

# Viruserkrankungen im urbanen Grün – eine Studie an Birken im Berliner Bezirk Steglitz-Zehlendorf

Viral diseases in urban areas – a study on birch in Berlin Steglitz-Zehlendorf

von Maria Landgraf, Juliane Langer, Janna Gröhner, Laura Zinnert, Martina Bandte, Susanne von Barga, Martin Schreiner, Barbara Jäckel und Carmen Büttner

## Zusammenfassung

In den Jahren 2015 und 2016 wurden Straßenbäume der Gattung *Betula* in Berlin Steglitz-Zehlendorf, die Auffälligkeiten im Wuchs, Kronenverkahlungen und frühzeitige Abgänge zeigten, molekularbiologisch auf die an Laubgehölzen verbreiteten Viren *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabid mosaic virus* (ArMV) und *Apple mosaic virus* (ApMV) untersucht. Die große Vielfalt der beobachteten Symptome sowie kürzlich neu entdeckte, bisher nicht charakterisierte Virusspezies in *Betula spp.* ließ vermuten, dass in den untersuchten Birken Mischinfektionen vorliegen könnten. Für den Nachweis von zwei neuen Viren der Gattungen *Badna-* bzw. *Carlavirus* in den erkrankten Birken wurden diagnostische *Primer*-paare eingesetzt.

## Summary

In 2015 and 2016 roadside birch trees (*Betula spp.*) within the Berlin area of Steglitz-Zehlendorf showing crown degeneration, bare-branched crowns and early die-back were investigated by molecular-biological methods testing for *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabid mosaic virus* (ArMV) and *Apple mosaic virus* (ApMV), commonly associated with deciduous trees. The diversity of symptoms and recently newly discovered viral species in *Betula spp.* lead to the assumption of a mixed infection of unknown viral origin. Moreover, primers for two new so far uncharacterized virus species of the genera *Badna-* and *Carlavirus* have been included in this study.

## 1 Einleitung

Laubbäume im Stadt- und Straßengrün, insbesondere in Grün- und Parkanlagen sowie in Stadtwäldern, leisten einen wichtigen Beitrag zur nachhaltigen Verbesserung des Stadtklimas (Stiftung Die Grüne Stadt 2014). In Berlin werden seit einigen Jahren zunehmende Degenerationen der Stadtbirken beobachtet. Der sich verschlechternde Gesundheitszustand der Bäume steht bei den Pflanzenschutzämtern im Fokus und ist Anlass für eine Ursachenforschung. Aufgrund ihrer langjährigen Erfahrung in der Baumvirologie haben die Autoren in Zusammenarbeit mit dem Pflanzenschutzamt erkrankte Bäume für eine genauere virologische Untersuchung ausgewählt. In der Literatur findet man erste Untersuchungen zu vi-

rusinfizierten Birken von SCHMELZER (1972) und wenig später von COOPER & MASSALSKI (1984). BANDTE et al. (2009) stellten den derzeitigen Stand der Forschung zu Viruserkrankungen an Birken in einer Buchserie zusammen. Aktuelle Ergebnisse von LANGER et al. (2016) sowie RUMBOU et al. (2016) zeigen auf, dass Viruserkrankungen für Birken von nicht zu vernachlässigender Bedeutung sind.

Im öffentlichen Stadtgrün Berlins mit insgesamt 438.159 Laubbäumen hat die Birke (*Betula spp.*) einen Anteil von 3 % (Senatsverwaltung Berlin 2016). Im Bezirk Steglitz-Zehlendorf, dem Untersuchungsgebiet und baumreichsten Berliner Bezirk mit insgesamt 61.414 Straßen- und Parkbäumen, hat die Birke einen Anteil von 6 %. Im Jahr 2015 wurden hier



**Abbildung 1: Kronenverkahlung an *Betula* spp. an verschiedenen ausgewählten Standorten in Berlin Steglitz-Zehlendorf: A Gärtnerstraße, B Schildhornstraße, C Wilskistraße, D Colmarer Weg, E Im Vogelsang**

997 Baumfällungen vorgenommen, wobei die Birke mit ca. 80 Bäumen (8 %; Anonymus: BA Fachbereich Grünflächen 2016) an dritter Stelle der gefälltten Baumarten stand (Straßen- und Grünflächenamt Berlin 2016). Degenerierende Birken, teilweise mit Kronenverkahlungen (Abbildung 1) und frühzeitigen Abgängen, werden seit einigen Jahren vom Straßen- und Grünflächenamt des Bezirks Steglitz-Zehlendorf und vom Pflanzenschutzamt registriert.

Als Ursache werden biotische und abiotische Faktoren diskutiert, eine wissenschaftliche Arbeit zur Differenzialdiagnose liegt bisher nicht vor. Im Rahmen der Untersuchung biotischer Stressoren wird in dieser Arbeit die Beteiligung von Pflanzenviren impliziert. Häufig zu beobachtende Blattsymptome wie chlorotische Adernbänderungen und Kleinblättrigkeit (Abbildung 2) deuten auf eine Virusinfektion hin.

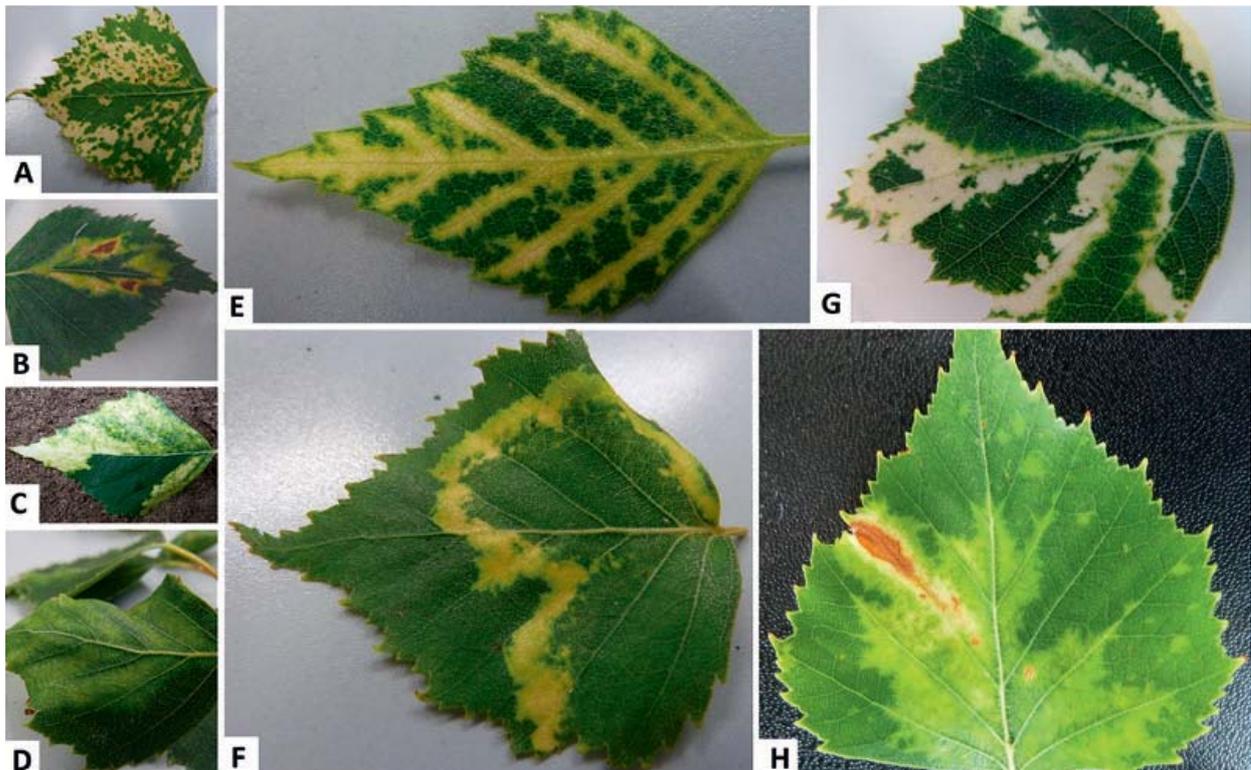
In vergangenen Untersuchungen konnten Infektionen mit *Cherry leaf roll virus* an Birken verschiedener Standorte bestätigt werden (BÜTTNER et al. 2013;

von BARGEN et al. 2014; LANGER et al. 2016; RUMBOU et al. 2016).

Bei den Untersuchungen in den Jahren 2015 und 2016 wurde eine detaillierte Bonitur im Kronenbereich durch Hubwageneinsätze ermöglicht. Dabei wurde ein vielfältiges Spektrum an Blattsymptomen entdeckt, einschließlich Blattrollen, chlorotischer Linienmuster und Ringflecken, teilweise nekrotisierend, seltener auch Panaschierungen (Abbildung 2) (LANDGRAF et al. 2016).

## 2 Material und Methoden

Gemeinsam mit Mitarbeitern des Straßen- und Grünflächenamts des Bezirks Steglitz-Zehlendorf (Fachbereich Grünflächen) wurden aus dem Baumkataster (gemäß § 2 Abs. 2 Nr. 3 Berliner Straßengesetz (BerlStrG)) überwiegend mit Birken bepflanzte Straßenzüge ausgewählt. Die Hinweise auf eine starke Schädigung der Bäume an diesen Standorten



**Abbildung 2: Virustypische Symptome an Birken im Untersuchungsgebiet: A Mosaik, B chlorotisches Linienmuster mit Nekrotisierung, C Panaschierung, D Interkostalchlorose mit Blattrollen, E chlorotische Adernbänderung, F chlorotisches Linienmuster, G Adernbänderung weiß, H Interkostalchlorose mit Nekrose**

konnten mit unseren visuellen Bonituren bestätigt werden. Im Frühjahr 2015 wurden Blattproben von 72 ausgewählten Bäumen der Gattung *Betula* an neun unterschiedlichen Standorten im Bezirk Berlin Steglitz-Zehlendorf entnommen. Dazu wurden eine Teleskopsäge und/oder ein Hubwagen eingesetzt, um auch obere Astpartien zu erreichen. Alle beprobten Bäume wiesen virusverdächtige Symptome an den Blättern auf (Abbildung 2).

Im Jahr 2016 wurden im Bezirk Berlin Steglitz-Zehlendorf insgesamt 70 Birken an 14 Standorten (davon acht neue Standorte) untersucht. Von den 70 Birken sind 18 Bäume an sechs Standorten in beiden Jahren (2015 und 2016) beprobt worden. Die Birken waren zum Zeitpunkt der Auswahl der Probenbäume im März 2016 noch unbelaubt, die Auswahl erfolgte demzufolge unabhängig von Blattsymptomen. Zum Zeitpunkt der Probenahme ab Mai zeigten von den ausgewählten Probenbäumen 56 deutlich virustypische Symptome, 14 Bäume dagegen wiesen keine

Symptome in den Blättern des zugänglichen Kronenbereichs auf.

Für den Nachweis von Virusinfektionen in den erkrankten Birken wurde auf *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Apple mosaic virus* (ApMV) und *Arabis mosaic virus* (ArMV) getestet, da diese Pflanzenviren an Laubgehölzen häufig nachgewiesen wurden und überdies einen sehr weiten Wirtspflanzenkreis besitzen (BANDTE & BÜTTNER 2004; BANDTE et al. 2009). Einen Hinweis auf eine Mischinfektion in Birken mit bislang unbekanntem viralen Erregern lieferten zudem Virussequenzdaten aus zwei CLRV-infizierten Birken aus Deutschland und Finnland, deren *Virom* mit Hilfe des *Next Generation Sequencing* (NGS) bestimmt wurde. Diese Methode ermöglicht es, die RNA-Sequenz von allen zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Pflanzenprobe transkriptionell aktiven Genen zu bestimmen. Dadurch können sowohl DNA- als auch RNA-Viren nachgewiesen werden. Auf diese Weise wurden zwei neue, nichtcharakterisierte Virusspezies der Gattun-

gen *Badna*- und *Carlavirus* identifiziert (RUMBOU et al. 2015), deren Nachweis in die Untersuchungen einbezogen wurde.

Das Vorhandensein dieser fünf Virusspezies im Birkenblattmaterial aus den Beprobungen der Jahre 2015 und 2016 mit und ohne virusverdächtige(n) Symptome(n) wurde im Labor molekularbiologisch mittels RT-PCR untersucht. Dafür wurde Gesamt-RNA aus dem Blattmaterial isoliert (InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit) und diese mit *random hexamer-Primern* in cDNA (RevertAid Reverse Transcriptase) transkribiert. Um potenzielle falsch negative Ergebnisse der viruspezifischen PCRs zu erkennen, wurde die Qualität der cDNA vorab in einer PCR mit *Primern* zum spezifischen Nachweis von Transkripten des pflanzlichen *nad5*-Gens (NADH Dehydrogenase Untereinheit 5) getestet (MENZEL et al. 2002).

In den PCR-basierten Virusnachweisen wurden z. T. publizierte oder neu entwickelte diagnostische *Primerpaare* verwendet: CLRV-CP350F/CP977R (LANGER et al. 2016) und CLRV-CP188F/CP350R (VON BARGEN et al. 2009); ApMV- CP1535F/CP1739R (LANGER 2016); ArMV-CPfor/CPrev (BERTOLINI et al. 2001); *Badna*\_ORF3\_for/rev und *Carla*\_for/rev (RUMBOU 2015).

### 3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 72 symptomtragende Birken aus den Probenahmen 2015 und insgesamt 70 Birken (56

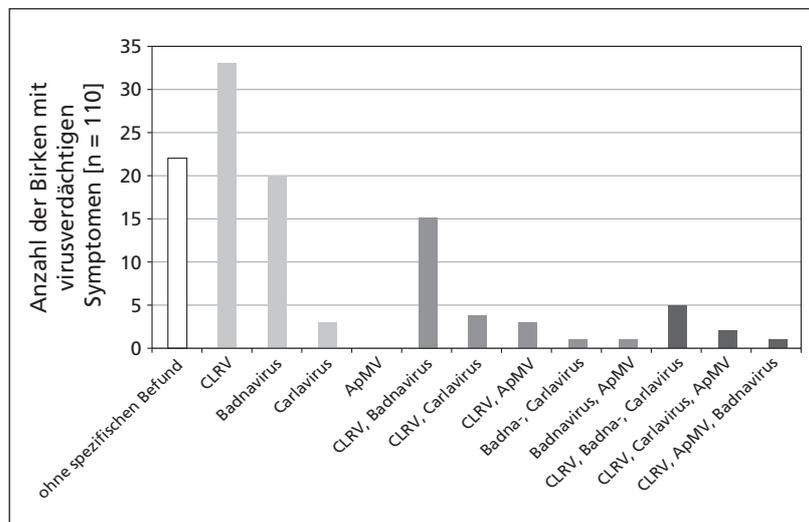
mit Symptomen, 14 ohne sichtbare Symptome) aus den Probenahmen 2016 auf Infektionen mit CLRV, ApMV, ArMV (nur Proben aus 2015) und den beiden neu entdeckten *Badna*- bzw. *Carlaviren* getestet.

Von den 2015 beprobten Birken sind 71 % (51 von 72) virusinfiziert. Dabei wurde in 44 % (32 von 72) der Bäume nur eine Virusspezies detektiert, während 26 % (19 von 72) mit zwei oder mehr Virusspezies mischinfiziert sind. In 29 % (21 von 72) der untersuchten Bäume mit virusverdächtigen Symptomen wurde keine der getesteten Virusspezies nachgewiesen. ArMV wurde in keiner der 2015 entnommenen Blattproben nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Arbeiten, in denen ArMV weder in Birken in Deutschland noch in Finnland nachgewiesen werden konnte (BANDTE et al. 2009; PAUWELS et al. 2014). Daher wurde auf eine Testung des Pflanzenmaterials auf ArMV im Kalenderjahr 2016 verzichtet.

Von den in 2016 beprobten Birken sind 76 % (53 von 70) virusinfiziert. Davon waren 71 % mit einer Virusspezies und 29 % mit zwei oder drei Virusspezies infiziert. Von den Birken mit Blattsymptomen sind 86 % und von denen ohne sichtbare Symptome 50 % virusinfiziert.

Das CLRV ist mit 71 % in allen nachweislich virusinfizierten Birken das am häufigsten vorkommende Virus an diesen Standorten (Abbildung 3). Das neue *Badnavirus* tritt in 46 % und das *Carlavirus* in 19 % aller als virusinfiziert anzusprechenden Birken auf.

**Abbildung 3: Zusammenfassende Übersicht der in erkrankten Birken nachgewiesenen Viren im Untersuchungsgebiet in den Jahren 2015 und 2016; weiß = Birken ohne speziellen Befund, hellgrau = Birken mit Einzelinfektionen, mittelgrau = Birken mit Mischinfektionen aus zwei Viren, dunkelgrau = Birken mit Mischinfektionen aus drei Viren. RNA-Isolierungsmethode, *Primerpaare* und RT-PCR-Protokolle waren identisch in beiden Jahren. Mehrfach beprobte Birken sind im Datensatz nur einmal enthalten.**



Das ApMV ist mit 12 % (ausschließlich in Mischinfektion) das am wenigsten nachgewiesene Virus an Birke an den untersuchten Standorten.

## 4 Diskussion

Die virologische Untersuchung erkrankter und degenerierender Birken im Stadtgrün des Berliner Bezirks Steglitz-Zehlendorf hat den Nachweis verschiedener Pflanzenviren in über 70 % aller beprobten Birken ( $n = 124$ ) von 17 verschiedenen Standorten erbracht. Darunter sind zwei in Laubgehölzen bekannte pathogene (CLRV, ApMV) und zwei im Jahr 2015 neu entdeckte, nicht charakterisierte Virusspezies (Gattung *Badnavirus* und *Carlavirus*). Da bislang der kausale Zusammenhang zwischen der offensichtlichen Erkrankung der degenerierenden Birken und der nachgewiesenen Viren nicht erbracht ist, bedarf es weiterer Forschungsarbeiten. Es bleibt zudem zu klären, warum in 29 % (2015) und 14 % (2016) der symptomaufweisenden Birken keine dieser Virusspezies, dagegen aber in 7 von 14 symptomlosen Birken ein oder mehrere der Viren nachgewiesen werden konnten.

Die Frage nach der Bedeutung von CLRV und ApMV wird im Hinblick auf Mischinfektionen im Ursachenkomplex neu aufgerollt. Auch die weitere Erforschung nicht charakterisierter Viren ist dringend notwendig. So ist die Bedeutung des *Badnavirus* im nachgewiesenen Viruskomplex nicht geklärt. Insbesondere, weil das neu entdeckte *Badnavirus* zu den DNA-Viren gehört, die sich ins Genom der Wirtspflanze integrieren können, den sogenannten endogenen Pararetroviren (STAGINNUS & RICHERT 2006; HOHN et al., 2008). Der Nachweis des *Badnavirus* ist daher nicht notwendigerweise mit der Bildung von Partikeln und einer infektiösen Phase verknüpft.

Auch zu dem in Birke neu entdeckten *Carlavirus* gibt es bis auf eine Genomsequenz keine weiteren Informationen, die für die Beurteilung der Bedeutung dieses Virus in der Birke herangezogen werden könnten. Ob auch das neue *Carlavirus* in den Birken zu den Pathogenen zu rechnen ist, muss noch gezeigt werden. Auch ist nicht bekannt, ob dieses Virus, wie andere *Carlaviren*, vektoriell oder über Samen übertragen wird und ob es zu wirtschaftlichen Einbußen führt.

Den Status der Viren in den Gehölzen und die darauf basierenden Handlungsempfehlungen kann man deshalb erst nach grundlegender Erforschung der Partikelmorphologie, der Symptomatologie, der Übertragbarkeit, des Wirtspflanzenkreises, der geographischen Verbreitung und anderer Faktoren diskutieren. Einem Konzept für den Umgang mit virusinfizierten Bäumen geht des Weiteren die Identifizierung und Detektion der verursachenden Pathogene und das Wissen über deren Epidemiologie und Interaktionen mit dem Wirt voraus. In jedem Fall sollten Pflanzenviren in die Differenzialdiagnose im Stadtgrün einbezogen werden.

## Danksagung

Wir möchten uns bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Bezirksamts Steglitz-Zehlendorf, Straßen- und Grünflächenamt, Fachbereich Grünflächen, für die Unterstützung bei der Probennahme bedanken.

## Literatur

- ANONYMUS, 2016: Datensatz – Baumfällungen Bezirksamt Steglitz-Zehlendorf Fachbereich Grünflächen 2016.
- BANDTE, M., BÜTTNER, C., 2004: Viruserkrankungen im öffentlichen Grün. In: DUJESIEFKEN, D., KOCKERBECK, P. (Hrsg.): Jahrbuch der Baumpflege 2004, Thalacker Medien, Braunschweig, 62–71.
- BANDTE, M., VON BARGEN, S., ARNDT, N., GRUBITS, E., JALKANEN, R., BÜTTNER, C., 2009: Bedeutende Viren an Birke – Fallbeispiele aus Deutschland, Finnland und den USA. In: DUJESIEFKEN, D. (Hrsg.): Jahrbuch der Baumpflege, Haymarket Media, Braunschweig, 215–221.
- BARBA, M., CZOSNEK, H., HADIDI, A., 2014: Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology; Review in *Viruses*, 6, 106–136.
- VON BARGEN, S., GRUBITS, E., JALKANEN, R., BÜTTNER, C., 2009: *Cherry leaf roll virus* – an emerging virus in Finland? *Silva Fennica* 43, 727–738.
- VON BARGEN, S., BANDTE, M., BÜTTNER, C., 2014: Virus-induzierte Symptome an Laubgehölzen – Formveränderungen und Absterbescheinungen. Poster. International Urban Plant Conference (IUPC) „Gesundes Stadtgrün durch funktionale Konzepte“, Beuth Hochschule für Technik Berlin, 14./15.10.2014.
- BERTOLINI, E., OLMOS, A., MARTÍNEZ, M.C., GORRIS, M.T., CAMBRA, M., 2001: Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colorimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods*, 96, 33–41.
- BÜTTNER, C., VON BARGEN, S., BANDTE, M., MÜHLBACH, H.-P., 2013: Forest diseases caused by viruses. Chap. 3 In: *Infectious forest diseases*. Gonthier P., Nicolotti G. (eds), CABI, 50–75.
- COOPER, J. I., MASSALSKI, P. R., 1984: Viruses and virus-like diseases affecting *Betula spp.* Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences Volume 85, Issue 1-2 (Birches) 183–195.
- GOTTLIEB, A.R., BERBEE J. G., 1973: Line Pattern of Birch Caused by Apple Mosaic Virus. *Phytopathology* 63: 1470–1477.

- HOHN, T., RICHERT-POGGELER, K.R., HARPER, G., SCHWARZACHER, T., TEO, C., TEYCHENEY, P.-Y., ISKRA-CARUANA, M.-L., HULL, R., 2008: Evolution of integrated plant viruses. In *Plant Virus Evolution*; Roossinck, M., Ed.; Academic Springer: Heidelberg, Germany; 54–76.
- LANDGRAF, M., GEHLEN, J., RUMBOU, A., BANDTE, M., VON BARGEN, S., SCHREINER, M., JÄCKEL, B., BÜTTNER, C. 2016: Absterbende Birken im urbanen Grün Berlins – eine Studie zur Virusinfektion. In: DUJESIEFKEN, D. (Hrsg.): *Jahrbuch der Baumpflege*, Haymarket Media, Braunschweig, 276–283.
- LANGER, J., RUMBOU, A., FAUTER, A., VON BARGEN, S., BÜTTNER, C., 2016: High genetic variation in a small population of *Cherry leaf roll virus* in *Betula* sp. of montane origin in Corsica. *Forest Pathology* doi: 10.1111/efp.12276.
- MENZEL, W., JELKMANN, W., MAISS, E., 2002: Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 1–2 (99), 81–92.
- PAUWELS, R., ROTT, M., VON BARGEN, S., BÜTTNER, C., 2014: Untersuchungen zum Auftreten und zur Verbreitung des *Arabis mosaic virus* (ArMV) in Fennoscandinavien. Poster 146, 59. Deutsche Pflanzenschutztagung, Julius-Kühn-Archiv 447, 2014, 515–516.
- RUMBOU, A., VON BARGEN, S., DEMIRAL, R., LANGER, J., ROTT, M., JALKANEN, R., BÜTTNER, C., 2016: High diversity at the inter-/intra-host level of *Cherry leaf roll virus* population associated with the birch leaf-roll disease in Fennoscandia, *Scandinavian Journal of Forest Research* 31, 546–560.
- RUMBOU, A., VON BARGEN, S., JALKANEN, R., BÜTTNER, C., 2015: The 'birch-leaf roll disease' emerging in forests and urban parks in Fennoscandia – Viral agents associated with the disease; Oral Presentations in Pest and Diseases in Trees XVIII. International Plant Protection Congress (IPPC), "Mission possible: food for all through appropriate plant protection"; 24–27 August 2015, Berlin (Germany), Book of Abstracts, p. 46.
- SCHMELZER K., 1972: Das Kirschenblattrollvirus aus der Birke (*Betula pendula* Ror.). *Zbl. Bakt., Abt. II* 127, 10–12.
- Senatsverwaltung für Stadtentwicklung und Umwelt Berlin, Referat Freiraumplanung und Stadtgrün Ausdruck vom 30.06.2016, Bericht Nr. 139, Grünflächeninformationssystem (GRIS) Straßenbäume in Berlin Stand: 31.12.2015 Bestand nach Hauptgattungen in den Berliner Bezirken.
- STAGINNUS, C., RICHERT-POGGELER, K. R., 2006: Endogenous pararetroviruses: Two-faced travelers in the plant genome. *Trends Plant Sci.*, 11, 485–491.
- Stiftung Die Grüne Stadt, 2014: *Bäume in der Stadt*. Siebengebirgs-Druck GmbH & Co. KG, Bad Honnef, 41 S.

### Autoren

*Dr. rer. nat. Maria Landgraf, Dr. agr. Juliane Langer, Dr. rer. nat. Martina Bandte, Dr. rer. nat. Susanne von Barga*n sind wissenschaftliche Mitarbeiterinnen im Fachgebiet Phytomedizin. *Janna Gröhner* und *Laura Zimmert* sind Bachelorstudentinnen im Fachgebiet Phytomedizin. *Prof. Dr. agr. Carmen Büttner* ist Leiterin des Fachgebiets Phytomedizin.

*Humboldt-Universität zu Berlin  
Lebenswissenschaftliche Fakultät  
Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und  
Gartenbauwissenschaften  
Fachgebiet Phytomedizin  
Lentzeallee 55/57  
14195 Berlin-Dahlem  
Tel. (0 30) 20 93-4 64 44  
phytomedizin@agrار.bu-berlin.de*

*Dr. Barbara Jäckel* ist Stellvertretende Leiterin des Pflanzenschutzamts Berlin. *M. Eng. Martin Schreiner* ist Mitarbeiter im Pflanzenschutzamt Berlin.

*Pflanzenschutzamt Berlin  
Möbriner Allee 137  
12347 Berlin  
Tel. (0 30) 70 00 06 -0  
pflanzenschutzamt@senstadtum.berlin.de*

