

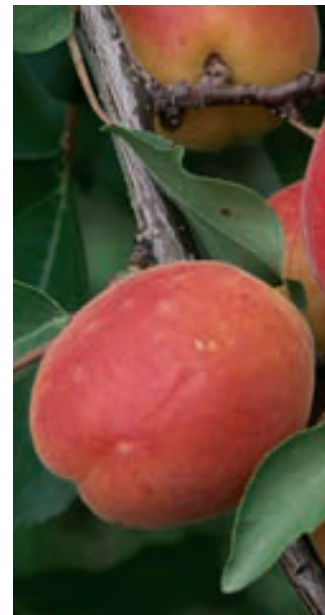
Biotechnologische Betrachtungen zur Marille

Nachweis und Eliminierung von Viren und Phytoplasmen

Margit LAIMER, Pflanzenbiotechnologie Gruppe, IAM, BOKU

Teil 2

Derzeit beobachten wir ein wachsendes öffentliches Bewusstsein und Interesse für den Gesundheitszustand von Pflanze, Tier und Mensch. Daher soll auf die Möglichkeiten hingewiesen werden, die die Pflanzenbiotechnologie im Rahmen der Diagnose von Krankheitserregern und in der Produktion von gesunden Obstgehölzen anbieten kann.



Wie die meisten Obstgehölze wird auch die Marille vegetativ durch Pfropfung als Sortenklone vermehrt, was einen bedeutenden Faktor in der Ausbreitung von Viren und Phytoplasmen darstellt.

Prinzipiell unterscheidet sich der Zugang zu den verschiedenen Pathogengruppen nach dem Schwierigkeitsgrad der Kontrolle:

- **Pilze** können im konventionellen Obstbau mit Fungiziden kontrolliert werden.
- **Bakterien** mit Antibiotika zu kontrollieren ist schon problematischer, wie am Beispiel der Diskussion um den Feuerbrand ersichtlich wurde.
- **Viren** können nicht bekämpft werden, wenn die Pflanze befallen ist. In Ermangelung kurativer stehen nur präventive Methoden, Rodung oder neue Züchtungsansätze (siehe Teil 3) zur Verfügung.
- **Phytoplasmen** sind relativ spät als Problem erkannt worden. Man muss sie wie Viren behandeln, da es derzeit noch keine kurativen Möglichkeiten gibt.

Marillensorten unterscheiden sich in ihren Anforderungen an klimati-

sche Verhältnisse, aber auch in ihrer Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen. So erwähnen etwa Mehlenbacher et al. (1991) eine reduzierte Pilzresistenz der zentralasiatischen Sorten, was mit ihrer Herkunft

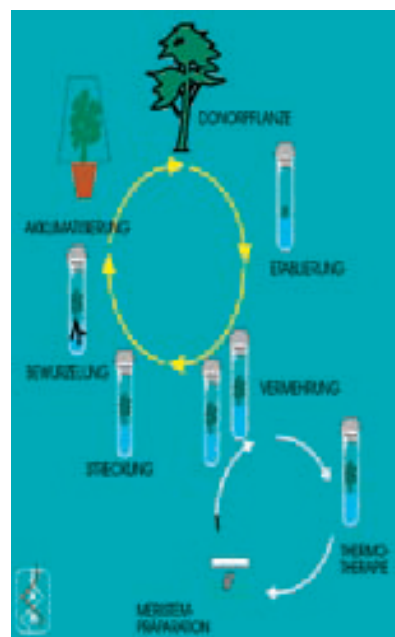
aus besonders trockenen Klimazonen korreliert sein dürfte.

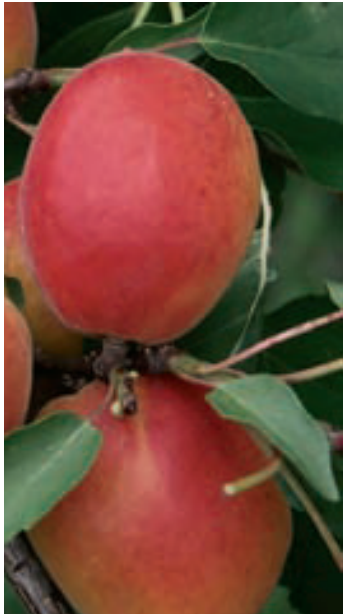
Marillen werden von einer Reihe von Virus- und Phytoplasma-bedingten Krankheiten befallen, die oft beträchtliche wirtschaftliche Schäden - vom Ausfall in der Baumschule, über Ernteauffälle oder Qualitätsminderung bis hin zum allmählichen Absterben des gesamten Baumes - verursachen.

Die Ertragsminderung variiert von Sorte zu Sorte und hängt zudem vom Virus- oder Phytoplasmenstamm und von Umweltfaktoren ab. Die verursachten Schäden sind der Grund dafür, weshalb diese Schad-erreger weltweit Beachtung durch phytosanitäre Organisationen und zunehmend auch durch Produzenten finden.

Einmal infizierte Bäume können nicht mehr geheilt werden. Daher kommt präventiven Maßnahmen, vor allem der Verwendung von virus- und phytoplasmafremem Pflanzmaterial besondere Bedeutung zu. In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig, die Übertragungswege verschiedener Pathogene zu beachten: das **Plum Pox Virus (PPV)**, der Erreger

Graphik 1: IAM-Methode zur Eliminierung von Viren und Phytoplasmen aus Kern- und Steinobst.





der Sharka-Krankheit, wird durch Blattläuse auf die meisten Steinobstarten übertragen. Das **European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFY)** hingegen wird durch Zikaden verbreitet.

Pflanzen, die von Nematoden-, Blattlaus- oder Pollen-übertragenen Viren oder von Zikaden-übertragenen Phytoplasmen befallen werden können, bedürfen daher auch einer kontinuierlichen Überwachung (epidemiologische Kontrollen, Eradikationsprogramme und/oder Bekämpfung des Vektors).

Virosen wie Phytoplasmosen breiten sich als Epidemien mit langer Inkubationszeit aus. Oft vergehen Jahre bis an den befallenen Pflanzen Krankheitssymptome sichtbar werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Pflanze aber schon eine Infektionsquelle für benachbarte Pflanzen.

Daher sind in der Europäischen Union bestimmte Viren, wie etwa PPV und Phytoplasmen, z. B. das ESFY, als **Quarantäneorganismen** eingestuft, und der Verwendung von virusfreiem Pflanzgut kommt als Präventivmaßnahme in der Europäischen Richtlinie 2000/29/EC höchste Priorität zu.

Das heißt im Klartext, solche Krankheitserreger dürfen in keinem Baum- schulmaterial, gleich ob Standard, virusfrei oder virusgetestet vorhanden sein. Schon die Nomenklatur verrät, dass auf Phytoplasmen bisher nicht besonders geachtet wurde. Was einerseits darauf beruhen mag, dass sie bisher nicht sonderliche Probleme verursachten, oder andererseits, dass keine vernünftigen Testmethoden dafür zur Verfügung standen.

Auch die „**Vinschger Marille**“ hat Anfang der 70er Jahre mit der Sharkavirose (PPV) Bekanntheit gemacht, was zu einem erheblichen Rückgang im Anbau führte. Vermutlich durch die Einfuhr von infizierten Unterlagen wurde diese Quarantänekrankheit damals eingeschleppt. Und in jüngster Zeit berichtete Mair (2006) von den ersten Beobachtungen des Auftretens von ESFY.

Im Rahmen eines EU-Forschungsprojektes zur „Validierung von diagnostischen Methoden an *in vitro*-Pflanzen zur Zertifizierung von Obstgehölzen“ unter der Leitung der Pflanzenbiotechnologie-Gruppe des IAM an der BOKU Wien, wurden Methoden zum Nachweis und zur Eliminierung von Virosen und Phytoplasmosen bei Kern- und Steinobst erarbeitet. In einem weiterführenden bilateralen Projekt „Pannonia“ mit ungarischen Partnerinstitutionen wurden speziell für die Marille Fragen der genetischen Charakterisierung (siehe Teil 1), aber auch der phytosanitären Verbesserung von Steinobst, besonders Marille und Pfirsich bearbeitet. Wenn von einer Sorte kein pathogenfreies Pflanzmaterial zur Verfügung steht, muss eine Pathogeneliminierung durchgeführt werden. Die Gewebekultur bietet heute neben der Routinemethode zur Massenvermehrung von Obstgehölzen auch wesentliche Vorteile in der Produktion von virus- und phytoplasmafreien Pflanzen.

Die **Pathogen-Eliminierungsmethode**, auf die wir uns spezialisiert haben, umfasst eine Kombination von verschiedenen *in vitro*-Methoden (Grafik 1). Ausgangsmaterial für

die Etablierung von Gewebekulturen waren befallene Bäume im Feld, oder davon angelegte Veredlungen im Glashaus, was ein jahreszeitenunabhängiges Arbeiten ermöglicht. Für die Thermo-therapie *in vitro* sind aktiv wachsende Sprosskulturen die wichtigste Voraussetzung. Der Einfluss von Wärmebehandlung auf virusbefallene Gewebekulturen in Verbindung mit Meristempräparationen führte zur höchsten Erfolgsrate bei allen Obstsorten. Kritische Faktoren hierbei sind das Alter der Kulturen zu Beginn der Wärmebehandlung sowie ihr Wachstum während der Thermo-therapie. Und erstaunlicherweise ist das sonst wärmeliebende Steinobst *in vitro* auf höhere Temperaturen (38 °C für 21 Tage), die Apfelkulturen leicht überstehen, überaus empfindlich. Das Überleben der Sprosse konnte erst mit einem schwankenden Temperaturrhythmus erzielt werden.

Weiterwachsende Sprosse müssen möglichst rasch und verlässlich auf ihren phytosanitären Zustand überprüft werden und dazu ist eine verfeinerte Nachweismethodik erforderlich.

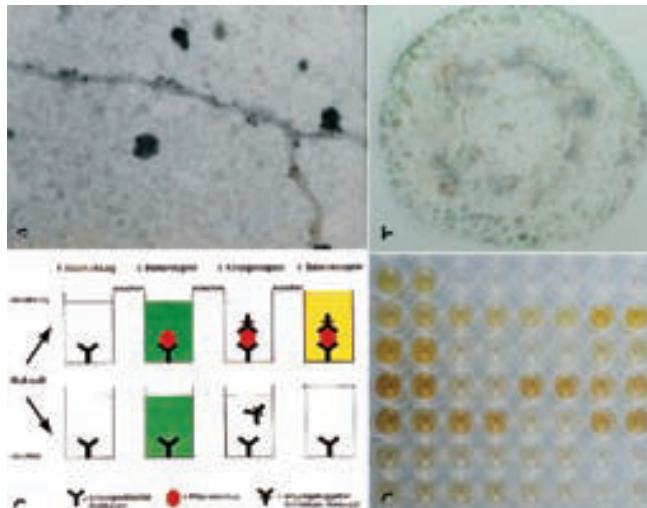
Die **diagnostischen Methoden** haben sich im Lauf der Zeit stark gewandelt.

Seit Jahren empfiehlt die Internationale Arbeitsgruppe für Obstvirosen der ISHS (International Society of Horticultural Sciences) neben Veredlungen auf Indikatortypen (Indexing) im Feld bzw. im Glashaus, die einen erheblichen Zeitaufwand erfordern, und bildgebenden Verfahren wie Elektronenmikroskopie (Grafik 2a), die technisch aufwändig sind, die Anwendung von Labortests im Bereich der Serologie: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), ITP (Immuno Tissue Print), und der molekularbiologischen Diagnoseverfahren wie Polymerase Chain Reaction der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wie wir sie heute vor allem in der Humanmedizin kennen.

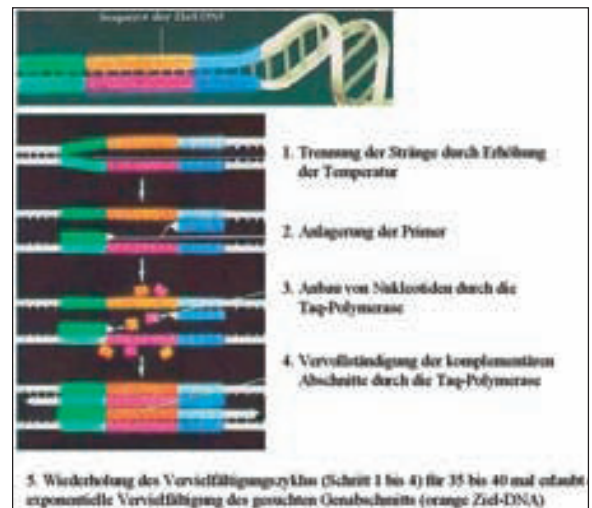
ITP (Grafik 2b) erlaubt, durch die Verwendung von spezifischen Antisera auch ohne EM ein Bild zu generieren. ▶

Grafik 2: Bildgebende und serologische Nachweismethoden für Pflanzenviren am Beispiel von Plum Pox Virus:

- a) im Elektronenmikroskop erkennt man die filamentösen Viruspartikel
- b) im ITP-Nachweis ist die Lokalisation von PPV in Steinobstgewebekulturen möglich
- c) schematischer Ablauf beim ELISA-Test
- d) das Ergebnis im ELISA-Test weist die positiven Proben farblich aus.



Grafik 3: Schema der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis der Erbinformation von Pathogenen.



► Der **ELISA-Test** wurde bereits vor über 30 Jahren zum Nachweis von Pflanzenviren entwickelt. Er wird routinemäßig zur Massenuntersuchung von Pflanzen eingesetzt, ist rasch, kostengünstig und einfach durchzuführen (Grafik 2c-d). Allerdings kann er nur für den Nachweis von Pathogenen eingesetzt werden, gegen die es Antiseren gibt. Dies ist zum Beispiel für das ESFY noch immer ein Manko.

Die Anwendung des Tests kann auch durch die unregelmäßige Verteilung der Viren im befallenen Pflanzengewebe sowie durch klimatische Einflüsse, die den Virustiter unter die Nachweisgrenze drücken, eingeschränkt werden. So ist es beispielsweise im Sommer für die Virusreplikation zu heiß, was sich auch auf den Rückgang der sichtbaren Symptome auswirkt.

Molekulare Methoden wie die **PCR** können spezifische Genabschnitte stark vermehren, sodass ein Nachweis leicht möglich ist, d. h. sie ist viel sensitiver. Daher sind sie besonders für den Nachweis geringer Pathogenkonzentrationen, wie bei neuen Virusinfektionen, oder bei ge-

ring vorhandenen Phytoplasmen in Leitbündelzellen, von großem Nutzen. Allerdings ist diese Methode auch teuer und etwas komplizierter in der Ausführung, und daher für Massentestungen derzeit schwer einsetzbar.

Für den Nachweis von Phytoplasmen, deren Erbsubstanz DNA ist, kann die PCR direkt eingesetzt werden. Für RNA-Viren muss zuerst in DNA umkopiert werden, denn die Technik der PCR vervielfältigt nur DNA Moleküle. Man muss eine spezifische Sequenz des gesuchten Phytoplasmas oder Virus genau kennen und kann darauf zwei spezifische Primer (Stecker) ansetzen lassen (Grafik 3). Zwischen diesen beiden Punkten wird der Genabschnitt durch eine hitzebeständige Polymerase (ein Vervielfältigungsenzym) tausendfach vermehrt. Anschließend kann man in einem Elektrophoresegel die spezifische Bande sehen, falls die Probe infiziert war, oder eben keine, wenn die Pflanze gesund war.

Zum näheren Anschauen dieser Thematik und Techniken sei auf unsere Webseite (www.boku.ac.at/iam/pbio-tech/phytopath) verwiesen.

Aus langjähriger Erfahrung können wir sagen, dass eine kluge Kombination von Detektions- und Eliminierungsmethoden am sichersten und am schnellsten zum Erfolg, d. h. zu **virusfreien Mutterpflanzen** führt. Diese müssen unter Bedingungen aufbewahrt werden, die boden- und luftbürtige Reinfektionen verhindern, d. h. in einem insektensicheren Saranhaus.

Heute werden auch besonders viele Initiativen zur Erhaltung wertvoller genetischer Ressourcen gesetzt. Diese sollten mit der Verwendung von pathogenfreien Pflanzen verknüpft werden, sodass Hobbygärtner bewusst gesunde Pflanzen aussetzen. Eine alte Sorte zu erhalten ist lobenswert, aber dem heutigen Wissensstand entsprechend sollten bevorzugt virus- und phytoplasmagetestete Pflanzen angepflanzt werden.

Für den Erwerbsobstbau wird in Zukunft sicherlich nur eine routinemäßige Testung von Unterlagen und Edelreisern zur Eindämmung und Kontrolle von Virosen und Phytoplasmen führen.