Gartenbauwissenschaft, **66** (1). S. 9–15, 2001, ISSN 0016–478X. © Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Alternative Übertragungswege für Kirschenringfleckenviren

Alternative means of transmission for *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus*

Alia Yacoub*, Christa Lankes* und J. Hamacher**
(* Institut für Obstbau und Gemüsebau der Universität Bonn
** Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn)

Zusammenfassung

In langjährigen Untersuchungen (1992 bis 1999) wurden Möglichkeiten der Boden- und Insektenübertragbarkeit als alternative Übertragungswege für Kirschenringfleckenviren überprüft.

Zur Bodenübertragbarkeit wurden Fangpflanzenversuche unter Freiland-, Gewächshaus- und Laborbedingungen (Tropfenapplikation *in vitro*) durchgeführt. Infiziert wurde mit unterschiedlichen Inokula, die entweder *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) und/oder *Prune dwarf virus* (PDV) oder *Petunia asteroid mosaic virus* (PAMV) enthielten. Mit verholzten *Prunus avium* und krautigen Indikatoren als Fangpflanzen im Container konnte kein Nachweis für die Aufnahme von PNRSV und/oder PDV aus dem Erdsubstrat geführt werden. Hingegen konnte mit dem Verfahren der Tropfenapplikation von Viruspartikeln unter *in vitro*-Bedingungen erstmalig die vektorlose Aufnahme von PAMV durch die Wurzeln von *Prunus avium* 'F12/1' (krautige Mikropflanzen) aus Agar-verfestigten Nährmedien nachgewiesen werden.

Bei nichtblühenden *Prunus*-Pflanzen wurde die Möglichkeit einer Virusübertragung durch Insekten von Nektarien infizierter Individuen auf die Nektarien gesunder Pflanzen unterstellt. Dies wurde in Käfigversuchen mit Hummeln überprüft. In deren Folge wurden fünf von 24 Fangpflanzen infiziert gefunden.

Damit ist in der Praxis in allen Fällen, in denen Übertragung durch Pollen oder Samen ausgeschlossen ist, dieser Übertragungsweg grundsätzlich zu berücksichtigen.

Summary

Samples taken from stool beds of cherry rootstock *Prunus avium* 'F12/1' propagated from nuclear stock material free of known viruses occasionally tested positive for *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV). After a possible source of infection was found, means of transmission were discussed. Since all known possibilities for virus spread could be excluded (transmission via seed and pollen are not relevant, nematodes were absent), uptake of virus particles through the plant roots in the absence of a vector were considered as an alternative way of transmission.

In order to test this hypothesis, the bait plant technique was used with plants grown in containers under field, greenhouse, and *in vitro* conditions. Various inocula containing either *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) and/or *Prune dwarf virus* (PDV) or *Petunia asteroid mosaic virus* (PAMV) were used.

The bait plant tests with woody *Prunus avium* 'F12/1' and herbaceous indicators did not provide evidence for vector-less soil transmission of PNRSV and/or PDV. However, the uptake of purified PAMV particles from nutrient media solidified with agar was proven for the first time for *Prunus avium* 'F12/1' (herbaceous plantlets).

With non-flowering *Prunus* plants also the hypothesis of extrafloral virus transmission by insects feeding on nectaries of virus infected individuals and transferring the virus particles to nectaries of healthy plants was proposed. This was investigated by caging bumblebees with infected *Prunus* trees and virusfree *Prunus avium* 'F12/1'. After 18 months five out of 24 bait plants were found infected. It is concluded that whenever transmission by pollen or seed is to be excluded transmission by insects feeding on extra-floral nectaries rather than soil transmission without any vector can be assumed.

Einleitung

Die Kirschenringfleckenviren *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) und *Prune dwarf virus* (PDV) gehören der Ilarvirus-Gattung (isometrische labile Ringfleckenviren) an. Sie werden, wie zahlreiche Untersuchungen gezeigt haben (BAUMANN 1967, GEORGE und DAVIDSON 1964, GRÜNTZIG et al. 1989, KUNZE 1969, MINK 1983 und NEMETH 1986), durch Samen und Pollen übertragen. Bei vegetativ vermehrten Kirschunterlagen, die im Mutterbeet nie zum Blühen kommen, ist eine Infektion mit Kirschenringfleckenviren über diese beiden Wege ausgeschlossen. Dennoch wurden in der Praxis in einem langjährig zur Vermehrung genutzten Mutterbeet von *Prunus avium* 'F 12/1' wiederholt Infektionen mit PNRSV gefunden. Die Pflanzen waren beim Aufbau des Mutterbeetes als virusfrei getestet worden. Auch Tests in dem Mutterquartier, aus dem sie entnommen worden waren, blieben ohne Befund.

Nematoden, die als potentielle alternative Virusüberträger in der Literatur bereits diskutiert wurden (NEMETH 1986), konnten durch entsprechende Bodenuntersuchungen ausgeschlossen werden. Daher wurde nach anderen Ausbreitungswegen gesucht.

Einerseits war nicht völlig auszuschließen, dass auf der fraglichen Fläche in der Vorkultur mit Kirschenringfleckenviren infizierte Pflanzen gestanden hatten, so dass mit Infektionspotential aus dem Boden zu rechnen war. Andererseits wurde in einem der betroffenen

Baumschulparzelle benachbarten Waldstück in einer mit Kirschenringfleckenviren infizierten Wildkirsche eine mögliche Infektionsquelle gefunden. Dieser Baum wuchs auf einer Kuppe, an deren Hang das Mutterbeet mit den nicht nachvollziehbaren Virusinfektionen angelegt war. Dies gab Anlaß zu der Annahme, dass es eventuell durch Verfrachtung von Viruspartikeln aus dem Wurzelraum der Wildkirsche mit dem Bodenwasser hangabwärts zu den Infektionen gekommen sein könnte.

Darüber hinaus wurden in dem fraglichen Mutterbeet während der Vegetationszeit stets große Populationen von nektarienbesuchenden Insekten (hauptsächlich Hummeln) beobachtet. *Prunus avium* 'F 12/1' weist große, stark sezernierende extraflorale Nektarien auf, die eine attraktive Nahrungsquelle für viele Insekten darstellen. Extraflorale Nektarien sind vegetative Drüsenorgane, die an den Blattstielen verschiedener *Prunus*-Arten zu finden sind. Sie scheiden Nektar aus, der aus verschiedenen Zuckerarten besteht (BARTELS 1993, TROLL und HÖHN 1973). Dieses Sekret kann aber auch wieder absorbiert und zu allen Pflanzenteilen weitergeleitet werden (PEDERSEN et al. 1958, SCHUEL 1961). Übertragen Insekten virushaltigen Nektar auf die Nektarien einer gesunden Pflanze, so könnte dieser absorbiert und die Viruspartikel dann über den Assimilatstrom in andere Pflanzenteile weitergeleitet werden.

Es wurden daher zwei Arbeitshypothesen aufgestellt, die seit 1992 in verschiedenen Versuchsansätzen geprüft wurden:

- Vektorlose Aufnahme von Viruspartikeln aus dem Boden durch die Pflanzenwurzeln (Bodenübertragbarkeit)
  a. bei Wiederbepflanzung von Erdsubstraten aus dem Wurzelraum kranker Bäume
  b. nach Verfrachtung von Viruspartikeln im Boden durch fließendes Bodenwasser
- Virusübertragung von Nektarien kranker auf Nektarien gesunder Pflanzen durch Insekten (Insektenübertragbarkeit)

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen stand das betroffene Mutterbeet ab 1994 nicht mehr zur Verfügung, da es aus phytosanitären Gründen gerodet worden war. Die oben genannten Arbeitshypothesen wurden deshalb durch Freiland- und Gewächshausversuche sowie Laboruntersuchungen am Institut für Obstbau und Gemüsebau und am Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn überprüft. Lediglich in einem Versuchsansatz (Ultrafiltration von Wasserproben) konnte für Untersuchungen auf das Vorhandensein von Viruspartikeln im Bodenwasser von der gerodeten Parzelle im Mai des Folgejahres Stauwasser entnommen werden.

Das Vorhandensein von Viruspartikeln im Boden wurde im Wurzelbereich von viruskranken Süßkirschenbäumen im Freilandquartier des Instituts für Obstbau und Gemüsebau untersucht.

Versuche zur vektorlosen Virusaufnahme durch Pflanzenwurzeln erfolgten mit Hilfe von Containerpflanzen im Freiland und Gewächshaus sowie unter *in vitro*-Bedingungen im Labor. Zur Absicherung des methodischen Vorgehens wurden die *in vitro* Untersuchungen nicht nur mit dem instabilen PNRSV sondern auch mit dem stabilen *Petunia asteroid mosaic virus* (PAMV), einem Virus der *Tombusvirus*-Gattung, als Vergleichsvirus durchgeführt. Für letzteres ist vektorlose Übertragbarkeit bereits bekannt, eine abiotische Übertragung im Boden gilt als wahrscheinlich (BRUNT et al. 1996 ff, DALLWITZ 1980, DALLWITZ et al. 1993).

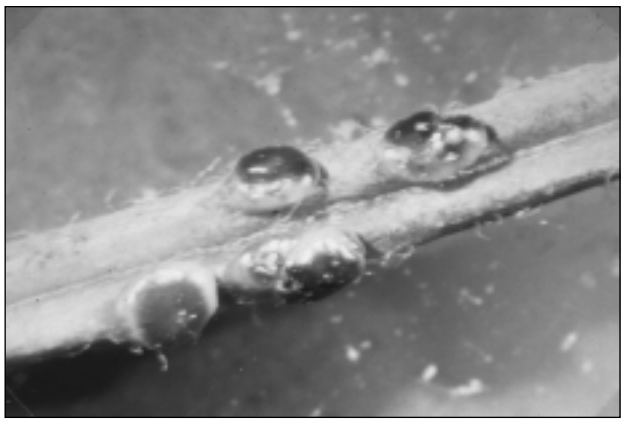


Abb. 1. Sezernierende extraflorale Nektarien auf dem Blattstiel einer 'F12/1'– Pflanze
Extrafloral nectaries with secretion on a petiole of a 'F12/1' plant

Ultrafiltration von Wasserproben

Für Untersuchungen zur Bodenwasserübertragbarkeit der Kirschenringfleckenviren wurden Wasserproben aus dem Freiland direkt (Stauwasser im Frühjahr) oder durch das Spülen von Erdsubstraten, in denen infizierte Containerpflazen wuchsen, gewonnen. Die potentiell virushaltigen Wasserproben wurden mit Hilfe eines Hollow-Fiber-Systems in Anlehnung an die Methode von BÜTTNER (1987) einer Ultrafiltration unterzogen.

Das nach der Ultrafiltration aufgefangene Konzentrat wurde in einigen Fällen direkt auf krautige Indikatorpflanzen übertragen. Bei anderen Varianten wurde es zusätzlich bei +4 °C und 40 000 rpm für 4 h ultrazentrifugiert. Das Sediment wurde resuspendiert und die Suspension für nachfolgende Biotests sowie für elektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet.

Untersuchungen von Bodenproben auf Vorkommen von Viruspartikeln

Die an der Stammbasis von mit beiden Kirschenringfleckenviren infizierten Süßkirschbäumen entnommenen Bodenproben wurden in Anlehnung an eine von FUCHS (1995, persönl. Mitteilung) empfohlene Methode aufbereitet. Dazu wurden von jeder Probe 80 g abgewogen und mit 140 ml Phosphatpuffer (0,03 M; pH 7,5) versetzt. Die Mischung wurde 60 Min. gerührt. Nach Absetzen der groben Bestandteile wurde der Überstand abpipettiert und bei +4 °C und 8000 rpm 20 Min. zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand wurde bei +4 °C und 40.000 rpm ultrazentrifugiert. Das Sediment wurde mit 0,5 ml Phosphatpuffer (0,03 M; pH 7,5) resuspendiert.

Das so gewonnene Konzentrat wurde unter Verwendung von zugekauften Antikörpern (Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; DSMZ) immunoelektronenmikroskopisch auf Vorhandensein von Viruspartikeln überprüft und sofort auf krautige Indikatorpflanzen (*Chenopodium quinoa* L. und *Cucumis sativus* L.) abgerieben.

Das Vorkommen von Ilarviren in Pflanzenwurzeln wurde auch mittels der RT-PCR untersucht. Diese Untersuchungen wurden von der DSMZ durchgeführt. Hierfür wurden Wurzelproben von Freilandbäumen in flüssigem Stickstoff zerrieben und eine Gesamt-RNA Präparation nach der Methode von CHOMCYNSKI und SACCHI (1987) vorgenommen. Je 1 µg des Gesamt-RNA Aufschlusses wurde dann für die Reverse Transkription zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die Bedingungen zum Nachweis des PNRSV, Primersequenzen und PCR-Temperaturen, wurden von MacKENZIE et al. (1997) abgeleitet. Die RT-PCR Primer und Reaktionsbedingungen zum Nachweis des PDV wurden der Publikation von JAKOBI et al. (1996) entnommen. Die RT-PCR Nachweismethoden für PNRSV und PDV sind an der DSMZ etablierte Standardmethoden. Zur Kontrolle der RT-PCR wurden Blattproben virusinfizierter Aprikosen herangezogen.

Fangpflanzenversuche mit Containerpflanzen im Freiland und Gewächshaus

Zur Überprüfung einer möglichen vektorlosen Virusaufnahme durch die Pflanzenwurzeln wurden in Anlehnung an die bei BÜTTNER (1987) und BÜTTNER und NIENHAUS (1989a) beschriebene Methode zwei Fangpflanzenversuche im Freiland mit *Prunus avium* 'F12/1' durchgeführt. Dazu wurde Erdsubstrat von Containern entnommen, in denen zuvor 19 Monate lang mit beiden Kirschenringfleckenviren künstlich infizierte 'F12/1'-Pflanzen, die eindeutige Blattsymptome und Wuchsdepressionen aufwiesen, gewachsen waren. Dieses wurde frischem Erdsubstrat beigemischt und mit virusfreien, vegetativ vermehrten Pflanzen der Kirschunterlage 'F12/1' bepflanzt. Als Kontrolle diente das gleiche virusfreie Pflanzenmaterial in ausschließlich frischem Erdsubstrat.

Der Virusnachweis wurde mit Hilfe des DAS- ELISA nach CASPER und MEYER (1981) als serologischem Laborverfahren durchgeführt. Dabei fanden ausschließlich zugekaufte Seren (Fa. AGDIA, Fa. BIOREBA, DSMZ und Fa. LOEWE) Verwendung. Außerdem wurden der Shirofugen-Test als Freilandindikatortest sowie die Rindenschildchenpfropfung im Gewächshaus (NEMETH 1986) herangezogen und durch Bonitieren von Blattsymptomen und Erfassung der Wuchsleistung ergänzt, da 'F 12/1' selbst als Bioindikator für Kirschenringfleckenviren verwendet werden kann.

Fangpflanzenversuche wurden auch unter Gewächshausbedingungen mit den krautigen Indikatoren *Cucumis sativus* L., *Chenopodium quinoa* L. und *Nicotiana tabacum* L. durchgeführt.

Fangpflanzenversuche in vitro (Tropfenapplikation)

Vergleichend wurden Tropfenapplikationsversuche unter sterilen kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst *Cucumis sativus* L. und *Prunus avium* 'F12/1' als virusfreie Fangpflanzen *in vitro* steril vermehrt und anschließend auf Bewurzelungsmedium weiterkultiviert.

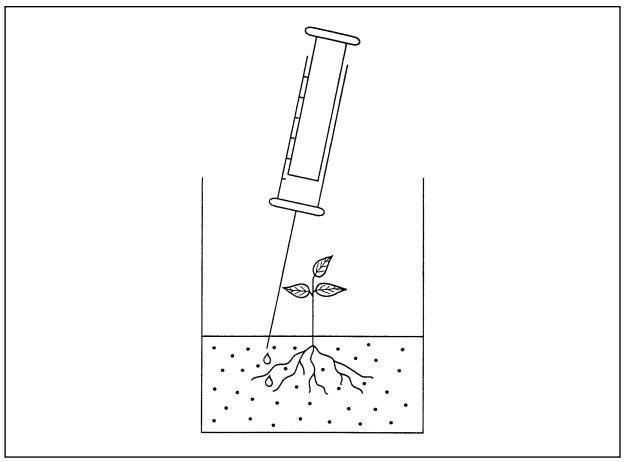


Abb. 2. Sterile Tropfenapplikation an *in vitro* kultivierten Fangpflanzen
Concentrated virus inoculum applied to bait plants in vitro

Parallel dazu wurden PNRSV und PAMV in geeigneten krautigen Wirtspflanzen im Gewächshaus vermehrt. PNRSV wurde aus frischen Keim- und echten Blättern infizierter Gurkenpflanzen nach der bei GUO (1995) beschriebenen Methode gereinigt. Die Reinigung von PAMV aus infizierten Blättern von

Chenopodium quinoa erfolgte nach KOENIG und KUNZE (1982). Die nach der Reinigung in Pufferlösung suspendierten Viruspartikel wurden unter sterilen Bedingungen an der Impfbank tropfenweise an die Wurzelzone in das Agar-verfestigte Nährmedium der *in vitro* kultivierten Versuchspflanzen appliziert (Abb. 2). Dazu wurden die vorbereiteten Viruspräparate von PNRSV und PAMV durch mehrmaliges Sterilfiltrieren von möglichen kontaminierenden Mikroorganismen gereinigt. Es wurde darauf geachtet, daß das Viruspräparat beim Applizieren nicht in Kontakt mit den Blättern der Testpflanzen kam. Wurzelverletzungen wurden vermieden. Die Kulturgläser mit den so behandelten Pflanzen wurden zur weiteren Kultivierung und Beobachtung unter kontrollierten Bedingungen gehalten.

Zum Virusnachweis an den *in vitro* gebildeten Blättchen wurden DAS-ELISA und Immunoelektronenmikroskopie (MILNE 1984, MILNE und LESEMANN 1978 und WALKEY und WEBB 1984) als serologische Nachweisverfahren herangezogen.

Untersuchungen zur Insektenübertragbarkeit

Die Versuche zur Insektenübertragbarkeit erfolgten mit Hummeln aus virusfreier Anzucht.

Für die Versuchsdurchführung wurden jeweils Kirschbäume mit hohem Virustiter für beide Kirschenringfleckenviren (PNRSV und PDV) ausgewählt. Um diese Infektionsquellen wurden Käfige aus insektendichtem Gewebe errichtet (Abb. 3), in die je sieben bzw. zehn in Container gepflanzte virusfreie 'F 12/1' – Pflanzen eingestellt wurden. Durch Insektizidbehandlungen wenige Tage vor dem Einbringen der Hummelvölker sowie visuelle Kontrollen wurden andere Insekten ausgeschlossen. Die Versuche wurden dreimal wiederholt (1 x 1995,



Abb. 3. Versuchsaufbau zum Einsatz von Hummeln als potentielle Virusüberträger (Käfigversuch)
Caging of bumblebees as potential virus vectors



Abb. 4. Virussymptome nach einer PAMV-Aufnahme durch die Wurzeln bei *in vitro* vermehrten *Prunus avium* 'F12/1'-Pflanzen nach Tropfenapplikation unter sterilen Bedingungen (rechts) im Vergleich zur Kontrolle (links).
Virussymptoms after PAMV-uptake through the roots of in vitro propagated Prunus avium 'F12/1' plants after drip application under sterile conditions (right) compared to the control (left)

2 x 1997), wobei die Hummelvölker 6 – 8 Wochen in den Käfigen blieben.

Nach Abschluß der Übertragungsversuche wurden die Fangpflanzen in unterschiedlichen Zeitabständen (4, 12 und 18 Monate) und mit unterschiedlichen Nachweisverfahren (DAS-ELISA, Shirofugen, PCR) einzeln auf Infektionen mit Kirschenringfleckenviren getestet.

Ergebnisse und Diskussion

Vorkommen von Viruspartikeln im Boden

Unter der gegebenen Versuchsanstellung konnten weder im Boden noch im Bodenwasser Kirschenringfleckenviren nachgewiesen werden. Mit den aus der Aufbereitung von Bodenproben oder durch Ultrafiltration gewonnenen Konzentraten wurden *Chenopodium quinoa* L. und *Cucumis sativus* L. mechanisch infiziert. Diese krautigen Indikatoren zeigten keine Virussymptome. ELISA-Befunde und elektronenmikroskopische Untersuchungen waren ebenfalls negativ.

Wie PCR-Untersuchungen an langjährig mit Kirschenringfleckenviren infizierten Bäumen von *Prunus avium*, *Prunus domestica* und *Prunus persica* gezeigt haben, sind PNRSV-Sequenzen im Wurzelgewebe vorhanden (Tab. 1). Das heißt, im Hinblick auf die Bodenübertragbarkeit ist die Pflanzenwurzel sowohl als möglicherweise Viruspartikel freisetzendes als auch als Virus aufnehmendes Organ zu berücksichtigen. Allerdings fehlen bisher Informationen darüber, unter welchen Bedingungen Kirschenringfleckenviren im Boden über einen ausreichend langen Zeitraum infektiös bleiben.

Tab. 1: Nachweis von PNRSV in *Prunus* spp.-Wurzeln mit Hilfe der RT-PCR
Detection of PNRSV in Prunus spp. roots by RT-PCR

Wirtspflanze	Jahre nach Infektion	Gesamtzahl an Bäumen	**Anzahl Bäume mit positivem PNRSV-Nachweis in der Wurzel**
Prunus avium	6	1	0
	4	1	1
Prunus domestica	6	6	**3**
Prunus persica	0,5	1	**1**

Fangpflanzenversuche im Freiland und unter Gewächshausbedingungen

Unter Freilandbedingungen zeigten die Fangpflanzen bereits nach vier Monaten signifikante Wuchsdepressionen im Vergleich zur Kontrolle. Sie wiesen Stauchungen auf und die Anzahl an Internodien war verringert. Eindeutige Blattsymptome traten aber während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 1994 bis 1999 nicht auf. Im Gegensatz dazu zeigten 'F12/1'-Pflanzen, die in einem Vergleichsversuch künstlich durch Doppelokulation mit Kirschenringfleckenviren infiziert worden waren, typische Virussymptome und hatten signifikant kürzere und weniger Internodien als die Kontrolle. Die Veränderungen dieser Wachstumsparameter stimmen also sowohl mit den Ergebnissen des eigenen Vergleichsversuchs als auch mit den Beobachtungen anderer Autoren an PDV- und PNRSV-infizierten Kirschen überein (ADAMS 1958, BAUMANN 1972, MILLIKAN 1953 und 1955, UYEMOTO et al. 1992).

Zur Abklärung einer möglicherweise latenten bzw. sich sehr langsam entwickelnden Virusinfektion wurden jährlich mehrmals serologische Untersuchungen an Blattmaterial (DAS-ELISA), einmal jährlich Shirofugentests mit Knospen sowie 1999 einmalig Rindenschildchenpfropfungen durchgeführt. Dabei erwiesen sich insgesamt zwei von fünfzehn Pflanzen des Freilandfangpflanzenversuchs von 1994 als nachweisbar mit PDV infiziert. Die Pflanzen eines Wiederholungsversuches von 1995 waren infolge von Frostschäden im Frühjahr 1997 abgestorben. Bis zu diesem Zeitpunkt war kein positiver Nachweis gelungen.

Die Fangpflanzenversuche unter Gewächshausbedingungen ergaben weder eindeutige Blattsymptome noch positive Befunde im DAS-ELISA.

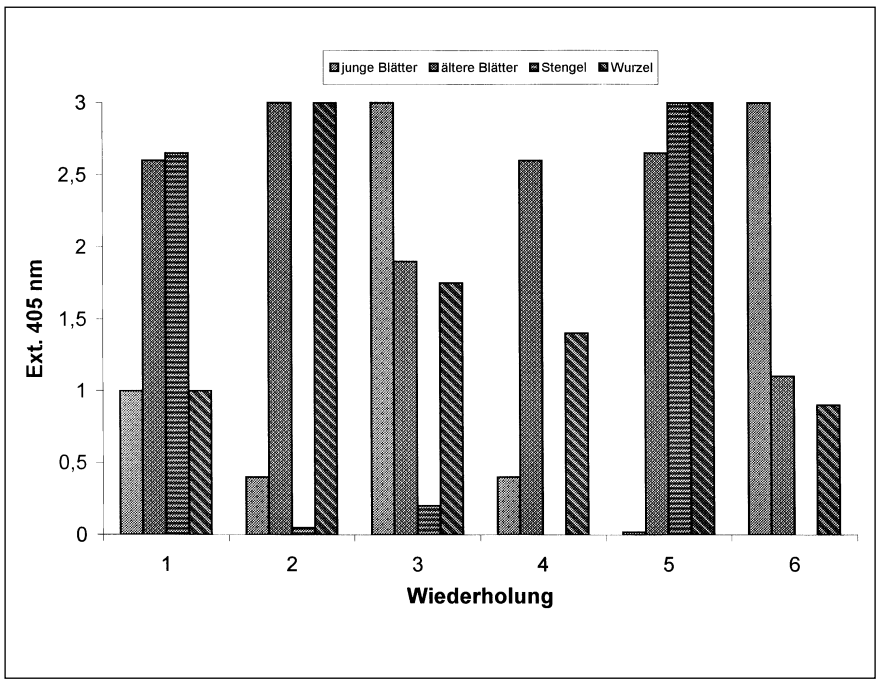


Abb. 5. Infektionserfolg für PAMV nach Tropfenapplikation in den Wurzelbereich von *in vitro* Pflanzen von *Prunus avium* 'F12/1'
Successful infection with PAMV after drip application to the root zone of in vitro plantlets of Prunus avium F '12/1'

Fangpflanzenversuche in vitro (Tropfenapplikation)

Zur Ausschaltung möglicher Störfaktoren wurden Fangpflanzenversuche auch unter *in vitro*-Bedingungen durchgeführt. Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde die vektorlose Aufnahme von PAMV durch die Wurzel eines holzigen Indikators (Kirschunterlage 'F12/1') unter sterilen Bedingungen überprüft und durch positive Testergebnisse bestätigt. Die Wuchsstärke der so infizierten Versuchspflanzen war im Vergleich zu den Kontrollkulturen sehr stark beeinträchtigt. Sie wiesen gestauchte Sprosse und deformierte Blätter auf (Abb. 4).

Sechs Monate nach Infektion durch tropfenweise Applikation einer gereinigten PAMV-Suspension wurden die *in vitro* Pflänzchen (3 x 6 Wiederholungen) in vier Fraktionen (junge und ältere Blätter, Stengel und Wurzeln) geteilt und mit Hilfe des DAS-ELISA auf PAMV-Partikel getestet. Für alle Blatt- und Wurzelproben ergaben sich positive Befunde mit meist sehr hohen Extinktionswerten ($Ext._{405nm}$ >3). Lediglich bei zwei Wiederholungen zeigten Stengelproben keine Reaktion (Abb. 5). Als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden nur Blattproben von Containerpflanzen herangezogen. Dabei lag die Negativkontrolle und damit der Schwellenwert für die Einstufung der positiven Befunde bei $Ext._{405nm}$=0, die Positivkontrolle bei $Ext._{405nm}$=2,25.

Soweit uns bekannt, ist es damit erstmalig gelungen, eine vektorlose Aufnahme von PAMV-Partikeln durch Wurzeln von 'F 12/1' *in vitro* nachzuweisen. Untersuchungen zur vektorlosen Bodenübertragbarkeit von Tombusviren beschränkten sich bisher auf die Applikation von PAMV-Partikeln in das Erdsubstrat von krautigen Indikatorpflanzen unter Gewächshausbedingungen, die allerdings nicht zu einer erfolgreichen Infektion führte (PFEILSTETTER 1992). Die erfolgreiche Übertragung *in vitro* mit der oben beschriebenen Methode erhärtet die Wahrscheinlichkeit einer abiotischen Bodenübertragbarkeit und läßt vermuten, dass bisher entweder methodische Unzulänglichkeiten oder virusinaktivierende Faktoren im Boden einem entsprechenden Nachweis entgegenstanden.

Diese Möglichkeit der Virusübertragung konnte für PNRSV in zehn Wiederholungen weder mit *Cucumis sativus* noch mit *Prunus avium in vitro* Kulturen bestätigt werden.

Untersuchungen zur Insektenübertragbarkeit

Nektarien infizierter Kirschbäume können aufgrund ihres Virustiters als Virusquelle infrage kommen, wie mit Hilfe des DAS-ELISA an sieben PDV infizierten 'F 12/1' Pflanzen gezeigt werden konnte (Abb. 6). Die Extinktionswerte der Nektarien waren zwar in allen Fällen geringer als die der Blattproben, bewegten sich aber deutlich im positiven Bereich (Negativkontrolle: $Ext._{405nm}$=0,98).

Beobachtungen während der Versuchsdurchführung ergaben, daß die extrafloralen Nektarien der Versuchspflanzen auf die als potentielle Vektoren eingesetzten Hummeln eine starke Attraktion ausübten. Sie wurden während der hellen Tagesstunden, relativ unabhängig von der jeweiligen Witterung, ständig aufgesucht, obwohl gesättigte Zuckerlösung ad libidum angeboten wurde.

Die Ergebnisse aller Virustests, die im Anschluß an die Übertragungsversuche zeitlich gestaffelt (bis 1999) mit verschiedenen Methoden durchgeführt wurden, sind in Abb. 7 zusammengefaßt. Dabei konnte nach der ersten Versuchsdurchführung 1995 für eine von zehn Fangpflanzen ein positiver Nachweis geführt werden. Nach den beiden Wiederholungen 1997 wurden jeweils zwei von je sieben Fangpflanzen infiziert gefunden. Somit ist für insgesamt fünf von 24 Fangpflanzen ein positiver Virusnachweis gelungen. In allen Fällen traten auch fragliche Befunde auf. Diese sollen durch wiederholte Rücktestung in späteren Jahren abgeklärt werden.

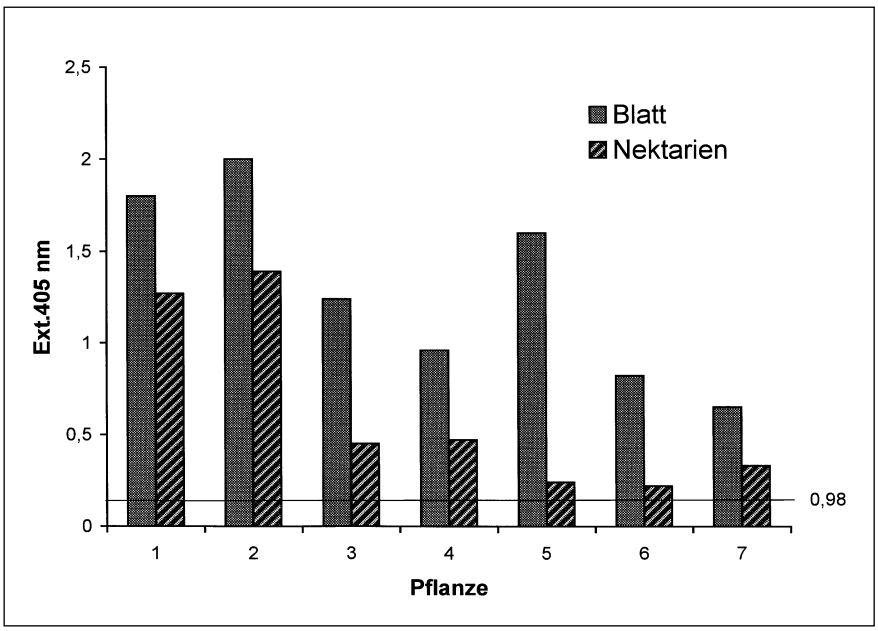


Abb. 6. PDV-Titer in Blättern und extrafloralen Nektarien von 7 'F12/1' – Pflanzen (alle Werte oberhalb der durchgezogenen Linie sind als positive Befunde einzustufen)
PDV titre in leaves and extra-floral nectaries of 7 'F12/1' plants (all the data above the continuous line are regarded as positive results)

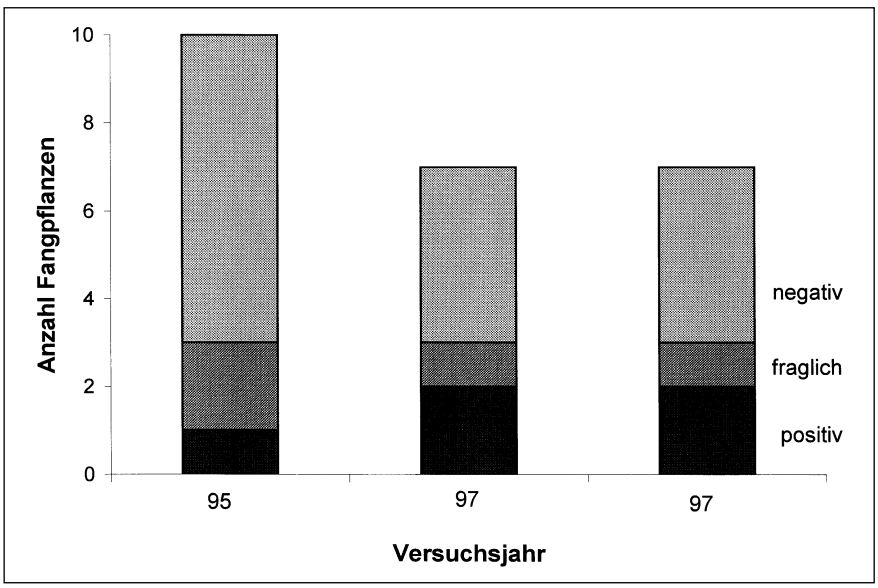


Abb. 7. Virusstatus der Fangpflanzen aus 3 Käfigversuchen zur Insektenübertragbarkeit von PDV und PNRSV
Virus status of the bait plants after 3 caging studies on insect transmission of PDV and PNRSV

Schlußfolgerung

Die mit den vorliegenden Untersuchungen erzielten Ergebnisse geben keine Anhaltspunkte für eine mögliche Bodenübertragbarkeit von Kirschenringfleckenviren.

Dagegen konnten eindeutige Belege für eine mögliche Insektenübertragbarkeit von Nektarien mit PDV und PNRSV mischinfizierter *Prunus spp.* auf Nektarien virusfreier 'F 12/1'-Pflanzen erbracht werden. Der begrenzte Umfang der bisher durchgeführten Untersuchungen erlaubt jedoch noch keine Angaben zur Größenordnung einer möglichen Übertragungsrate von Nektarien zu Nektarien.

Die praktische Bedeutung bei langjährig genutzten Unterlagenmutterbeeten mit jährlich hoher Vermehrungsrate sollte jedoch Veranlassung zu weiterer Bearbeitung dieser Fragestellung geben.

Die Untersuchungen erfolgten mit Förderung des Ministeriums für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen sowie Spenden von Baumschulbetrieben. Frau Alia Yacoub wurde finanziert durch ein Stipendium des Katholischen Akademischen Ausländerdienstes.

Das Institut für Bienenkunde der Universität Bonn stellte freundlicherweise Hummeln aus virusfreier Anzucht für die.Versuche zur Insektenübertragbarkeit zur Verfügung. Die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig unterstützte uns mit der Durchführung der PCR-Untersuchungen.

Anmerkung

Die Nennung von Firmennamen dient der Information, eine Empfehlung ist nicht damit verbunden.

Literatur

ADAMS, R. E. 1958: Two stone fruit virus diseases not previously reported from west virginia. Plant Disease Reporter **42,** 202.

BARTELS, H. 1993: Gehölzkunde. Einführung in die Dendrologie. Stuttgart, Ulmer.

BAUMANN, G. 1967: Die Stecklenberger Krankheit der Sauerkirsche. Erwerbsobstbau **9,** 44–47

BAUMANN, G. 1972: Wichtige Viruskrankheiten des Kern- und Steinobstes. Erkennung und Verhütung. Erwerbstobstbau **14,** 177–198.

BRUNT; A.A., K. CRABTREE, M.J. DALLWITZ, A.J. GIBBS, L. WATSON, and E.J. ZURCHER (eds.) 1996 onwards: Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16th January 1997. URL http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/

BÜTTNER, C. 1987: Untersuchungen zur Viruskontamination von Böden und Gewässern in Waldökosystemen. Dissertation, Universität Bonn.

BÜTTNER, C. and F. NIENHAUS 1989a: Viruscontamination of soils in forest ecosystems of FRG. Eur. J. For Pathol. **19,** 47–53.

CASPER, R. und S. MEYER 1981: Die Anwendung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis pflanzenpathogener Viren. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **33 (2),** 49–54.

CHOMCYNSKI, P. and N. SACCHI 1987: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**, 156–159.

DALLWITZ, M. J. 1980: A general system for coding taxonomic descriptions. Taxon. **29**, 41–46.

DALLWITZ, M. J., T. A. PAINE and E. J. ZURCHER 1993: User's guide to the

GEORGE, J. A. and T. R. DAVIDSON 1964: Further evidence of pollen transmission of *necrotic ring spot* and *sour cherry yellows viruses* in sour cherry. Canad. J. Plant Sci. **44,** 383–384

GRÜNZIG, M., H.-H. SCHIMANSKI, E. FUCHS, O. FRANK und H.-J. KOCH 1989: Zum Auftreten mechanisch übertragbarer Viren in Steinobstbeständen. Arch. Gartenbau **37,** 471–485

GUO, D. 1995: Molekularbiologische Charakterisierung der RNA3 und deren subgenomischer RNA des *Prunus necrotic ringspot virus*. Dissertation, Universität Braunschweig.

JACOBY, V., M. CHEVALIER, D.J. BARBARA, and A.N. ADAMS 1996: Laboratory methods for virus detection in fruit trees. Proceedings of the BCPC Symposium No: 65 Diagnostics in Crop Protection.

KOENIG, R. and L. KUNZE 1982: Identification of t*ombusvirus* isolates from cherry in southern Germany as *petunia asteroid mosaic virus*. Phytopath. Z. **103**, 341–368.

KUNZE, L. 1969: Der Einfluß der Stecklenberger Krankheit auf den Ertrag von Sauerkirschen. Erwerbsobstbau **11,** 1–3

MacKENZIE, D.J., M.A. McLEAN, S. MUKERIJ, and M. GREEN: Improved RNA extraction from woody plants for detection of viral pathogens by reverse transcrition polymerase chain reaction. Plant Disease **81,** 222–226.

MILLIKAN, D. F. 1953: The influence of the *ring spot virus* on the growth of one year old sweet cherry nursery trees. Phytopathology **43,** 480.

MILLIKAN, D. F. 1955: The influence of infection by *ring spot virus* upon the growth of one-year-old Montmorency nursery trees. Phytopathology **45,** 565–566.

MILNE, R. G. and D.-E. LESEMANN 1978: An Immunoelectron Microscopic Investigation of *Oat Sterile Dwarf* and Related Viruses. Virology **90,** 299–304.

MILNE, R. G. 1984: Electron microscopy for the identification of plant viruses in *in vitro* propagation. 87–120, In: Methods in virology, Vol. VII, Hrsg.: Maramorosch, K. and Koprowski, H., Academic Press, Orlando.

MINK, G. I. 1983: The possible role of honeybees in long-distance spread of *prunus necrotic ringspot virus* from California into Washington sweet cherry orchards. In: Plant Virus Epidemiology. The Spread and control of insect-borne viruses. R. T. PLUMB and J. M. THRESH Blackwell Scientific Publications, 85–91

NEMETH, M. 1986: Virus, Mycoplasma, and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht / Boston / Lancaster

PEDERSEN, M.W., C.W. LeFEVRE, and H.H. WIEBE 1958: Absorption of ^{14}C labled sucrose by alfalfa nectaries. zit. in: ESAU (1969): Pflanzenanatomie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

PFEILSTETTER, E. 1992: Untersuchungen zur Virösen Zweignekrose an Süßkirschen Oberfrankens: Vorkommen, Ausbreitung und Möglichkeiten des Nachweises der Erreger *Petunia asteroid mosaic virus* (PAMV) und *carnation Italien ringspot virus* (CIRV). Dissertation, Technische Universität München.

SCHUEL, R.W. 1961: Influence of reproductive organs on secretion of sugars in flowers of *Streptosolen jamesonii*. Zit. in: ESAU (1969): Pflanzenanatomie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

TROLL, K. und K. HÖHN 1973: Allgemeine Botanik. 4. Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

UYEMOTO, J. K., W. K. ASAI, and C. F. LUHN 1992: *Ilarviruses*: Evidence for Rapid Spread and Effects on Vegetative Growth and Fruit Yields of Peach Trees. Plant Disease **76/1,** 71–75.

WALKEY, D. G. A., and M. J. W. WEBB 1984: The Use of a Simple Electron Microscop Serology Procedure to Observe Relationships of Seven Viruses. Phytopath. Z., **110,** 319–327.

Eingereicht: 22. 2. 2000 / 1. 8. 2000

Anschrift der Verfasser: Dr. Alia Yacoub und Dr. Christa Lankes: Institut für Obstbau und Gemüsebau, Auf dem Hügel 6, 53121 Bonn. Priv. Doz. Dr. J. Hamacher, Institut für Pflanzenkrankheiten, Nußallee 9, 53115 Bonn.