

(Aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.)

Bedeutung und Wert der serologischen Virusdiagnose für die Kartoffelzüchtung.

Von C. Stapp.

Die Sicherstellung unserer Ernährung ist eine der dringendsten Forderungen besonders während des Krieges. Von allen landwirtschaftlichen Erzeugnissen dürfte der Kartoffel als dem Volksernährungsmittel schlechthin daher auch die größte Wichtigkeit zuzusprechen sein. Die Ernteerträge je Flächeneinheit nicht absinken zu lassen, zumindest auf ihrer jetzigen Höhe zu halten, nach Möglichkeit noch zu steigern, muß daher unser vornehmstes Bestreben sein. Daß der Kartoffelbau durch die sog. *Abbaukrankheiten* ernstlich gefährdet ist, wird in Fachkreisen nicht bestritten. Diese Abbaukrankheiten sind — das steht heute einwandfrei fest — auf den Befall der Kartoffeln durch *Viren* zurückzuführen. Wenn solche Viren in den Kartoffelbeständen in größerem Umfange auftreten, können die Ertragsminderungen recht beträchtliche Ausmaße annehmen. Nach neueren Veröffentlichungen von KLAPP (2) zeigte sich in einem Bonner Nachbauversuch bereits nach einem Jahr im Mittel mehrerer Sorten ein Ertragsrückgang von rund 62%, im 4. Nachbau sogar von rund 85%, d.h. also, daß im 4. Nachbaujahr nur noch 15% der ursprünglichen Erntemenge anfiel! Solche Ernteverluste lassen sich aber verhindern durch Anbau *gesunder Kartoffelpflanzgutes*. Nun läßt sich zwar bei vielen Kartoffelsorten der Befall bzw. die spontane Infektion durch ein Virus am *Symptombild* des Kartoffellaubes feststellen, es besteht aber *keinerlei* Möglichkeit, bei den Knollen auf Grund rein äußerlicher Merkmale oder am Knollenfleisch irgendwie zu erkennen, ob dieselben virusverseucht sind oder nicht. Andererseits gibt es Kar-

toffelsorten, die als „latente Virusträger“ angesprochen werden müssen. Diese Virusträger, denen das von ihnen jeweils beherbergte Virus anscheinend nichts anhaben kann bzw. deren Knollenerträge nicht mehr wesentlich absinken, zeigen teilweise auch am Kraut keine charakteristischen Krankheitssymptome. Bei gewissen Sorten jedoch, die seit Jahren zu 100% verseucht sind, würde voraussichtlich — das muß einmal hier hervorgehoben werden — das Habitusbild der Kartoffelpflanze ein ganz anderes sein, als es zur Zeit bekannt ist, wenn diese Sorten befreit von ihrem jeweiligen Virus gezogen werden könnten.

Diese „latenten“ Virusträger sind nicht nur eine Gefahr für benachbarte gesunde Kartoffelbestände, sondern sie selbst sind auch jeweils stark gefährdet, weil bei Hinzutritt eines zweiten Virus mit erheblichen Ernteminderungen bei diesen Sorten sicher zu rechnen ist.

In allen den erwähnten Fällen ist es notwendig, Untersuchungsverfahren zu besitzen, die eine schnelle und sichere Diagnose der Kartoffeln auf Virusfreiheit bzw. Virusbefall gestatten. Diese müssen auch möglichst einfach in der Durchführung sein, damit in zeitlich engen Grenzen eine recht große Zahl von Kartoffelsämlingen oder anderem Kartoffelzüchtmaterial auf ihren Gesundheitszustand geprüft werden kann. Alle bisherigen Schnellverfahren chemischer, physikalisch-chemischer oder kolorimetrischer Art sind aber unspezifisch. Sie zeigen jeweils höchstens an, daß in den untersuchten Pflanzen oder Pflanzenteilen irgendwelche Abweichungen vom normalen vitalen Stoffwechsel vorliegen, nicht aber, ob und mit welchen Viren das pflanzliche Untersuchungsmaterial verseucht ist.

Das einzige, wirklich brauchbare biologische Verfahren, die Keimaugenmethode in Verbindung mit dem sog. Pflanzentest, das von KÖHLER

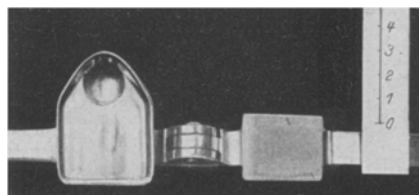
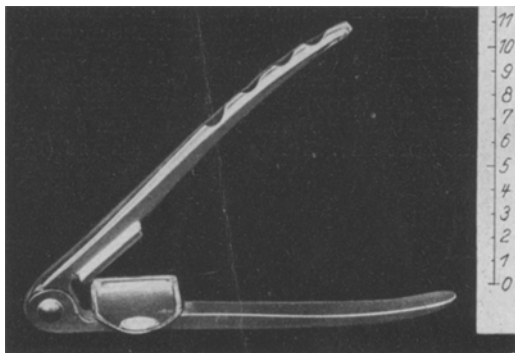


Abb. 1 u. 2. Handsaftpresse mit „Tropfenfänger“ zur Gewinnung der serologisch zu prüfenden kleinen Mengen von Pflanzensaft.

(3) in Deutschland eingeführt wurde, eignet sich jedoch nicht für Massenuntersuchungen.

Hier stellt nun das serologische Verfahren, die sog. *Sero-Mikro-Reaktion*, einen bedeutsamen Fortschritt dar (6, 7, 1). Frisch vom Felde entnommenes Kartoffellaub kann unmittelbar zu

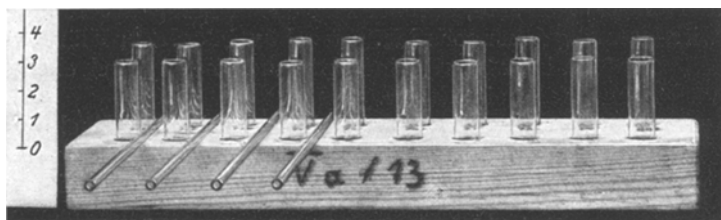


Abb. 3. Holzblock zur Aufnahme von 20 kleinen Glasröhrchen der klar zentrifugierten Preßsäfte.

diesen Untersuchungen herangezogen werden. Die Kartoffelknollen, die als solche einen hohen Hundertsatz *unspezifischer* Reaktionen ergeben, werden zunächst im *Halbdunkel* angekeimt, bis die Keime eine Länge von 3—4 cm haben¹.

Aus einer Probe des Kartoffellaubes — es genügen im allgemeinen je nach Größe 2—4 Fiederblätter — oder aus 1—2 Keimen der Kartoffelknolle wird der Saft ausgepreßt. Vorläufig bedienen wir uns hierzu einer Handsaftpresse, wie sie z. B. die Firma Carl Zeiß, Jena, bei Bezug eines Refraktometers mitliefert (siehe Abb. 1 u. 2). Später wird man zweckmäßig eine selbständig arbeitende Apparatur verwenden, die es gestattet, jeweils gleichzeitig etwa 10—20 Proben (im Großbetrieb gegebenenfalls noch mehr) auszupressen. Es werden je Probe einige wenige Tropfen Preßsaft gewonnen, die in ein Zentrifugengläschen gegeben und dann mit der gleichen Menge einer 0,5%igen wäßrigen Natriumsulfatlösung gemischt und 5—10 Minuten bei 3000—3500 Umdrehungen je Minute zentrifugiert werden. Sofort nach dem Zentrifugieren wird der geklärte Saft vom Bodensatz in kleine Glasröhrchen abgegossen, die in eigens hierzu hergestellte und für jedes Gläschen mit Nummern versehene Holzklötzchen (siehe Abb. 3) gestellt werden². Von diesem verdünnten völlig klaren Preßsaft wird jeweils ein kleiner Tropfen mit einer dünnen sterilen Pipette auf einen Objektträger gebracht und mit einem Tröpfchen des entsprechenden „vorbehandelten“ klaren Antiserums gemischt. Die Objektträger mit dem

klaren Preßsaft-Antiserumgemisch werden sofort in einen Brutschrank von +23 C° gebracht und 20—30 Minuten darin belassen. Es hat sich herausgestellt, daß diese Temperatur für die Reaktion am günstigsten ist, während höhere und auch niedere, z. B. Raumtemperaturen, die Reaktion ungünstig beeinflussen.

Tritt in der klaren Saft-Antiserummischung eine zunächst vielfach wolkige, dann etwas mehr kristalline Ausscheidung ein, ein sog. Präzipitat, so ist das betreffende Untersuchungsmaterial viruskrank. Aus der Stärke des jeweilig auftretenden Präzipitates kann unmittelbar auf die Stärke

der Virusverseuchung geschlossen werden. Es ist somit nicht nur der qualitative, sondern sogar ein quantitativer Nachweis der jeweilig vorliegenden Viren mit diesem serologischen Verfahren möglich.

Abb. 4—7. Sero-Mikro-Reaktion auf Kartoffelviren. Mikrophotographische Aufnahmen. Vergr. etwa 50 fach.

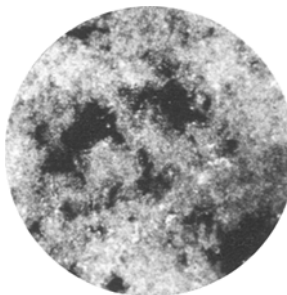


Abb. 4. Starke positive Reaktion auf X-Virus.

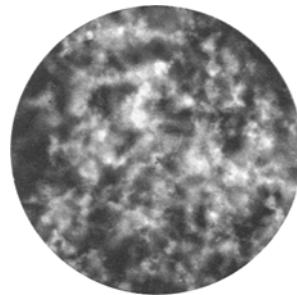


Abb. 5. Ziemlich starke positive Reaktion auf Y-Virus.

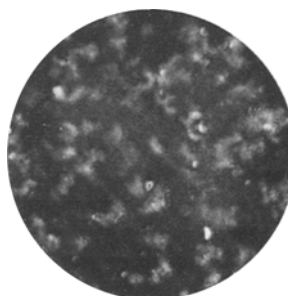


Abb. 6. Schwächere aber deutliche Reaktion auf A-Virus.

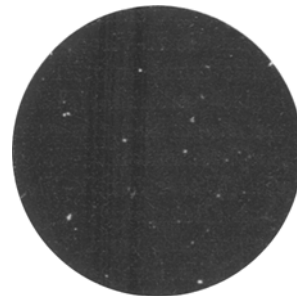


Abb. 7. Negative Reaktion. Kontrolle mit Preßsaft gesunder Pflanzen.

Die Feststellung einer positiven oder negativen Reaktion erfolgt bei schwacher, etwa 50facher Vergrößerung *unter dem Mikroskop im einfachen Dunkelfeld* (Abb. 4—7) bei hellem Tageslicht oder unter Verwendung einer gewöhnlichen Mikroskopierlampe.

Das „einfache Dunkelfeld“ wird in der Weise hergestellt, daß unter Verwendung eines schwa-

¹ Gänzlich im Dunkeln zum Keimen gebrachte Knollen werden mit ihren Dunkelkeimen vor der Untersuchung 24—48 Stunden in diffuses Licht gestellt.

² Neuerdings wird von uns der Preßsaft direkt in den kleinen Glasröhrchen zentrifugiert, wozu besondere Reduziereinsätze Verwendung finden, die es gestatten, 72 Proben auf einmal auszu-zentrifugieren.

chen Objektives — wir verwenden als Objektiv ein apochromatisches ($f = 16$ mm) und als Okular ein Zeiß Kompensations-Okular 4 (alte Bezeichnung) — die oberste Linse des Abbéschen Kondensors von Zeiß abgeschraubt und in den Diaphragmenträger eine Sternblende mit einer Zentralscheibe von 18 mm Durchmesser eingelegt wird (Abb. 8). Der Kondensor wird dann

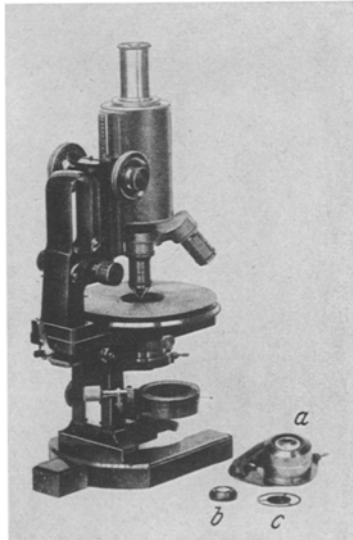


Abb. 8. Mikroskop mit Einzelteilen vor der Herrichtung zur einfachen Dunkelfeldbeobachtung.

a = Abbéscher Kondensor.
b = abgeschraubte Frontlinse des Kondensors.
c = Sternblende.

so weit nach unten gedreht bis das günstigste Dunkelfeld erreicht ist.

Bis jetzt sind von uns hergestellt: Antiseren gegen die X-Viren, gegen Y-Viren und gegen A-Virus der Kartoffel¹. Obwohl es mehrere serologisch unterscheidbare X-Viren gibt, gelingt es, mit *einem* X-Antiserum alle in Deutschland bisher bekannten X-Viren serologisch nachzuweisen. Unter den Y-Viren haben wir vor kurzem ebenfalls serologisch getrennt zu erfassende Viren festgestellt, worüber an anderer Stelle noch nähere Mitteilung erfolgt. Anscheinend existieren auch unter den A-Viren serologisch unterschiedliche; hierüber sind Untersuchungen noch im Gange.

Während wir also den Befall durch X-Viren mittels der Sero-Mikro-Reaktion *sicher* nachweisen können, beschränkt sich der Nachweis

von Y- und A-Viren nur auf diejenigen, gegen die ein entsprechendes Antiserum bisher von uns gewonnen wurde. Wie viele verschiedene Y- und A-Viren in Deutschland vorkommen und ob diese durch jeweils nur ein monovalentes bzw. polyvalentes Antiserum zum Nachweis zu bringen sind, darüber können zur Zeit genauere Angaben noch nicht gemacht werden. Zur Klärung dieser Fragen sind Untersuchungen jedoch ebenfalls eingeleitet.

Selbstverständlich lassen sich auch Infektionen mit *mehreren* Viren, sog. Mischinfektionen, mit den entsprechenden Antiseren nachweisen, d.h. es ist möglich, in der gleichen Pflanze eine Durchseuchung mit X- und Y-Virus bzw. X-, Y- und A-Virus oder einer anderen Kombination dieser Viren serologisch festzustellen (5, 8).

Da manche Pflanzensäfte auch unspezifische Reaktionen mit Antiseren geben, ist stets zur Kontrolle erstens das Verhalten der virushaltigen Pflanzensäfte gegen *Normalserum* und zweitens der Saft *gesunder* Pflanzen mit den entsprechenden Antiseren zu prüfen. Nur wenn in beiden Fällen der Kontrolle die Serumreaktionen negativ ausfallen, sind die Gesamtergebnisse verwertbar.

Die zur Ausführung der Sero-Mikro-Reaktion notwendigen Antiseren werden von uns selbst hergestellt. Die dazu nötigen Antigene werden in der Weise gewonnen, daß entweder aus den Preßsäften viruskranken Kartoffelkrautes oder aus denen mit bestimmten Kartoffelviren künstlich infizierten Tabakpflanzen bestimmter Sorten das Virus auf chemischem Wege nach PFANKUCH u. KAUSCHE (4) angereichert wird und die meist 10fach angereicherte Viruslösung als Antigen Versuchstieren in steigenden Dosen intravenös, intraperitoneal oder subcutan injiziert wird. Als Versuchstiere kommen bei uns in Frage Kaninchen und Hammel, neuerdings auch Ziegen.

Da die hierbei gewonnenen Seren jedoch gleichzeitig noch auf gesundes Pflanzeneiweiß von Kartoffel oder Tabak ansprechen, sind diese Seren jeweils vor Gebrauch mit gesundem Saft dieser Pflanzen zu behandeln, wobei die gegen das gesunde Protein ansprechenden Antikörper abgebunden werden. Es genügt, wenn hierbei *gleiche Mengen* von reinem Antiserum und z. B. Preßsaft gesunder Tabakpflanzen im Reagenzglas gemischt und etwa 3 Stunden bei 23° im Brutschrank gehalten werden. Nach Klärung durch Zentrifugieren sind die derart „vorbehandelten“ Antiseren dann gebrauchsfertig.

Empfehlenswert ist nur jeweils soviel Antiserum „vorzubehandeln“, als für die nächsten

¹ Vor längerer Zeit ist auch einmal versuchsweise ein durchaus brauchbares Antiserum gegen das Kartoffel-Aucuba-Mosaik von uns hergestellt worden, doch steht ein solches zur Zeit nicht zur Verfügung.

Tage unbedingt benötigt wird. Über Nacht und bei nicht unmittelbarer Verwendung sind die gebrauchsfertigen Antiseren stets kühl zu halten, da sie sich sonst zersetzen. Überhaupt ist ein möglichst aseptisches Arbeiten mit den Seren dringend anzuraten.

Bei Vorhandensein genügender Pressen und der geeigneten Zentrifugen usw. lassen sich täglich mehrere Hundert Proben serologisch untersuchen.

Im vergangenen Frühjahr konnten in der hiesigen Dienststelle der Biologischen Reichsanstalt bereits viele Tausend Kartoffelknollen verschiedener heimischer Kartoffelzuchtbetriebe erstmalig auf Virusbefall durchgeprüft werden und es war damit die Gelegenheit gegeben, als virusverseucht diagnostiziertes Material sofort von der weiteren Zucht auszuschließen.

Dem serologischen Verfahren kommt wegen seiner hohen Spezifität und seiner einfachen und schnellen Durchführungsart gegenüber allen anderen bisher bekannten Methoden des Nachweises abbaukranken Kartoffelmateriale schon jetzt *erhöhte Bedeutung* zu.

Ein methodisches Einarbeiten ist innerhalb weniger Wochen auch für nicht wissenschaftlich vorgebildete Hilfskräfte möglich. Versuchsweise sind die ersten Abgaben kleiner Mengen von Antiseren an einzelne Züchter bereits erfolgt.

Unser eigentliches Ziel läuft jedoch darauf

hinaus, das Verfahren so auszubauen und zu vervollkommen, daß nicht nur die Züchter ihr Kartoffelzuchtmaterial ständig serologisch durchzuprüfen in der Lage sind, sondern daß mit seiner Hilfe im Reichsgebiet schließlich das gesamte Kartoffelpflanzgut auf Virusfreiheit bzw. -befall kontrolliert werden kann.

Literatur.

1. JERMOLJEV, E.: Serologie bei Kartoffelzüchtung. Z. Pflanzenzüchtg. **24**, 104—107 (1941).
2. KLAPP, E.: Arbeiten zur praktischen Bekämpfung des Kartoffelabbaues. Forschungsdienst **16**, 370—377 (1942).
3. KÖHLER, E.: Der Virusnachweis an Kartoffeln. Mitt. a. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtschaft, 2. Aufl., 1940, H. 61.
4. PFANKUCH, E., u. G. A. KAUSCHE: Über Darstellung, Eigenschaften und quantitative Bestimmung von Tabakmosaikvirus und Kartoffel-X-Virus und ihre physiko-chemische Differenzierung. Biochem. Z. **299**, 334—345 (1938).
5. STAPP, C.: Serologischer Nachweis von X-, Y- und A-Virus der Kartoffeln. Zbl. Bakt. Abt. II **105**, 127—128 (1942).
6. STAPP, C.: Über serologische Virusforschung und den diagnostischen Wert serologischer Methoden zum Nachweis der pflanzlichen, insbesondere der am Kartoffelabbau beteiligten. Viren. J. Landw. **89**, 161—188 (1942/43).
7. STAPP, C.: Die serologische Virusdiagnose und ihre Bedeutung für den Kartoffelbau. Mitt. a. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtschaft, im Druck.
8. STAPP, C., u. O. MARCUS: Serologische Untersuchungen am Tabak über Ausbreitung und Verteilung der 3 Kartoffelviren X, Y und A. Zbl. Bakt. Abt. II **105**, 369—405 (1942/43).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Züchtungsforschung, Erwin Baur-Institut, Müncheberg/Mark.)

Die Virusanfälligkeit von *Solanum demissum*-Herkünften.

Von G. Stelzner und H. Schwalb.

Bei der Prüfung des gesamten uns zur Verfügung stehenden Kartoffelsortimentes auf Verhalten gegen die wichtigsten Kartoffelviren fiel die Wildform *Solanum demissum* mit ihren Herkünften durch starke Anfälligkeit auf. Diese Tatsache wurde von uns bereits verschiedentlich erwähnt (2 u. 3). Von besonderem Interesse bei dieser Beobachtung war die Wirkung des A-Virus, das bei einigen Herkünften des *Solanum demissum* nach Inokulation Nekrosen verursachte. Möglicherweise ließen sich die Formen für das Abtesten von Kartoffelzuchtmaterial auf den Befall mit A-Virus verwenden. Unter diesen Gesichtspunkten wurde eine Reihe von Versuchen angestellt, über die hier berichtet werden soll.

Die Prüfung des Kartoffelsortimentes auf Virusanfälligkeit war in drei voneinander unabhängigen Versuchen unter Benutzung von verschiedenen Inokulationsmethoden, der Abrei-

bung, Läuseübertragung und Pfropfung durchgeführt worden. In die Untersuchung hatten wir das X-, das Y- und das A-Virus einbezogen. Das erstere wurde aus der latent infizierten Sorte Erstling, das Y-Virus aus der Zeeuwschen Blauwen und Thorbecke, das A-Virus aus der Sorte Juli entnommen. Bei den späteren Prüfungen der *Solanum demissum*-Herkünfte auf ihre Brauchbarkeit als Testpflanze wurden lediglich Einreibungen vorgenommen, wobei an Stelle der Sorte Erstling Jubel und nur noch Zeeuwsche Blauwe und Juli als Infektionsmaterial dienten.

Das Abreiben der Pflanzen geschah in der üblichen Weise unter Hinzunahme von Carborundpulver. Bei der Pfropfung wurde das virushaltige Reis mit Keilschnitt in den gespaltenen Haupttrieb der Demissum-Unterlage eingesetzt. Zur Übertragung des Y-Virus diente ferner die Blattlaus *Myzus persicae*, die in Glaskäfigen auf