



Axel Feldhoff (Autor)

**Immunologische und molekularbiologische Techniken  
zum Nachweis und zur Charakterisierung von  
Pflanzenviren im Zierpflanzenbau sowie der Einsatz  
dieser Techniken und Thermotheapie *in vitro* zur  
Viruskontrolle**

Axel Feldhoff

---

„Immunologische und molekularbiologische Techniken  
zum Nachweis und zur Charakterisierung von  
Pflanzenviren im Zierpflanzenbau sowie der Einsatz  
dieser Techniken und Thermotheapie *in vitro* zur  
Viruskontrolle“

---



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/5049>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# 1. Allgemeine Einleitung

## 1.1. Zertifizierung von Zierpflanzen - Neue Anforderungen an den Zierpflanzenbau

In den letzten drei Jahrzehnten haben die Produktion und der Handel mit Zierpflanzen welt- und insbesondere europaweit sehr stark zugenommen. Diese Zunahme äußerte sich u.a. in einer Expansion der Unternehmen in geographische Regionen, in denen man die Zierpflanzen kostengünstiger als in den traditionellen Anbaugebieten produzieren und vermarkten konnte. In Zentral- und Südamerika, Afrika, Südostasien und im Nahen Osten wird heute eine sehr breite Palette von Kulturen angebaut und anschließend in Form unbewurzelter Stecklinge oder als Endprodukt (z.B. Schnittblumen) in die traditionellen Konsumgüterländer Europas und die Vereinigten Staaten exportiert. Pflanzen aus mehr als 60 Gattungen in 30 Familien werden in mehr als 35 Länder über Verteilungszentren wie beispielsweise die Blumenversteigerungen in Aalsmeer in den Niederlanden verschickt.

Die vegetative Vermehrung von Pflanzen hat das Risiko der schnellen Ausbreitung von Pflanzenviren in Stecklingen und Blumenzwiebeln deutlich erhöht (Lawson, 1981). Darüber hinaus birgt die verstärkte Produktion und die Intensivierung des internationalen Handels die Gefahr, daß Schaderreger, die in einer bestimmten Region bisher nicht auftraten, eingeschleppt werden und große ökologische und ökonomische Schäden verursachen könnten. So haben dann auch die letzten Jahre gezeigt, daß traditionelle Quarantänemaßnahmen wie Grenzkontrollen, phytosanitäre Zertifikate und Quarantäne nach Eintritt in bestimmte Gebiete ("Schutzzone"), vor allem in Ländern mit hohem Handelsvolumen und/oder geographischer Isolation zum Teil versagt haben und somit die Einführung und schnelle Verbreitung von gefährlichen Quarantäneschädlingen wie z.B. den Insekten *Frankliniella occidentalis* und *Bemisia tabaci* oder *tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) möglich war (Krczal, 1998). Die drei genannten Schaderreger werden mittlerweile in nahezu allen größeren zierpflanzenproduzierenden Regionen innerhalb Europas und des Mittelmeerraumes vorgefunden (Lopian, 1994).

### 1.1.1. Regulierungen auf dem Europäischen Markt vor 1993

In Europa machte man sich nach dem zweiten Weltkrieg Gedanken über eine mögliche Harmonisierung von Quarantänemaßnahmen zwischen den verschiedenen Ländern Europas und des Mittelmeerraumes zur Begrenzung der Einschleppung und Verbreitung von Schadorganismen, ohne jedoch den Handel einschränken zu wollen. Aus diesen Überlegungen heraus wurde 1951 die *European Plant Protection Organization* (EPPO) gegründet, deren Hauptaufgabe es ist, die internationale Verbreitung von potentiellen gefährlichen Pflanzenpathogenen und -krankheiten in eine Region und innerhalb dieser zu verhindern (Lopian, 1994; Mathys, 1977). Trotz der

Bemühungen, die Quarantänemaßnahmen zu harmonisieren, existierten zunächst nur nationale gesetzliche Pflanzenschutzvorschriften. Die Bestimmungen sahen in vielen Ländern lediglich eine stichprobenartige visuelle Kontrolle auf Krankheitssymptome und Insektenbefall von importierten Waren durch die nationalen Pflanzenschutzdienste vor. Diese Kontrollen wurden aber auf Grund des steigenden Handelsvolumens in den vergangenen Jahren immer unzuverlässiger, da die kleinen Stichprobenvolumen keine ausreichende Garantie für eine rechtzeitige Erkennung von Pflanzenpathogenen ergaben. Darüber hinaus treten viele Pflanzenpathogene nur latent auf, oder die Symptome sind visuell nur sehr schwer erkennbar (Lopian, 1994). In anderen Ländern hingegen gab es strikte Bedingungen, um sich mit allen Mitteln gegen die Neueinschleppung von Krankheiten und Schädlingen abzusichern (Mathys, 1977). Diese unterschiedliche Behandlung von Pflanzen und Pflanzenmaterial an den verschiedenen Grenzen der Mitgliedstaaten der Europäischen Gemeinschaft (EG) schuf somit eine Handelsbarriere und behinderte den freien Handel mit Pflanzen innerhalb der Gemeinschaft. Das EG-Pflanzengesundheitssystem von 1976 konnte deshalb auch nur in begrenztem Rahmen die Standards zwischen den einzelnen Ländern zu harmonisieren. Um dennoch eine Harmonisierung zwischen den Staaten Europas und des Mittelmeerraumes voranzutreiben, hat die EPPO seit 1970 empfehlende Listen erstellt, die den Pflanzenschutzdiensten als freiwillige Richtlinie ermöglichte, gezielt importiertes oder exportiertes Pflanzenmaterial auf Schaderreger zu untersuchen. Da es sich dabei aber ausschließlich um Stichproben handelte, konnten die Grenzkontrollen immer nur eine Momentaufnahme sein und deshalb die Einschleppung der oben genannten Schadorganismen nicht verhindern.

### **1.1.2. Konsequenzen für den Zierpflanzenhandel nach Einführung des Europäischen Binnenmarktes**

Durch den *Single European Act* (1986) wurde die *Treaty of Rome* (1957; Schaffung einer Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EWG) mit Zollunion als Kern bis 1970) verbessert und bereitete so den Weg zur Schaffung eines grenzenlosen Europas im Jahre 1993; das bedeutete den freien Transport von Nahrungsmitteln, Personen, Dienstleistungen und Kapital innerhalb der EG. Das hieß aber gleichzeitig, daß die Inspektionsverfahren des EG-Pflanzengesundheitssystems von 1976 nicht mehr ausreichten und daß das EG-Pflanzengesundheitssystem an die neuen Handelsbedingungen angepaßt werden mußte. Ein Richtlinienprogramm mit den folgenden Hauptpunkten wurde aufgestellt (Krczal, 1998):

1. Die Angleichung der phytosanitären Standards für nationalen und intra-EG-Handel.
2. Die Verlegung der phytosanitären Kontrollen von den internen Grenzen zu den Orten der Produktion innerhalb der EG und zu den äußeren Grenzen der EG für Produkte aus Drittländern, zudem die Schaffung eines angemessenen Schutzes für bestimmte definierte Zonen innerhalb der EG, um diese vor Schaderregern zu schützen, für die es keine einheitliche Standards in der EG

geben kann (Schutzzone: es handelt sich um Zonen, in denen Schaderreger, die in anderen Gebieten auftreten, noch nicht vorkommen).

3. Die Einführung eines Systems von Pflanzenpässen, die die Erfüllung der EG-Bedingungen bescheinigen. Die Pässe stellen den freien Pflanzenaustausch innerhalb der Gemeinschaft sicher und ersetzen Pflanzengesundheitszertifikate im innereuropäischen Handel.
4. Die Einführung einer EG-Pflanzengesundheitsinspektion, die darauf achtet, daß einheitliche Kontrollen von den nationalen Inspektoren durchgeführt werden und den Import aus Drittländern kontrollieren.

Des Weiteren wurde ein ständiges Büro für die EG-Inspektoren eingerichtet und die Mitgliedstaaten haben die nationalen Gesetze und ihre Pflanzenschutzkontrollen nach den EG-Richtlinien neu organisiert. Die Kommissionsdirektive 77/93/EEC von 1993 schreibt Schutzmaßnahmen vor, die die Einführung und Verbreitung von Schaderregern und Quarantäneschädlingen innerhalb der EG verhindern. Nach diesen Richtlinien gehandeltes Pflanzenmaterial wird mit dem Pflanzenpaß versehen, der somit die Freiheit von Quarantäneschaderregern garantiert. Um aber künftig Ausgangsmaterial von Zierpflanzen, sei es unbewurzelt oder bewurzelt, mit Qualitätsstandards in Europa vermarkten zu können, strebt die EG-Kommission eine obligatorische Zertifizierung an, d.h. die Pflanzen müssen neben der Freiheit von Quarantäneschaderregern auch einen bestimmten Qualitätsstandard (z.B. Sortenechtheit) erfüllen (Brielmaier-Liebetanz & Böhmer, 1990; Krczal, 1996). Die Zertifizierung soll sicherstellen, daß qualitätsmindernde Krankheiten und Schädlinge nicht stärker als bisher in der EG verschleppt werden. Insbesondere will man erreichen, daß die Jungpflanzen-Produktion frei von Krankheiten und Schädlingen erfolgt, um den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln in der weiteren Produktion zu verringern (Von der Beeck, 1991). Die Maßnahmen, die dafür zu erfüllen sind, wurden in der EG-Kommissionsdirektive 91/682/EEC festgelegt und beinhalten Bedingungen für die Produktion und Vermarktung von Zierpflanzen sowie Regelungen zur Überwachung der Produzenten und ihrer Produktionsstandorte. Betroffen sind in erster Linie die Gattungen und Arten von Zierpflanzen, die eine wichtige wirtschaftliche Rolle innerhalb der EG spielen (Krczal, 1998). In der Direktive 93/49/EEC sind die Gattungen und Arten aufgeführt, für die laut Artikel 4 der Direktive 91/682/EEC bestimmte Qualitätsstandards erfüllt sein müssen (Tab. 9.1). Die Bestimmungen können aber nur als ein minimaler Standard angesehen werden und entsprechen den momentanen Zuständen innerhalb der Gemeinschaft. Sie werden je nach Ansprüchen weiterentwickelt werden müssen, um ein Höchstmaß an Qualität zu gewährleisten (Krczal, 1998). Die Charakteristika der verschiedenen Sorten einer Art auf dem Markt, vor allem der neu hinzukommenden Sorten, beeinflussen das dynamische Verhältnis sowohl der Vektor- als auch der Viruspopulation, wodurch sich der Einfluß, die Schwere und die Bedeutung von Krankheiten in der Kultur verändern kann (Buddenhagen, 1983). Der Produzent bzw. Lieferant hat

alle nötigen Maßnahmen, und zwar für alle Stufen der Produktion und Vermarktung, zu unternehmen, um die von der Direktive festgelegten Standards zu erfüllen. Die verantwortlichen Behörden des Mitgliedlandes führen die Kontrollen und Inspektionen durch, um sicherzustellen, daß der Produzent/Lieferant seinen Verpflichtungen nachkommt (Krczal, 1998). Sollte das Pflanzenmaterial visuell Symptome der in Tab. 9.1 aufgelisteten Schaderreger aufweisen, so müssen die Kulturen gleich behandelt (Insekten, Nematoden, Pilze) oder aber aus dem Bestand entfernt (Bakterien, Viren) werden. Der Produzent von zertifiziertem Material wird von einer offiziellen Behörde überwacht und wird mindestens einmal pro Jahr zu einer angemessenen Zeit während der Produktion kontrolliert (Krczal, 1998). Die Regelungen gelten nicht nur für Zierpflanzen, die ins europäische Ausland exportiert werden sollen, sondern auch für die Pflanzen die innerhalb des jeweiligen Landes gehandelt werden. Material, welches aus Drittländern in die EG importiert wird, muß die gleichen Bedingungen erfüllen.

### 1.1.3. Kontrolle von Zierpflanzen mittels Zertifizierungsschemata

Die Forderung nach einer gesundheitlichen Überprüfung und Kontrolle von Pflanzenkulturen ist nicht neu. Bereits 1899 schlug Mangin als erster eine gesundheitliche Überprüfung von Pflanzenkulturen zur Kontrolle von Zierpflanzenkrankheiten vor. Es dauerte allerdings bis in die 40er Jahre dieses Jahrhunderts bis entsprechende Programme entwickelt wurden. Dimrock (1940) erarbeitete in den USA zum erstenmal ein Konzept zur kommerziellen Kontrolle von *Verticillium* in *Dendranthemum-Grandiflorum-Hybriden*<sup>1</sup>, welches damals die gefährlichste und am häufigsten auftretende Krankheit bei dieser Kultur war. Der Nutzen eines solchen Programms wurde als erstes von Mitarbeitern des Unternehmens Yoder Brothers Inc., FL, USA erkannt und in Folge nicht nur für Pilzerkrankungen, sondern auch für Virus- und Viroiderkrankungen bei *Dendranthemum* weiterentwickelt (Raju & Olson, 1985). Um Viruskrankheiten erfolgreich unter Kontrolle zu halten, sind verschiedene Punkte zu beachten bzw. durchzuführen (Lawson, 1981):

1. Die Pflanzenqualität muß verbessert werden, indem vorhandene Viren eliminiert und gesunde Pflanzen für die weitere vegetative Vermehrung selektiert werden (*candidate material*).
2. Da die meisten Viren durch Vektoren (Insekten, Milben, Nematoden oder Pilze) übertragen werden, müssen geeignete Maßnahmen ergriffen werden, die eine Übertragung durch die Vektoren unterbindet.
3. Geeignete Diagnoseverfahren müssen eingesetzt werden, die die Erkennung sowohl von symptomatischen als auch von latenten Virusinfektionen ermöglichen.

In Europa ist vor allem die EPPO betraut mit der Erstellung von vergleichbaren und kompatiblen Zertifizierungsschemata und Pflanzenkontrollsystemen für Pflanzenkulturen auf internationalem

---

<sup>1</sup> Botanische Pflanzennamen nach Encke et al., 1993.

Niveau mit dem Ziel, die Qualität von vermehrtem Pflanzenmaterial zu verbessern. Ein Ausschuß von Experten aus mehreren Mitgliedsländern arbeitet eng zusammen und erstellt die Schemata (diese werden den Regierungen der EPPO-Mitgliedstaaten vorgeschlagen, haben aber lediglich empfehlenden und keinen verpflichtenden Charakter). Zu den 34 EPPO-Mitgliedstaaten gehören aber nicht nur die EG-Mitglieder, sondern auch alle Mittelmeeranrainerstaaten wie z.B. Israel, welches eine wichtige Rolle im weltweiten Zierpflanzenhandel spielt. Seit Beginn der 90er Jahre wurden die Zertifizierungsschemata für verschiedene Zierpflanzenkulturen wie *Dendranthemum-Grandiflorum-Hybriden* (OEPP/EPPO, 1993a), *Dianthus* (OEPP/EPPO, 1991a), *Impatiens-Neu-Guinea-Hybriden*, *Narcissus* (OEPP/EPPO, 1993b) und *Pelargonium* (OEPP/EPPO 1992), um nur einige zu nennen, aufgestellt.

Das Hauptaugenmerk bei den Schemata liegt in der Kategorisierung der Pflanzenproduktion in Abhängigkeit von der Anzahl der Vermehrungsstufen, d. h. je niedriger die Vermehrungsstufe, desto höher ist der Qualitätsanspruch an das Pflanzenmaterial. Unterschieden werden die drei Kategorien: *nuclear stock*, *propagation stock* und *certified stock*. Diese Einteilung wird bei allen Zertifizierungsschemata beibehalten und wurde in einem allgemeinen Schema zur Zertifizierung vorgestellt (OEPP/EPPO, 1991b):

1. *Nuclear stock*: Die *Nuclear-stock*-Pflanzen bilden die höchste Kategorie im Zertifizierungsschema und besitzen den höchstmöglichen Gesundheitsstatus. Sie gehen aus *candidate material* hervor, welches auf die für die jeweilige Kultur definierten Pathogene in Einzelpflanzentests überprüft und für gesund befunden wurde und welches sich durch Sortenechtheit auszeichnet. Die Pflanzen des *nuclear stock* müssen von den beiden anderen Kategorien getrennt in einer geeigneten Umgebung (insektensichere Gewächshäuser oder *in vitro*) kultiviert werden. Aus der Vermehrung des *nuclear stock* hervorgegangene Pflanzen, die denselben Status erhalten sollen, müssen zuvor wieder einzeln getestet werden. *Nuclear stock*, der *in vitro* gehalten wird, behält seinen Status bei.
2. *Propagation stock*: Die Pflanzen des *propagation stock* bilden die zweite Kategorie und werden ebenfalls wie der *nuclear stock* auf verschiedene Schaderreger überprüft, jedoch nicht in einer Einzelpflanzentestung. Auch der *propagation stock* soll in einer insektensicheren Umgebung und von anderen nicht-zertifizierten Pflanzen getrennt kultiviert werden. Je nach Kultur ist nur eine bestimmte Anzahl von Generationen im *propagation stock* zulässig, wobei die vermehrten Pflanzen auch stichprobenartig überprüft werden müssen. Pflanzen, die mit Schaderregern infiziert sind, müssen eliminiert werden, sofern keine Behandlungsmöglichkeiten vorhanden sind. In einem weiteren Vermehrungsschritt geht aus dem *propagation stock* der *certified stock* hervor.
3. *Certified stock*: Der *certified stock* bildet den Mutterpflanzenbestand, von dem das Endprodukt, der unbewurzelte oder bewurzelte Steckling gewonnen wird an jede andere Gärtnerei verkauft

werden kann, die dann die Pflanze für den Endverkauf fertig. Auch im *certified stock* müssen stichprobenartige Kontrollen erfolgen (je nach Art), die aber weniger streng sind als beim *propagation stock*. Virus-infizierte Pflanzen müssen aus dem Bestand entfernt werden. Die Pflanzen sollten von den beiden anderen Kategorien oder nicht-zertifiziertem Material getrennt kultiviert werden.

Alle Bearbeitungsschritte sowie die Testergebnisse vom *candidate material* über den *nuclear stock* bis hin zum *certified stock* müssen dokumentiert und festgehalten werden und bei einer offiziellen Überprüfung durch die Pflanzenschutzdienste zur Verfügung stehen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Zertifizierungsschemata ist deshalb auch die Forderung, daß einzelne Pflanzen innerhalb des Systems jederzeit durch die Kategorien hindurch zur Ursprungspflanze im *nuclear stock* zurückverfolgt werden können. Dadurch ist es möglich, den Ursprung einer Krankheit ausfindig zu machen (Krczal, 1998).

#### 1.1.4. Zertifizierungsschemata - zwei Beispiele

##### 1.1.4.1. *Dendranthemum-Grandiflorum-Hybriden*

Das EPPO-Schema für *Dendranthemum-Grandiflorum-Hybriden* (OEPP/EPPO, 1993) verlangt eine Überprüfung des *candidate materials* auf *chrysanthemum virus B* (CVB), *tomato aspermy virus* (TAV), TSWV und *chrysanthemum stunt viroid* (CSVd). Dabei müssen alle Pflanzen, die in den *nuclear stock* aufgenommen werden sollen, getestet und frei von diesen Schaderregern sein. Das gleiche Testschema gilt für den *nuclear stock*. Für den *propagation stock* und den *certified stock* müssen Stichproben getestet werden (Mischproben sind möglich), wobei 0% des *propagation stock* und 1% des *certified stock* infiziert sein dürfen. Die infizierten Pflanzen müssen aus dem Bestand entfernt werden während die gesunden Pflanzen jedoch das Zertifikat erhalten. Die Testungen können mittels *double-antibody-sandwich-ELISA* (DAS-ELISA) bzw. Polyacrylamidgellelektrophorese (PAGE) im Falle von CSVd oder durch Übertragung auf Indikatorpflanzen (Biotest) durchgeführt werden (Tab. 1.1). Darüber hinaus sollten die Pflanzen visuell auf die in Tab. 9.1 für *Dendranthemum* aufgelisteten Schaderreger überprüft werden.

##### 1.1.4.2. *Dianthus*

Ähnlich sieht das Schema für *Dianthus* aus (OEPP/EPPO, 1991a). Das *candidate material* und der *nuclear stock* müssen auf die Viren *carnation etched ring virus* (CERV), *carnation latent virus* (CarLV), *carnation mottle virus* (CarMV), *carnation necrotic fleck virus* (CNFV), *carnation ringspot virus* (CRSV) und *carnation vein mottle virus* (CVMV) getestet werden. Das größte Problem bei den Nelkenviren verursacht das CarMV, da es oft in geringen Konzentrationen vorkommt. Deswegen sind ELISA-Tests alleine nicht zuverlässig genug und es sollten zusätzlich

Biotests durchgeführt werden, während bei den anderen Viren die eine oder die andere Methode ausreichend ist. Die Praxis hat aber auch gezeigt, daß Pflanzen, die aus Gewebekultur stammen und frei sind von CarMV, im allgemeinen auch die anderen Viren nicht mehr enthalten (Krczal, 1998). Deshalb ist eine stichprobenartige Überprüfung des *propagation stock* und *certified stock* im DAS-ELISA und Biotest nur für CarMV notwendig. Für die anderen Viren genügt eine visuelle Kontrolle. In den Niederlanden, wo die Zertifizierung für Nelken bereits durchgeführt wird, sind für den *nuclear stock* und den *propagation stock* 0% und für den *certified stock* 10% zulässig (Tab. 1.1) (Van Ruiten, 1988).

Da die Zertifizierungsschemata nach einem allgemeinen Schema (OEPP/EPPO, 1991b) aufgebaut sind, ist es auch möglich, daß Produktionsbetriebe in Zusammenarbeit mit den nationalen Behörden für andere Kulturen, bei denen ein Zertifizierungsschema noch nicht vorliegt, ein vergleichbares und kompatibles Schema ausarbeiten. Dies wurde z.B. für stecklingsvermehrte Petunien und Verbänen in den Niederlanden durchgeführt. Auf Grund von erheblichen Virusproblemen in den beiden Kulturen in der Saison 1994/95 war ein Zertifizierungskonzept und die schnelle Ein- und Durchführung dieser Kontrollen unerlässlich. Die niederländischen Produzenten haben in Zusammenarbeit mit der NAKB (*Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor Bloemisterij- en Boomkwekerijgewassen*) ein Konzept erarbeitet, welches in der folgenden Saison zur Auslieferung von virus-freiem Ausgangsmaterial führte. Dieses Beispiel zeigt, welche Vorteile die Produzenten durch die Umstellung der Produktion zur Verbesserung des Qualitätszustandes der Zierpflanzen sowie durch strenge Kontrollen von außerhalb erreichen.

## **1.2. Taxonomie und Evolution der Viren**

Der Begriff Virus beschreibt eine große Bandbreite von einfachen nicht-selbständigen Organismen, die für ihre Reproduktion auf ihre Wirte angewiesen sind (Garnett & Antia, 1994). Sowohl eine Evolutionsbiologie als auch eine Taxonomie der Viren gestaltet sich aber als schwierig, da zur Betrachtung und Einordnung von Viren, vor allem solchen mit RNA-Genomen, Informationen zur Verfügung stehen, die sich erheblich von denen höherer Organismen unterscheiden. Im Gegensatz zu höheren Organismen sind phänotypische Merkmale, die in der Evolutionsbiologie und der Taxonomie eine große Rolle spielen, bei Viren limitiert. Darüber hinaus hinterlassen sie als obligate intrazelluläre Parasiten keine "fossilen Spuren", so daß die für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung stehenden Virusisolate nicht älter als 80 Jahre sind. Aus diesen Gründen war lange umstritten, ob die auf Darwin basierende Evolutionstheorie überhaupt auf Viren angewendet werden kann. Diese Schwierigkeiten spiegeln sich auch in einer Aussage Bawdens (1953) wider (Morse, 1994): „*We are in a post-Darwinian era, but our relevant knowledge of viruses is in the pre-Linnaean stage of knowledge on plants and animals*“.