Diagnostik von Phytoplasmosen im Obstbau

Seit Beginn des Obstanbaus in der Schweiz sind Phytoplasmen (früher Mycoplasmen) präsent: Apfeltriebsucht, Birnenverfall und Europäische Steinobstvergilbungs-Krankheit. Phytoplasmen können zu Ertrags- und Qualitätseinbussen, ja sogar zum Absterben der Obstbäume führen. Seit 2001 gelten die genannten Phytoplasmen als Quarantäne-Organismen. Um grössere Probleme bei der Obstproduktion in der Schweiz zu verhindern, werden die zertifizierten Edelreiserschnittgärten periodisch auf Befall überprüft. Dazu ist eine möglichst zuverlässige und kostengünstige Nachweismethode erforderlich.

Hélène Johnston, Markus Bünter und Santiago Schaerer, Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB
Mauro Genini, Kantonaler Pflanzenschutzdienst VS
markus.buenter@agroscope.admin.ch

Im Obstbau sind drei verschiedene Phytoplasmen-Arten weit verbreitet: die Apfeltriebsucht (AP vom engl. apple proliferation, *Candidatus phytoplasma mali*), der Birnenverfall (PD vom engl. pear decline, *Candidatus phytoplasma pyri*) und die Europäische Steinobstvergilbungs-Krankheit (ESFY vom engl. European stone fruit yellows, *Candidatus phytoplasma prunorum*).

Phytoplasmen sind Bakterien ohne Zellwand, die sich ausschliesslich im Phloem der von ihnen befallenen Wirtspflanzen vermehren. Die Ausbreitung der Krankheit geschieht über verschiedene Wege:

- durch die Verwendung von kontaminiertem Veredelungsmaterial (Edelreiser oder Unterlagen)
- durch pflanzensaugende Insekten (Psyllen bzw. Blattsauger)
- und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch durch Anastomosen des Wurzelsystems (Wurzelverwachsungen)

Phytoplasmosen sind über die ganze Schweiz verteilt. Vor allem sind Hochstamm-Obstgärten betroffen. Es wird geschätzt, dass zirka 10 bis 35% Hochstamm-Apfelbäume mit AP und rund 60 bis 80% Hochstamm-Birnbäume mit PD infiziert sind. ESFY ist besonders im Kanton Wallis weit verbreitet; dort werden jährlich bis 5% der Aprikosenbäume wegen ESFY gerodet. Der jährliche Schaden bei Aprikosen wird auf 500 000 Franken geschätzt. In Apfel- und Birnenanlagen gibt es weit weniger kranke Bäume, weil die Baumschulparzellen sowie das zertifizierte Ausgangsmaterial wie Edelreiser und Unterlagen jährlich kontrolliert werden.

Verschiedene Nachweismethoden möglich

In einem befallenen Baum sind die Phytoplasmen nicht gleichmässig verteilt; zudem verändert sich die Verteilung mit den Jahreszeiten. Aus diesen Gründen ist die Labordiagnose schwierig und die klassischen serologischen (ELISA) oder molekularbiologischen (PCR) Methoden sind nicht immer ausreichend empfindlich, um diese Mikroorganismen routinemässig und zuverlässig nachweisen zu können. Im Labor für Phytoplasmologie von Agroscope in Changins wird als Referenzmethode für die über Tausend Proben, die jedes Jahr zur Prüfung eintreffen, gegenwärtig die nested-PCR-Methode (nPCR) verwendet, auf Deutsch: «verschachtelte» PCR.

n-PCR wird in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit zwei verschiedenen Primer-Paaren durchgeführt: Das erste Paar bindet an stabile Bereiche des Genoms der Phytoplasmen, das zweite Paar setzt innerhalb dieser Bereiche an und vervielfältigt einen DNA-Abschnitt, mit dem sich die Zugehörigkeit der betreffenden Phytoplasmen zu einer Gruppe bestimmen lässt.

In den letzten Jahren wurde von Fachpersonen im Pflanzenschutzdienst immer häufiger die Frage gestellt, ob die nPCR letztlich ausreichend empfindlich ist, insbesondere im Vergleich zu ultra-sensitiven technologischen Entwicklungen wie Real-Time-PCR (auch: Echtzeit- oder quantitative PCR oder engl. quantitative real-time PCR, abgekürzt: qPCR). Im vorliegenden Artikel wird ein Vergleich der nPCR mit einer Variante der qPCR beschrieben und analysiert. Der Vergleich fand mit rund Hundert Proben statt, die von Bäumen mit und ohne Symptome entnommen und im Rahmen der Pflanzenpass-Kontrollen und der Prüfung für zertifiziertes Material an unser Labor gesandt wurden.

Herkunft der Blattproben

Die Blattproben von Apfel- und Birnbäumen wurden unter der Aufsicht von Agroscope gesammelt. Grundsatz für die Probennahme: Mischprobe von drei Bäumen mit jeweils vier Blättern pro Baum. Die Blattproben wurden im Zusammenhang mit den Pflanzenpass-Kontrollen in einer Baumschule und im Rahmen einer Genressourcen-Sammlung (Erhalt von alten Obstsorten) für das Projekt Nationaler Aktionsplan (NAP) entnommen und untersucht.

Bei den Aprikosenbäumen wurden unter der Anleitung des Kantonalen Pflanzenschutzdienstes (KPSD) des Kantons Wallis Proben aus dem Wurzelwerk entnommen. Diese Proben stammen aus den Sammlungen von Agroscope (Standort Conthey) und des Kantons (bei Châteauneuf). Die Proben wurden zwischen September 2011 und März 2012 gesammelt. Die Beschreibung des genauen Vorgehens im Labor für die Diagnostik kann bei den Autoren eingeholt werden.

DNA-Amplifikation mit nPCR und qPCR

In den Abbildungen 1, 2 und 3 sind Beispiele der Reaktionsprodukte dargestellt, entweder in einem Agarose-Gel mit Ethidiumbromid oder nach der Analyse im Rotor-Gene-System.

Wenn bei der nPCR das erwartete Amplikon (1071 Basenpaare) nachgewiesen wird, ist das Ergebnis für die betreffende Probe positiv. Im Zweifelsfall wird die Analyse wiederholt. In der qPCR zeigt die Intensität des Fluoreszenzsignals (SYBR Green) eine positive Reaktion an.

Mit einem Ct-Wert < 30 ist eine Probe stark positiv, Ct-Werte zwischen 30 und 37 entsprechen positiven Proben und Ct-Werte von 38 bis 40 gelten als schwach positive oder nicht eindeutige Ergebnisse.

Vergleich zwischen nPCR und qPCR

Für die vergleichende Studie wurden insgesamt 116 Proben von Apfel-, Birnen- und Aprikosenbäumen wiederverwendet, die vorgängig bereits im Rahmen der Prüfung von zertifizierten Edelreisermuttergärten oder von Material der NAP-Sammlung getestet worden waren (Tabelle).

Die bei -20 °C gelagerte DNA wurde mit nPCR erneut getestet. Die Ergebnisse waren identisch mit der ersten Diagnose (positive Proben waren erneut positiv, negative wieder negativ). Die Analyse derselben DNA mit qPCR bestätigte die vorhergehenden Ergebnisse in dem Sinne, dass die mit nPCR positiv ausgefallenen Proben auch bei der qPCR positiv waren. Dagegen wurden fünf zuvor negative Proben mit qPCR positiv getestet, wobei sich der Ct-Wert zwischen 35 und 36 (positive Proben) bewegte. Aufgrund dieser Daten schliessen wir, dass mit Real-Time-PCR (mit SYBR Green) positive Proben empfindlicher nachgewiesen werden können als mit nPCR. Der Unterschied (5 von 116 Bäumen) beträgt 4.3%.

Vor- und Nachteile der beiden Diagnosemethoden

Real-Time-PCR mit SYBR Green (qPCR) weist gegenüber Nested-PCR (nPCR) einige Vorteile auf: eine einzige PCR statt zwei, Verzicht auf Agarose-Gels und Ethidiumbromid (krebserregend) zugunsten einer digitalen und sofortigen Verarbeitung der Ergebnisse im System sowie stark abgekürzte Zyklen (Denaturierung/Hybridisierung/Polymerisation). Im Rahmen der Testkampagnen für die zertifizierte Jungpflanzenproduktion im Obstbau fallen mehr als Tausend Proben an (zwischen 2010 und 2012 wurden jährlich 1000 bis 1400 Bäume getestet). Mehr als 90% des Arbeitsaufwands im Labor wird

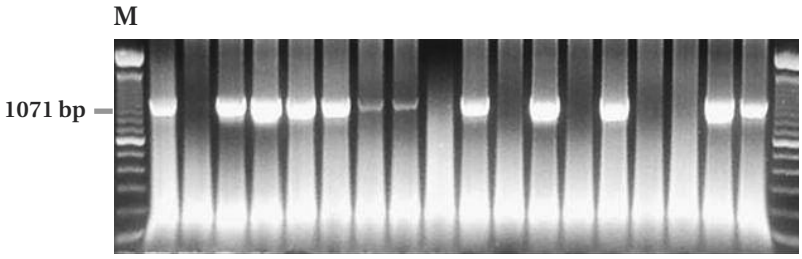

Abb. 1: Amplikon nach nPCR bei Wurzelproben von Aprikosenbäumen. Die leuchtenden Banden bei 1071 bp zeigen Phytoplasmen-positive Proben an. M = Grössenmarker, bp = Basenpaare.

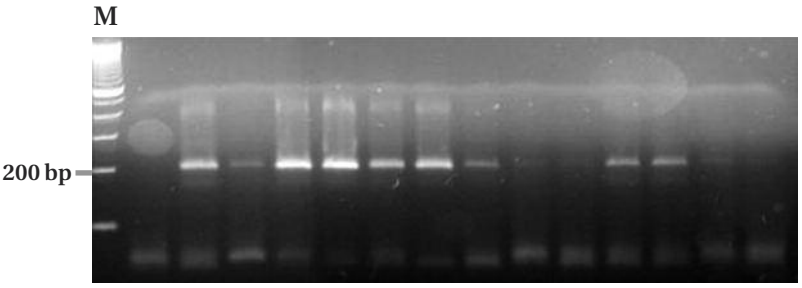

Abb. 2: Prüfung der Übereinstimmung des Amplikons nach qPCR bei Proben von Aprikosenbäumen. M = Grössenmarker, bp = Basenpaare.

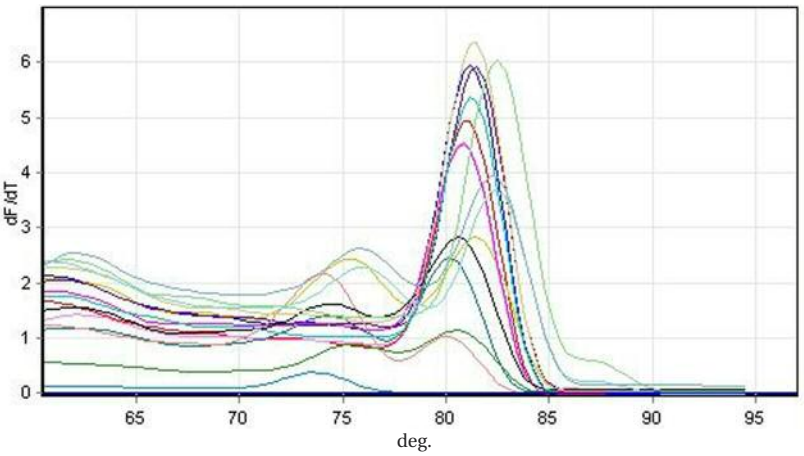

Abb. 3: Melting-Kurven (= Trennung der beiden homologen DNA-Stränge) für die qPCR bei Proben von Aprikosenbäumen.

Anzahl positiv getesteter Proben von Apfel-, Birn- und Aprikosenbäumen bei einer Analyse durch nPCR und qPCR.

Baum	Anzahl	Entnommenes Organ	Positiv bei nPCR	Positiv bei qPCR
Apfelbaum	23	Blatt	1	1
Birnbaum	3	Blatt	0	0
Aprikosenbaum	30	Blatt	9	11
Aprikosenbaum	60	Wurzeln	18	21

Abb. 4: Vorzeitiger Austrieb bei der Aprikosensorte Bergarouge.

für die Präparation und Verpackung des Pflanzengewebes (etikettieren, zuschneiden, wägen) aufgewendet, bevor die DNA extrahiert und gereinigt werden kann. Aus diesem Grund ist die Zeitersparnis durch den Einsatz der qPCR letztlich nur gering. Die Reagenzien für qPCR sind jedoch teurer als für nPCR.

Der Unterschied positiv getesteter Proben zwischen nPCR und qPCR liegt bei 4.3%. Diese geringe Abweichung hat vermutlich nur leichte Auswirkungen für die Sanierungskampagnen (Beseitigung erkrankter Bäume), die im Rahmen der Pflanzenpass-Kontrollen durchgeführt werden. Sie sind allerdings relevant bei der Produktion von zertifiziertem Obstjungpflanzen, insbesondere bei zertifizierten Edelreisermuttergärten, in denen die Mutterbäume jährlich Hunderte von Edelreisern produzieren und somit eine grosse Anzahl Jungpflanzen veredelt werden können.

Abb. 5: Ausgeprägte Rötung des Laubs in einem Birnen-Obstgarten.

Optimale Probennahme ist auschlaggebend

Selbst bei einer qPCR-Analyse würden mit Sicherheit einzelne kontaminierte Bäume durch die Maschen des Tests schlüpfen und als negativ deklariert. Die Ursache für diese falsch-negativen Ergebnisse ist jedoch eher bei der Probennahme im Feld als bei der Empfindlichkeit der Analysemethode zu suchen.

Das Sammeln der Proben ist bei Bäumen kein unerheblicher Faktor, da dabei Symptome berücksichtigt werden müssen, die Hinweise darauf geben, an welcher Stelle die Proben entnommen werden sollten. In vielen Fällen ist das Krankheitsbild nicht klar, was die Qualität der Testergebnisse erheblich beeinträchtigen kann. Zum Beispiel lässt sich ein typisches Symptom von ESFY, der vorzeitige Austrieb (Abb. 4), in der Schweiz selten erkennen, während er weiter im Süden Europas leicht zu beobachten ist. Umgekehrt deutet ein häufiger sichtbares Symptom wie die ausgeprägte Rötung eines Baums (Abb. 5) nicht eindeutig auf eine Phytoplasmose. Im Fall des Birnbaums gibt es kein zuverlässiges Symptom zur visuellen Diagnose des PD. Vergrösserte Nebenblätter sind ein zuverlässiges Symptom für die AP (Abb. 6) – bei der Probennahme ist dieses Symptom aber leicht zu übersehen und statt der symptomatischen Blätter können normale, gesunde Blätter beprobt werden.

Die systematische Analyse Hunderter von Aprikosenbaum-Proben, die bei verschiedenen Geweben und Organen (Wurzel, Zweig, zweijähriges Holz, Blatt, Blüte, grüne Frucht, reife Frucht), von verschiedenen Sorten und zu verschiedenen Zeitpunkten der Anbausaison gesammelt wurden (Genini und Schaerer, nicht veröffentlichte Ergebnisse), zeigt, dass die Konzentration der Phytoplasmen je nach Jahreszeit, Gewebe und Organ variiert. Deshalb kann die Probe eines kranken Baums negativ getestet werden, wenn sie zu einem ungünstigen Zeitpunkt oder an einer ungeeigneten Stelle entnommen wurde.

Vergleiche unterschiedlicher Probennahmen

Wie lässt sich bei all diesen Einschränkungen die Qualität der Tests verbessern? Ein Ansatz besteht darin, pro Baum genügend Material zu sammeln, zum Beispiel etwa Hundert (oder mehr) Blätter aus der ganzen Belaubung. Mit diesem Ansatz kann zwar die Wahrscheinlichkeit des Nachweises der Phytoplasmen maximiert werden, er ist jedoch sehr ressourcenintensiv.

Eine Verbesserung der Tests kann auch durch die Wahl von Geweben oder Organen angestrebt werden, bei denen der Phytoplasmennachweis am aussichtsreichsten ist. So werden bei Aprikosenbäumen unter den Bedingungen im Wallis die besten Ergebnisse erzielt, wenn Ende März Wurzelgewebe gesammelt wird (Genini und Schaerer, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die Entnahme und Extraktion von Wurzeln oder Holz erfordert aber einen zusätzlichen Arbeitsauf-

wand sowohl im Feld als auch im Labor. In Edelreiserschnittgärten werden immer drei Bäume zusammen in einer Blattmischprobe (pro Baum vier Blätter) beprobt.

Phytoplasmosen sind komplexe Krankheiten und die schwierige Probennahme ist nur eines von vielen Hindernissen. Gegenwärtig ist die Art der Probennahme entscheidender als die Analysemethode. Diese Unsicherheiten lassen sich im Moment nicht vollständig ausräumen, trotz aller Bemühungen, die Auswirkungen möglichst gering zu halten.

Fazit

- Ein Vergleichstest zwischen nPCR (Nested-PCR) und qPCR (Real-Time-PCR mit SYBR Green) bei Proben von 116 Obstbäumen zeigt, dass die qPCR präziser ist als die nPCR.
- Die Testergebnisse stimmten bei fünf Bäumen nicht überein, was 4.3% der getesteten Proben entspricht.
- Dieser Empfindlichkeitsunterschied ist unerheblich bei Sanierungskampagnen, die im Rahmen der Pflanzenpass-Kontrollen durchgeführt werden, kann jedoch bei der Produktion von zertifiziertem Vermehrungsmaterial (Edelreiser) beträchtliche Auswirkungen haben, insbesondere durch die Übertragung der Erreger bei der Veredlung.
- Welche der beiden molekularbiologischen Methoden zum Einsatz kommt, ist für die Präzision der Kontrolle eines Obstgartens weniger entscheidend als der korrekte Zeitpunkt und die richtige Art der Probennahme.

Dank

Die Autoren danken Gérard Devènes (Agroscope in Conthey) für seine Hilfe beim Sammeln und Vorbereiten der Wurzelproben. ■

Abb. 6: Vergrösserte Nebenblätter bei einem erkrankten Apfelbaum.
(Foto: Südtiroler Beratungsring)

Literatur

Johnston H., Genini M., Bünter M. und Schaerer S.: Phytoplasmoses en arboriculture fruitière: diagnostic par PCR en temps réel ou par PCR nichée?, Revue Suisse Vitic., Arboric., Hortic. 46 (2), 110–115, 2014.

Bünter M. und Schaerer S.: Merkblätter Phytoplasmen im Obstbau, Revue Suisse Vitic., Arboric., Hortic. 44 (1), 21, 2012.

Jarausch B. und Jarausch W.: Psyllid Vectors and their Control. In: Phytoplasma: Genomes, Plant Hosts and Vectors. P.G. Weintraub & P. Jones (Eds), CAB International, 250–271, 2010.

Ramel M., Gugerli P., Bourquin J., De Meyer J. und Schaub L.: Caractérisation de l'enroulment chlorotique de l'abricotier et détection du phytoplasme > ESFY en Suisse romande, Revue Suisse Vitic., Arboric., Hortic. 33 (5), 279–286, 2001.

Weitere Literaturhinweise beim Korrespondenz-Autor erhältlich.

Diagnostic de phytoplasmoses en arboriculture

RÉSUMÉ

La PCR nichée (nPCR) et la PCR en temps réel (qPCR) sont des techniques utilisées routinièrement pour diagnostiquer les phytoplasmoses en arboriculture fruitière, comme la prolifération du pommier, le dépérissement du poirier et l'enroulement chlorotique de l'abricotier.

Sur la base de 116 échantillons de pommier, poirier et d'abricotier, les résultats de la nPCR, utilisée normalement dans le laboratoire de phytoplasmologie à Changins, ont été comparés à ceux de la qPCR. Cette comparaison montre que la qPCR est légèrement plus précise. Cette faible différence peut cependant avoir un impact significatif sur la production de matériel végétal arboricole certifié. Toutefois, le facteur d'imprécision le plus déterminant est lié au moment et au mode d'échantillonnage choisi.