

Apfelviren: molekularbiologischer Nachweis im Vergleich mit der konventionellen Indikatortestung

Im zunehmend geöffneten Handelsraum ist die Testung der importierten Obstgehölze und der schnelle und sichere Nachweis von latent vorhandenen Krankheitserregern im Pflanzenmaterial von grosser Bedeutung. Damit kann die Ausbreitung von zunächst unerkannten Krankheitserregern, vor allem von Viren, vermieden werden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, wie die klassische Methode zum Nachweis von Viren, die in der Regel bis zu drei Jahre dauert (Indikatortestung), durch eine schnelle, empfindliche und zuverlässige molekularbiologische Diagnose ergänzt werden kann.

MAJA HILBER-BODMER, THOMAS HASLER, BEATRIX BUCHMANN,
ELISABETH BOSSHARD UND JÜRGEN E. FREY,
EIDGENÖSSISCHE FORSCHUNGSANSTALT WÄDENSWIL

Die Testung von Jungpflanzen verschiedener Obstarten ist von grosser Bedeutung, weil dadurch den Produzenten garantiert virusfreies Pflanzgut zur Verfügung gestellt werden kann (Laimer et al. 2002). Dies ist vor allem deshalb wichtig, da verschiedene Viren zunächst latent sind, das heisst, die infizierten Pflanzen sehen bei der Pflanzung optisch gesund aus. Schäden oder Ertragsreduktionen zeigen sich erst zu einem späteren Zeitpunkt und können grosse Ausfälle verursachen. Eine direkte Bekämpfung von Viren in der Baumschule oder in einer Obstanlage ist nicht möglich, die Vorsorge (Prävention), das heisst der Einsatz von gesundem, virusfreiem Pflanzgut ist die Voraussetzung für den erfolgreichen Obstanbau.

Viruskrankheiten in Obstgehölzen sind mit einer Reihe von Verfahren nachweisbar. Die Wahl des Nachweisverfahrens wird im Allgemeinen aufgrund von dessen Zuverlässigkeit, Schnelligkeit und gegebenenfalls der Kosten getroffen. Viren sind nur einige millimeter gross und deshalb unter dem Lichtmikroskop nicht sichtbar. Da sie nicht auf künstlichen Nährmedien angezogen werden können wie Pilze und Bakterien, mussten spezifische Nachweismethoden entwickelt werden. Die klassische Methode zum Nachweis einer Viruserkrankung arbeitet mit Indikatorpflanzen in der Baumschule und ist dadurch sehr aufwändig; sie dauert in der Regel zwei bis drei Jahre.

Molekularbiologische Methoden reduzieren die für den Nachweis benötigte Zeit auf wenige Tage (Frey et al. 2002). Der aufwändige Feldtest könnte dadurch stark reduziert werden.

Kranke Pflanzen können nach dem eindeutigen Nachweis eines Virusbefalls frühzeitig aussortiert und der Virusfreimachung (Hitzebehandlung) zugeführt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Anpassung und Einführung einer modernen molekularbiologischen Me-

thode zur Diagnose der Apfelviren «Chlorotische Blattfleckung» (ACLSV), «Stammfurchung» (ASGV) und «Stammnarbung» (ASPV) im Blattmaterial und im Holz.

Durch Viren erzeugte Symptome auf Apfelblättern und -holz

Ein Virus kann an verschiedenen Obstsorten unterschiedliche Symptome hervorrufen (Abb. 1 bis 3). Auch wenn befallene Pflanzen keine Symptome aufweisen, kann es zu Wachstumsstörungen oder Ertragshemmung kommen. Infektionen können auch latent oder maskiert sein; dies bedeutet, dass sie zunächst keine von blossen Auge sichtbare Sympto-



Abb. 1: Chlorotische Blattfleckung des Apfels (englisch: Apple Chlorotic Leaf Spot Virus, ACLSV).

Krankheitsbild: Nach der Infektion treten häufig Blattdeformationen, gelbgrünliche Blattfleckungen oder aber Unterdrückung des Wachstums auf. Die Unterlage Spy 227 reagiert mit ringförmigen chlorotischen Flecken. Bei starker Fleckung sind die Blätter meist gekräuselt oder gewellt. Infektionen mit dem ACLS-Virus rufen an der Birne Symptome von Ringfleckmosaik sowie von Rindenrissigkeit hervor.



Abb. 2: Stammfurchung des Apfels (englisch: Apple Stem Grooving Virus, ASGV). Krankheitsbild: Als latentes Virus verursacht es nur in verholzten Indikatorpflanzen sichtbare Symptome. Im zweiten Jahr sind unmittelbar oberhalb der Veredlungsstelle unter der Rinde dunkle Furchen sichtbar. Oberhalb der Okulationsstelle (Infektionsquelle) bilden sich überall im Holz Nekrosen.

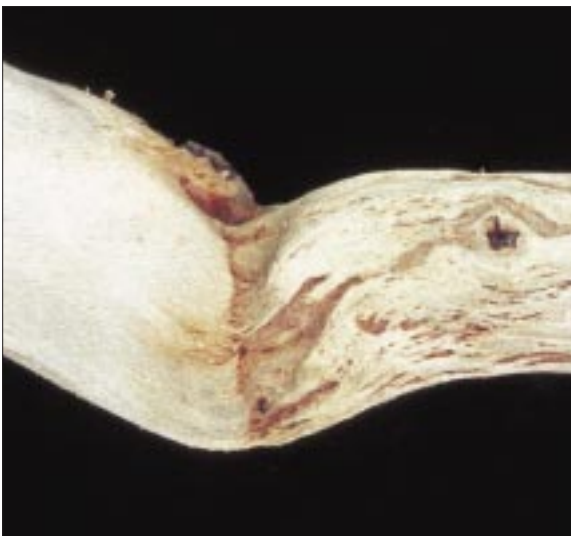


Abb. 3: Stammnarbung des Apfels (englisch: Apple Stem Pitting Virus, ASPV). Krankheitsbild: Die Stammnarbung führt nur an wenigen Kultursorten zu Symptomen. An der Indikatorpflanze (Pflanze, die auf eine Infektion mit typischen, deutlich sichtbaren Symptomen reagiert) Virginia Crab zeigen sich nach dem Löstren der Rinde oberhalb der Okulationsstelle schmale, lange, rillenförmige Einsenkungen.

me hervorrufen. Mischinfektionen mit mehreren Viren kommen häufig vor, sind als solche jedoch ebenfalls nicht immer erkennbar.

Ablauf der Zertifizierung von Obstgehölzen an der Eidgenössischen Forschungsanstalt Wädenswil

Zuerst wird festgelegt, welche Sorten in das virusgeprüfte Sortiment aufgenommen werden sollen. Im Gespräch mit Sortenfachleuten wird die Auswahl der

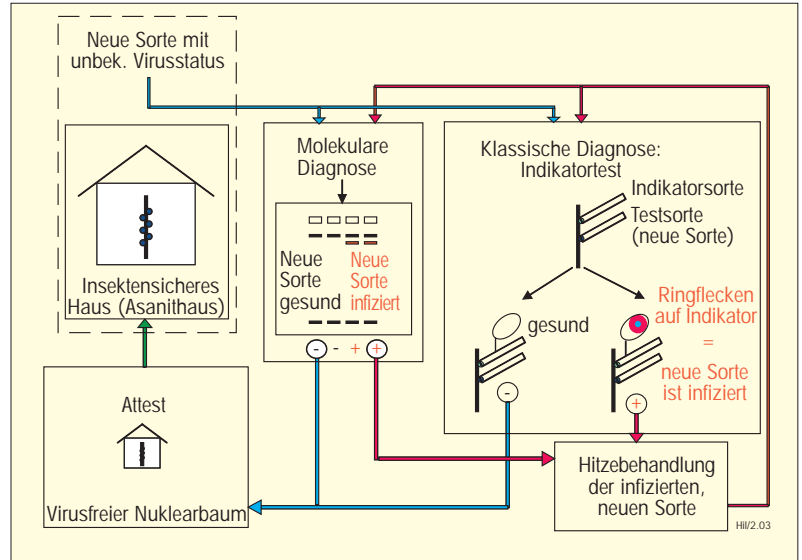


Abb. 4: Schematische Darstellung der klassischen und der molekularbiologischen Modelle.

auf Virenbefall zu testenden neuen Sorten getroffen. Pro Jahr werden zwanzig bis dreissig Sorten ausgewählt. Wesentliche Auswahlkriterien sind die Anbauwürdigkeit und bei neuen Sorten natürlich die zu erwartende Nachfrage aus der Praxis. Danach erfolgt die Virus-Testung.

Klassische Methode: Indikatorortestung

Von den ausgewählten Sorten kommt je ein Baum in ein insektensicheres Gewächshaus. Parallel dazu werden in der Baumschule Indikatorbäume produziert, indem auf Obstunterlagen auf zirka 15 bis 20 cm Höhe Augen von virusempfindlichen Indikator-Sorten (Sorten, die sehr klare Virussympome zeigen) okuliert werden. Eine Woche später erfolgt unterhalb des Indikatorauges eine Doppelokulation mit der zu testenden Sorte. Im Frühjahr des darauf folgenden Jahres treiben die Indikatorbäume aus. Sie werden während zwei bis drei Jahren regelmässig auf Virussympome kontrolliert. Zeigen die verschiedenen Indikatoren keine Symptome, gilt auch der Baum im insektensicheren Zelt als virusfrei und wird zum eigentlichen Nuklearbaum. Werden Symptome festgestellt, erfolgt eine Virusfreimachung durch Hitzebehandlung und anschliessende Spitzenveredlung (Abb. 4). Das dadurch gewonnene gesunde Pflanzenmaterial muss zur Kontrolle nochmals einer Indikatorortestung unterworfen werden.

Molekularbiologische Methode: Nachweis durch RT-PCR

Ribonukleinsäure (RNA = genetische Information der Viren) wird aus Blatt- oder Holzgewebe gewonnen. Das Pflanzenmaterial wird mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben und anschliessend mit einer klassischen RNA-Isolationsmethode extrahiert. Nach einem ersten Schritt, bei dem die RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase (RT) in DNA (Desoxyribonukleinsäure, Erbsubstanz von Bakterien und höheren Lebewesen) umgeschrieben wird, folgt die eigentliche PCR (Polymerase-Kettenre-

aktion) unter Einsatz des Enzyms Taq-Polymerase. Dazu müssen der Reaktion zwei so genannte Primer beigegeben werden. Dabei handelt es sich um kurze, synthetisch hergestellte DNA-Stücke, die dem Enzym Taq-Polymerase sozusagen als Startpunkte für die Vervielfältigung dienen. Bei dieser Reaktion wird ein für das gesuchte Virus spezifischer Abschnitt (Kummert et al. 2000) der Virus-Erbsubstanz vieltausendfach vervielfältigt. Erst durch diese Vervielfältigung der DNA-Sequenz wird eine exakte Analyse möglich. Nach der Vervielfältigung werden die Proben auf einen Chip aufgetragen, mit einer neuen Technik (Capillar Technique Bio System) aufgetrennt und die Länge der vervielfältigten DNA-Abschnitte bestimmt. Der Virus-Nachweis ist positiv, wenn ein DNA-Stück einer bestimmten Grösse vorhanden ist.

Resultate

Es wurden acht Apfelsorten ausgewählt, die in der klassischen Indikatorrestung «Chlorotische Blattfleckung» positiv waren und zum Teil auch die Viren «Stammfurchung» und «Stammnarbung» aufwiesen.

Tab. 1: Nachweis von «Chlorotischer Blattfleckung» in Apfelblättern mit der molekularbiologischen Methode.

Datum der Probenahme	30.04.02	30.05.02	11.07.02	29.07.02	02.09.02	30.9.02
Untersuchte Sorten						
Positiv Kontrolle	+	+	+	+	+	+
Negativ-Kontrolle	-	-	-	-	-	-
Braeburn Redfield	+	+	-	-	+	+
Golden Supreme	+	-	-	-	+	+
Delblush - Tentation 99/31	+	-	-	-	+	+
Jonagored 10313	+	-	-	-	+	+
Obrogala	+	-	-	-	+	+
Red Boskoop Superstar	+	-	-	-	+	+
Akifu N 1x 4537	+	-	-	-	+	+
Braeburn noue 9872	+	-	-	-	+	+

Tab. 2: Nachweis von «Chlorotischer Blattfleckung» (ACLSV), «Stammfurchung» (ASGV) und «Stammnarbung» (ASPV) in Apfelblättern mit zwei verschiedenen Methoden.

Datum der Probenahme	30.04.02	30.04.02	30.04.02	30.04.02	30.04.02	30.04.02
	ACLSV RT-PCR	ACLSV Indikator-testung	ASGV RT-PCR	ASGV Indikator-testung	ASPV RT-PCR	ASPV Indikator-testung
Untersuchte Sorten						
Positiv Kontrolle	+		+		1*	
Negativ-Kontrolle	-	-	-	-	-	-
Braeburn Redfield	+	+	+	+	+	-
Golden Supreme	+	+	+	+	+	+
Delblush - Tentation 99/31	+	+	-	-	+	-
Jonagored 10313	+	+	-	-	+	+
Obrogala	+	+	-	-	+	+
Red Boskoop Superstar	+	+	-	-	-	-
Akifu N 1x 4537	+	+	+	+	+	+
Braeburn noue 9872	+	+	+	-	+	-

1* nicht getestet, da Virus kommerziell nicht erhältlich.

Tab. 3: Nachweis von «Chlorotischer Blattfleckung» (ACLSV), «Stammfurchung» (ASGV) und «Stammnarbung» (ASPV) in Apfelholz.

Datum der Probenahme	22.11.02	22.11.02	22.11.02
	ACLSV RT-PCR	ASGV RT-PCR	ASPV RT-PCR
Untersuchte Sorten			
Positiv Kontrolle	+	+	1*
Negativ-Kontrolle	-	-	-
Braeburn Redfield	+	+	+
Golden Supreme	+	+	+
Delblush - Tentation 99/31	+	-	-
Jonagored 10313	+	-	+
Obrogala	+	-	+
Red Boskoop Superstar	+	-	-
Akifu N 1x 4537	+	+	+
Braeburn noue 9872	+	+	+

1* nicht getestet, da Virus kommerziell nicht erhältlich.

Der oben beschriebene molekularbiologische Nachweis wurde mehrmals wiederholt, um falsch-negative Diagnosen auszuschliessen. In einem ersten Experiment (Probenahme 30.4.02) wurde die Verteilung des Virus in verschiedenen Blättern einjähriger Triebe untersucht. Von jeweils zehn Proben des Nuklearbaums waren entweder alle positiv oder alle negativ, was auf eine homogene Verteilung der Viren in der Pflanze hinweist.

Die Resultate zeigen, dass die molekulare Diagnose bei der «Chlorotischen Blattfleckung» zu den gleichen Resultaten führt wie die Indikatorrestung im Feld. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Virus-Konzentration in den Pflanzen während der Sommermonate so stark zurückgeht, dass das Virus auch mit dieser sensitiven Methode nicht mehr nachgewiesen werden kann (Tab. 1).

Auch die Viren «Stammfurchung» und «Stammnarbung» konnten mit der molekularbiologischen Methode nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass diese Methode eine höhere Sensitivität aufweist als die klassische Indikatorrestung (Tab. 2). Bei «Stammfurchung» konnte das Virus in einem Fall nachgewiesen werden, obwohl die Indikatorpflanze keine Symptome zeigte. Bei «Stammnarbung» wurde das Virus sogar in drei Fällen nachgewiesen, ohne dass auf der Indikatorpflanze Symptome beobachtbar gewesen wären. Dies ist damit zu erklären, dass bei Mischinfektionen die Symptome der weniger aggressiven Viren abgeschwächt und verspätet sichtbar werden, während der molekularbiologische Nachweis auch geringe Viruskonzentrationen erfasst.

Bei der Indikatorrestung spielt die unterschiedliche Symptomausbildung keine Rolle, da kranke Pflanzen nach dem Auftreten der ersten Symptome (hervorgerufen durch den virulentesten Virus) ohnehin einer Hitzebehandlung unterzogen werden.

Wie Tabelle 3 zeigt, können alle drei Viren im Winter mit der molekularbiologischen Methode im Holz nachgewiesen werden. Dies erlaubt die Virusrestung auch, wenn kein Blattmaterial zur Verfügung steht.

Glossar

Okulation	Veredelungsart im Sommer
RNA	Ribonukleinsäure (Erbsubstanz der meisten Viren)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Erbsubstanz der Pflanzen und Tieren)
Primer	Starter
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion

Schlussfolgerungen

Die molekularbiologische Methode war bezüglich Zeitaufwand und Sensitivität der herkömmlichen Indikatorrestung überlegen. Wie die Resultate zeigen, ist die Diagnose mit dieser Methode sehr schnell und zuverlässig. Die Beobachtung, dass die Viren im Sommer nicht nachgewiesen werden können, wurde auch von anderen Gruppen beschrieben. Candresse et al. 2001 vermuten, dass die hohen Temperaturen im Sommer zum Rückgang der Viruskonzentration im Blattmaterial führen.

Mit der Wahl des richtigen Zeitpunkts der Probenahme wird diesem Problem Rechnung getragen.

Die Indikatorrestung wird in Zukunft durch die molekularbiologische Methode ergänzt. Sofern die Resultate der beiden Nachweismethoden weiterhin gut übereinstimmen, kann die Indikatorrestung mit der Zeit stark reduziert werden. Damit wird neben dem Zeitgewinn auch die Qualität der Testung weiter verbessert.

Mit unserer Forschung tragen wir dazu bei, dass der erste Schritt zum erfolgreichen Anbau – nämlich der Start mit gesundem, virusfreiem Pflanzenmaterial – gelingt.

Literatur

Candresse T., Lanneau M., Revers F., Kofalvi S. und Macquaire G.: PCR-based techniques for the detection of plant viruses and viroids. Acta Horticulturae 550, 61–67, 2001.

Frey J. E., Bosshard E., Gafner J., Heller W., Hilber M., Kellerhals M., Ladner J., Schärer H.-J. und Theiler R.: Molekulare Diagnostik in der Landwirtschaft. Schweiz. Z. Obst-Weinbau 138, 469–473, 2002.

Kummert J., Vendrame M., Steyer S. und Lepoivre P.: Development of routine RT-PCR tests for certification of fruit tree multiplication material. OEPP/EPPPO Bulletin 30, 441–448, 2000.

Laimer M., Bertaccini A., Kummer J., Candresse T. und Jelkmann W.: FAIR CT 97–3889: Validierung von diagnostischen Methoden an in vitro Pflanzen zur Zertifizierung von Obstgehölzen. Erwerbsobstbau 44, 76–81, 2002.

RÉSUMÉ

Virus des pommes: comparaison entre le dépistage par biologie moléculaire et les tests conventionnels par indicateurs

A l'heure de la libéralisation rapide de l'espace commercial, le contrôle des arbres fruitiers importés et le dépistage fiable de la présence latente d'agents pathogènes dans le matériel végétal revêtent une importance grandissante. Il s'agit en effet d'éviter la propagation d'agents pathogènes, et notamment de virus, qui passent inaperçus dans un premier temps.

Dans le présent travail, nous montrons comment la méthode classique de dépistage des virus qui peut nécessiter jusqu'à trois ans (tests par indicateurs) peut être remplacée par un diagnostic sensible et fiable faisant appel à la biologie moléculaire. Cette méthode s'est avérée à la fois plus rapide (1 à 2 jours) et plus sensible que les tests conventionnels par indicateurs.

Par notre recherche, nous posons les fondements du succès dans l'horticulture en assurant que le matériel végétal utilisé soit sain et exempt de virus.