

# Nachweis von Obstbaum-Phytoplasmen

Phytoplasmen, die die Apfeltriebsucht, den Birnenverfall und die Europäische Steinobst-Vergilbungskrankheit verursachen, gelten als Quarantäne-Organismen. Analog zur Entwicklung neuer Methoden für den Nachweis von Viren (Hilber et al. 2003) werden im Diagnoselabor der Agroscope FAW Wädenswil (FAW) auch für die Erfassung von Phytoplasmen moderne, empfindliche, schnelle und sichere Nachweismethoden getestet. Die Testung erfolgt, um den möglichen latenten Befall von neu importierten Sorten und Unterlagen sowie in zertifizierten Edelreiser-Schnittgärten möglichst rasch feststellen zu können und um die Ausbreitung der Krankheitserreger ausgehend von infizierten Junganlagen in unseren Anbaugebieten zu verhindern. Es wird daran gearbeitet, die klassische Methode mit Indikatortests (Gehölzindikatoren) durch eine schnellere molekularbiologische Diagnose zu ergänzen und damit den EU-Empfehlungen nachzukommen.

ELISABETH BOSSHARD, BEATRIX BUCHMAN, MARKUS BÜNTER, MAJA HILBER-BODMER, BEATRICE FREY, JÜRIG E. FREY, FRANZISKA LAMPART UND FRANZ SCHWALLER, AGROSCOPE FAW WÄDENSWIL  
[elisabeth.bosshard@faw.admin.ch](mailto:elisabeth.bosshard@faw.admin.ch)

**P**hytoplasmen (frühere Bezeichnung: Mycoplasmen oder MLO) sind zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes (siehe Tab.), die nur in den Siebröhren befallener Pflanzen vorkommen. Die Organismen sind sehr klein (< 1µm) und können unter dem Lichtmikroskop nur nach der Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff erkannt werden. Phytoplasmen lassen sich nicht auf künstlichem Medium züchten, da sie sich nur in lebenden Pflanzenzellen vermehren.

Die Obstbaum-Phytoplasmen besiedeln die Wurzeln und steigen im späten Frühling mit dem Saftstrom in die oberirdischen Pflanzenteile auf. Es wird angenommen, dass eine Übertragung von Pflanze zu Pflanze durch Wurzelverwachsungen möglich ist (Harzer 2003); dadurch liesse sich der nesterweise Befall in den Obstanlagen erklären. Charakteristisch ist das unregelmässige Auftreten von Symptomen; sie können in einem Jahr sehr deutlich ausgeprägt sein und in den folgenden Jahren nicht mehr auftreten. Oft scheint latenter Befall vorzuliegen, der schwer

nachzuweisen ist. Nach Beobachtungen von Seemüller (Seemüller et al. 1984) und anderen Phytoplasmen-Spezialisten ist eine Gesundung kranker Bäume nicht möglich. Gustav Schmid erwähnt in seiner Publikation (1989), dass eine zuverlässige Evaluation des Krankheitsverlaufs langjährige Beobachtungen einer befallenen Anlage erfordert.

## In der Schweiz hauptsächlich auftretende Obstbaum-Phytoplasmosen und ihre Symptome

Die Apfeltriebsucht (Abb. 1, «Hexenbesen», engl. apple proliferation) ist in der Schweiz seit langem bekannt; die Krankheit tritt unterschiedlich häufig auf (Schmid 1989) und ist zur Zeit vor allem in älteren Anlagen zu finden. Sie ist heute in fast allen Ländern Mittel- und Südeuropas verbreitet. Aus den Nachbarländern Deutschland und Italien wird seit dem Jahr 2000 starkes Auftreten mit grossen Ausfällen gemeldet.

Die Symptome der Apfeltriebsucht sind die typischen Besentriebe (Hexenbesen) an einjährigen Trieben und die Produktion kleiner, fader und schlecht gefärbter Früchte. In machen Fällen ist eine vorzei-

### Bakterien, Mollicuten und Viren als Erreger von Pflanzenkrankheiten.

Merkmale	Bakterien	Mollicuten		Viren
Zellwand	ja	nein		nein
Sichtbar mit Lichtmikroskop	ja	ja		nein
Nukleinsäuren	DNA, RNA	DNA, RNA		DNA oder RNA
		Spiroplasma*	Phytoplasma**	
Wachstum auf künstlichen Nährböden	ja	ja	nein	Nein
Befallenes Gewebe	Parenchym, Xylem extrazellulär	Phloem, Blüten intrazellulär	Phloem intrazellulär	Parenchym, Phloem intrazellulär

\* Beispiel: Asternvergilbung Sellerie

\*\* Beispiele: Apfeltriebsucht, Birnenverfall, Europäische Steinfruchtvergilbung

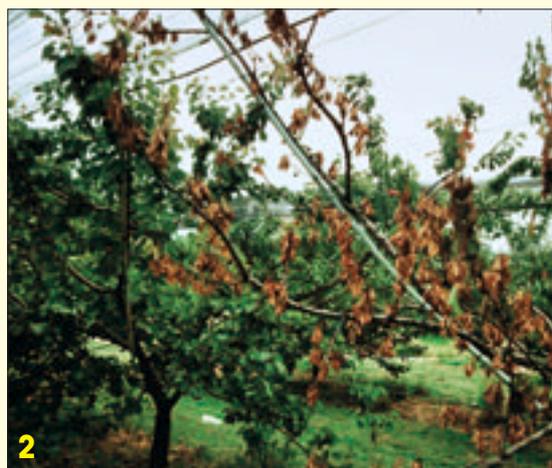
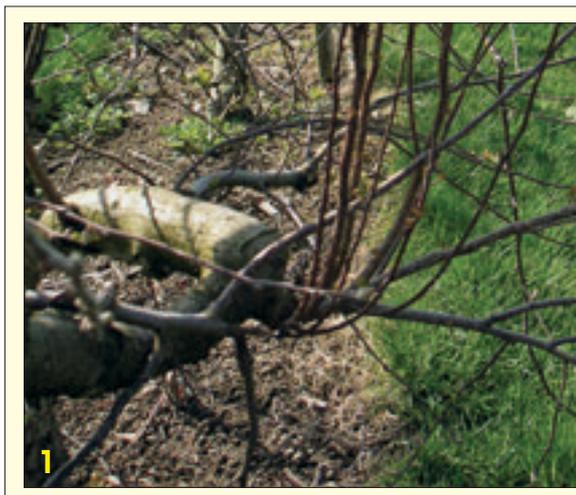


Abb. 1: Apfeltrieb-sucht/Hexenbesen auf Arlet.  
(Foto: Ueli Gremminger, LBBZ Liebegg, Gränichen)

Abb. 2: ESFY auf Aprikose Hargrand.  
(Foto: Maria-Elena Ramel, RAC)

tige Herbstverfärbung, meist verbunden mit der Ausbildung vergrößerter Nebenblätter, das einzige Symptom.

Der Birnenverfall (pear decline) ist in unseren Anbaugebieten vor allem auf Hochstämmen weit verbreitet. In Intensivanlagen ist die Krankheit in den letzten Jahren nur vereinzelt aufgetreten. Gemäss Beobachtungen von Fachleuten kann ein durch Manipulationen am Baum (Schnitt, Veredlung) oder Witterungsbedingungen verursachter Stress das plötzliche Auftreten von Symptomen verursachen, das heisst aus einem latenten kann ein akuter Befall entstehen (Alfred Husistein, mündliche Mitteilung).

Die Krankheitssymptome sind eine frühe Rotverfärbung der Blätter, Kleinblättrigkeit und Kleinfrüchtigkeit, verbunden mit reduziertem Triebwachstum. Der Befall kann ein langsames Absterben der Bäume verursachen.

Die Europäische Steinobst-Vergilbungskrankheit (european stone fruit yellows, ESFY) konnte in der Schweiz bis jetzt nur im Wallis auf Aprikosen nachgewiesen werden (Ramel et al. 2001). In Frankreich ist die Krankheit seit langem bekannt, seit einigen Jahren auch in Spanien, Italien und anderen südeuropäischen Ländern; 1998 wurde sie erstmals in Österreich nachgewiesen (Richter 1999).

Die zahlreichen Symptome sind sehr unterschiedlich; sie hängen von der Anfälligkeit der Sorten und Unterlagen sowie von den Kulturbedingungen ab (siehe FAW-Merkblatt «Europäische Steinobst-Vergilbungskrankheit, ESFY» und Ramel et al. 2003).

Viele der erwähnten Symptome können auch durch Mäusefrass, Frostschäden oder mangelhafte Affinität zwischen Unterlage und Edelreis hervorgerufen werden (Schmid 1989).

Die verursachenden Phytoplasmen der aufgeführten Krankheiten sind nah miteinander verwandt und können deshalb mit der gleichen Methode nachgewiesen werden.

Übertragung der Phytoplasmen: Im Freiland werden die Phytoplasmen durch saugende Insekten (*Cacopsylla*) übertragen (Seemüller et al. 2003). Eine Übertragung ist auch durch alle Arten der vegetativen Vermehrung kranker Pflanzen möglich (Petruschke 2003).

## Methoden für den Nachweis von Phytoplasmen

In unserer Publikation zum Nachweis von Apfelnviren werden der Ablauf der Testung von Obstgehölzen an der FAW und die verwendeten Nachweismethoden ausführlich erörtert und schematisch dargestellt (Hilber et al. 2003). Der herkömmliche Test auf Phytoplasmenbefall in Obstgehölzen erfolgt analog zum Test auf Virusbefall mit Gehölzindikatoren.

## Molekularbiologische Methode

Im EU-Projekt FAIR CT 97-3889 wurden serologische und molekularbiologische Methoden validiert; sie werden von den Experten für die Testung von zertifizierten Obstgehölzen empfohlen (Laimer et al. 2002). Der Nachweis von Phytoplasmen stellt hohe Ansprüche an die Methodik, da die unregelmässige Verteilung in der Wirtspflanze sowie latenter Befall zu falsch negativen Resultaten führen können (Heinrich et al. 2001).

Die Phytoplasmen-DNA wird je nach Jahreszeit aus Wurzeln, Blattmittelrippen oder Triebkambium extrahiert. Mit Hilfe von PCR (Polymerase-Kettenreaktion) wird eine für Obstbaum-Phytoplasmen spezifische Gensequenz vermehrt (Jarasch et al. 2003; Lorenz et al. 1995) und im BioSystem nachgewiesen (Hilber et al. 2003).

## Resultate

Die molekularbiologische Methode wurde für den Phytoplasmen-Nachweis an befallenen Apfel-, Birnen- und Aprikosenbäumen eingesetzt und ergab positive Resultate. Es zeigte sich, dass die Phytoplasmen im Spätsommer und Herbst in Blattmittelrippen und im Triebkambium nachgewiesen werden können, und dass der Nachweis in den Wintermonaten an Wurzelproben gemacht werden muss. Bei Wurzelproben ist darauf zu achten, dass die extrahierte DNA genügend gereinigt wird; bei älteren Wurzeln werden auch Substanzen wie Phenole extrahiert, die die PCR hemmen können. Nach unseren Beobachtungen sind die Phytoplasmen im System einer Pflanze unregelmässig

verteilt; die Probengrösse muss diesem Umstand angepasst werden.

Es besteht der Verdacht, dass Birnbäume mit «Affinitätsproblemen» vom Birnenverfall befallen sind. Durch die Untersuchung von Wurzeln oder Blattmittelrippen mit PCR und spezifischen Primern können allenfalls vorhandene Phytoplasmen und damit die Ursache der Probleme eindeutig nachgewiesen werden.

Seit dem Jahr 2003 werden die im Kanton Thurgau neu gepflanzten Aprikosenanlagen regelmässig visuell auf mögliche Symptome der Europäischen Steinobst-Vergilbungskrankheit kontrolliert, da sie aus einem verseuchten Anbaugebiet stammen; bei Verdacht auf Befall wurden Proben im Diagnose-Labor molekularbiologisch auf Phytoplasmenbefall untersucht. Alle bisher untersuchten Proben waren negativ.

### Schlussfolgerungen

Wie bei den Virosen wird die Testung der Obstbäume auf Phytoplasmen mit Gehölzindikatoren in Zukunft durch die molekularbiologische Methode ergänzt. Die PCR ist die sensitivste Nachweismethode, die auch den Nachweis eines latenten Befalls ermöglichen soll (Jarusch 2003). Dies ist besonders wichtig, da die Symptome der Phytoplasmosen sehr unregelmässig auftreten. Die Methode wurde im EU-Projekt FAIR CT 97-3889 validiert (Laimer et al. 2002); in der Publikation wird darauf hingewiesen dass «... die Anwendung von hochsensitiven Diagnostikmethoden einen bedeutenden Fortschritt in der Verhinderung der Ausbreitung von Virosen und Phytoplasmosen in Obstgehölzen darstellt ...».

Die Nuklearstock-Obstbäume der FAW werden mit Hilfe der molekularbiologischen Methode periodisch auf Phytoplasmen-Befall überprüft. In den zuständigen Gremien werden auch regelmässige Kontrollen der Bäume in den zertifizierten Edelreiser-Schnittgärten diskutiert.

Die molekularbiologische Methode kann auch für die Erfassung von latentem Befall auf alten Sorten im Obsterhaltungsprojekt beigezogen werden.

### Glossar

- DNA: Desoxyribonukleinsäure (Erbsubstanz der Pflanzen und Tiere)
- MLO: Mycoplasma-like organisms (Mycoplasma alte Bezeichnung für Phytoplasma)
- PCR: Polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion
- Primer: Starter

### Literatur

- Harzer U.: Biologie und Auftreten der Apfeltriebsucht in Südwestdeutschland. Obstbau 4, 195–198, 2003.
- Heinrich M., Botti S., Caprara L., Arthofer W., Strommer S., Hanzer V., Kättinger H., Bertaccini A. and Laimer M.: Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. Plant Molecular Biology Reporter 19, 169–179, 2001.
- Hilber M., Hasler T., Buchmann B., Bosshard E. und Frey J.: Apfelviren: molekularbiologischer Nachweis im Vergleich mit der konventionellen Indikatorrestung. Schweiz. Z. Obst-Weinbau 15, 16–19, 2003.
- Jarusch W.: Wie kann man Phytoplasmen im Apfel am besten nachweisen? Obstbau 4, 199, 2003.
- Laimer M., Bertaccini A., Kummerl 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.
- Lorenz K.-H., Schneider B., Ahrens U. and Seemüller E.: Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85, 771–776, 1995.
- Petruschke M.: Apfeltriebsucht - Übertragung durch Pfropfung im Winter. Obstbau 4, 201–202, 2003.
- Ramel M.-E., Gugerli P., Bourquin L., De Meyer J. et Schaub L.: Caractérisation de l'enroulement chlorotique de l'abricotier et détection du phytoplasme ESFY en Suisse romande. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. 33, Nr.5, 279–286, 2001.
- Ramel M.-E., Gugerli P. und Schaub L.: FAW-Merkblatt «Europäische Steinobst-Vergilbungskrankheit (ESFY)», erschienen als Beilage in der Schweiz. Z. Obst-Weinbau 139, Nr. 7, 2003.
- Richter S.: Chlorotisches Blatrollen der Marille - Erstauftreten in Österreich, Diganose und Epidemiologie einer Quarantänekrankheit. Mitt. Klosterneuburg 49, 245–249, 1999.
- Schmid G.: Langjährige Erhebungen zum Auftreten des Apfelbesenwuchses (Triebsucht, Proliferation). Schweiz. Z. Obst-Weinbau 125, 471–479, 1989.
- Seemüller E., Kunze L. und Schaper U.: Besiedlungsverhalten von MLO und Symptomausbildung bei triebsuchtkranken Apfelbäumen und verfallskranken Birnbäumen im Verlauf mehrerer Jahre. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 91, 525–532, 1984.
- Seemüller E., Berwarth C. und Dickler E.: Die Apfeltriebsucht wird durch Blattsauger übertragen. Obstbau 4, 212–214, 2003.

## RÉSUMÉ

### Dépistage de phytoplasmes sur les arbres fruitiers

*Comme pour les viroses, les tests de dépistage de phytoplasmes sur les arbres fruitiers au moyen d'indicateurs dendrologiques vont être complétés à l'avenir par la méthode biomoléculaire. Le PCR est la méthode de dépistage la plus sensible qui devrait même permettre à l'avenir de détecter une infestation latente (Jarusch 2003). C'est d'autant plus important que les symptômes d'une phytoplasmosose se manifestent de manière très irrégulière. La méthode a été validée dans le cadre du projet UE FAIR CT 97-3889 (Laimer et al. 2002). Dans la publication, il est noté que «... l'utilisation de méthodes de diagnostic hypersensibles représente un progrès important dans la lutte contre la prolifération de viroses et de phytoplasmoses dans les arbres fruitiers».*

*Les arbres fruitiers du matériel végétal de base de l'Agroscope FAW Wädenswil (FAW) sont testés périodiquement à l'aide de la méthode biomoléculaire pour détecter une éventuelle infestation par les phytoplasmes. Dans les organes compétents, on discute également de la mise en place de contrôles réguliers des arbres dans les cultures de matériel de propagation. La méthode biomoléculaire peut également servir à détecter une infestation latente sur les espèces anciennes dans le cadre du projet de conservation de la diversité variétale.*