



Botrytis-Nachweis – simpel einfach!

Im Handel sind immunologische Kits erhältlich, die in der Art von Schwangerschaftstests einfach und rasch den Nachweis von Botrytisbefall in Trauben-Presssaft, Maische und Wein ermöglichen sollen. In einer Studie, die letztes Jahr in der *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* veröffentlicht wurde (Nr. 45/5, S. 314-320), prüfte ein Forschungsteam von Agroscope die Praxistauglichkeit eines solchen Kits.

ÀGNES DIENES-NAGY, SANDRINE BELCHER, FABRICE LORENZINI
UND KATIA GINDRO, AGROSCOPE, NYON
HANS PETER RUFFNER, SZOW, WÄDENSWIL (ÜBERSETZUNG AUS
DEM FRANZÖSISCHEN)
agnes.dienes-nagy@agroscope.admin.ch

Die Graufäule bei Trauben wird durch *Botrytis cinerea* verursacht, einen Schadpilz, der dank seiner Anpassungsfähigkeit auf verschiedenen Wirtsorganismen und unter ungünstigen Bedingungen leben kann. Die Infektion von Trauben kann schon bei der Blüte erfolgen und bis zum Reifebeginn unentdeckt (latent) bleiben (Keller et al. 2003; Viret et al. 2004). Ein Ausbruch der Krankheit hängt stark von den klimatischen Bedingungen ab, verändert die Traubenqualität und hat oft namhafte Ernteverluste zur Folge.

Nachweise für Botrytis-Befall

Die Schwere des Graufäule-Befalls und die Pilzentwicklung kann auf mehrere Arten erfasst werden: Schon Beobachtungen von Auge geben Hinweise auf den Gesundheitszustand der Trauben. Leider treten eindeutige Symptome erst auf, wenn der Pilz die Inhaltsstoffe bereits verändert hat. Chemische Analysen wie die Erfassung von Mucinsäuren und Galakturonsäure, Gluconsäure und Glycerin machen diese Veränderungen messbar (Dienes-Nagy et al. 2011). Dazu werden die Leitsubstanzen oder «Marker» im Traubenmost gemessen und so der Gesundheitszustand beurteilt. Die Infrarot-Analyse mit dem «Wine-Scan» ist eine weitere Möglichkeit, mit der nach vorangehender Kalibrierung dem Lesegut ein «phytosanitärer Index» zugeordnet werden kann (Versary et al. 2008). Aller-

dings ist diese Masszahl abhängig von der Herkunft der Probe und Rebsorte. Meist ist eine individuelle Kalibrierung notwendig, was eine grosse Zahl an Proben mit verschiedenen Infektionsgraden bedingt. Molekularbiologische Methoden erlauben via PCR ebenfalls den Nachweis von Botrytis in Traubenbeeren (Gindro et al. 2005), ohne aber Anhaltspunkte zur Befallsstärke zu liefern.

Immunologische Tests als Alternative

Immunologische Tests mit spezifischen Antikörpern (Dewey et al. 2000) ergänzen das Methodenspektrum mit einfachen und rasch anwendbaren Alternativen zur Detektion von *B. cinerea* in Traubensaft. Test-Stäbchen mit immobilisierten Antikörpern – vergleichbar einem Schwangerschaftstest – sind sowohl im Kellerbereich als auch im Weinberg anwendbar. Solche Kits der Herstellerfirmen «EnviroLogix» und «Pocket Diagnostic» sind seit einigen Jahren im Handel erhältlich. Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Aussagekraft dieser Tests in Traubensaft und Wein zu prüfen und im Besonderen ihre Verlässlichkeit bei Mustern von in der Schweiz gängigen Rebsorten zu untersuchen.

Erkennung und Visualisierung

Das Funktionsprinzip der immunologischen Tests ist für beide Fabrikate (QuickSticks™ und Pocket Diagnostic) dasselbe: Für die Identifikation wird der monoklonale Antikörper BC-12.CA4 benutzt (Meyer et al. 2000), der spezifisch ein von *B. cinerea* produziertes Antigen erkennt. Zur Sichtbarmachung lagern sich die mit einem Farbmaler versehenen Antikörper an das auf dem Teststreifen vorhandene Pilz-Antigen an und erscheinen nach einer enzymatischen Farbreaktion als blauviolette Bande (Abb. 1). Zur Kontrolle ist auf dem Teststreifen bereits eine Zone mit Botrytis-Antigen vorhanden, das mit dem Antikörper reagiert und als zweite Farbbande aufleuchtet. Da das Antigen wärmostabil ist und in der Gärung nicht abgebaut wird, ist es auch in Weinen nachweisbar, die aus fäulnisbefallenen Trauben stammen. Die beiden Testkits unterscheiden sich zwar in technischen Details, die Resultate sind aber durchaus vergleichbar.

Nachweis und Erfolgskontrolle

Für die vorliegende Studie wurde nur das Kit QuickSticks™ (EnviroLogix Inc., Portland, Maine, USA) eingesetzt. Es erwies sich als einfach und rasch in der Anwendung. Die Packung enthält 25 Teststäbchen mit Antikörpern, eine Pufferlösung sowie die nötigen Reaktionsgefässe. Die Streifen können zur Dokumentation für mindestens vier Monate aufbewahrt werden. Die Verwendung eines QuickSticks Readers™ erlaubt durch Vergleich der Antikörper-Färbung von Probe und Kontrollzone eine halbquantitative Auswertung. Das Messsystem wurde mit zunehmend verdünntem Saft aus infizierten Chardonnay-Trauben kalibriert; die Ergebnisse werden in SI-Einheiten angegeben. In der Studie wurden die Proben (Traubensaft, Maische, Weine) im Ver-



Abb. 1: Immunologischer Botrytis-Schnelltest.

hältnis 1:40 mit Pufferlösung verdünnt, gut gemischt, davon zirka 0.5 ml in die Reaktionsgefässe gegeben und ein Teststreifen hineingestellt. Durch die Kapillarwirkung steigt die Probelösung auf und interagiert nach Erreichen der Reaktionszone mit dem Antikörper. Nach einigen Minuten muss die blauviolette Kontrolllinie erscheinen, wenn der Test erwartungsgemäss funktioniert. Das Auftreten einer weiteren Linie zeigt an, dass die Probe Botrytis-Antigen enthielt, also positiv reagiert (Abb. 2). Nach insgesamt zehn Minuten kann der Teststreifen in das Farbmessgerät eingeführt werden, um die Intensität (SI) der Antikörper-Reaktion zu messen (Abb. 3).

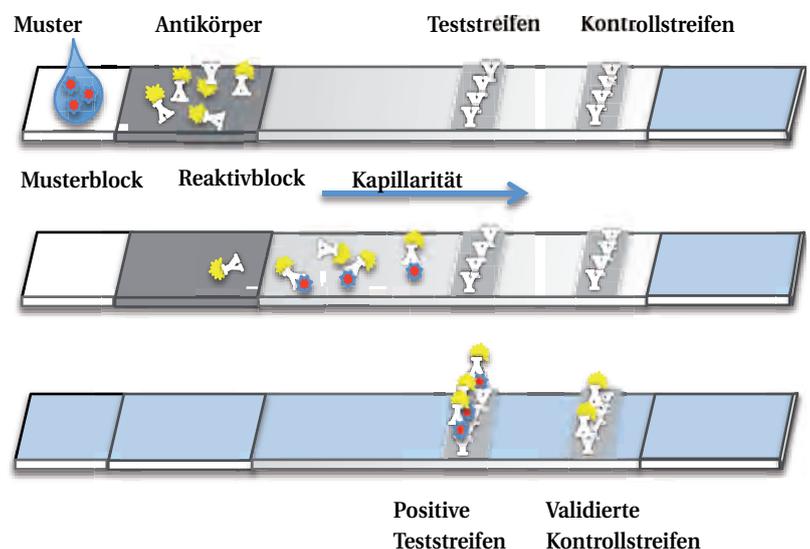


Abb. 2: Funktion des QuickSticks™.

Empfindlichkeit gut – kein Latenznachweis

Die ersten positiven Botrytis-Signale traten Mitte Oktober in Gamay-Trauben auf, die bei der Blüte anfangs Juni künstlich mit Botrytis-Sporensuspensionen infiziert worden waren. Da es sich um die erste positive Reaktion im Verlauf der wöchentlichen Probennahmen dieser Versuchsreihe handelte, ist damit klar, dass mit dem Test keine latenten Botrytis-Infektionen in Trauben nachgewiesen werden können. Die Nachweisempfindlichkeit ist recht gut: Botrytisbefallsstärken von 1% ru-

Abb. 4a-c: Vergleich der chemischen Markersubstanzen mit den SI-Werten des QuickSticks™.

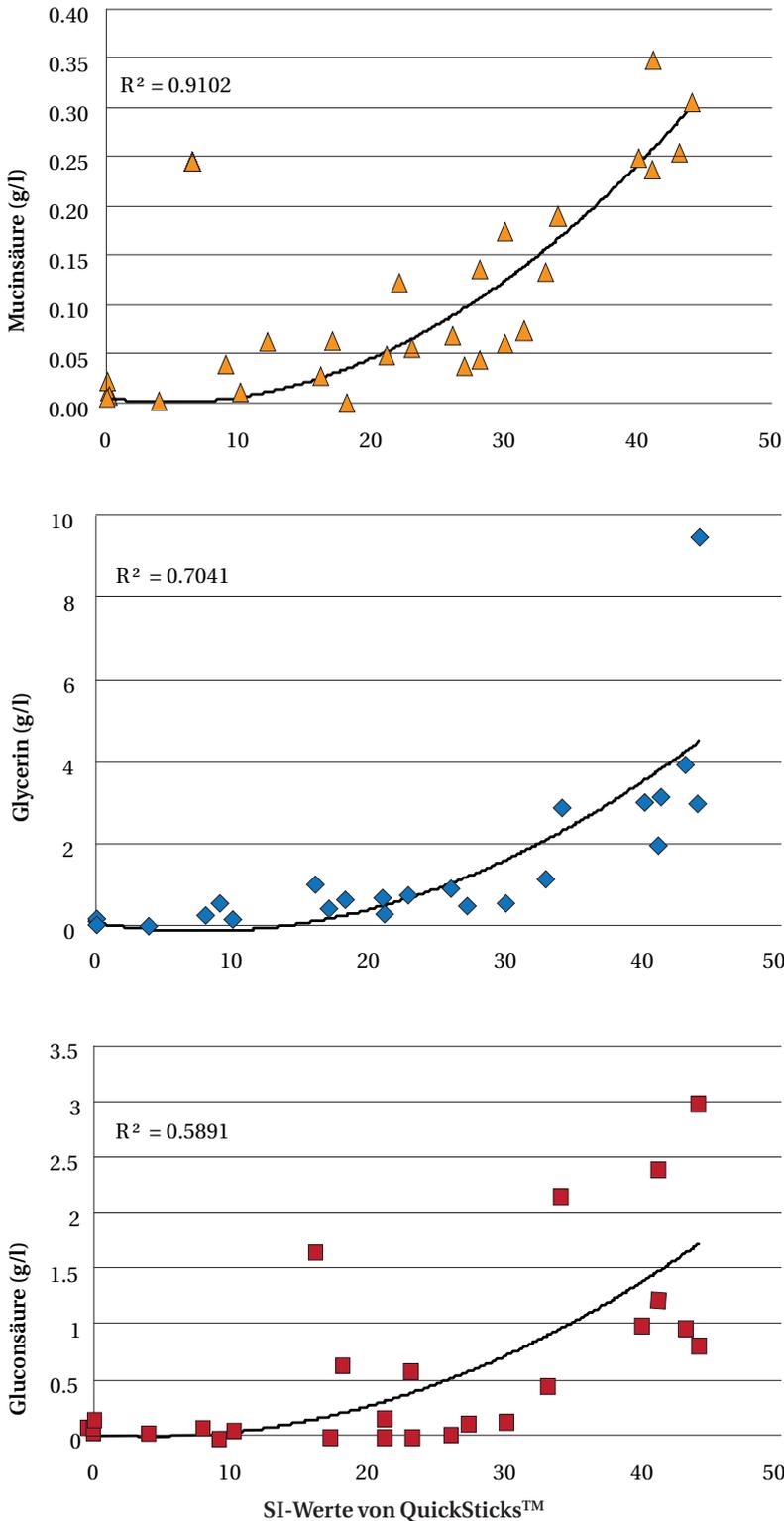


Abb. 3: Farbmessgerät.

fen eine schwache Farbreaktion hervor, für eine deutliche Färbung ist ein Befall über 10% erforderlich. Die visuelle Beurteilung (%) korreliert bei den Sorten Gamay, Gamaret und Pinot noir gut mit den gemessenen SI-Werten.

Immunologie und Analyse im Vergleich

Im Rahmen des genannten Feldversuchs wurden im Beerensaft auch die chemischen Markersubstanzen bestimmt und mit den SI-Werten verglichen. Wenn der QuickSticks™-Test nicht ansprach, lagen auch die Analysewerte unter der Nachweisschwelle. Latente Botrytis-Infektionen werden also auch so nicht erkannt. Während im Fall von Galacturonsäure zwischen immunologischer und analytischer Erfassung keine signifikante Korrelation auftrat, waren die Bezugswerte bei Mucinsäure, Glycerin und Gluconsäure recht eindeutig (Abb. 4 a-c). Nach Ausdehnung der Untersuchung auf die Maische von elf Rebsorten bestätigte sich die sehr gute Korrelation zwischen den SI-Werten von QuickSticks™ und Mucinsäure (R²=0.9116). Bei den anderen drei Markern zeigten die ANOVA-Auswertungen Korrelationen von R²=0.7016 und darunter. Kostspielige Analysen von Botrytis-Markern (insbesondere von Mucinsäure) in Maischen werden also dank des immunologischen Tests wohl überflüssig. Gemäss den vorliegenden Resultaten deuten SI-Werte von weniger als zehn auf schwachen Botrytis-Befall hin, solche zwischen zehn und 35 liegen im mittleren Bereich und Werte über 35 stehen für starken Befall.

Immunologie funktioniert auch in Wein

Messungen von chemischen Markern zur Bestimmung des Graufäule-Befalls sind nur in Traubensaft und Maischeproben möglich, für Wein sind sie nicht geeignet, da die Leitsubstanzen – insbesondere Glycerin – auch von Hefen gebildet werden oder (wie die besonders befallspezifische Mucinsäure) bei der Gärung auch als Oxidationsprodukt der Galakturonsäure aus Traubenpektin entstehen. Im Gegensatz dazu wird das Botrytis-Antigen bei der Gärung nicht verändert und kann in Wein aus infiziertem und nicht ausreichend gesöndertem Traubenmaterial nachgewiesen werden.

Spätlese oder Cryo-Extraktion?

Die Anwesenheit von *B. cinerea* in den Maischen kann auch darauf zurückzuführen sein, dass die Proben aus infizierten Spät- und Trockenbeerenauslesen stammen. Unter diesen Voraussetzungen wird der Pilz zur qualitätssteigernden «Edelfäule». Mit dem Botrytis-Test lässt sich also auch nachweisen, ob Süssweine aus (edel)faulem Material gekeltert worden sind oder ob eine Cryo-Extraktion vorliegt. SI-Werte von Weinen aus fäulnisbefallenen Trauben zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Indices aus dem infizierten Ausgangsmaterial. Es gibt aber zurzeit noch keine ausreichende Datengrundlage für eine eindeutige Korrelation zwischen Botrytis-Befall und Weinqualität – dafür sind weitere sensorische und analytische Vergleichsuntersuchungen nötig.

Dank

Wir danken der Firma EnviroLogix für die Zurverfügungstellung des Messgeräts für diese Untersuchungen. Unser Dank geht aber auch an das Laborpersonal, namentlich S. Kuyumcuyan, C. Monnard, F. Vuichard und D. Nardone für die Analytik der Proben, an Ph. Duruz für die Koordination der Arbeiten im Rebberg und schliesslich an S. Jeannotat für die kritische Durchsicht des Manuskripts. ■

Literatur

Dewey F. M., Ebeler S. E., Adams D. O., Noble A. C. und Meyer U. M.: Quantification of Botrytis in grape juice determined by a monoclonal antibodybased immunoassay. *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (3), 276–282, 2000.

Dewey F. M., Steel C. C. und Gurr S. J.: Lateral-Flow Devices to Rapidly Determine Levels of Stable Botrytis Antigens in Table and Dessert Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 64 (2), 291–295, 2013.

Dienes-Nagy A., Belcher S., Gindro K. und Dubuis P.-H.: Indices sanitaires et marqueurs chimiques pour évaluer l'état sanitaire du raisin. 2. Marqueurs chimiques de la pourriture grise. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 43 (4), 234–242, 2011.

Gindro K., Pezet R., Viret O. und Richter H.: Development of a rapid and highly sensitive direct-PCR assay to detect a single conidium of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr in vitro and quiescent forms in planta. *Vitis* 44 (3), 139–142, 2005.

Keller M., Viret O. und Cole F. M.: *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency and disease expression. *Phytopathology* 93 (3), 316–322, 2003.

Meyer U. M. und Dewey F. M.: Efficacy of different immunogens for raising monoclonal antibodies to *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 104, 979–987, 2000.

Versary A., Parpinello G. P., Mattioli A. U. und Galassi S.: Determination of Grape Quality at Harvest using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 59 (3), 317–322, 2008.

Viret O., Keller M., Jaudzems V. G. und Cole F. M.: *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: Light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* 94 (8), 850–857, 2004.

Un kit simple et rapide pour détecter la pourriture des raisins

R É S U M É

Des tests immunologiques rapides permettent de détecter la présence du champignon responsable de la pourriture grise des raisins en moins de dix minutes. Depuis quelques années, ces kits sont sur le marché. Agroscope a conduit une étude pour évaluer la pertinence de ces tests, notamment sur onze cépages suisses tels que le Gamaret, le Gamay, le Chasselas ou la Petite Arvine. Les résultats confirment que le cham-

pignon peut être détecté dans le raisin, le moût ou le vin, indépendamment du cépage. Cependant, l'infection est détectée lorsqu'elle est déclarée, mais non à l'état latent. Une corrélation a été établie entre les résultats fournis par le test et la présence de marqueurs chimiques de la pourriture grise. Le test étudié se révèle donc utilisable pour caractériser l'état sanitaire d'une récolte.