

K. Rebenstorf · C. Büttner

Eine kleine Studie zum Auftreten des Sharka-Virus (Plum pox potyvirus) in Pflaumenobstbeständen im Berliner Umland

Eingegangen: 15 November 2003 / Angenommen: 18 November 2003 / Online veröffentlicht: 10 Februar 2004
© Springer-Verlag 2004

Zusammenfassung In den letzten Jahren haben Anbauer von Pflaumenobstplantagen im periurbanen Bereich von Berlin wiederholt chlorotische Ringflecken und Bänderungen auf den Blättern von Pflaumenbäumen beobachtet, die auf eine Infektion mit dem Sharka-Virus (PPV, Plum pox virus) hindeuten. Um die Ursachen zu klären, wurden in 4 Obstanbaubetrieben Probenahmen durchgeführt und mittels Biotest, Elektronenmikroskopie sowie serologischer und molekularbiologischer Testverfahren untersucht. In allen besichtigten Betrieben konnten im Herbst im Jahr 2000 an den Blättern der untersuchten Pflaumenbäume chlorotische und nekrotische Flecken sowie chlorotische Ringflecken und Bänderungen beobachtet werden. Durch den spezifischen Nachweis von PPV mittels DAS-ELISA konnte in jedem der 4 untersuchten Betriebe Infektionen mit PPV nachgewiesen werden. Insgesamt 52% aller untersuchten Blattproben (insgesamt 13 von 25) bzw. 62% aller untersuchten Pflaumensorten (10 von 16) waren PPV-infiziert. 92% aller positiv bewerteten Proben hatten deutliche Symptome. Der Anteil PPV-infizierter Gehölze in den einzelnen Betrieben war jedoch sehr heterogen und schwankte von 15–100%. PPV ist daher in den vier untersuchten Betrieben in der Umgebung von Berlin als weit verbreitet einzustufen. Mischinfektionen mit dem Prunus dwarf virus (PDV) und dem Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) konnten nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Es sollte überprüft werden, welcher der beiden PPV-Stämme D und M im Umkreis von Berlin vorkommt. Hierfür wurde mit dem Pflanzenpresssaft von Pflaumenblattproben mit Symptomen mit Hilfe der RT-PCR und anschließender Restriktionsanalyse eine Stammdifferenzierung durchgeführt. Beide untersuchten Proben konnten

als PPV-D-Stamm identifiziert werden, welcher die nicht-epidemiologische Form des PPV darstellt. Dieser Stamm gilt in West- und Zentraleuropa als allgemein weiter verbreitet als der PPV-M-Stamm. Es ist notwendig, eine größere Anzahl von Proben aus Pflaumenobstgärten im periurbanen Bereich von Berlin zu untersuchen, um das Auftreten der unterschiedlichen Stämme des PPV einschätzen zu können.

Schlüsselwörter Sharka-Virus · Chlorotische Ringfleckenkrankheit · Prunus dwarf virus · Prunus necrotic ring spot virus · Nachweismethoden · Krankheitssymptome · Pflaumenobstplantagen

A short investigation of the distribution of Sharka virus in plum orchards in the periurban area of Berlin

Abstract In recent years, keepers of plum orchards in the periurban area of Berlin have repeatedly observed chlorotic ring spots and chlorotic mottling on the leaves of plum trees which might correlate to an infection with the Sharka virus. Thus, leaves were sampled from symptomatic and asymptomatic plum trees in four orchards in autumn 2000 and tested by bioassay, electron microscopy for virus infection, and serological and molecular assays for plum pox polyvirus (PPV) infection. Some samples were also analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)-amplified DNA fragments. The RFLP profiles of amplified fragments of the C-terminal part of the PPV coat protein have been shown to be useful for differentiation of PPV isolates, and the polymorphism correlates with serogrouping of PPV strains according to Wetzel et al. (1991a). Plum pox polyvirus was detected in 52% of all tested symptomatic leaf samples (13 of 25) and 62% of all tested plum cultivars (10 of 16) by DAS enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The proportion of PPV-infected samples and cultivars in different orchards was heterogeneous (15% to 100%). The symptom expression of

K. Rebenstorf · C. Büttner
Institut für Gartenbauwissenschaften,
Humboldt-Universität Berlin,

K. Rebenstorf (✉)
Fachgebiet Phytomedizin, Institut für Gartenbauwissenschaften,
Humboldt-Universität zu Berlin,
Lentzeallee 55–57, 14195 Berlin
E-Mail: kathrin.rebenstorf@agrar.hu-berlin.de

samples testing positive for PPV in DAS-ELISA varied strongly between cultivars. Sharka disease in plum trees was widely distributed in the four orchards tested in the area of Berlin. Two samples from different orchards in the western and northeastern parts of the city were analysed by RT-PCR and RFLP analysis using the restriction enzyme *Rsa I*. This enzyme was previously described to be useful for strain differentiation. The D strain of PPV, considered to be the nonepidemic form of PPV, was detected in the samples analysed. The more aggressive M strain, considered the epidemic form, was not detected. However, for accurate evaluation of the occurrence of different strains of PPV, it is necessary to investigate a larger number of isolates obtained from plum orchards from the Berlin periurban area.

Keywords Sharka virus · Chlorotic ring spot disease · Prunus dwarf virus · Prunus necrotic ring spot virus · Methods of proof · Disease symptoms · Plum orchards

Das Scharka-Virus (Plum pox potyvirus *PPV*) ist ein weltweit verbreiteter Erreger von großer wirtschaftlicher Bedeutung; in Europa ist er immer noch für eine der zerstörerischen Krankheiten von verschiedenen Prunusarten verantwortlich. Große Schäden verursacht PPV vor allem an Pfirsich, Aprikose, Pflaume und Nektarine.

Die durch PPV hervorgerufenen Symptome an Prunus sind sehr unterschiedlich ausgeprägt. Sie kommen auf den Blättern, Früchten und Samen vor und variieren in Abhängigkeit von der Prunusart, -sorte, PPV-Stamm, Jahreszeit und dem Standort.

In der Regel zeigen die Blätter chlorotische und nekrotische Ringflecken und chlorotische Linienmuster oder Flecken. Die Symptomausprägung auf Blättern und Früchten ist zurzeit des Wachstums besonders ausgeprägt. Die Frucht von Aprikose und Pflaume kann missgebildet und deformiert sein. Der Samen weist in vielen Sorten Ringflecken auf. Einige Pfirsichsorten zeigen Farbveränderungen der Blütenblätter. Auch latente Infektionen sind möglich.

Eine Infektion kann erhebliche Ertragsverluste zur Folge haben. Über 100 Mio. Steinfruchtbäume sind zu diesem Zeitpunkt in Europa schon infiziert und anfällige Sorten weisen bis zu 80–100% Ertragsverlust auf (Kegler 1998).

Das Auftreten von Mischinfektionen von PPV mit anderen Viren ist zudem von großer ökonomischer Bedeutung, da diese die Symptomausprägungen verstärken. So verursacht eine Mischinfektion von PPV und Prunus dwarf ilarvirus (PDV) an einigen Pflaumenkultivaren starke Wuchsdepressionen, Rindengeschwüre und Stammveränderungen, die zum Tod des Gehölzes führen können. Durch eine Mischinfektion mit PPV, PDV und Prunus necrotic ring spot ilarvirus (PNRSV) kann das Gehölz innerhalb weniger Jahre absterben (Németh 1992).

Die Symptome des Plum pox potyvirus wurden erstmals zwischen 1915 und 1918 von Pflaumenanbauern in Bulgarien beobachtet. Beschrieben wurde diese Virus-

krankheit erst 1932 von Atanosoff, der ihr ihren Namen „Sarka po slivite“, also „Pflaumen-Pocken“ (=Scharka) gab. Heute ist das Sharka-Virus — mit Ausnahme von Australien — auf allen Kontinenten verbreitet.

Eine Übertragung des Plum pox virus ist mechanisch und mit biologischen Vektoren möglich. Die Verbreitung von PPV in andere Regionen oder Länder erfolgte durch die Vermehrung und die anschließende Verteilung von kontaminiertem Material (Roy et al. 1994).

Die Viruspartikeln werden von zahlreichen Blattlausarten im nichtpersistenten Modus übertragen (Brunt et al. 1996), davon werden 4–6 Vektoren für wirtschaftlich bedeutend eingestuft. Die wirtschaftlich bedeutenden Vektoren in den jeweiligen Ländern sind *Brachycaudus cardui*, *B. helichrysi*, *Myzus persicae* und *Phorodon humuli*.

Es gibt mehrere Stämme des PPV, die sich anhand ihrer serologischer Verwandtschaft sowie anhand ihren biologischen und molekularen Eigenschaften unterscheiden lassen. Bisher wurden 4 verschiedene Stämme bzw. Serogruppen charakterisiert und als PPV-Stamm M, D, EA und C bezeichnet (Kerlan u. Dunez 1979; Wetzel et al. 1991b; Kalashyan et al. 1994; Crescenzi et al. 1994). Der PPV-Didreon (PPV-D)-Stamm ist der am stärksten verbreitete Stamm in Westeuropa. Der PPV-D-Stamm gilt als nichtsamenertragbar, schwieriger auf Testpflanzen zu übertragen und weniger effizient bei der Vektorübertragung. Der D-Stamm stellt die nichtepidemiologische Form der Scharka-Krankheit dar. Der PPV-Marcus (PPV-M)-Stamm ist der am stärksten verbreitete Stamm in Süd-, Ost- und Zentraleuropa. Pfirsich ist der Haupt-Prunus-Wirt, zudem sind Pflaumen und Aprikosen anfällig. Németh und Kölber (1983) beschreiben diesen Stamm als samenübertragbar. Der M-Stamm gilt als leichter auf Testpflanzen zu übertragen und effizienter bei der Vektorübertragung als PPV-D. Der M-Stamm wird als die epidemiologische Form der Scharka-Krankheit betrachtet. Der PPV-El-Amar (PPV-EA)-Stamm wurde erstmals aus Aprikosen in El Amar (Ägypten) isoliert und tritt vor allem in nordafrikanischen Regionen auf. Der PPV-Cherry (PPV-C)-Stamm stellt bis heute den einzigen Stamm dar, der natürlicherweise Süß- und Sauerkirschen infiziert. Dieser Stamm konnte experimentell auch auf andere Prunusarten übertragen werden. PPV-C ist blattlausübertragbar und hat einen größeren Wirkkreis als andere PPV-Stämme. Dieser Stamm kommt vor allem in Ost- und Zentraleuropa vor (insbesondere in Italien).

In Deutschland wurde PPV zum ersten Mal 1955 nachgewiesen und hat sich inzwischen in alle bedeutsamen Pflaumenanbaugebiete Deutschlands ausgebreitet. Über die Verbreitung von PPV im Berliner Umland lagen bisher keine Informationen vor.

Virusverdächtige Symptome an Pflaumenblättern mit Verdacht auf PPV, die in verschiedenen Anlagen im Berliner Umland von einem Anbauberater dieser Region beobachtet wurden, waren Anlass für die vorliegenden Untersuchungen. Es wurden in insgesamt 4 Obstanbaubetrieben Probenahmen durchgeführt und das Auftreten von PPV an Pflaumenbäumen mittels Biotest, Elektro-

nenmikroskopie sowie serologischer und molekularbiologischer Testverfahren untersucht.

Material und Methoden

Für diese Untersuchungen wurden im Jahr 2000 im periurbanen Bereich südwestlich und nordöstlich von Berlin 4 verschiedene Pflaumenobstanlagen stichprobenweise untersucht. Es handelte sich hierbei um insgesamt 25 verschiedene Proben von 17 verschiedenen Pflaumensorten (Tabelle 1). Es wurden vor allem Blätter von Pflaumenbäumen beprobt, die virusverdächtige Symptome aufwiesen.

Sowohl biologische, serologische und molekulare Testverfahren wurden angewendet, um einen eindeutigen Nachweis des Erregers zu ermöglichen.

Biotest

Da pflanzenpathogene Viren auf den Wirten in vielen Fällen keine eindeutig typischen Symptome verursachen, wird der Biotest in der Regel den serologischen Methoden vorangestellt. Als Inokulum diente der Pflanzensaft aus virusinfiziertem Blattmaterial auf krautigen Indikatorpflanzen, wie *Chenopodium quinoa* und *Nicotiana clevelandii*. Der Nachweis erfolgte durch Inokulation, indem virusinfiziertes Blattmaterial zusammen mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 und unter Zusatz vom Schleifmittel (Celite) homogenisiert und das Blatthomogenat auf Blätter von Indikatorpflanzen abgerieben wurde. Anschließend wurden die inokulierten Blätter mit Leitungswasser abgespült.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurde das Virus anhand morphologischer Merkmale wie Form und Größe der Partikeln charakterisiert. Zur Beschichtung der Netzen wurde die Negative-Staining-Standard-Prozedur (Standard-EM) angewendet.

Double Antibody Sandwich Enzym-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)

Das DAS-ELISA ist eine serologische Methode, die zum spezifischen Nachweis pathogener Viren eingesetzt werden kann. Sie stellt gegenwärtig die am häufigsten angewendete und kostengünstigste Diagnosemethode für phytopathogene Viren dar. Dieser Test wurde in Anlehnung an die von Clark und Adams (1977) beschriebene Methode mit Hilfe eines Antikörpers der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH) durchgeführt.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) und Restriktionsverdau mit Rsa I

Die PCR stellt heute die sensibelste Nachweismethode für phytopathogene Viren dar.

Die RT-PCR, die dem Restriktionsverdau zur Diagnose der Stämme vorangestellt wird, wurde an die Methode von Wetzel et al. (1991a) angelehnt. Sie ist nach Wetzel et al. (1992) 5000-mal sensibler als der DAS-ELISA.

Seit einigen Jahren weiß man, dass PPV verschiedene Stämme umfasst, die sich in ihrer Biologie, in ihrer serologischen Reaktivität sowie in ihren molekularen Daten unterscheiden. In Deutschland konnte bislang nur der PPV-D-Stamm nachgewiesen werden. Dass der epidemiologisch bedeutendere PPV-M-Stamm auch in Deutschland vorkommen kann, ist jedoch nicht auszuschließen. Daher war es von Interesse, anhand einer Stichprobe (2 Pflaumenproben aus Brandenburg) eine Stammdifferenzierung durch Restriktionsverdau der PCR-Produkte durchzuführen. Das Vorliegen einer Restriktionsschnittstelle für das Enzym Rsa I im carboxyterminalen Teil des Hüllproteins ist laut Wetzel et al. (1991a) ein Charakteristikum des D-Stamms von PPV und daher zur Differenzierung zwischen D- und M-Stamm geeignet.

Ergebnisse

Symptombeobachtung

Die Blätter der beprobten Pflaumenbäume zeigten chlorotische Ringflecken und Bänderungen (Abb. 1 und Abb. 2). Die Sorte 'Hanita', die als Scharka-tolerant eingestuft wird, zeigte eine besonders starke Symptomausprägung auf den Blättern.

Bei einigen Pflaumensorten fiel der starke Fruchtfall und ein Platzen der Rinde auf. Der auffällig hohe Fruchtfall schien sich aber, nach Aussagen der Anbauer, mit der starken Neigung zum Überhang der meisten Sorten zu kompensieren und war deshalb wirtschaftlich nicht gravierend.

Biotest

Die biologische Testung durch Inokulation von Testpflanzen erwies sich als schwierig und die Ausbeute war sehr gering (9%). Bei einigen wenigen krautigen Indikatorpflanzen zeigten sich die in der Literatur beschriebenen Symptome für PPV, wie chlorotische Lokalläsionen bei *Chenopodium quinoa* und chlorotische Scheckungen und Blattdeformationen bei *Nicotiana clevelandii*.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der Negative-Staining-Standard-Prozedur (Standard-EM) konnten bei einer Vergrößerung von 40 K und 60 KeV PPV-Partikeln fotografiert werden. Die für PPV

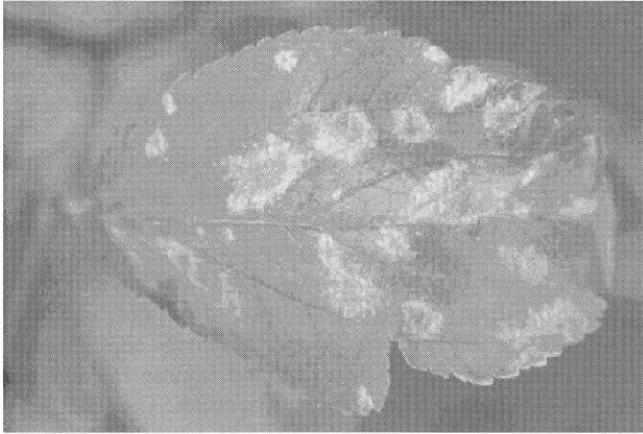


Abb. 1 Blattsymptome: chlorotische Ringflecken auf Pflaumenblättern



Abb. 2 Blattsymptome: Ringflecken und Bänderungen auf Pflaumenblättern

charakteristischen flexiblen Stäbchen unterschieden sich in ihrer Länge stark voneinander. Die längsten Partikeln waren nach Schätzung zwischen 700 nm und 800 nm lang (Abb. 3).

Nachweis mittels DAS-ELISA

Der DAS-ELISA erwies sich als eine sichere Methode, PPV in Pflaumen nachzuweisen. Durch den spezifischen Nachweis von PPV mittels DAS-ELISA konnte in allen vier untersuchten Betrieben eine Infektion mit PPV nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten sich 52% aller untersuchten Blattproben (insgesamt 13 von 25) bzw. 62% aller untersuchten Pflaumensorten (10 von 16) als PPV infiziert. 92% aller positiv bewerteten Proben zeigten Symptome. Der Anteil PPV-infizierter Gehölze in den einzelnen Betrieben war sehr heterogen und schwankte von 15–100% (Tabelle 1).

In einigen Fällen trat PPV auch latent auf; einige Blattproben zeigten keine Symptome und das Ergebnis

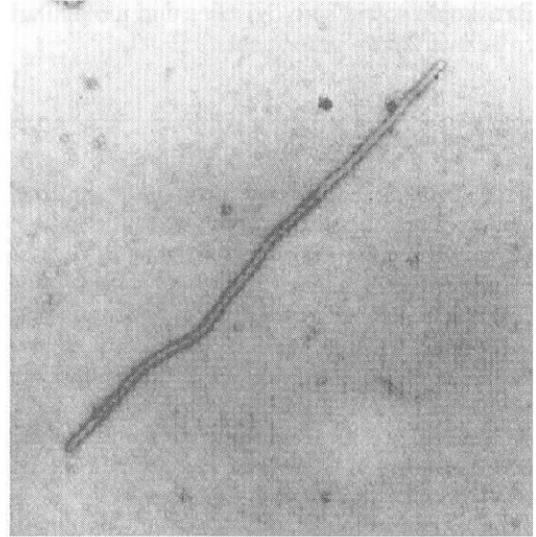


Abb. 3 Morphologie des PPV (ca. 750 nm leicht flexible Stäbchen der Pflaumenprobe 'Valjewka'). Fotografie bei 40 k und 60 KeV

Tabelle 1 Vergleich der Symptomausprägung der Blätter und dem DAS-ELISA-Ergebnis

Sorte	Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4
'Bühler'			S-/E-	
'Cacaks Beste'			S-/E-	S+/E+
'Cacaks Fruchtbare'	S+/E+			
'Cacaks Schöne'			S-/E-	S+/E+
'Elena'			S+/E+	S+/E+
'Hanita'		S-/E-	S+/E-	S+/E+
'Hauszweitsche'		S+/E+		
'Herman'	S+/E+		S-/E-	S+/E+
'Katinka'			S-/E-	
'Menschen Messer'			S-/E-	
'Nancy Stanley'			S-/E-	
'Pitestan'			-	
'President'	S+/E+			
'Schlüfer'			S-/E-	
'Top'			S+/E-	
'Valjewka'	S+/E+		S+/E+	
'Valor'	S+/E+		S-/E-	
Im DAS-ELISA positiv für PPV	5 von 5	1 von 2	2 von 13	5 von 5

S+ symptomtragendes Pflaumenblatt, S- symptomfreies Pflaumenblatt, E+ im DAS-ELISA positiv für PPV, E- im DAS-ELISA negativ für PPV

des DAS-ELISAs erwies sich als positiv. Alle symptomlosen Blätter waren im Test negativ.

Stammdifferenzierung mittels RT-PCR und anschließendem Restriktionsverdau

Alle 3 mittels RT-PCR untersuchten Proben zeigten amplifizierte Fragmente in der erwarteten Größe von 243 bp und bestätigten somit die Ergebnisse des DAS-ELISAs. In den beiden untersuchten Proben wurde das amplifizierte Fragment durch das Enzym Rsa I in 2 Teilstücke von 162 und 81 bp gespalten, demnach konnte

der weniger aggressive D-Stamm (nichtepidemiologische Form der Scharka-Krankheit) nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung

In dieser kleinen Studie zum Auftreten des Sharka-Virus im Umland von Berlin konnte das Virus in allen untersuchten Pflaumenobstanbaubetrieben nachgewiesen werden. Anhand der stichprobenartigen Untersuchung zeigte sich, dass in den untersuchten Betrieben im Umland von Berlin die Scharka-Krankheit weit verbreitet ist.

Der Verbreitungsstatus des PPV in Brandenburg, in Mecklenburg-Vorpommern und in urbanen Gebieten, wie Berlin, bleibt jedoch immer noch zu klären.

Nach den Aussagen der Anbauer scheint die Infektion der untersuchten Pflaumensorten mit dem Scharka-Virus den Ertrag nicht negativ zu beeinflussen. Es ist daher zu vermuten, dass bei optimaler Kulturführung eine Infektion des Baumes mit PPV zu keiner verringerten Fruchtbildung am Gehölz führt. Entsprechende Daten zu vergleichbaren Anlagen mit gesunden Bäumen fehlen.

Viele Pflaumensorten neigen stark zum Überhang. Der zum Teil häufig zu beobachtende hohe Fruchtfall in den Anlagen schien daher für die Anbauer in Bezug auf den Ertrag keine große Rolle zu spielen. Ferner gewannen wir den Eindruck, dass in den Untersuchungen die nur sehr seltenen und unauffälligen Fruchtsymptome möglicherweise kein qualitätsmindernder Faktor sind.

Der durchgeführte Nachweis zum Auftreten der Stämme des PPV lässt aufgrund der geringen Anzahl der getesteten Proben keine umfassende Beurteilung zu.

Es ist ratsam, regelmäßig Stichproben infizierter Pflaumenbäume zu untersuchen um die PPV-Stämme und ihre Verbreitung zu ermitteln und einer weiteren möglichen epidemiologischen Ausbreitung vorzubeugen. Nicht nur der M-Stamm stellt eine Gefährdung dar (Kerlan u. Dunez 1979).

Literatur

- Atanasoff D (1935) Plum pox. A new virus disease. Yearbook University of Sofia. Faculty of Agriculture 11: 49–69
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L (1996) Viruses of plants. Descriptions and lists from the VIDE Database. CAB International University Press, Cambridge
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475–483
- Crescenzi A, Nuzzaci M, Levy L, Piazzolla P, Hadidi A (1994) Infezioni di sharka su ciliegio dolce in Italia meridionale. *Informatore Agrario*. 34: 73–75
- Dunez J (1988) Plum pox disease of stone fruit in Egypt. Report of a mission to Egypt. TCP/EGY/6756
- Kegler H, Fuchs E, Grüntzig M, Schwarz S (1998) Some results of 50 years of research on the resistant to plum pox virus. *Acta Virol* 42: 200–215
- Kalashyan YA, Bilkey ND, Verderevskaya TD, Rubina EV (1994) Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldova. *Bull OEPP/EPPPO* 24: 645–649
- Kerlan C, Dunez J (1979) Biological and serological differentiation of strains of sharka virus. *Ann Phytopathol* 11: 241–250
- Németh M (1992) On the distribution and economic significance of fruit trees viruses in Hungary. *Növényvédelem* 28: 26–32
- Roy AS, Smith IM (1994) Plum pox situation in Europe. *Bull OEPP/EPPPO* 24: 515–523
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Dunez J (1991a) A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J Virol Methods* 33: 355–365
- Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Delbos RP, Mazyad H, Aboul-Ata AE, Dunez J (1991b) Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of the plum pox potyvirus. *J Gen Virol* 72: 1741–1746
- Wetzel T, Candresse T, Maquaire G, Ravelonandro M, Dunez J (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J Virologic Meth* 39: 27–37
- Németh M, Kölber M (1983) Additional evidence on seed transmission of plum pox virus in apricot, peach, and plum, proved by ELISA. *Acta Hort* 130:293–300

