



PCR-Methode zur Diagnose von Pflanzenviren

David DUBOIS und Eveline JENNY, Eidgenössische Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau, Reckenholz (FAP), CH-8046 Zürich

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) steht eine neue vielversprechende Diagnosemethode zur Verfügung, welche Pflanzenpathogene an ihrer Erbsubstanz erkennt und sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität auszeichnet. Anhand der Diagnose des Gelbverzwergungsvirus der Gerste werden die Arbeitsschritte der PCR-Diagnose von Pflanzenviren dargestellt.

Anders als bei Schädlingen und vielen Schädelpilzen sind Viruskrankheiten an Kulturpflanzen meist nur schwierig zu diagnostizieren. Die im Feld auftretenden Symptome (Abb. 1) sind oft unspezifisch, leicht mit Wachstumsstörungen verschiedenster Ursache zu verwechseln (Mangelernährung, Staunässe, Herbizidschäden usw.) und gehen mehrheitlich rasch in generelle Alterungserscheinungen über. Optisch sind Viren nur mit dem Elektronenmikroskop festzustellen, so dass für einen sicheren und raschen Nachweis meist Labormethoden eingesetzt werden müssen.

Vielfach werden serologische Diagnostiktests verwendet. Für spezifische Fragestellungen, wie zum Beispiel die Unterscheidung nahe verwandter Virusstämme, befriedigen diese jedoch nicht. Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eröffnen sich nun neue Diagnosemöglichkeiten.

Was macht die PCR?

Die PCR ermöglicht in einer komplexen Mischung extrahierter Erbsubstanz (DNS) kleinste Mengen einer gesuchten DNS-Sequenz aufzufinden und innert weniger Stunden mehrere Millionen Kopien des gesuchten DNS-Abschnittes *in-vitro* zu synthetisieren. Dadurch wird dieser DNS-Abschnitt leicht nachweisbar und zeigt, zum Beispiel bei der Krankheitsdiagnose, die Existenz des betreffenden Pathogens an.

Wie funktioniert die PCR?

Das Prinzip der PCR wurde von Vögel *et al.* 1994 in dieser Zeitschrift bereits vorgestellt (Agrarforschung 1 (2), 1994). Deshalb werden hier nur noch die wichtigsten Schritte der Reaktion aufgeführt.

Ausgangsmaterial für die PCR ist ein DNS-Extrakt, welcher zum Beispiel aus einer Pflanzenprobe hergestellt wurde. Dieser wird mit dem Enzym DNS-Polymerase und den zur DNS-Synthese benötigten Bausteinen im Reaktionspuffer gemischt.

Zusätzlich werden zwei DNS-Stücke (Primers) in ausreichender Konzentration zugegeben, die zu einem bestimmten Abschnitt der gesuchten DNS beziehungsweise zu dessen komplementären Strang passen.

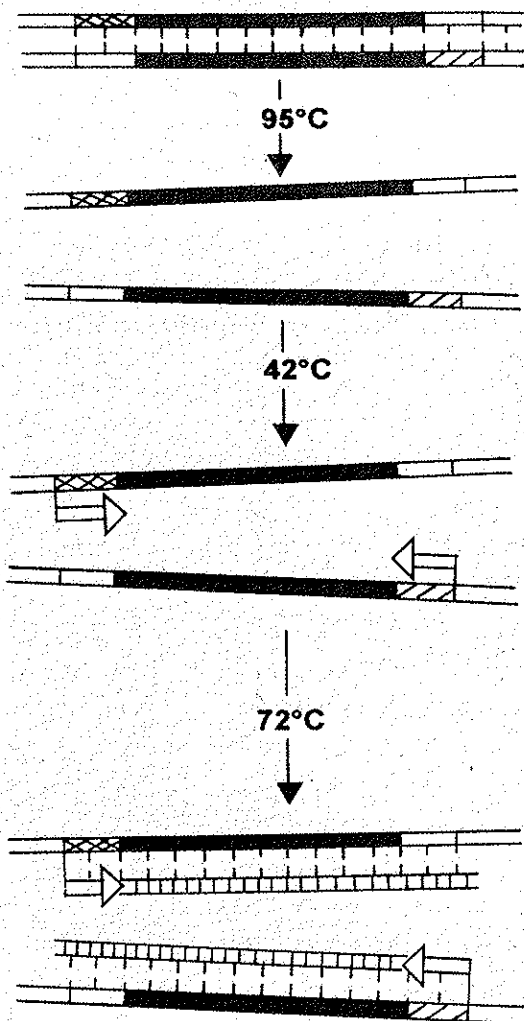
Der Ablauf der PCR basiert auf drei Reaktionsschritten (Abb. 2):

1. Durch Erhitzen auf 92 bis 95°C werden die DNS-Doppelstränge getrennt (**Denaturierung**).
2. Nach Abkühlung auf 42 bis 55°C lagern sich die zwei Primer an die gesuchte DNS an (**Annealing**).



Abb. 1. Ist diese Gerstenpflanze durch das Gelbverzwergungsvirus der Gerste befallen? Die Labordiagnose gibt Auskunft.

1. Zyklus



**DNS-Doppelstränge
trennen sich.
(Denaturierung)**

**Primer (\Rightarrow)
lagern sich an
die gesuchten
DNS-Sequenzen.
(Annealing)**

**Das Enzym DNS-
Polymerase syn-
thetisiert neuen,
komplementären
DNS-Strang ($\square\square\square$)
(Extension)**

2. Zyklus

**Denaturierung
Annealing
Extension**

3. Zyklus

.....

Abb. 2. Ablauf der Reaktionsschritte eines Zyklus der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

Fachbegriffe

BYDV : Gelbverzwergungsvirus der Gerste

DNS : Desoxyribonukleinsäure; Hauptbestandteil der Erbsubstanz

DNS-Polymerase: Enzym, welches die Synthese neuer DNS-Ketten katalysiert

Molekulare Hybridisierung: Prozess der Bindung eines DNS-Abschnittes an einen DNS-Strang mit komplementärer Basensequenz

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Primer: kurzes DNS-Stück einer ausgewählten Basensequenz, welches mit der gesuchten DNS hybridisiert und damit die PCR ermöglicht

RNS: Ribonukleinsäure, eine zur DNS zusätzliche Form, genetische Information zu speichern

Thermocycler: Gerät zur automatischen Temperatursteuerung der Proben während der PCR

3. Dann beginnt die DNS-Polymerase, in Verlängerung der Primer den fehlenden komplementären DNS-Strang bei 72°C zu synthetisieren (**Primer extension**).

Die Primers sind so ausgewählt, dass die dort ansetzende DNS-Synthese an beiden DNS-Strängen in Richtung des gegenüberliegenden Primers verläuft.

Nach Beenden der Primer-Extension wird der Reaktionszyklus erneut gestartet. Da nun auch die neusynthetisierten „DNS-Kopien“ als Ausgangsmatrizen für den nächsten Syntheszyklus dienen, wird der gesuchte DNS-Abschnitt beim wiederholten Durchlaufen dieses Reaktionszyklus exponentiell vermehrt. Davon leitet sich die Bezeichnung Polymerase-Ketten-Reaktion ab. Meist werden 20 bis 40 Reaktionszyklen in einem Thermocycler automatisch durchgeführt, wobei bereits bei 20 Zyklen eine millionenfache (2^{20}) Vermehrung der DNS-Kopienzahl erzielt wird. Lag die gesuchte DNS in der Probe vor, führt dies zu einer Anhäufung des gesuchten, durch die beiden Primer abgegrenzten DNS-Abschnitts; dem PCR-Produkt.

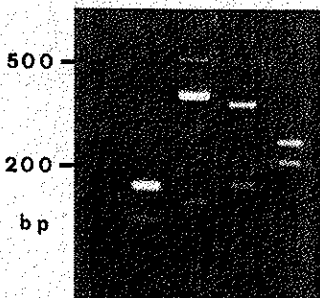
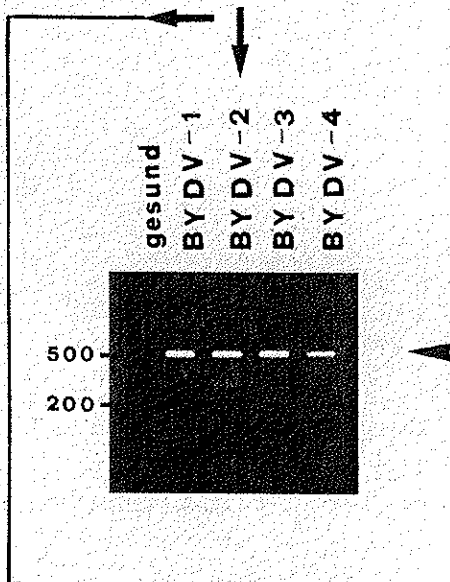
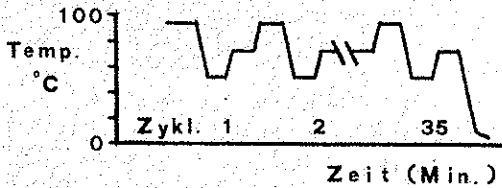
Einführung der PCR

Im Jahr 1984 formulierte Kary Mullis in Kalifornien das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR von Englisch „polymerase chain reaction“). Anfänglich wurde eine DNS-Polymerase des Bakteriums *Escherichia coli* verwendet. Da diese durch Hitze zerstört wird, musste sie nach jeder Denaturierung erneut zupipettiert werden. Mit der Einführung einer hitzestabilen Form der DNS-Polymerase um 1988 entfiel das erneute Zugeben dieses Enzymes nach jedem Erhitzungsschritt. Die Kettenreaktion konnte automatisiert werden.

Die Verfügbarkeit der neuen Technik eröffnete grundlegend neue Möglichkeiten auf dem ganzen Gebiet der Molekularbiologie. Der Einsatz der PCR zur Diagnose von Viren und Pathogenen von Pflanzen fand rasch Verbreitung. Dies zeigt die seit 1988 beinahe exponentielle Zunahme an Publikationen über diese Anwendung von PCR.

Diagnose der Gelbverzwergung

Das Gelbverzwergungsvirus der Gerste tritt in der Schweiz sporadisch auf und kann bei frühen Infektionen von Gerste Ertragsverluste von 20 bis 80 % verursa-



Probe sammeln.

RNS extrahieren, partiell reinigen und in DNS umschreiben.

Bei der PCR wird in 35 Zyklen der gesuchte Abschnitt des viralen Genoms *in-vitro* millionenfach vervielfältigt.

Nur bei virusinfizierten Proben ist das PCR-Produkt auf dem gefärbten Elektrophoresegel sichtbar.

Nach Spaltung der PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym lassen sich die Virusstämme gut unterscheiden.

ergibt sich je nach BYDV-Stamm eine unterschiedliche epidemiologische Situation.

Um die Infektion von Wintergerste durch Blattläuse zu vermindern, sind Fröhsaaten zu vermeiden oder gezielte Insektizidspritzungen gemäss einem noch aufzubauenden Warnsystem nötig. Ertragsverluste könnten in Zukunft auch durch BYDV-tolerante Gerstensorten vermieden werden. All diese Massnahmen müssen jedoch auf den jeweiligen Stamm des Gelbverzwergungsvirus ausgerichtet werden.

Es stellte sich deshalb die Frage, welche Stämme des BYDV in der Schweiz vorherrschen. Da herkömmliche Immunoserren oder wiederholte Blattlausübertragungen die verschiedenen BYDV-Stämme nicht befriedigend zu unterscheiden vermochten, wurde dies mittels PCR versucht.

Zwei Stämme vorherrschend

Nach dem Sammeln erster Isolate aus der Schweiz scheinen vor allem zwei BYDV-Stämme auf Gerste zu dominieren. Es sind dies der Stamm, welcher effizient durch die Traubenkirschenblattlaus, und jener, welcher vorwiegend durch die grosse Getreideblattlaus übertragen wird (BYDV-PAV und BYDV-MAV). Dabei scheint der erste Stamm häufiger aufzutreten.

Hohe Sensitivität der PCR

Die PCR erlaubt Konzentrationen von Viren nachzuweisen, die viel tiefer sind als beim Nachweis mit gebräuchlichen Immunoserren (im Schnitt drei bis vier Zehnerpotenzen geringere Konzentrationen). Dies ermöglicht, latente Virusinfektionen früher zu erkennen, ohne dass zuvor eine zeitraubende Virusvermehrung induziert werden muss. Selbst an einzelnen Blattläusen ist eine Virusdiagnose möglich. Die hohe Sensitivität der PCR wird ohne Einsatz von Radioaktivität erzielt. Sie beruht auf der Eigenheit dieser Methode, das gesuchte Signal (einen Abschnitt der viralen cDNS) *in-vitro* exponentiell zu vermehren. Dadurch wird der gesuchte DNS-Abschnitt nicht nur nachweisbar, sondern kann zugleich als Ausgangsmaterial für weitere Abklärungen dienen.

Hohe Spezifität der PCR

Die PCR zeichnet sich durch ihre hohe Spezifität aus. Diese kommt durch die molekulare Hybridisierung der Primer mit

Abb. 3. Arbeitsschritte bei der Diagnose und Unterscheidung verschiedener Stämme des Gelbverzwergungsvirus der Gerste (BYDV) mittels PCR. (Siehe auch Kasten Seite 418)

chen. Das Virus zählt zu den Luteoviren. Es wird durch gewisse Blattläuse beim Saugen von Pflanzensaft von viruskranken auf gesunde Pflanzen übertragen. Fünf Stämme des Gelbverzwergungsvirus der Gerste (BYDV) sind bekannt. Diese

unterscheiden sich sowohl in ihrer Virulenz gegenüber Gerste als auch durch die Blattlausart, von welcher sie vorwiegend übertragen werden. Da diese Blattläuse unterschiedliche Überwinterungswirte und Zeitpunkte des Herbstfluges haben,

Arbeitsschritte der Virusdiagnose

1. Die Erbsubstanz des Gelbverzwergungsvirus der Gerste liegt in den Pflanzen als Ketten von Ribonukleinsäuren (RNS) vor. Sie muss zuerst aus der Pflanzenprobe extrahiert und teilweise gereinigt werden (Abb. 3).
2. Mit Hilfe des Enzymes Reverse Transkriptase wird eine zur RNS komplementäre DNS *in-vitro* hergestellt.
3. Bei der anschliessenden PCR kommen zwei Primer zum Einsatz, die zu speziellen Sequenzen passen. Diese Sequenzen kodieren für das virale Hüllprotein und sind bei allen Luteoviren gleich zusammengesetzt, das heisst, sie sind für diese Virengruppe typisch. Die Abfolge der Nukleinsäuren (Adenin A, Guanin G, Thymin T, Cytosin C, degenerierte Position R) dieser zwei Primer lautet:
Primer 1: 5' CCAGTGGTTRTGGTC 3'
Primer 2: 5' GTCTACCTATTTGG 3'
Die Auswahl der Primer erfolgte aufgrund von publizierten Angaben über die Nukleinsäuresequenzen von BYDV-Stämmen und einer Vielzahl von Luteoviren.
Die PCR erfolgt unter folgenden Temperaturschritten: 94°C für das Denaturieren (15 sec.), 42°C für das Anlagern der Primer (1 Min) und 72°C für die DNS-Synthese bei der Primerextension (1 1/2 Min).
Dieser Reaktionszyklus wird in einem Thermocycler 35 mal wiederholt.
4. Ein Teil der PCR-Probe wird anschliessend auf ein Gel zur Elektrophorese aufgetragen und läuft im angelegten elektrischen Feld zur Anode. Nach Färben des Gels mit Ethidiumbromid ist bei PCR-Proben, welche die gesuchten viralen Sequenzen enthielten, im UV-Licht ein deutliches DNS-Band erkennbar. Dieses DNS-Band ist eine Anhäufung des während der PCR vervielfältigten DNS-Abschnittes des gesuchten Luteovirus. Die Grösse dieses PCR-Produktes wird durch die Primer definiert. Es trägt im beschriebenen Beispiel etwa 530 Basenpaare. Bei virusfreien Proben liegt kein PCR-Produkt dieser Grösse vor.
5. Nachdem die BYDV-Proben als luteovirenhaltig diagnostiziert wurden, werden die PCR-Produkte der verschiedenen BYDV-Isolate aufgrund einer Restriktionsanalyse verglichen. Dazu werden die PCR-Produkte mit einem Restriktionsenzym gespalten. Da sich die PCR-Produkte der fünf BYDV-Stämme in ihren DNS-Sequenzen zwischen den Primern unterscheiden, ergibt dies je nach Stamm eine unterschiedliche Anzahl DNS-Fragmente unterschiedlicher Grösse. Nach elektrophoretischem Auftrennen und Anfärben werden diese Restriktionsfragmente erkennbar und erlauben es, die BYDV-Stämme zu unterscheiden.

den gesuchten DNS-Sequenzen zustande. Die Wahl der geeigneten Primer gestaltet sich je nach Fragestellung verschieden. Ähnlich wie bei den Immunoseren können eng oder breit selektive, ganze Virengruppen erfassende, Primer angewendet werden. Dabei basiert die Wahl des Primerpaars auf umfangreichen Angaben über Nukleinsäuresequenzen der gesuchten sowie davon abzugrenzenden Viren. PCR erlaubt somit, im Gegensatz zur Diagnose mit Immunoseren, ein Pathogen nach bekannten, auch in anderen Labors nachvollziehbaren Kriterien direkt nachzuweisen. Im Vergleich zu herkömmlichen Labormethoden weist PCR eine höhere Spezifität auf und eröffnet so neue diagnostische Möglichkeiten. Die PCR vermag zum Beispiel Virenstämme, die mit monoklonalen Antikörpern nicht unterschieden werden können, zu differenzieren. Durch die Möglichkeit, andere Primer

einzusetzen, bietet die PCR zudem eine vielseitig anwendbare Grundtechnik, die nach geringen Anpassungen leicht zur Detektion anderer DNS-Fragmente eingesetzt werden kann. PCR mit zufällig ausgewählten, kurzen Primern (RAPD, von random amplification of polymorphic DNA) wird zum Beispiel beim genetischen Fingerprinting zur Unterscheidung verschiedener DNS-Proben verwendet (Unterscheidung von isolierten Pathogenstämmen, phylogenetische Studien, Biodiversität usw).

Beschränkt auf bekannte Virusgruppen

Da eine differenzierte Diagnose mit PCR das Vorhandensein detaillierter genetischer Informationen voraussetzt, beschränkt sich diese Anwendung nur auf gut bearbeitete Virengruppen. Ein weite-

rer Nachteil besteht im Aufwand für die Extraktion und Vorreinigung der Erbsubstanz. Der Zeitbedarf pro Probe ist derzeit mindestens viermal so gross wie bei der Diagnose mit Immunoseren. Ähnlich höher sind momentan auch die Material- und Apparatkosten. Weiter bedarf es einer sehr exakten Arbeitsweise, damit die empfindliche virale RNA nicht degradiert wird, oder falsche Positivresultate durch kleinste Probenverschleppungen entstehen.

Bald Grundtechnik der Labordiagnose

Mit der PCR steht eine neue vielversprechende Methode zur Verfügung, die Pflanzenpathogene anhand von Abschnitten ihrer Erbsubstanz erkennt und sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet. Die Vereinfachungen bestehender PCR-Protokolle und deren Weiterentwicklung für neue Anwendungsgebiete werden dazu beitragen, dass die PCR bald zu den Grundtechniken der Labordiagnose von Pflanzenpathogenen zählen wird.

LITERATUR

Ein ausführliches Literaturverzeichnis ist beim Autor erhältlich.

RÉSUMÉ

PCR: une méthode pour diagnostiquer des phytovirus

L'amplification de gènes *in-vitro* (PCR de l'expression anglaise «polymerase chain reaction») représente une méthode de diagnostic prometteuse. Cette méthode permettant de reconnaître les agents pathogènes par leur génome est très spécifique et hautement sensible. Le procédé de diagnostic des virus avec la méthode PCR est présenté pour le cas de la détection du virus de la jaunisse nanaïsante de l'orge.

SUMMARY

PCR in the diagnosis of plant viruses

The polymerase chain reaction (PCR) represents a promising new method for diagnostic purposes. It recognizes plant pathogens by their genome and shows a high specificity and sensitivity. The procedure used to detect plant viruses by PCR is presented with an example of the diagnosis of the barley yellow dwarf virus.

KEY WORDS: Diagnosis, PCR, plant virus, BYDV