

Eine Methode zur serienmässigen Durchführung von Tropfenreaktionen bei serologischer Diagnose der Pflanzenviren

J. NOHEJL

Forschungs- und Züchtungsinstitut für Kartoffeln, Havlíčkův Brod, ČSSR

Abschluss des Manuskriptes: 3. März 1981

Zusätzliche Stichworte: Serienbestimmung

Zusammenfassung

Es wird eine neue Einrichtung zur Rationalisierung von serologischen Tropfentesten beschrieben. Sie eignet sich zur serienmässigen Testung von Pflanzenmaterial und wird deshalb besonders für die Kartoffeltestung empfohlen. Das Pipettieren einzelner Saft- und Serumtropfen auf eine Arbeitsunterlage wird abgelöst durch das Übertragen und gleichzeitige Mischen einer grossen Anzahl von Tropfen mit Hilfe einer Auftrageschablone auf eine Tropfenplatte.

Pflanzensaft und Seren befinden sich dabei in wannenartigen Behältern, wobei die speziell dafür entwickelten Mehrzweckreagenzgläser sowohl die Zentrifugation des Saftes erlauben als auch die Entnahme der Tropfen mit der Auftrageschablone.

Die neue Methode erhöht die Arbeitsproduktivität und verringert den Bedarf an diagnostischen Seren.

Einleitung

Die serologische Diagnose von Pflanzenviren wird in der Praxis besonders bei Kontrollen des Gesundheitszustandes von Züchtungs- und Vermehrungsmaterial angewandt. So werden auf diese Weise alljährlich in grossem Umfange Kartoffeln auf Viren getestet. Dabei hat sich die Tropfenmethode bisher am besten bewährt. Dieses Verfahren wurde von Dumin & Popova (1937) entwickelt und von Jermoljev & Hruška (1947) durch die Einführung der Saftzentrifugation und des Mikroskopes zur Beurteilung der Reaktion verbessert.

Bei der weiteren Entwicklung war der Übergang zu Mikroreaktionen in Verbindung mit einem Schutz der Präparate gegen Austrocknen von Bedeutung. Van Slogteren (1954) überschichtete zu diesem Zwecke die Präparate mit Paraffinöl, Nohejl (1962) verwendete speziell geschlossene Dosen aus Plexiglas und Herold (1964) Paletten mit erhöhtem Rand.

Bei allen Modifikationen der Tropfenreaktionen werden die Saft- und Serentropfen

¹Für diese Einrichtung und auch für die Mehrzweckreagenzgläser wurden die Autor-Bescheinigungen einer Erfindung erteilt (Nohejl, 1979, 1980).

mit Hilfe verschiedener Pipetten oder Tropfgläsern einzeln eingetropt und gemischt. Die Pipetten müssen dabei für jede Saftprobe absolut rein sein. Das Eintropfen, Mischen sowie der Austausch oder die Reinigung der Pipetten und Tropfgläser verlangen grossen Arbeitsaufwand und nehmen einen wesentlichen Teil der für die Vorbereitung der Präparate notwendigen Zeit in Anspruch.

Technische Lösung und Beschreibung der Einrichtung¹

Die hier vorgestellte neue Einrichtung mit den dazu gehörenden Mehrzweckreagenzgläsern für die grossserienmässige Durchführung der Tropfenreaktion vereinfacht dieses Verfahren. Sie eignet sich deshalb besonders für die serienmässige Testung von Kartoffeln.

Mit Hilfe dieser Einrichtung sowie des empfohlenen Arbeitsganges wird das einzeln vorgenommene Eintropfen auf die Unterlage und das einzeln durchgeführte Vermischen der Präparate durch ein Masseneintropfen und -vermischen ersetzt. Dadurch wird die zur Vorbereitung der Präparate bisher notwendige Zeit vielfach verkürzt und die Arbeitsproduktivität wesentlich erhöht.

Die Einrichtung besteht aus drei Elementen: der Auftrageschablone, den Behältern für Seren und Pflanzensaft (Rinnenwannen oder Mehrzweckreagenzgläsern) und der Tropfenplatte.

Die Auftrageschablone besteht aus einer Platte, in die Rundstäbe zum Auftragen von Saft und Seren eingeführt sind. Die Grösse der Schablone sowie Anzahl, Anordnung, Entfernung und Durchmesser der Rundstäbe richten sich nach den jeweiligen Anforderungen. So besteht die Möglichkeit, kleinere Schablonen baukastenmässig zu verbinden und auf diese Weise die Grösse der Schablonen zu ändern. Die Tropfengrösse ist durch den Durchmesser der Rundstäbe sowie durch die Form ihrer Enden gegeben. Aus 1 ml Reagens können so 100–600 Tropfen gewonnen werden, was vom Standpunkt der benutzten Mikroreaktionen vorteilhaft erscheint. Eine Schablone mit 4×10 aufzutragenden Rundstäben ist in Abb. 1 dargestellt.

Als Behälter für Seren und Pflanzensaft werden Rinnenwannen und Mehrzweckreagenzgläser verwendet. Aus ihnen werden mit Hilfe der Auftrageschablone Seren und Saft entnommen. Deshalb müssen Abmessungen und Anordnung der Behälter zur Auftrageschablone passen. Für die Mehrzweckreagenzgläser wurde als Abstandhalter ein Ständer entwickelt. Die Rinnenwannen sind langgestreckte wannenähnliche Behälter, die in der ganzen Länge offen sind. Die Mehrzweckreagenzgläser (Abb. 2) sind ähnlich geformt, jedoch teilweise geschlossen, so dass ein Ende die Form eines Röhrchens hat. Dies hat den Vorteil, dass die Mehrzweckreagenzgläser auch zum Zentrifugieren der Pflanzensäfte verwendet werden können.

Auf der Tropfenplatte erfolgt die Mischung der Saft- und Serumtropfen sowie die Beurteilung der Reaktion.

Sie besteht aus einer Glasunterlage, die von einem erhöhten Rand begrenzt wird. Der Rand ermöglicht das Stapeln der einzelnen Platten, ausserdem verhindert er das Austrocknen der Tropfen. Die Grösse der Arbeitsfläche muss mit derjenigen der Auftrageschablone, bzw. einem Vielfachen davon, übereinstimmen.

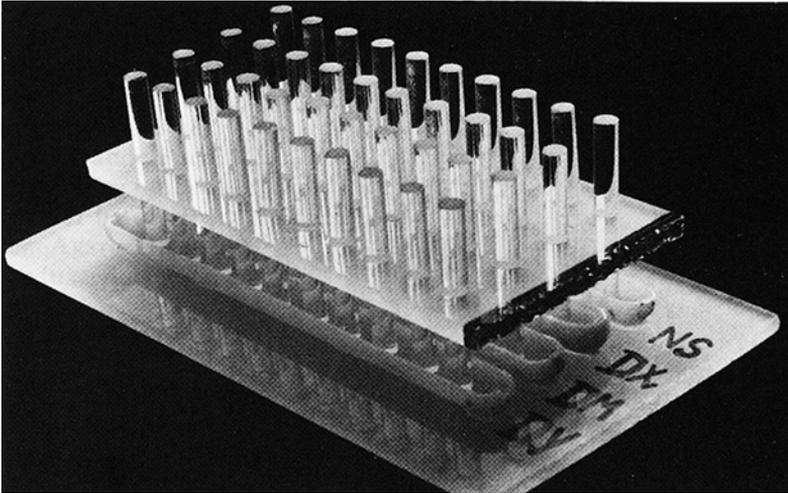


Abb. 1. Die Auftrageschablone (10 × 4 Elemente) mit wannenartigen Behältern (Rinnenwannen) für Antiseren.

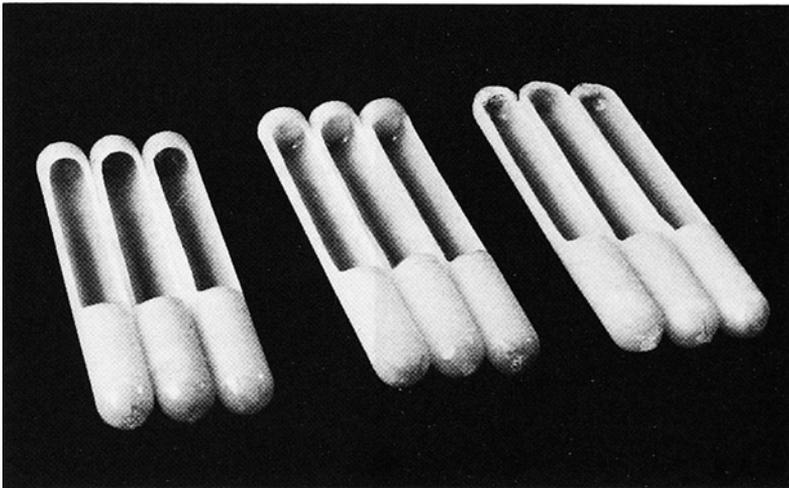


Abb. 2. Verschiedene Typen von Mehrzweckreagenzgläsern.

Arbeitsvorgang

Im Falle von drei zu testenden Viren werden Seren in vier horizontal angeordneten Rinnenwannen gebracht; die drei spezifischen Antiseren sowie ein Normalserum für die Kontrolle. Mit Hilfe der Auftrageschablone werden die Seren entnommen und in waagerechten Reihen auf die Tropfenplatte übertragen (Abb. 3). Zum Tropfen der

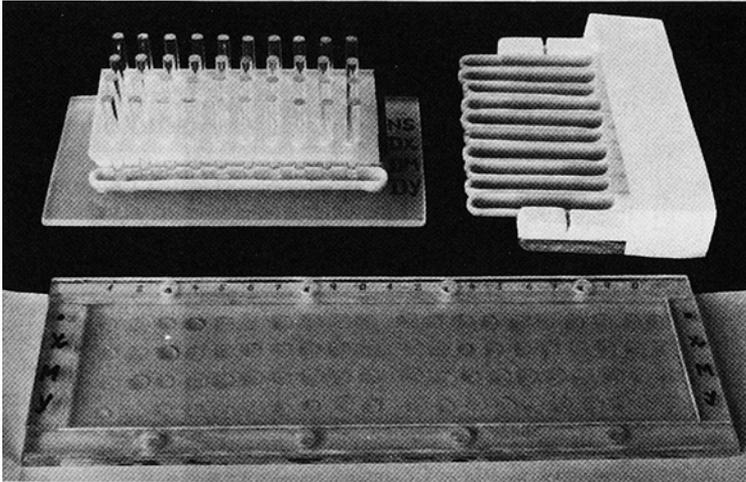


Abb. 3. Übertragen von 4 verschiedenen Serentropfen auf die Tropfenplatte für 20 Pflanzensaftproben.

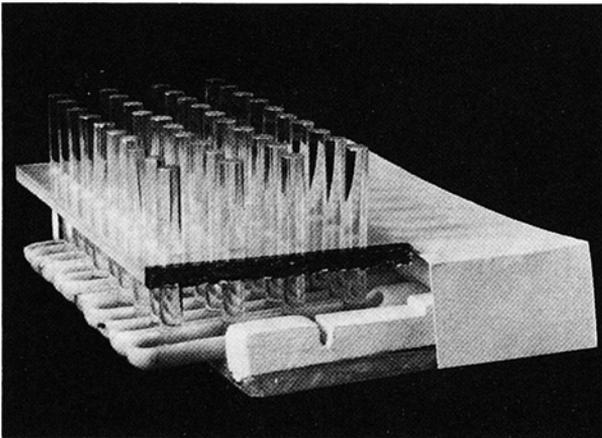


Abb. 4. Übertragen von Safttropfen mit der Auftrageschablone aus Mehrzweckreagenzgläsern für 10 Pflanzensaftproben.

Seren wird stets die gleiche Auftrageschablone verwendet. Der Pflanzensaft wird in ähnlicher Weise aus den Rinnenwannen oder den Mehrzweckreagenzgläsern auf die Tropfenplatte gebracht, jedoch in senkrechten Reihen, so dass jede Saftprobe mit vier verschiedenen Seren reagieren kann (Abb. 4).

Gleichzeitig mit dem Auftragen der Safttropfen wird mit Hilfe einer Drehbewegung der ganzen Auftrageschablone das Durchmischen aller Präparate vorgenommen. Die Präzision des Tropfenauftrags sowie die Gleichmässigkeit des Durchmischens der Reagenzien wird durch Benutzung von Leitstiften, die in die grösseren Öffnungen im

Rahmen der Schablone einfallen, erhöht. Mit dieser Methode ist es auch möglich, weitere Reagenzien, wie z.B. stabilisierende Substanzen, zu applizieren. Die Platten können gestapelt werden, wodurch ein Austrocknen der Tropfen weitgehend verhindert wird. Ein Zusatz von $1/5$ bis $1/4$ Glycerin bei der Verdünnung der Seren hat sich darüber hinaus als günstig erwiesen.

Auch andere serologische Methoden, die auf Tropfentesten beruhen, können auf diese Weise rationalisiert werden. So ist es möglich, mit nur geringen Veränderungen des hier beschriebenen Arbeitsganges serienmässig Viren mit dem Latex-Test oder dem Agargelddiffusions-Test nachzuweisen. Es wird dadurch nicht allein die Arbeitsproduktivität gesteigert, sondern auch der Verbrauch der Seren wesentlich verringert.

Danksagung

Gerne möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr H. C. Weidemann bedanken für die stilistische Überarbeitung.

Literatur

- Dunin, M. S. & N. N. Popova, 1937. Kapelnyj metod analiza virusov v rastenijevodstve. Moskva.
 Herold, M., 1964. Bemerkungen zu einer Tropfenpalette für serologische Untersuchungsreihen. *Z. landw. Versuchs- u. Untersuchungswesen* 10 (4): 311-319.
 Jermoljev, E. & L. Hruska, 1947. Sérologická metoda urcování virových chorob u bramborů. Sborník výzkumných ústavů zemědělských, sv. 178.
 Nohejl, J., 1962. Die Diagnostik der Kartoffelvirosen und ihre Anwendung in der Tschechoslowakischen Sozialistischen Republik. *NachrBl. dt. Pfl.Schutzdienst* 16 (4): 68-72.
 Nohejl, J., 1979. Zariadení pro sériové provádení kapkových reakcí. Vynález, c. aut. osvedčení 197 613. Úrad pro vynálezy a objevy, Praha.
 Nohejl, J., 1980. Víceúčelová zkumavka. Vynález, c. aut. osvedčení 206754, Úrad pro vynálezy a objevy, Praha.
 Slogteren, D. H. M. van, 1954. Serological microreactions with plant viruses under paraffin oil. *Proc. 2nd. Conf. Potato Virus Diseases.* (Lisse-Wageningen): 51-54.