



Experimente zur Übertragung von Reboviren durch Schildläuse

Gerard Hommay, Etienne Herrbach, Christoph Hoffmann

► To cite this version:

Gerard Hommay, Etienne Herrbach, Christoph Hoffmann. Experimente zur Übertragung von Reboviren durch Schildläuse. [Technical Report] INRA Colmar. 2018, pp.4. hal-02264365

HAL Id: hal-02264365

<https://hal.science/hal-02264365>

Submitted on 18 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Experimente zur Übertragung von Reboviren durch Schildläuse

(Versuchsprotokoll der INRA, UMR SVQV Colmar,
im Rahmen des Interreg 2016-2018 Projektes „InvaProtect“)

Der Sinn dieser Anleitung ist es, Versuchsaufbau und Versuchsbedingungen im Hinblick auf die Bestimmung der Übertragungseffizienz der Vektoren bei Virusübertragungsexperimenten mit Blattrollviren nachvollziehbar zu beschreiben. Sie richtet sich an die Projektpartner des InvaProtect Projektes, die beabsichtigen, selbst solche Experimente durchzuführen. Von dieser Anleitung gibt es auch eine französische Version. Sie geht auf die zwei folgenden Versuchsarten ein:

- I. **Virusübertragung unter kontrollierten Bedingungen** um die Übertragungseffizienz oder deren Variabilität unter Laborbedingungen zu prüfen.
- II. **Natürliche Infektiosität von Schildläusen**, die direkt aus dem Weinberg entnommen wurden, mit dem Ziel, das Übertragungspotential von Vektorpopulationen unterschiedlicher Herkünfte zu ermitteln.

Generell laufen Übertragungsexperimente in folgender Reihenfolge ab:

- **Akquisitionsphase** (*acquisition access period, AAP*) = Phase, in der das Insekt (Schildlaus) und die Virusquelle (infizierte Pflanze) in Kontakt sind. Dabei saugt das Insekt an der Pflanze und nimmt das Virus auf. Bei Experimenten vom Typ I. ist die Länge dieser Phase standardisiert, bei jenen vom Typ II. ist sie unbekannt.
- **Inokulationsphase** (*inoculation access period, IAP*) = Phase, in der das Insekt, das zuvor das Virus aufgenommen hat, mit einer gesunden Pflanze (getestet) mit dem Ziel der Übertragung der Erreger in Kontakt gebracht wird.
- **Inkubationsphase** = Phase, in der die Pflanze im Labor oder im Gewächshaus inkubiert werden muss, bis das Virus erstmalig nachweisbar ist (ELISA/PCR). Dieser Nachweis gibt Aufschluss darüber, ob eine Übertragung stattgefunden hat oder nicht.

I. Virusübertragung unter kontrollierten Bedingungen

Voraussetzungen für diese Art von Experiment sind:

- **Schildläuse**, die im Ausgangszustand des Versuches noch kein Virus aufgenommen haben (Laboraufzucht, Eier bei oviparen Arten, oder Individuen, die von einem nachweislich nicht Virus infizierten Stock entnommen wurden).
- Eine **Virusquelle** (= Herkunftspflanze der Viren) für Akquisitionsphase (Blätter oder Stecklinge einer positiv getesteten Pflanze).
- Junge nachweislich virusfreie Pflanzen (**Testpflanzen**), die in Gewächshäusern mittels Stecklingsvermehrung oder als Sämlinge hergestellt wurden und für die Inokulation mit Schildläusen verwendet werden, die das Virus bereits akquiriert haben. Die Anzahl der bereitzustellenden Pflanzen (Wiederholungen) richtet sich nach der geplanten Zahl der zu prüfenden Schildläuse (20-30 Tiere pro Pflanze). Wenn es sich bei den untersuchten Viren um ein Vitivirus (GVA, GVB, ...) handelt, ist es möglich, als Testpflanzen auch krautige Pflanzen, die das entsprechende Virus vermehren, zu verwenden (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*. Vorsicht: Man sollte hier besonders junge Exemplare dieser Pflanzen verwenden, weil ältere Haare ausbilden, die die Bewegungsfreiheit der Schildläuse erheblich einschränken können).

Im Idealfall sollte das Virus in der Virusquelle sowie die Abwesenheit des Virus in der Testpflanze vor jedem Übertragungsexperiment mit ELISA nachgewiesen werden. Vorsorglich können Virusquelle und Testpflanzen regelmäßig mit einem wirksamen Insektizid behandelt werden, um ungewollte Übertragungen auszuschließen. Diese Behandlungen sollten spätestens ein Monat vor Versuchsbeginn abgeschlossen werden.

Die **Akquisition des Virus** erfolgt meistens von einem Blatt, das von einer infizierten Pflanze entnommen wird, und seltener von einer ganzen Pflanze. Die entnommenen Blätter werden am Leben gehalten, indem man ihre Stiele mit feuchter Watte und Parafilm® umwickelt und sie in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt (z. B. Butterdose, Petrischale, ...). Werden ganze Pflanzen verwendet, werden diese in individuelle Tüten vereinzelt (z.B. Breadbag®). Der Vorrat virusfreier Schildläuse wird im Labor entweder frei auf virusfreien Pflanzen gehalten oder in kleinen anklemmbaren Käfigen (Clip-Käfige, kleine Petrischale) an Blättern.



Fig 1. Akquisition des Virus durch die Schildlaus an einem Blatt einer virösen Pflanze, die beide in einem Plastikgefäß am Leben gehalten werden.



Fig. 2. Aquisitionsphase des Virus durch die Schildlaus am Blatt einer viruspositiven Pflanze mit Hilfe eines Clip-Käfigs. Die selbe Technik kann auch bei der Inokulationsphase verwendet werden (Fig. 3)

Eine weitere Variante kann mit Eiern oviparer Arten durchgeführt werden (z. B. *Parthenolecanium corni*), die aus den abpräparierten Schilden der eierlegenden Weibchen ausgesiebt werden. Für die Akquisition kann man verschiedenen Vorgehensweisen wählen:

- Man verwahrt die Eier in geschlossenen Behältnissen auf einem Blatt, das von der als Virusquelle dienenden Pflanze entnommen wird, bis die Larven schlüpfen (Fig. 1). Nach Schlüpfen und Festsaugen der Larven setzt man zur Inokulation das Blatt, oder Teile davon, auf gesunde Test-Pflanzen wie nachstehend beschrieben.
- Man gibt die Eier in festklemmbare Minikäfige und lässt die Larven direkt auf der als Virusquelle dienenden Pflanze schlüpfen (Fig. 2).

Einen Teil derselben Population hält man separat bei gleicher Temperatur, um die Schlüpfdynamik der Population zu beobachten.

Die maximale Dauer der Akquisitionsphase sollte zwischen 2 bis 4 Tagen liegen. Im Anschluss daran kann mit Hilfe einer RT-PCR mit 10 Individuen getestet werden, ob das Virus von den Larven aufgenommen wurde.

Inokulation: Nach der Akquisitionsphase werden die vermeintlich virustragenden Schildläuse von der Virusquelle (Blatt, Pflanze) auf die Testpflanze übertragen. Dies geschieht in einem Gefäß, um die unkontrollierte Verschleppung der virustragenden Insekten zu verhindern. Dieser Vorgang wird entweder mit Hilfe einer Präpariernadel oder einer feinen Pinzette vollzogen, die es ermöglichen, die Schildläuse einzeln zu übertragen, oder man schneidet das Blatt mit den Schildläusen in kleine Stücke, die die gewünschte Anzahl an Tiere beherbergen, die man nun zum Beispiel in einen Clip-Käfig geben kann, der an der Testpflanze befestigt wird (Fig. 3) oder als Blattstück direkt an die Pflanze geklemmt wird (Fig. 4). Die letztgenannte Methode ist für das Insekt die schonendste. Ein Minimum von 20-30 Tieren pro Testpflanze wird empfohlen. Die Testpflanzen werden nun in PVC-Zylindern gehalten, die mit Gaze oder verschließbaren Brotsäcken (Breadbag®) verschlossen werden. Diese bleiben für die Dauer der Inokulation so eingeschlossen auf einem mit Kulturlicht versehenen Pflanztisch bei Langtagbedingungen (16h/8h) stehen. Die Temperatur sollte dabei zwischen 23 und 25°C liegen.



Fig 3. Virusübertragung mit virus-tragenden Schildläusen auf virusfrei getestete Pflanzen mit Hilfe der Clip-Käfig-Methode.



Fig. 4. Übertragung der Viren mit Hilfe von Schildläusen auf trocknenden Blättern virus-positiver Pflanzen, die an virusfrei getesteten Pflanzen befestigt werden, so dass die Schildläuse überwandern können.

Es ist wichtig die Behältnisse, in denen die Übertragungsarbeiten stattfinden, nach jedem Wechsel (Virusisolat, Vektorspezies oder -herkunft) mit heißem Wasser auszuwaschen und sich selbst die Hände mit Seife zu waschen. Bei Übertragungsversuchen sollte man immer damit beginnen, die gesunden Kontrollpflanzen zu inkubieren, auf die keine virustragenden Schildläuse übertragen werden oder die mit nicht virustragenden Schildläusen inokuliert werden sollen. Nach jedem Arbeitsschritt sollte die Arbeitsplatte mit Alkohol desinfiziert werden, um zu garantieren, dass sich keine Schildläuse mehr darauf befinden.

Am Ende der Inokulationsphase werden die Säckchen vorsichtig abgezogen und die Zahl der auf der Pflanze festgesaugten Schildläuse gezählt oder geschätzt, wenn mehr als 30 Tiere vorliegen. Die Pseudococciden werden am besten abgesammelt, um entweder abgetötet oder in Röhrchen für eventuell später stattfindende Tests konserviert zu werden. Um alle Schildläuse auf den Testpflanzen sicher abzutöten, werden diese anschließend unter einem Abzug mit einem Insektizid behandelt. Diese Pflanzen werden nun bis zum Virusnachweis in einer extra Gewächshauskammer gehalten, die physisch getrennt ist von der Anzucht der Testpflanzen und jener Pflanzen, die als Virusquelle dienen. Hier werden regelmäßige Insektizidbehandlungen durchgeführt.

Der **Virusnachweis** in den vermeintlich infizierten Testpflanzen erfolgt nach 4-6 Monaten Inkubation des Virus. Ein zweiter Nachweis erfolgt in der Regel nach 10-12 Monaten. Routinemäßig erfolgt der Test mit Hilfe von ELISA, kann jedoch auch mit Hilfe von RT-PCR erfolgen, einer präziseren Methode mit der falsch-positive Befunde vermieden werden können. Von jeder Pflanze entnimmt man eine Probe von 3 vorzugsweise älteren Blättern, möglichst von verschiedenen Trieben. Alternativ kann man im Winterzustand auch das Holz beproben. Der Virusnachweis sollte zur kühlen Jahreszeit erfolgen, weil hohe Temperaturen die Vermehrung der Viren in der Pflanze unterbinden können.

II. Natürliche Infektiosität von Schildläusen

Voraussetzung für diese Art von Experiment sind:

- **Potentiell virustragende Schildläuse**, die aus Weinbergen von Pflanzen mit nachgewiesenem Virusbefall entnommen wurden (d.h. natürliche Akquisition des Virus unter nicht kontrollierten Bedingungen).
- Junge virusfrei getestete **Testpflanzen** (Stecklingsreben), die im geschlossenen Gewächshaus zur Inokulation mit Schildläusen produziert wurden. Wenn es sich bei den untersuchten Viren um einen Vitivirus (GVA, GVB, ...) handelt, ist es möglich als Testpflanzen auch krautige Pflanzen, in denen sich das Virus vermehrt, zu verwenden.

Die Schildläuse werden von den virustragenden Reben gesammelt, indem man ein oder mehrere mit Tieren besetzte Blätter und sie in verschlossenen Gefäßen ins Labor verbringt. Die Inokulations- sowie die Inkubationsphase erfolgt ebenso wie in Punkt I. beschrieben.

Nachtrag: Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Alle Versuchsmaterialien vor Versuchsbeginn zusammentragen (Pflanzen, Behältnisse, Präparationsbesteck, Stereomikroskop).
- Laborkittel tragen.
- Als Virusquelle dienende Pflanzen vor Versuchsbeginn identifizieren bzw. bereiten. Erst dann die Schildläuse sammeln.
- Sich vergewissern, dass die Testpflanzen zu Anfang frei von Schildläusen sind.
- Immer nur mit Schildläusen einer Art oder einer bestimmten Herkunft arbeiten, um Vermischungen zu vermeiden.
- Stets unter vergleichbaren Bedingungen arbeiten, was Rebsorte, Temperatur, Tageslänge und Dauer von Akquisitions-, Inokulations-, Inkubationszeit anbelangt.

Gérard HOMMAY und Etienne HERRBACH, INRA Colmar, 2018

übersetzt von Christoph HOFFMANN, JKI Siebeldingen