befalls schon im Weinberg und da-

Fortsetzung nächste Seite

mit für das Qualitätsmanagement geeignet.

Der Test kann in einem ELISA-Labor mit der üblichen Ausstattung durchgeführt werden. Als erster Arbeitsschritt wird der Botrytis-spezifische Antikörper auf eine 96-well Mikrotiterplatte gebunden und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Most- oder Maischeproben zusammen mit dem enzymmarkierten Antikörper aufgetragen. Am nächsten Morgen wird die Substratlösung zugegeben.

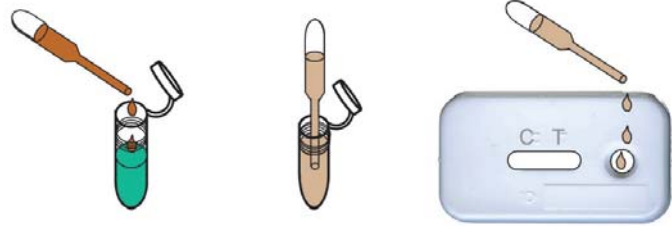
Die Substratlösungen zeigen zuverlässig eine vom Befallsgrad des untersuchten Traubengutes abhängige Farbreaktion, die sich photometrisch nachweisen und über die ermittelten OD-Werte quantitativ erfassen lässt. Nach etwa einer halben bis einer Stunde kann der Farbumschlag spektrophotometrisch oder visuell bewertet werden. Je intensiver die Blaufärbung, desto höher ist der Befall mit Botrytis (siehe untenstehendes Foto).

Das Verfahren eignet sich besonders für Massentests, da gleichzeitig hunderte von Proben analysiert werden können. Bei Auftrag der Proben am Abend liegen die Ergebnisse im Verlauf des nächsten Morgens vor.

● Lateral Flow Schnelltest

Dieses Testverfahren ermöglicht die Beurteilung des Botrytis-Befalls innerhalb weniger Minuten. Der Test kann ohne Vorkenntnisse und Laborausstattung am Ort des Geschehens 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 Plastikassette eingebracht ist. Dieses Design erweist sich als besonders anwenderfreundlich und robust in der praktischen Anwendung unter den Arbeitsbedingungen im Keller oder im Weinberg.



1. Das Probengefäß mit enthaltenem Puffer öffnen und mit Most/Maische/Traubensaft auffüllen
2. Mit der Pipette gut mischen
3. Langsam 2-3 Tropfen der Mischung auf die Probenauftragsöffnung geben

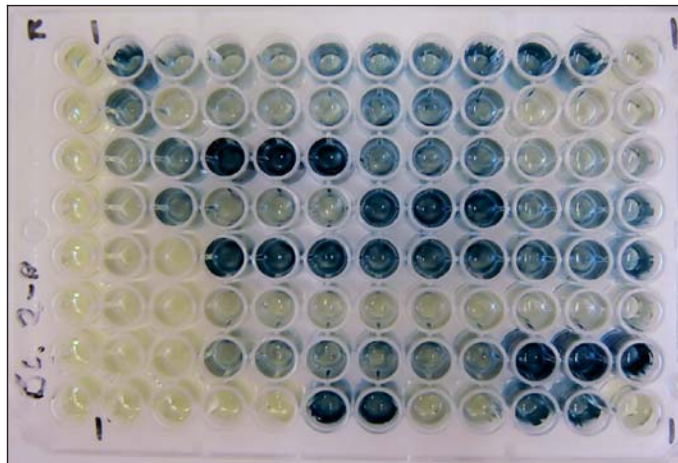
Design und Durchführung des Botrytis cinerea Lateral Flow Schnelltests.
Bild: Loewe

Die vorbereitete Probe (aus Traube, Most, Maische) wird durch die runde Probenöffnung eingeträufelt und löst den rotgefärbten Botrytis-spezifischen Antikörper. Bei Botrytis-Befall entsteht ein Immunkomplex aus Antigen und Antikörper, der zur Testlinie wandert. Er wird dort immobilisiert und bildet eine scharfe rote Bande aus. Ist in der Probe kein Antigen enthalten, entfällt die Komplexbildung; es kann keine rote Testlinie entstehen. Die obenstehende Abbildung illustriert die einfache Durchführung des Tests.

Obwohl eine quantitative Auswertung des Lateral Flow Tests derzeit noch nicht möglich ist, kann mit einiger Erfahrung durchaus eine Aussage zum Befalls-

grad gemacht werden: Erscheint eine starke Testlinie innerhalb einer Minute, ist von einem starken Botrytis-Befall auszugehen. Erscheint sie innerhalb von zwei bis fünf Minuten, ist ein mittlerer Befall wahrscheinlich. Ist nach zehn Minuten nur eine schwache Linie zu erkennen, liegt der Befall schätzungsweise unter zehn Prozent. Die Abbildung auf der nächsten Seite oben links zeigt eine Versuchsreihe mit bonitierten Trauben, die eine halbquantitative Aussage über den Grad an Befall zulässt.

Der Schnelltest lässt sich ohne Probleme in den Ablauf der Traubenverarbeitung einfügen und eignet damit sich für eine rasche Kontrolle während der Traubenannahme.



Farbentwicklung des Botrytis cinerea ELISA nach 30 Minuten Reaktionszeit – blaue Positionen zeigen Befall an, eine visuelle Beurteilung ist leicht möglich.
Bild: Loewe



Kontroll-Linie (C) und Test-Linie (T) sichtbar
= positives Ergebnis



nur Kontroll-Linie (C) sichtbar
= negatives Ergebnis

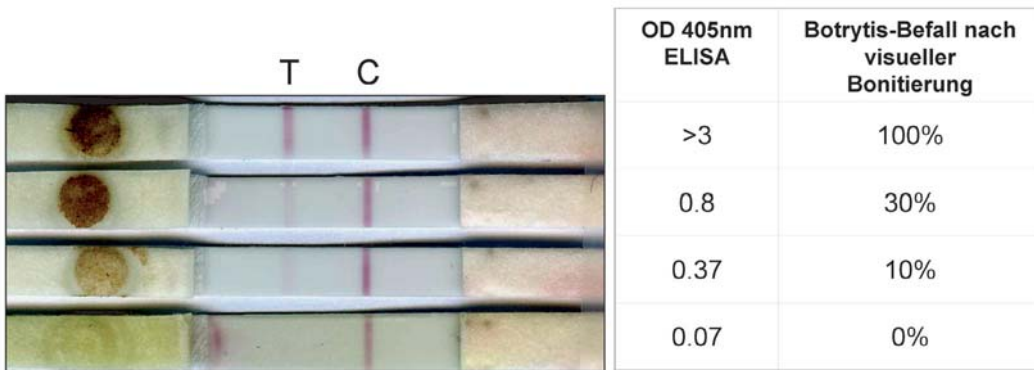
4. Nach 2-10 Minuten das Testergebnis im Sichtfenster ablesen

Optische Bonitur und serologischer Nachweis

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die wichtigsten Ausbreitungsteile des Pilzes, die Konidien, bis hin zu sehr niedrigen Konzentrationen photometrisch nachweisen lassen (etwa 10^3 pro ml); dies gilt entsprechend auch für das zugehörige Mycel. Über die Einführung eines internen Proteinstandards ergeben sich erfolversprechende Möglichkeiten zu einer Quantifizierung des Nachweises, zum Beispiel mit Hinblick auf einen definierbaren Befallsgrad.

Zur weiteren Klärung der Frage wurden Versuchsreihen mit Proben definierter Befallsstärken von 0 % bis 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, dass bei allen getesteten Rebsorten (Spätburgunder, Riesling, Müller-Thurgau, Ruländer) eine gute Korrelation zwischen definierter Bonitur und serologischem Nachweis besteht (siehe Grafik auf der nächsten Seite).

Fortsetzung nächste Seite



Unterschiedlich stark befallene Trauben im Lateral Flow Test (Streifen aus der Testkassette entfernt); im Vergleich sind die Messergebnisse der ELISA-Analyse angegeben. Bild: Loewe

Ein Resümee

Begleitende Arbeiten zeigen, dass die entwickelten serologischen Testverfahren ohne Einschränkung zur Überprüfung der Mostqualität einsetzbar sind. Sie sind robust gegenüber möglichen Rückständen von Pflanzenschutzmitteln und, besonders bedeutsam, es kommt zu keinen Kreuzreaktionen mit anderen an Wein vorkommenden Mikroorganismen. Eine Reproduzierbarkeit sowie ein möglicher Abgleich mit anderen Nachweisverfahren sind vollständig gegeben.

Das Verfahren ist deutlich genauer im Vergleich zur üblichen visuellen Bonitur und erlaubt den Nachweis auch geringster Mengen des Botrytis-Pilzes, unabhängig von dessen Zustand (Konidien, Mycel etc.).

Vorteile der Verfahren liegen nach den bisherigen praktischen Erfahrungen → in der prinzipiell möglichen Relation mit bestimmten Befallsgraden, → in der Möglichkeit eines beträchtlichen Probendurchsatzes sowie → in der insgesamt empfindlichen Erfassung des Verursacher-Organismus.

Ein mit Hinblick auf die Praxis möglicher Nachteil liegt im notwendigen Zeitintervall von einigen Stunden zwischen Probennahme und Befund. Diesem Problem kann gegebenenfalls mit der Anwendung des Schnelltests begegnet werden; hier ist eine halbquantitative Aussage innerhalb weniger Minuten möglich.

Das Testverfahren ist insgesamt reif für eine umfassende Anwendung in der Praxis; eine zuverlässige Bewertung des Leseguts wird dadurch ermöglicht.

Beide Tests sind kommerziell verfügbar und können bezogen werden bei der Loewe Biochemica GmbH, Mühlweg 2a, 82054 Sauerlach (Fax 08104/61648). □

Dr. Michael Fischer,
Telefon 0761/40165-78,
Michael.Fischer@wbi.bwl.de

Der Test in der Praxis

Das entwickelte serologische Verfahren wurde anlässlich der Weinlese der letzten Jahre an verschiedenen Standorten in Deutschland und Frankreich wiederholt und prinzipiell erfolgreich in der Praxis erprobt. Auch unter verschiedenen Anlieferungsbedingungen hinsichtlich des Leseguts war eine 100-prozentige Probenahme möglich, unter gleichzeitiger Berücksichtigung von Sorte, gegebenenfalls Reifegrad und allgemeinem Zustand der Beeren.

Von mehreren hundert Proben, sowohl weißen als auch roten Sorten, erwiesen sich etwa 30 % als nachweisbar mit Botrytis belastet. Nicht unerwartet, war ein Befall von weißen Sorten dabei deutlich häufiger nachweisbar. Wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, waren prinzipiell aber alle Sorten gleichermaßen betroffen. Ein grundsätzlicher Bedarf eines empfindlichen Nachweises von Botrytis ist demnach jedenfalls gegeben.

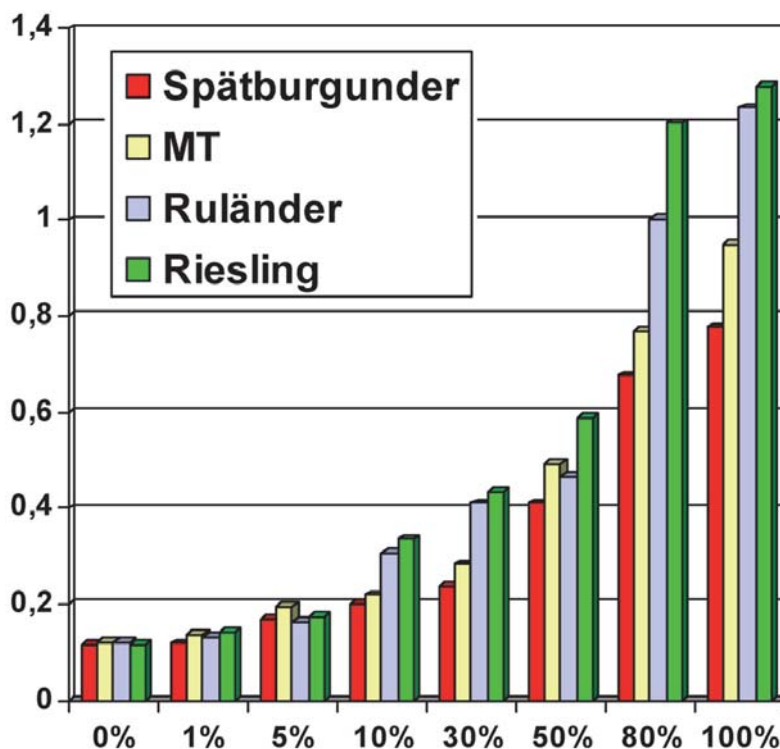
Beide Testmethoden, Cocktail-ELISA sowie Schnelltest, wurden intensiv hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber Botrytis cine-

rea untersucht. Hierzu wurde das Antiserum einerseits auf Reaktion mit anderen Botrytis-Isolaten und nahe verwandten Pilzen, andererseits auf zahlreiche rebenrelevante Pathogene und Saprophyten (Bakterien, Pilze, Hefen) sowie auf die gängigsten im Weinbau verwendeten Spritzmittel gegen Schädlingsbefall getestet. Wir konnten in keinem Fall falsch-positive Neben- bzw. Kreuzreaktionen beobachten. Auch handelsübliche Botrytizide beeinflussten die Testverfahren nicht.

Die Nachweisgrenze beider Testverfahren liegt sehr

niedrig. Hierzu haben wir einen Positivstandard aus Botrytis cinerea-Mycel hergestellt und die Menge an löslichen Pilzproteinen mittels einer quantitativen Proteinbestimmung bestimmt. Der Cocktail-ELISA zeigt eine positive Reaktion noch bei 150 Mikrogramm je Milliliter Pilzprotein. Beim Lateral Flow Test liegt sie geringfügig höher, bei zirka 300 Mikrogramm.

Werden visuell bonitierte Trauben für den Nachweis herangezogen, ergibt sich bei beiden Testverfahren eine Nachweisgrenze, die zwischen 1 und 5 % Botrytis-Befall liegt.



Gute Korrelation zwischen „ausgezähltem“ Befallsgrad und Konidienkonzentration in verschiedenen Rebsorten. Grafik: Fischer