

---

## Themenkreis C: Phytopathologie und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

---

### CPL 9 Molekularbiologische Diagnostik von Pflanzenkrankheiten

*Molecular diagnosis of plant diseases*

**Sabine Grausgruber-Gröger, Richard A. Gottsberger, Thomas Leichtfried, Helga Reisenzein**

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES),  
Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien, Österreich  
sabine.grausgruber-groeger@ages.at



DOI 10.5073/jka.2014.446.009

#### Zusammenfassung

In der Abteilung für Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten der AGES werden molekularbiologische Diagnoseverfahren eingesetzt um gesetzliche Kontroll- und Vollzugsaufgaben zu erfüllen, aber auch um Untersuchungen auf pflanzliche Schaderreger für private Kunden durchzuführen. Verwendet werden unterschiedliche PCR Techniken um Phytoplasmen, Bakterien, Pilze, Viren, Viroide, Insekten und Nematoden zu diagnostizieren. Die Vorteile der PCR Techniken werden dargestellt.

Stichwörter: PCR, RT-PCR, qPCR, RT-qPCR, DNA-Barcoding

#### Abstract

The Department for Molecular Diagnostics of Plant Diseases of the Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES) uses molecular diagnostic tools to support control and execution tasks regulated by law, and to test private plant samples for plant pathogens. Different PCR techniques are used to investigate for phytoplasma, bacteria, fungi, virus, viroids, insects and nematods. The advantages of molecular tools are summarized.

Keywords: PCR, RT-PCR, qPCR, RT-qPCR, DNA-barcoding

#### Inhalt

In der Abteilung für Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten der AGES werden molekularbiologische Diagnoseverfahren gemäß den Anforderungen internationaler Standards eingesetzt, um das österreichische Saatgutgesetz, das Pflanzgutgesetz, das Pflanzenschutzgesetz, sowie einschlägige europäische und internationale Regelungen umzusetzen. Um die gesetzlichen Kontroll- und Vollzugsaufgaben zu erfüllen werden Untersuchungen im Rahmen von nationalen und internationalen Monitoringprogrammen, der Ein-, Aus- und Durchfuhr von Pflanzen und Pflanzenerzeugnissen, ihrem Verbringen, sowie bei der Produktion und im Handel durchgeführt. Die Einrichtungen unseres Diagnoselabors stehen aber auch für private Kunden (Landwirte, Gärtner, Privatpersonen, Vereine etc.) zur Verfügung. Darüber hinaus beteiligt sich unsere Abteilung an wissenschaftlichen Forschungsprojekten und internationalen Ringtests.

Zahlreiche molekularbiologische Nachweise wurden in den letzten Jahren etabliert um phytopathogene Schadorganismen detektieren zu können. Für Phytoplasmen, Viren und Viroide werden molekulare Methoden als alleinige Untersuchungsmethode verwendet. Bei Bakterien, Pilzen, Insekten und Nematoden werden molekularbiologische Nachweise als alleinige, als auch zur Bestätigung von anderen Diagnosemethoden (z.B. morphologische, mikroskopische, mikrobiologische und serologische Methoden) eingesetzt. Verwendet werden Primer und Arbeitsvorschriften nach internationalen (IPPC) und europäischen (EPPO) Vorschriften, beispielsweise bei vielen Quarantäneschadorganismen, aber auch bereits publizierte oder selbst entwickelte Assays.

Die konventionelle PCR (polymerase chain reaction) unter Verwendung von genspezifischen Primern wird routinemäßig für den Nachweis einer Vielzahl von Pflanzenpathogenen eingesetzt. Der Einsatz von generischen Primern, die nachfolgende Sequenzierung der Amplifikationsprodukte und der Vergleich der Sequenz mit bereits bekannten Sequenzen (DNA barcoding) wird

zur Detektion, Bestimmung bzw. Bestätigung einzelner Quarantäneschädlinge verwendet, besonders dann wenn keine spezifischen Primer zur Verfügung stehen. Generische Primer werden auch eingesetzt, wenn im Zuge der Bestimmung eines Schaderregers zunächst einmal auf eine Gattung oder eine Art eingegrenzt werden soll, wie z. B. bei der Bestimmung von Viren.

Die meisten pflanzenpathogenen Viren sind einzelsträngige RNA-Viren, und auch Viroide bestehen aus einem ringförmigen RNA Molekül. Eine PCR Reaktion ist jedoch nur mit der DNA, nicht aber mit der RNA möglich. Daher wird die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), bei der vor der PCR die RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben wird, routinemäßig für den Viren- und Viroidnachweis verwendet.

Die Etablierung der real-time PCR (qPCR und RT-qPCR) hat es ermöglicht, die Nachweise zahlreicher Schadorganismen nicht nur schneller, sondern auch mit höherer Sensitivität und Spezifität durchzuführen.

Es gibt zahlreiche Vorteile molekularbiologischer gegenüber anderer Nachweismethoden. Die Sensitivität der PCR und insbesondere der real-time PCR ist weitaus höher, als bei serologischen Methoden (z. B. ELISA). Eine hohe Sensitivität ist besonders wichtig, wenn der Schaderregers in sehr niedriger Konzentration vorkommt, wie das beispielsweise bei Saatgutuntersuchungen der Fall sein kann, oder auch teilweise in verholztem pflanzlichen Gewebe. Ein weiterer Vorteil ist die Schnelligkeit, beispielsweise im Vergleich zu Bioassays oder manchen morphologischen Untersuchungen, die oft nur in bestimmten Entwicklungsstadien eines Schaderregers (z. B. Insekten) möglich sind.

Stehen spezifische Primer zur Detektion eines Pathogens zur Verfügung, kann der Erreger direkt in der Pflanze nachgewiesen werden, und muss nicht vorher isoliert werden. Die Spezifität eines Nachweises mit spezifischen Primern und Sonden bei Verwendung von qPCR ist außerdem sehr hoch, was besonders wichtig ist, wenn beispielsweise ein Quarantäneschaderreger von einem nahe verwandten Erreger unterschieden werden muss.

Ein großer Vorteil der PCR ist auch, dass diese Technik sehr universell einsetzbar ist, d.h. für viele Nachweise unterschiedlicher Schaderreger die gleichen Arbeitsvorschriften, nur unter Austausch der jeweiligen Primer, verwendet werden können. Außerdem kann eine PCR meist in allen Entwicklungsstadien eines Erregers (z. B. bei Insekten, Nematoden) vorgenommen werden.

## Literatur

- GOSCH, C., GOTTSBERGER, R.A., STICH, K. und T.C. FISCHER, 2012: Blue <sup>6a</sup>LAMP – a specific and sensitive method for visual detection of genomic *Erwinia amylovora* DNA. *European Journal of Plant Pathology* **134**: 835-845.
- GOTTSBERGER, R.A., 2010: Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters of Applied Microbiology* **51**: 285-292.
- GOTTSBERGER, R.A. und A. PLENK, 2009: First report of *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*, the bacterial leaf spot pathogen on *Euphorbia pulcherrima* in Austria. *Plant Pathology* **58**, 795.
- GOTTSBERGER, R.A. und B. SUÁREZ-MAHECHA, 2010: Detection of Citrus exocortis viroid on *Solanum jasminoides* plantlets from an Austrian nursery. *Plant Pathology* **59**: 1159.
- GRAUSGRUBER-GRÖGER, S., 2012: First report of Impatiens necrotic spot virus on *Ocimum basilicum*, *Eruca sativa* and *Anthriscus cerefolium* in Austria. *New Disease Reports* **26**: 12.
- GRAUSGRUBER-GRÖGER, S. und R.A. GOTTSBERGER, 2011: First report of Tomato apical stunt viroid and Chrysanthemum stunt viroid in *Solanum jasminoides* in Austria. *New Disease Reports* **24**: 4.
- LEICHTFRIED, T., 2013: Wheat streak mosaic virus (WSMV) erstmals in Österreich nachgewiesen: Das Strichelmosaik des Weizens als neues Anbaurisiko? *Der Pflanzenarzt* **66**: 4-5.
- NIELSEN, S. L., A. ENKEGAARD, M. NICOLAISEN, P. KRYDER, M. VIRŠEK MARN, I. MAVIĆ PLEŠKO, A. KAHRER und R.A. GOTTSBERGER, 2012: No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology* **133**: 505-509.
- PERSEN, U., R.A. GOTTSBERGER und H. REISENZEIN, 2011: Spread of *Erwinia amylovora* in Apple and Pear Trees of Different Cultivars after Artificial Inoculation. *Acta Horticulturae (ISHS)* **896**: 319-330.
- REISENZEIN, H. und R. STEFFEK, 2011: First Outbreaks of Grapevine Flavescence Dorée in Austrian Viticulture. *Bulletin of Insectology* **64** (Supplement): 223-224.