

## DETEKSI *BEGOMOVIRUS* PADA TANAMAN CABAI MERAH DENGAN I-ELISA TEST DAN TEKNIK PCR

### Begomovirus Detektion in Red Pepper Plant Using I-ELISA Test and PCR Technique

S. Mudmainah<sup>1)</sup> dan Purwanto<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Alumni Program Studi HPT Unibraw, Malang. <sup>2)</sup> Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman  
Jl. Dr. Soeparno Karangwangkal Purwokerto.

#### ABSTRACT

The aim of this research was to study the symptom appear in the fields caused by *Begomovirus* or other viruses. The laboratory research was conducted using I-ELISA to confirm the presence of *Begomovirus* and other mixed viruses and PCR to study coat protein band DNA of *Begomovirus*. The sample was collected from the plant that showed symptom of *Begomovirus* infection. The results of I-ELISA detection showed that the symptoms was varied in the field. The symptoms were mixed infection among *Begomovirus* and *Tobamovirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*. Based on PCR detection, using universal primer coat protein of *Begomovirus* could amplify DNA fragment at 580 bp.

**Key words:** Begomovirus, I-ELISA, PCR, and red pepper,

#### PENDAHULUAN

Di Indonesia penyakit daun keriting kuning pada tanaman cabai pertama kali dilaporkan tahun 1999 di Jawa Barat, penyebabnya adalah geminivirus dari genus *begomovirus* (Hidayat *et al.*, 1999) dan telah menyebar dengan cepat ke berbagai sentral tanaman cabai di Indonesia. Di Daerah Istimewa Yogyakarta dan Jateng, penyakit yang sama telah meresahkan petani dan sangat mempengaruhi produksi cabai (Sulandari, 2004).

Gejala penyakit pada tanaman cabai berupa bercak kuning di sekitar tulang daun, kemudian tampak *vein clearing* yang berkembang menjadi warna kuning sangat jelas, tulang daun menebal dan helai daun menggulung ke atas (*cupping*). Gejala lanjut penyakit ini menunjukkan daun-daun muda menjadi kecil-kecil, helai daun berwarna kuning cerah atau hijau muda yang berseling dengan warna kuning dan cerah yang akhirnya tanaman kerdil (Sulandari *et al.*, 2001). Penyakit *begomovirus* berdasarkan

*International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) 2005* termasuk dalam famili *geminiviridae*, famili ini dibedakan menjadi empat genus yaitu *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* dan *Topocovirus* (Hull, 2002).

Genus *begomovirus* dicirikan dengan tipe *Bean golden mosaic virus*, struktur genomnya bipartit/monopartit, inangnya tanaman dikotil dan vektornya *Bemisia tabaci* Genn (Castilo *et al.* 1998). Berdasarkan kesamaan sekuen DNA-nya *begomovirus* cabai Indonesia dibawah 90% dari spesies *begomovirus* yang sudah dilaporkan sebelumnya di Gen Bank, spesiesnya diberi nama *Pepper Yellow Leaf Curl Virus* (Pep YLCIDV) (Sukanto, 2005). Penyakit ini merupakan jenis penyakit virus yang menyerang tanaman dengan kisaran inang cukup luas meliputi tanaman budidaya maupun gulma di sekitar tanaman, infeksi pada jaringan inang hanya dilakukan oleh serangga vektor (*B. tabaci*), satu vektor yang *viruliferous* dilaporkan mampu menularkan virus (Aidawati *et al.* 2002). Akibat serangannya dapat menghilangkan hasil cabai antara 20-100% (Setiawati, 2003).

Deteksi *Begomovirus* selama ini dilakukan dengan metode konvensional, dengan melihat gejala khasnya yaitu pada helai daun tampak *vein clearing* yang kemudian berkembang menjadi warna kuning sangat jelas, tulang daun menebal dan helai daun menggulung ke atas (*cupping*). Pada gejala lanjut, daun-daun muda menjadi kecil-kecil, helai daun bewarna kuning cerah atau tetap bewarna hijau muda dan tanaman menjadi kerdil. (Sulandari, *et al.*, 2001). Namun cara ini belum dapat memastikan gejala tersebut disebabkan oleh *Begomovirus* atau virus yang lainnya. Deteksi *Begomovirus* dengan metode konvensional seringkali tidak mungkin dilakukan karena tidak semua *Begomovirus* dapat ditularkan secara mekanis dengan cairan perasan tanaman terinfeksi, dengan demikian penggunaan biosai untuk identifikasi dan evaluasi kisaran inang sulit dilakukan (Aidawati, 2006).

Epidemi penyakit yang disebabkan oleh *Begomovirus* semakin lama semakin meluas dan berpotensi menghambat produksi tanaman cabai maka perlu adanya prosedur untuk mendeteksi *Begomovirus* di dalam tanaman diantaranya dengan metode serologi dan PCR *Polymerase chain reaction* (PCR).

Metode serologi merupakan cara yang paling sering digunakan untuk mendeteksi dan mendiagnosis virus tumbuhan, baik menggunakan antibodi poliklonal maupun antibodi monoklonal. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan teknik deteksi patogen yang mendasarkan pada reaksi antibodi dan antigen. Antibodi diikat dengan enzim spesifik sebagai penanda. Bila ada reaksi positif, enzim akan menghidrolisis substrat sehingga terjadi perubahan warna yang dapat dibaca secara visual. Metode ini sangat potensial untuk digunakan sebagai deteksi *Begomovirus* karena dapat dilakukan dengan mudah, memberikan hasil dalam waktu singkat dan biaya pelaksanaan yang relatif murah, selain itu teknik serologi cukup untuk mendeteksi virus dalam bahan tanaman maupun serangga vektornya (Sulandari, 2004). Namun demikian, masih terdapat sedikit hambatan keberhasilannya apabila diterapkan untuk

*Begomovirus*. Hal ini disebabkan sulitnya mendapatkan virus murni dalam jumlah yang cukup untuk membuat antiserum (Roberts *et al.*, 1984). Metode serologi tidak efisien untuk mendeteksi virus-virus gemini, karena pembuatan antisera untuk virus gemini terbukti sulit yang disebabkan oleh sifat fisik dan kimia partikel virus yang membuatnya sulit untuk dimurnikan dalam bentuk yang stabil, sifat imunogenik dari virion yang lemah, dan protein selubung terutama untuk virus-virus yang ditularkan *B. tabaci* tidak dapat dibedakan melalui antiserum poliklonal maupun monoklonal (Roberts *et al.*, 1984).

Keragaman *Begomovirus* di lapangan sangat beragam, hal ini diakibatkan penularan *Begomovirus* oleh serangga vektornya pada inang yang sama ataupun yang masih dekat kekerabatannya dapat terinfeksi oleh satu jenis *Begomovirus* secara tunggal, bersamaan dengan jenis *Begomovirus* lain maupun oleh strain lainnya (Sulandari, 2004).

Dewasa ini untuk karakterisasi maupun deteksi virus tumbuhan banyak dikembangkan teknik molekuler. Teknik PCR akhir-akhir ini berkembang sangat pesat untuk deteksi berbagai virus tumbuhan. Deteksi virus secara PCR akan memberikan hasil yang akurat, cepat dan sangat peka. Teknik PCR hanya memerlukan jumlah sampel yang sedikit, dan sampel dapat berupa bahan segar, sudah dikeringkan atau beku. Teknik PCR pada umumnya dapat mengatasi kendala pada pengujian virus secara serologi (Sulandari, 2004).

Tujuan penelitian ini untuk mempelajari dan mendeteksi gejala yang muncul dilapangan melalui teknik I-ELISA test dan PCR.

## **BAHAN DAN METODE**

Penelitian dilaksanakan dengan mengambil sampel tanaman sakit di petak pertanaman cabai milik petani di desa Kaliwanglu, Harjobinangun, Kecamatan Pakem, Sleman, Yogyakarta. I-ELISA test dan PCR dilaksanakan di Laboratorium Virologi Tumbuhan Jurusan Perlindungan

Tanaman dan Laboratorium Genetika Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian laboratorium dilakukan untuk mendeteksi infeksi *Begomovirus* dan untuk menguji ada tidaknya variasi gejala campuran dari virus. Pengujian laboratorium dilakukan dengan I-ELISA dan deteksi PCR. Metode I-ELISA yang digunakan adalah *Indirect ELISA* tanpa pelapisan (*nonprecoating*) (Koenig, 1981). Pengujian dilakukan dengan menggunakan *polysyrene microtitre plate* (Nunc-Immuno-Plate, Intermed). Antigen pengujian terdiri dari ekstrak daun sakit yang diambil sebagai sampel. Pengujian dilakukan dengan antibodi yang telah dimurnikan.

Deteksi secara molekuler dilakukan dengan PCR dengan menggunakan 2 pasang primer yaitu Krusty&Homer dengan urutan nukleotida (Tabel 1), dikonstruksi berdasarkan daerah genom *geminivirus* yang memiliki konservasi tinggi, yaitu di daerah penyandi protein replikasi dan selubung virus (Rojas *et al.*, 1993). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan *Ready To Go Bead* (Amersham Pharmacia Biotech Inc) menggunakan DNA 2 µl (hasil ekstraksi DNA), 1 µl dan akuades sampai total volume reaksi mencapai 25 µl dan 1 sampel menggunakan *MMR* (11 µl), 1 µl DNA (hasil ekstraksi), dan akuades sampai total volume reaksi 25 µl PCR dilakukan dengan 30 siklus dengan tahapan pemisahan utas DNA pada 94°C selama 1 menit, penempelan primer pada DNA template pada 52°C selama 1 menit dan sintesis DNA pada 72°C. Hasil amplifikasi DNA selanjutnya dianalisis dengan elektroforesis.

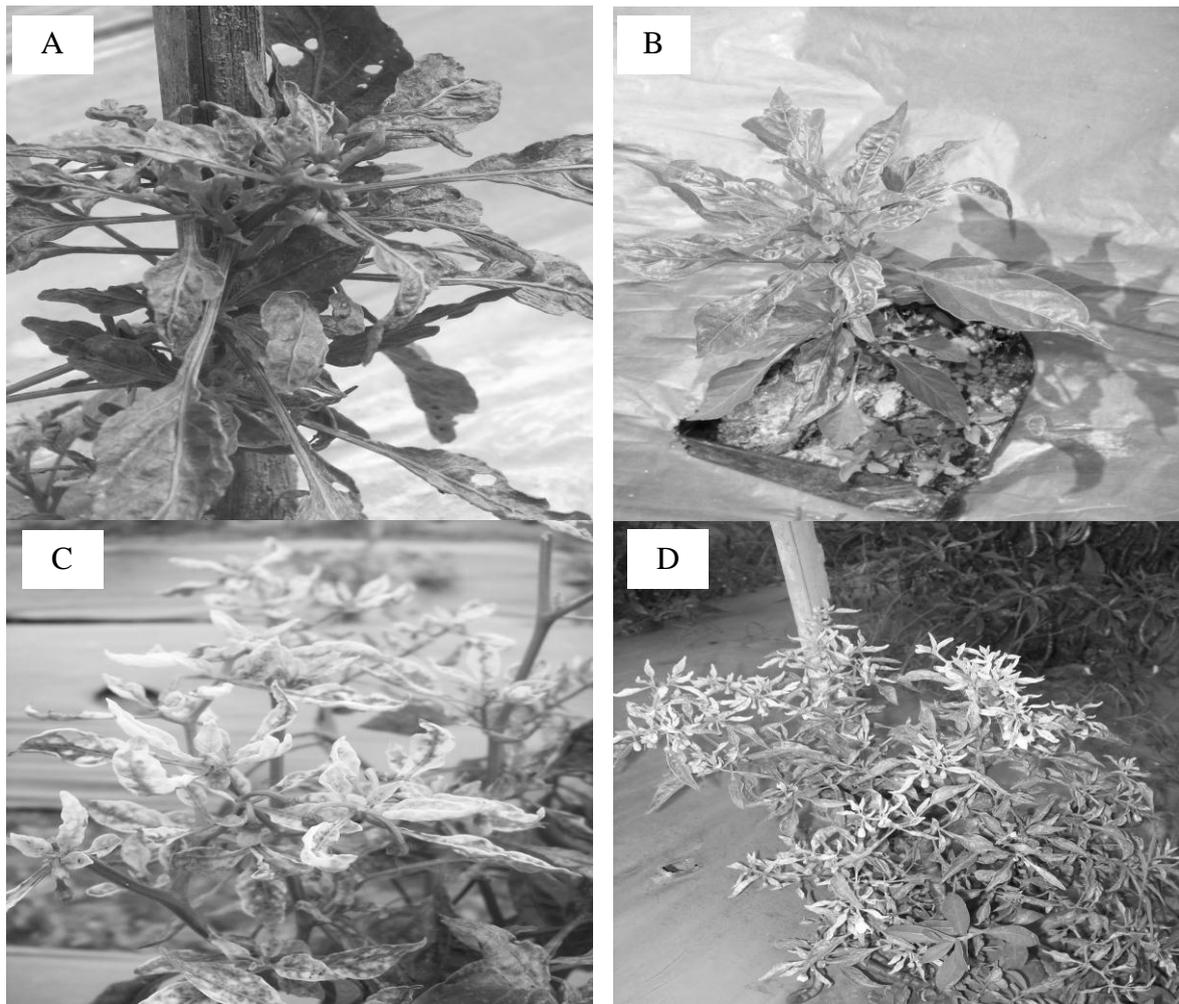
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Gejala Penyakit.** Hasil penelitian diketahui bahwa tanaman cabai yang terinfeksi oleh *Begomovirus* pada umumnya menunjukkan gejala berupa helaian daun tampak *vein clearing* yang berkembang menjadi warna kuning sangat jelas, tulang daun menebal dan melengkung keatas (*cupping*) pada gejala lanjut, daun-daun muda menjadi

kecil-kecil, helai daun bewarna kuning cerah atau hijau muda yang berseling dengan warna kuning cerah, dan tanaman menjadi kerdil selain gejala diatas ditemukan beberapa variasi gejala, yang dapat dikelompokkan menjadi empat seperti yang tampak pada Gambar.1 yaitu : A) warna daun hijau, keriting, kaku, tulang daun menebal, daun-daun kelihatan bertumpuk dan bergelombang, B) warna daun hijau, mengkerut, tulang daun menebal, mosaik, beberapa daun menggulung ke atas dan ke bawah dan *vein clearing*, C) warna daun dominan kuning keputihan, *vein clearing*, tepi daun menggulung ke atas (*cupping*), tulang daun terdapat bercak hijau warna daun dominan kuning kehijauan, ukuran daun mengecil, tulang daun menebal, malformasi dan tanaman kerdil.

Berdasarkan variasi gejala yang muncul diketahui bahwa semua galur cabai yang di uji dapat terinfeksi oleh *Begomovirus*. Adanya respon yang berbeda pada masing-masing galur cabai diduga dipengaruhi oleh kerentanan galur tersebut terhadap virus maupun serangga vektornya. Variasi gejala ini dipengaruhi oleh faktor tanaman seperti umur, kultivar dan genotip tanaman selain itu adanya faktor lingkungan seperti tingkat kesuburan tanah dan iklim sekitar tanaman (Matthew, 1992).

Berdasarkan variasi gejala yang muncul dapat dikatakan bahwa semua kultivar cabai yang di uji dapat terinfeksi oleh *Begomovirus*. Adanya respons yang berbeda pada masing-masing galur cabai diduga dipengaruhi oleh kerentanan galur tersebut terhadap virus. Variasi gejala ini dipengaruhi oleh faktor tanaman seperti umur, kultivar dan genotip tanaman selain itu adanya faktor lingkungan seperti tingkat kesuburan tanah dan iklim sekitar tanaman (Matthew, 1992). Lebih lanjut Polston (1996) menyatakan bahwa ekspresi gejala pada tanaman terinfeksi *Begomovirus* juga dipengaruhi oleh strain virus dan waktu infeksi, jika infeksi virus terjadi pada fase generatif intensitas serangan secara umum lebih ringan dibandingkan tanaman yang terinfeksi pada fase vegetatif (Sudiono *et al.*, 2001).



Gambar 1. Variasi Gejala yang Ditemukan di Lapangan (A) Daun Keriting dan Bergelombang, (B) Daun Mosaik, Mengkerut dan *Vein Clearing*, (C) Daun Kuning Cerah dan *Cupping*, (D) Daun Kecil, Warna Kuning Kehijauan dan Tulang Daun Menebal.

Tabel 1. Variasi Gejala Penyakit pada Berbagai Kultivar Cabai:

Kultivar	Variasi gejala	Gejala dominan yang muncul
Supersamas	mc,mf, hj,vc	mc
Tampar	ku,hj,vc, dk	kj
Deprok	ku,cp,tb, kd,mf	ku
Semarangan	kr,mc,vc,tb	kr
Krida-99	mc,ku,vc,hj	mc
Kado-99	mc,vc, cp, dh, ku hj	kj

Ket: mc: daun mosaik, vc: *vein clearing*, kj: kuning dan warna hijau sedikit di jaringan sekitar tulang daun seperti jala, cp: *cupping*, dk: daun kecil, ku: warna kuning, hj: warna daun hijau, dk hj : daun kecil hijau, tb: tulang daun menebal, kr: daun keriting dan bergelombang, kd: kerdil, mf: malformasi.

**Deteksi *Begomovirus* secara ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).** Pada Tabel 2. diketahui variasi gejala tanaman yang terinfeksi *Begomovirus* mempunyai gejala yang hampir sama sehingga sukar untuk membedakan secara spesifik apakah gejala tersebut hanya terinfeksi *Begomovirus* atau ada campuran virus lainnya, untuk mengatasi hal tersebut dilakukan serologi untuk membedakanya.

Hal ini sependapat dengan Somowiyarjo *et al.*, (1989) menyatakan bahwa virus tertentu dapat mengakibatkan infeksi gejala mirip yang diakibatkan virus lain, satu atau lebih infeksi virus pada tanaman. Selanjutnya jika ada kombinasi virus di dalam tanaman dan terdapat kecocokan pada inangnya maka akan memunculkan strain baru sehingga gejala yang diekspresikan pada tanaman juga bervariasi (Wege, 2007).

Tabel 2. Deteksi pada Sampel Daun Bergejala dengan I-ELISA

Sampel	Antibodi	A <sub>405</sub> nm			Keterangan
		1	2	Rerata	
Daun mosaik, mengerut dan vein clearing	SSV	0,383	0,357	0,370	+
	PatMov	0,823	0,807	0,815	+
	ToMV	0,736	0,788	0,762	+
	TYLCV	0,556	0,543	0,55	+
Daun kecil, warna kuning ke hijauan, tulang daun menebal	SSV	0,319	0,205	0,262	+
	PatMov	0,897	0,828	0,863	+
	ToMV	0,485	0,508	0,497	+
	TYLCV	0,565	0,574	0,570	+
Daun keriting bergelombang	SSV	0,502	0,561	0,532	+
	PatMov	0,704	0,728	0,716	+
	ToMV	0,518	0,510	0,514	+
	TYLCV	0,472	0,486	0,479	+
Daun kuning, <i>cupping</i>	SSV	0,278	0,217	0,240	+
	PatMov	0,864	0,832	0,848	+
	ToMV	0,102	0,192	0,147	-
	TYLCV	0,484	0,499	0,492	+
Kontrol	SSV	0,119	0,107	0,113	-
	PatMov	0,220	0,228	0,224	-
	ToMV	0,143	0,162	0,153	-
	TYLCV	0,136	0,125	0,131	-
Buffer	SSV	0,104	0,095	0,099	-
	PatMov	0,084	0,090	0,087	-
	ToMV	0,086	0,105	0,096	-
	TYLCV	0,041	0,089	0,065	-

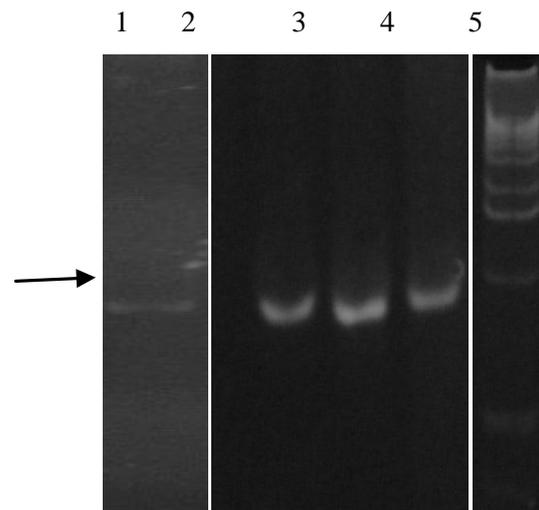
Ket: Tanda + menunjukkan bahwa sampel positif terinfeksi virus  
Tanda - menunjukkan bahwa sampel tidak terinfeksi virus

Pada daun dengan variasi gejala daun mosaik, mengkerut dan *vein clearing* ternyata terinfeksi campuran virus, hal tersebut ditunjukkan dengan antibodi SSV, PatMov, ToMV dan TYLCV bereaksi positif. Pada daun dengan variasi gejala daun kecil, kuning kehijauan dan tulang daun menebal ternyata terinfeksi campuran virus, hal tersebut ditunjukkan dengan antibodi SSV, PatMov, ToMV dan TYLCV bereaksi positif. Pada daun dengan variasi keriting bergelombang ternyata terinfeksi campuran virus, hal tersebut ditunjukkan dengan antibodi SSV, PatMov, ToMV dan TYLCV bereaksi positif. Pada daun dengan variasi gejala daun kuning dan *cupping* ternyata terinfeksi campuran virus, hal tersebut ditunjukkan dengan antibodi SSV, PatMov, ToMV dan TYLCV bereaksi positif. Pada daun dengan variasi gejala daun kuning dan *cupping* ternyata terinfeksi campuran virus, hal tersebut ditunjukkan dengan antibodi SSV, PatMov, ToMV dan TYLCV bereaksi positif.

Berdasar hasil nilai absorbansi sampel daun bergejala yang diperoleh dari lapangan pada uji I-ELISA menunjukkan bahwa nilai absorbansi tertinggi terdapat pada tanaman bergejala daun kecil, kuning kehijauan dan tulang daun menebal yang diuji dengan antibodi PatMov yaitu sebesar 0,863. Nilai absorbansi tinggi menunjukkan tingginya titer virus yang terdapat pada sampel tersebut.

Dari keempat variasi gejala dengan pengujian antibodi SSV, ToMV, PatMoV dan TYLCV bereaksi positif, hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat campuran virus *Begomovirus* dengan *Cucumovirus*, *Potyvirus* dan *Tobamovirus*.

**Deteksi *Begomovirus* secara PCR (Polymerase Chain Reactions).** Pada pengujian dengan menggunakan teknik PCR untuk memastikan apakah dari empat macam variasi gejala yang dikelompokkan tersebut apakah benar-benar terinfeksi oleh *Begomovirus*, selama ini dengan melihat gejala khas dengan deteksi konvensional belum dapat dipastikan secara pasti gejala tersebut akibat infeksi *Begomovirus*. Hal ini sependapat dengan Papiomatas *et al* (1994) menyatakan bahwa gejala penyakit tidak cukup untuk digunakan membedakan *Begomovirus* dilapangan maka perlu deteksi dengan menggunakan PCR untuk memastikan virus tersebut *Begomovirus*.



Gambar 2. Hasil Visualisasi Ekstraksi DNA Total Tanaman Cabai dengan Menggunakan Primer Krusty Homer sebesar 580 bp. (1) Daun Keriting dan Bergelombang ; (2) Daun Mosaik, Mengkerut Dan *Vein Clearing* ; (3) Daun Kuning dan *Cupping*; (4) Daun Kecil, Warna Kuning Kehijauan , Tulang Daun Menebal;5) Marker DNA  
 → : pita DNA *Begomovirus* berukuran 580 bp

Deteksi dengan PCR menggunakan primer universal Krusty & Homer berhasil mengamplifikasi genom *Begomovirus* yaitu dengan diperoleh pita DNA berukuran sekitar 580 bp pada isolat cabai dengan gejala (daun keriting dan bergelombang) (lajur 1), (daun mosaik, mengkerut dan *vein clearing*) (lajur 2), (daun kuning cerah dan *cupping*) (lajur 3) dan (daun kecil, warna kuning kehijauan dan tulang daun menebal) (lajur 4) menunjukkan bahwa keempat variasi gejala diinfeksi oleh *Begomovirus*.

## KESIMPULAN

Hasil deteksi I-ELISA dari berbagai variasi gejala yang muncul di lapangan disebabkan infeksi campuran antara *Tobamovirus*, *Cucumovirus* dan *Potyvirus*, berdasarkan hasil PCR menggunakan primer universal *coat protein* mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 580 bp.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aidawati, N. 2000. *Penularan Virus Kerupuk Tembakau dengan B.tabaci Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae)*. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Aidawati, N. 2006. *Keanekaragaman Begomovirus pada Tomat dan Serangga Vektornya, Bemisia tabaci Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). Serta Pengujian Ketahanan Genotipe Tomat terhadap Strain Begomovirus*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Castilo, J. N., Sonia, S. C., and Juan, A. D., 1998. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Is Causes a Novel Disease of Common Bean and Severe Epidemics in Tomato in Spain*. Plant Disease 83(1) : 29-32.
- Hidayat, S. H., E. S. Rusli, dan Nooraidawati. 1999. *Penggunaan Primer Universal dalam Polymerase Chain Reaction untuk Mendeteksi Virus Gemini pada Cabe*. Prosiding Kongres Nasional XI dan Seminar Ilmiah PFI, Purwokerto, 16-18 September 1999. Hal: 355-359.
- Hull R. 2002. *Matthews Plant Virology*. Fourth Ed. San Diego: Academic Press.
- Matthew, REF. 1992. *Fundamental of Plat Virology*. Academic Press Inc. Sandiego.
- Papiomatas, EJ, Pater, ID, Nou, YM, Noveiry, AO, Gilbertson, RL. 1994. *Moleculer Characterization of a New Sap Transmissible Bipartite Genome Geminivirus in Fecting Tomatoes in Mexico*. Phytopathology. 84:1215-1224.
- Polston, J.E dan Anderson, P.K. 1997. *The Emergence of Whitefly-Transmitted Geminivirus in Tomato in the Western Hemisphere*. Plant Disease. 81 (12) : 1358-1369.
- Robert, IM, Robinson, DJ, Harrison, BD.1984. *Serological Relationship and Genome Homologies among Geminiviruses*. Ann. Appl. Biol. 105:483-493.
- Setiawati, W. 2003. *Pengendalian Kutu Kebul (B.tabaci) pada Tanaman Cabai*. Seminar Sehari mengenai Pengenalan dan Pengendalian Virus Kuning pada Tanaman Cabai, Jakarta, 20 Februari 2003.10 Hal.
- Somowiyarjo, S., N. Sako, and F. Nonaka. 1989. *Dot Immunobinding Assay for Zucchini Yellow Mosaic Virus using Polyclonal and Monoclonal Antibodies*. Ann Phytopath Indonesia. Denpasar hal 112-114.
- Sudiono, S. H Hidayat, R. Suseno dan S. Sosromarsono. 2001. *Deteksi Molekuler dan Uji Kisaran Inang Virus Gemini Asal Tanaman Tomat*. Prosiding Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah perhimpunan Fitopatologi Indonesia, Bogor, 22-24 Agustus.
- Sukamto. 2005. *Mengenali Virus Tanaman Cabai*. Aavailable at on -line with updates at [www.beritaiptek.com/zberita/beritaiptek/2005-07-13/Mengenali-Virus Tanaman- Cabai.html](http://www.beritaiptek.com/zberita/beritaiptek/2005-07-13/Mengenali-Virus_Tanaman_Cabai.html), (diakses 6 November.2006).
- Sulandari, S. 2004. *Karakterisasi Biologi, Serologi dan Analisis Sidik Jari DNA Virus Penyebab Penyakit Daun Keriting Kuning Cabai*. Desertasi. IPB, Bogor.
- Sulandari, S., Suseno, R, Hidayat, S.H. , Harjosudarmo, J. dan Sastromarsono, S. 2001. *Deteksi Virus Gemini pada Cabai di Daerah Istimewa Jogjakarta*. Prosiding Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah PFI 22-24 Agustus 2001. Bogor.
- Wege, C. 2007. *Movement and Localization of Tomatto Yellow Leaf Curl Viruses in the Infected Plant*. Departemen of Moleculer Biology and Virology. Institute of Ciology Universitat Stuttgart, D-70550, Stuttgart, Germany.