

Infektion werden die morphologischen Unterschiede im Infektionsablauf ausgeschaltet; auch ist es denkbar, daß die Sorten Unterschiede in der Reproduktion des *Septoria*-Erregers besitzen, die in der Prüfung mit künstlicher Infektion nicht erfaßt werden. Erst mit Hilfe der Parathion-Spritzung ist ein Vergleich natürlich infizierter mit gesunden Pflanzen möglich.

Zusammenfassung

In zweijährigen Freiland-Versuchen bei S-Weizen Kolibri zeigte das Insektizid E 605 forte (Parathion-äthyl) eine statistisch gesicherte Wirkung gegen den pilzlichen Parasiten *Septoria nodorum*. Auf Grund der bisherigen Erfahrungen verspricht die Anwendung des Mittels im Zeitraum von Mitte des Schossens bis Erscheinen des Fahnenblatts bei einer Aufwandmenge von 1 l/ha Erfolg. Weitere Versuche sind erforderlich, um die Wirkung bei verschiedenen Sorten zu prüfen, die Grenzen des Anwendungszeitraumes festzulegen und die geringste noch wirksame Aufwandmenge zu ermitteln.

Bei der dargestellten *Septoria*-Wirkung handelt es sich vermutlich nicht um die spezifische Wirkung des Präparats E 605 forte, sondern um die einer Gruppe von Phosphorsäureestern. Offenbar wird in der Weizenpflanze eine Resistenz induziert, die die Sporenbildung des pilzlichen Parasiten hemmt.

Summary

In field experiments over two years with spring wheat Kolibri the insecticide E 605 forte (parathion-äthyl) revealed a significant effect against the fungus *Septoria nodorum*. According to the experiences so far good results may be achieved by application of E 605 in the interval from the middle of shooting to the emergence of the flag leaf at a dosage of 1 l/ha. Further trials are necessary to investigate the effect in different varieties, to limit the space of time being available and to find out the lowest effective dosage.

It is suggested that the *Septoria*-effect is specific not only for E 605 forte, but for a group of phosphorus compounds.

Obviously in the wheat plant a resistance is induced, which stops spore production of the fungal parasite.

Literatur

- Courtillet, M. und Gondran, J. (1970): Traitements chimiques contre la rouille couronnée. VII^e Congrès International de la Protection des Plantes, Paris 1970. Résumés des Communications 250-252.
- Kees, H. (1971): E 605 gegen *Septoria nodorum*? Ges. Pflanzen 23, 77-80, 82.
- Kiewnick, L. und Rademacher, B. (1963): Beobachtungen über den Befall des Winterweizens mit *Septoria nodorum* Berk. nach Anwendung von Kalkstickstoff und Fungiziden. Z. Pfl.krankh. u. Pflanzenschutz 70, 273-279.
- Fleischmann, G., Martens, J. W. und McKenzie, R. I. H. (1968): Parathion, a selective rust fungicide, compared with maneb in the control of cereal rusts. Can. J. Plant Sci. 48, 261-265.
- Scheinpflug, H. und Jung, H. F. (1968): Die Verwendung von organischen Phosphorverbindungen zur Bekämpfung von pilzlichen Krankheitserregern bei Kulturpflanzen. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 21, 79-91.
- Simons, M. D. und Browning, J. A. (1970): Differential sensitivity to parathion of certain crown rust-oat cultivar interactions. Plant Dis. Repr. 54, 807-809.
- Wenzl, H., Graf, A., Meinx, R. und Krexner, R. (1955): Über die Wirkung des innertherapeutischen Insektizids Systox gegen *Cercospora beticola* an Rübe. Pflanzenschutzber. 14, 65-75.

Anmerkung der Abteilung für Pflanzenschutzmittel und -geräte der Biologischen Bundesanstalt zu vorstehendem Artikel

Auf der Sitzung des Sachverständigenausschusses für die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln - Fachgruppe „Allgemeiner Pflanzenschutz“ - im Dezember 1971 in Braunschweig wurden wegen der möglichen Umweltgefährdung schwerwiegende Bedenken gegen eine Zulassung parathionhaltiger Präparate gegen „*Septoria*-Arten in Getreide“ erhoben. Aus diesem Grunde wurde die Beurteilung der Wirksamkeit parathionhaltiger Präparate in dieser Indikation zurückgestellt.

Orth, Vorsitzender des Sachverständigenausschusses

Serologischer Reihentest auf Befall mit *Prunus necrotic ring spot virus* zum Nachweis der Stecklenberger Krankheit

Von Rudolf Casper und Ludwig Kunze, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Virusserologie, Braunschweig, und Institut für Obstkrankheiten, Dossenheim üb. Heidelberg

[Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 24, 1972, 20-24]

Die Stecklenberger Krankheit ist in Deutschland die wichtigste Virose der Sauerkirsche. Sie wird hervorgerufen durch das *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRV), das bei allen Steinobstarten auftritt. Das Virus kann durch den Pollen auf gesunde, fruchtende Bäume übertragen werden (George and Davidson, 1963, 1964) und breitet sich in den Sauerkirschenanlagen auf natürlichem Wege aus (Davidson and George, 1964; Schuch, Mischke und Kunze, 1967). Außerdem kann es mit dem Samen auch auf die Sämlingsnachkommen übergehen.

Die Stecklenberger Krankheit der Sauerkirsche beginnt meist mit einem Schock, der besonders deutlich bei der Sorte 'Schattenmorelle' ausgeprägt ist. Bei neu erkrankten Bäumen sind die Blüten meist klein und kurz gestielt oder bleiben in den Knospenschuppen stecken. Dementsprechend sinkt der Ertrag auf etwa ¼ einer normalen Ernte. In den nächsten Jahren folgt dann in der Regel eine deutliche Erholung. Die Blüten

sind wieder normal und nur an einigen Zweigen treten feine Blattsprengelungen oder einzelne Blattenationen auf, die aber auch fehlen können. Trotzdem bleibt der Ertrag im Durchschnitt um 35% niedriger als bei gesunden Bäumen (Kunze, 1969).

Die natürliche Ausbreitung der Krankheit erfolgt ziemlich rasch. So stieg z. B. in einer regelmäßig überprüften Schattenmorellenanlage mit über 400 Bäumen der Anteil der befallenen Bäume von 1,5% im 5. Standjahr auf 68% im 11. Standjahr (Kunze, 1969). Es ist daher anzunehmen, daß in älteren Sauerkirschenanlagen die Erträge durch die Stecklenberger Krankheit erheblich gemindert werden. Eine wesentliche Voraussetzung für eine Verbesserung der Situation ist die Aufpflanzung geschlossener Neuanlagen aus gesundem Material, getrennt von den alten Beständen. Hierbei müßten die Jungbäume nicht nur von getesteten Reiser- und Unterlagen-Mutterpflanzen abstammen, sondern auch regelmäßig auf Neuinfektionen überprüft werden, um

einen massierten Einbruch der Stecklenberger Krankheit möglichst lange hinausschieben zu können und damit die Rentabilität der Anlage zu erhöhen.

Für die Testung auf PNRV stehen mehrere holzige Indikatoren zur Verfügung. Als besonders geeignet erwies sich die Zierkirschensorte *Prunus serrulata* 'Shirofugen', die mit einer lokalen Überempfindlichkeitsreaktion auf das PNRV (und das prune dwarf virus) anspricht. Es lassen sich daher etwa 12–20 Tests auf einem mehrjährigen 'Shirofugen'-Busch durchführen. Im Vergleich mit anderen Freilandtests erfolgt die Reaktion relativ schnell, trotzdem dauert der Test immerhin 5–6 Wochen. Von besonderem Interesse waren daher die Arbeiten von van Regenmortel und Engelbrecht (1962) und Schade (1967), bei denen serologische Verfahren zur Prüfung verschiedener *Prunus*-Arten auf PNRV-Befall verwendet wurden. Der von Schade (1967) angewandte Test brachte so gute Ergebnisse, daß er als „Vortest“ zur Aussonderung PNRV-befallener Pflanzen vor der Durchführung arbeits- und zeitaufwendiger anderer Testmethoden verwendet werden konnte.

Das Verfahren von Schade (1967) wurde von Casper, Albrechtova und Schulze (1971) modifiziert. Im Hinblick auf Reihentests in größerem Umfang wurde dabei besonderer Wert auf eine möglichst einfache Methode gelegt, die keine speziellen serologischen Kenntnisse erfordert. Wie die nachfolgend geschilderten Untersuchungen zeigen, kann dieses zeitsparende Verfahren mit genügender Sicherheit für den Nachweis der Stecklenberger Krankheit bei Sauerkirschen eingesetzt werden.

Material und Methode

Die serologischen Tests wurden in vier Versuchsreihen durchgeführt. Es wurden untersucht:

1. 12 Sauerkirschenbäume mit je 4 Proben, die jeweils aus dem nördlichen, östlichen, südlichen und westlichen Teil der Krone entnommen worden waren.
2. 190 Sauerkirschenbäume mit je 1 Mischprobe aus dem gesamten Kronenbereich.
3. Einige Apfel-, Myrobalanen-, Pfirsich- und Vogelkirschenbäume mit je einer Mischprobe.
4. 15 Sauerkirschenbäume mit jeweils mehreren Mischproben, die zu verschiedenen Zeiten entnommen worden waren.

Jede Probe bestand aus 5 Reisern.

Bei den Bäumen der Versuchsreihen 1 und 2 handelt es sich um 'Schattenmorellen' aus einer Anlage im Rhein-Main-Gebiet, die seit 1962 vom Institut für Obstkrankheiten regelmäßig auf Befall mit Stecklenberger Krankheit untersucht wird. Die Bäume sind in den vergangenen Jahren wiederholt mit der Zierkirschensorte 'Shirofugen' getestet worden. Es war daher bekannt, ob und wie lange die einzelnen Bäume bereits erkrankt waren. Für die serologischen Untersuchungen wurden die Reiser Mitte März 1971 geschnitten und zunächst kühl aufbewahrt. Ende März wurden sie dann im Gewächshaus bei etwa 22°C für 5–6 Tage angetrieben, bis die Blütenknospen so weit angeschwollen waren, daß sie nur noch zur Hälfte oder zu einem Drittel von den braunen Knospenschuppen bedeckt wurden. Zum gleichen Zeitpunkt wurden in den Terminalknospen die Spitzen der einzelnen Blättchen sichtbar (Abb. 1). In diesem Stadium, das dem Stadium III–IV in der Veröffentlichung von Schade (1967) entspricht, wurden dann von jeder Probe etwa 25 Knospen (zum großen Teil Blütenknospen) für die serologische Untersuchung entnommen, die in der Zeit vom 30. 3. – 2. 4. 1971 erfolgte.

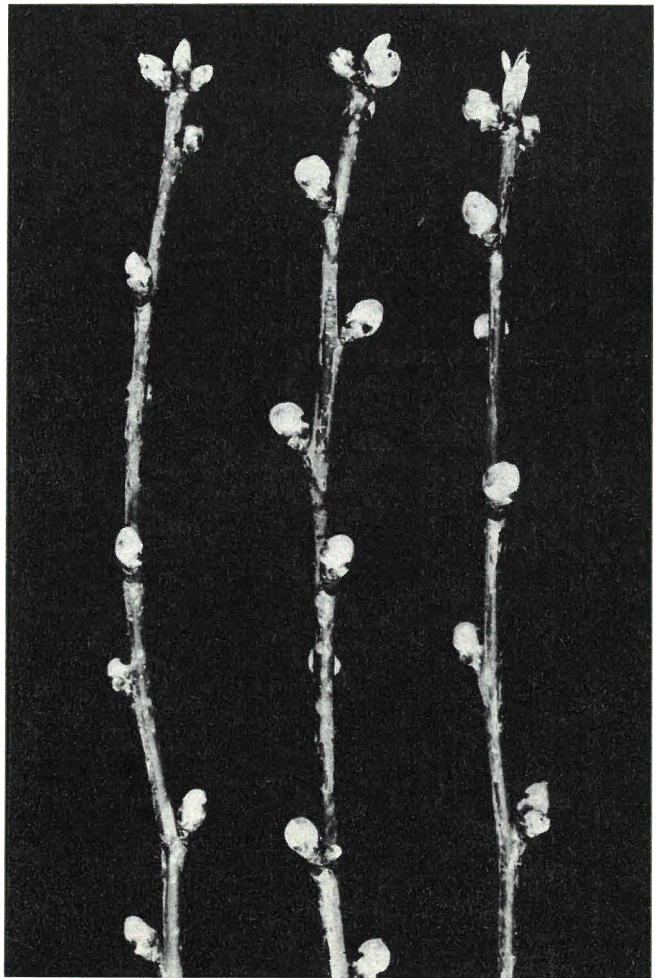


Abb. 1. Entwicklungsstadium der Blütenknospen bei vorgetriebenen Sauerkirschenreisern zum Zeitpunkt der serologischen Prüfung.

Die Reiser der Versuchsreihe 3 stammten von Pflanzen auf dem Versuchsfeld des Instituts für Obstkrankheiten in Dossenheim, die durch Pfropfung mit verschiedenen Obstviren infiziert worden waren. Die Reiser wurden am 1. 4. 1971 geschnitten und nach kurzfristigem Vortreiben einige Tage später untersucht.

Für die Versuchsreihe 4 wurden Bäume der Sorte 'Schattenmorelle' aus einer Anlage in Veltheim/Ohe bei Braunschweig ausgewählt. Hier wurden die Reiser während und nach dem natürlichen Knospenaustrieb geschnitten, und zwar erstmalig am 20. 4. 1971, und dann weiterhin im Abstand von 6–9 Tagen bis zum 26. 5. 1971.

Der serologische Test wurde in Anlehnung an das Gelddiffusionsverfahren von Ouchterlony (1958) in folgender Weise durchgeführt:

In Plastik-Petrischalen (Wegwerfeschalen) oder silikonisierte Petrischalen aus Glas wird heißer Agar (0,7% Agar in 0,02 M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,0, mit 0,05% Natriumazid „Merck“) bis zu einer Schichtdicke von 2 mm gegossen. Die Glasschalen werden silikonisiert, indem man sie mit Silikonlösung (Serva, Heidelberg) benetzt und den entstandenen Film bei 100°C eine Stunde lang einbrennen läßt. In silikonisierten Petrischalen wird durch die bessere Haftung des Agars am Schalenboden ein Unterwandern des Agars durch Serum oder Rohsaft vermieden. Der Zusatz von Natriumazid als Konservierungsmittel ermöglicht monatelanges Aufbewahren der Schalen mit dem Agartest. Zweckmäßigerweise sollte dies im Kühlschrank ge-

schehen, um ein zu starkes Eintrocknen des Agars zu verhindern.

Die Agarplatten bleiben nach dem Erkalten des Agars zur Härtung der Oberfläche eine Stunde offen stehen. Zur Aufnahme des Blattpreßsaftes und des Antiserums werden Sätze von je vier Löchern mit einem Stempel aus Messingrohr in der aus Abb. 2 ersichtlichen Anordnung in den Agar gestanzt. Die Löcher haben einen Durchmesser von 3 mm und einen Abstand vom mittleren Loch von 3 mm. Mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pipette wird der Agar aus diesen Löchern gesaugt. Je nach Größe der Petrischale können sechs oder mehr solcher Sätze in eine Petrischale gestanzt werden.

Zur Gewinnung des Blattrohsaftes werden ungefähr 2 g Blatt- bzw. Knospenmaterial mit bis zu 1,5 ml Stabilisierungsgemisch grob gemörsert. Das Stabilisierungsgemisch besteht aus 0,02 M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 8,0, 1% Coffein, 0,2% Ascorbinsäure und 0,2% Natriumsulfit (Casper et al., 1971). Braune Knospenschuppen stören den Test nicht, sie müssen daher nicht entfernt werden. Der entstandene Brei, der noch nicht zerriebene Blattstücke enthalten darf, wird zwischen einer Lage Mull in der Quetschzange entsaftet. Dieser sehr stark getrübe Saft (Rohsaft) wird unzentrifugiert sofort für den Test verwendet.

Beim serologischen Test auf PNRV müssen Antigen und Antiserum in Konzentrationen vorliegen, die einen günstigen Bereich der Äquivalenzzone erfassen. Da die Konzentration des PNRV im Pflanzensaft meist gering ist, muß das Antiserum stark verdünnt werden, um auch eine entsprechend niedrige Antikörperkonzentration zu erhalten. Zur Verdünnung wird eine 0,9%ige Kochsalzlösung verwendet, die mit Phosphatpuffer auf pH 7,0 eingestellt ist und 0,05% Natriumazid „Merck“ enthält. Durch den Natriumazidzusatz sind die Serumverdünnungen ohne Aktivitätsverlust mehrere Wochen haltbar. In unseren Versuchen erhielten wir deutliche Reaktionen mit scharfen Präzipitationslinien, wenn das Antiserum auf den Endtiter bzw. ein bis zwei Stufen davor verdünnt wurde. Verwendet wurden dabei Seren mit Titern zwischen 1 : 32 und 1 : 1024.

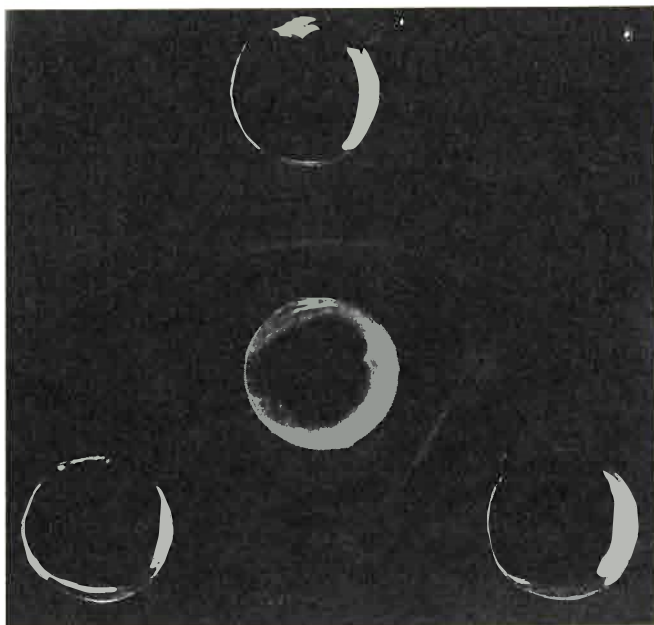


Abb. 2. Agargeltest zum PNRV-Nachweis im Preßsaft von Sauerkirschknospen. Zentrales Agarloch: Preßsaft aus Knospen von Sauerkirschreisern mit Zusatz von Stabilisierungsgemisch. Oberes Agarloch: PNRV-Antiserum (Titer: 1 : 256) 64fach verdünnt. Unteres rechtes Agarloch: PNRV-Antiserum 128fach verd. Unteres linkes Agarloch: PNRV-Antiserum 256fach verd.

Das aus Abb. 2 ersichtliche Lochmuster läßt sich in zwei verschiedenen Anordnungen für den Test benutzen:

- In das mittlere Loch wird der konzentrierte Rohsaft und in die drei äußeren das Antiserum in drei verschiedenen Verdünnungen getropft (Abb. 2) und dann in gleicher Anordnung in einem zweiten Lochmuster eine Verdünnung des Rohsaftes 1 : 2 (1 Teil Rohsaft + 1 Teil Stabilisierungsgemisch) mit den gleichen Antiserumverdünnungen wie im ersten Ansatz getestet.
- In das mittlere Loch wird das verdünnte Antiserum gegeben und drei Verdünnungsstufen des Rohsaftes in die äußeren Löcher; in einem zweiten Lochmuster wird dann eine weitere Verdünnungsstufe des Serums mit den drei Verdünnungsstufen des Rohsaftes getestet.

Kontrolltests, z. B. mit Rohsaft von garantiert gesunden Pflanzen oder mit Kaninchennormalserum sind nicht für jede Probe erforderlich, wenn in ihrem Testverhalten bekannte Antiseren und Rohsäfte für einen Reihentest verwendet werden.

Die Agarplatten mit den eingefüllten Testlösungen bleiben über Nacht bei Zimmertemperatur stehen und werden am nächsten Morgen bonitiert. Im Fall einer positiven Reaktion treten zwischen den Antiserumlöchern und dem Rohsaftloch weiße Präzipitationslinien auf, die im schrägeinfallenden Licht vor dunklem Hintergrund sichtbar sind. 24 Stunden nach der ersten Bonitierung kann noch einmal eine Nachkontrolle erfolgen, die aber in unseren Versuchen keine Veränderung der Ergebnisse brachte. Der von uns gewählte 3-mm-Abstand zwischen den Löchern ist für die Zuverlässigkeit des Tests sehr wichtig, weil dadurch die Diffusionswege des Antiserums und des Antigens kurz sind und daher das instabile PNRV nach kurzer Zeit auf die Antikörper trifft und präzipitiert wird (Casper et al., 1971).

Zur Kontrolle der serologischen Tests wurde in unseren Versuchen bei einem großen Teil der Proben der Versuchsreihen 1 und 2 der getestete Rohsaft auf Gurken im Keimblattstadium abgerieben. Alle Bäume dieser beiden Gruppen, die nach den Ergebnissen des serologischen Tests gesund waren, wurden außerdem während der Blüte auf Virusbefall bonitiert und anschließend nochmals mit dem Shirofugen-Test überprüft.

Ergebnisse

Alle 12 Sauerkirschenbäume der 1. Versuchsreihe waren bereits in den vorangegangenen Jahren als befallen erkannt worden. Durch die Probenentnahme aus vier verschiedenen Sektoren der Krone sollte zunächst geklärt werden, ob die Viruskonzentration im gesamten Kronenbereich hoch genug für einen serologischen Nachweis ist oder ob starke Konzentrationsunterschiede vorliegen. In dieser Versuchsreihe konnte das PNRV in allen 48 Proben serologisch erfaßt werden, wobei zwischen den verschiedenen Kronensektoren desselben Baumes lediglich geringe graduelle Unterschiede in der Reaktionsstärke auftraten. Auch die Testung auf Gurken verlief in allen Fällen positiv.

Die Sicherheit des serologischen Nachweises mit nur einer Mischprobe je Baum wurde in der 2. Versuchsreihe geprüft, die 190 Sauerkirschenbäume umfaßte. Diese Bäume wurden bereits seit 1962 unter Anwendung des Shirofugen-Tests auf Befall mit Stecklenberger Krankheit kontrolliert. Unter ihnen befanden sich 154 Bäume, die in der Zeit von 1962 bis 1970 erkrankt waren. Sie konnten im serologischen Test alle einwandfrei ermittelt werden (Tabelle 1). Auch der Gurkentest, der in 42 Fällen durchgeführt wurde, brachte stets posi-

Tabelle 1

Ergebnis des serologischen Tests auf PNRV-Befall bei 190 Sauerkirschen (Versuchsreihe 2).

	Gesamtzahl der Bäume	Serologischer Test	
		+	-
A. Erkrankt 1962-1970	154	154	0
Neuerkrankt 1971 (lt. Blütenbonitierung)	21	10	11
Ohne Befund im Shirofugen-Test	15	0	15
B. Neuerkrankt 1971 mit Blütensymptomen an			
mehr als 50% der Krone	8	8	0
40-50% der Krone	5	2	3
weniger als 40% der Krone	8	0	8

tive Ergebnisse. Von den übrigen 36 Bäumen, die nach den Ergebnissen des Shirofugen-Tests von 1970 noch als gesund galten, zeigten 21 bei der Blütenbonitierung am 27. 4. 1971 Neubefall. In 10 Fällen konnte dieser Neubefall bereits 4 Wochen vorher serologisch nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um Bäume, die Ende April an 40-100% der Blüten typische PNRV-Symptome aufwiesen. Die übrigen 11 neuerkrankten Bäume, die Ende März im serologischen Test noch keine Reaktionen auslösten, entwickelten dagegen Ende April nur an 10-50% der Blüten Symptome. Ein Shirofugen-Test, der unmittelbar nach der Blüte durchgeführt wurde, verlief bei diesen Bäumen positiv und wies nur noch 15 der insgesamt 190 Bäume als gesund aus. Bei den neuerkrankten Bäumen wurde allerdings auch im Shirofugen-Test häufig nur ein Teilbefall festgestellt. Da die Reiser für die serologische Untersuchung bereits 5-6 Wochen vor der Blüte geschnitten wurden, war offenbar bei den neuerkrankten Bäumen die Virusverteilung z. T. noch zu ungleichmäßig für eine sichere Diagnose. Dementsprechend hing bei Bäumen, die zur Blüte einen Befall der Krone bis zu 50% aufwiesen, das Testergebnis davon ab, ob zufällig mehr kranke oder mehr gesunde Reiser in der Mischprobe enthalten waren. Dies wurde auch durch den parallelen Gurkentest bestätigt, der in allen Fällen zu den gleichen Resultaten führte wie die serologische Prüfung.

Insgesamt gesehen bewährte sich in dieser Versuchsreihe mit einer Mischprobe je Baum der serologische Test sehr gut. Ende März durchgeführt, erfaßte er zuverlässig alle Bäume, die seit mehreren Jahren infiziert waren, und neuerkrankte Bäume, deren Krone zu mehr als 50% befallen war. Ein geringerer Teilbefall der Krone ließ sich jedoch in der Regel erst durch die Blütenbonitierung feststellen, also zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits wieder neue Infektionen über den Pollen erfolgen konnten. Hierauf wird in der Diskussion noch näher eingegangen.

Um zu prüfen, ob das von uns verwendete Serum nur mit dem PNRV reagiert, wurden in der 3. Versuchsreihe 11 Bäume verschiedener Obstarten untersucht, die mit verschiedenen Viren infiziert waren, sowie 7 Kontrollpflanzen. Eindeutig positive Reaktionen traten nur bei den Proben von einer Myrobalane (*Prunus cerasifera*) und einer Vogelkirsche (*P. avium*) auf, die vom PNRV befallen waren. Eine schwach positive Reaktion zeigte die Probe von einem Apfel mit Apfelmosaik. Da das Apfelmosaikvirus ein Stamm des PNRV ist, war dieser Befund, der auf einer serologischen Verwandtschaft beruht, zu erwarten. Infektionen mit Pflaumenbandmosaik (3 Myrobalanen) oder prune dwarf virus (1 Pfirsich,

4 Vogelkirschen) lösten ebenso wie die gesunden Kontrollpflanzen - 1 Apfel, 3 Myrobalanen, 1 Pfirsich, 2 Vogelkirschen - keine Reaktion aus.

In den Versuchsreihen 1-3 wurden stets Reiser untersucht, die zumindest für kurze Zeit im Gewächshaus vorgetrieben worden waren. Da sich der serologische Test in diesen Versuchsreihen bewährt hatte, sollte auch seine Brauchbarkeit bei im Freiland ausgetriebenen Knospen überprüft werden. Die 15 Sauerkirschenbäume dieser 4. Versuchsreihe wurden erstmals am 20. 4. 1971 getestet. Die verwendeten Knospen waren aufgebrochen und zeigten die Blattspitzen. In vorbereitete Gläser, die 1,5 ml Stabilisierungsgemisch enthielten, wurden je 25 Knospen (= ca. 2 g) Untersuchungsmaterial direkt vom Baum gegeben und wenige Stunden später im serologischen Test geprüft. 13 der getesteten 15 Bäume lösten eine positive Reaktion aus. Am 26. 4. 1971 wurden die gleichen Bäume erneut getestet. Die Blätter hatten sich noch nicht voll entfaltet, an den Spitzen der Blütenknospen waren jedoch bereits die weißen Blumenkronenblätter sichtbar. Blattknospen und Blütenknospen wurden getrennt getestet. Wiederum zeigten die gleichen 13 Bäume eine positive Reaktion, und zwar sowohl die Blatt- als auch die Blütenknospen ohne graduelle Unterschiede.

Am 5. 5. 1971 wurden junge, 2-3 cm große Blätter und Blüten ohne Knospenschuppen erneut getrennt getestet. Je 2 g Testmaterial wurden mit nur 1 ml Stabilisierungsgemisch versetzt, das eine höhere Konzentration besaß, nämlich 0,03 M Phosphatpuffer, pH 8,0 mit 0,3% Ascorbinsäure, 0,3% Natriumsulfit und 1,5% Coffein. Die Blattproben reagierten bei den 13 Bäumen wiederum deutlich positiv, die Blütenproben dagegen nur schwach positiv bzw. bei 7 Bäumen gar nicht.

Am 12. 5. 1971 wurden Blattproben getestet, die aus nicht ganz entfalteteten bis voll entwickelten, 4-6 cm langen Blättern bestanden. Einem eventuellen Abfall der Viruskonzentration in diesem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium versuchten wir entgegenzuwirken, indem wir bei den Proben von 5 Bäumen die Agarlöcher für den Rohsaft zweimal im Abstand von ungefähr einer Stunde füllten. Diese Proben ergaben, bis auf eine gesunde, deutlich positive Reaktionen. Die Proben der 9 anderen Bäume (eine Probe von einem gesunden Baum ging verloren) wurden in der üblichen Weise untersucht. Sie reagierten nur in acht Fällen - und dabei zum Teil sehr schwach - positiv. Zu diesem Zeitpunkt wurde also der serologische Test in der bisher angewandten Form zu unsicher. Wir dürfen aber annehmen, daß zumindest die schwach reagierenden Proben bei zweimaligem Füllen der Rohsaftlöcher eindeutig positive Resultate erbracht hätten.

In weiteren Tests am 21., 25. und 26. 5. 1971 zeigte sich, daß mit fortschreitender Jahreszeit sowohl der serologische Test als auch der Gurkentest an Zuverlässigkeit stark abnahmen. Ab Mitte Mai wurde es zunehmend schwieriger, Rohsaft aus den Kirschblättern zu gewinnen, da die Blätter zu viel Schleimstoffe enthielten. Der schleimige Rohsaft ließ sich entweder gar nicht oder nur unter Schwierigkeiten in die Agarlöcher pipettieren. Da er auch nach 24 Stunden nicht völlig in den Agar eindiffundiert war, dürfte schon durch diesen Umstand der Abfall der Zuverlässigkeit des serologischen Tests zumindest teilweise zu erklären sein.

Diskussion

Die von uns durchgeführten Versuche dienen der Erprobung des serologischen PNRV-Nachweises als Testverfahren zum Nachweis der Stecklenberger Krankheit. Bereits 1967 hatte Schade eine serologische Prüfung auf PNRV als Vortest für die Auswahl gesunder Mutterpflanzen bei Sauerkirschen und Pflaumen

empfohlen. Wir haben für unsere Versuche das von Schade angewandte Verfahren modifiziert und konnten damit in den Versuchsreihen 1 und 2 sehr gute Testergebnisse bei Sauerkirschen erzielen. Bei der Kontrolle der Zuverlässigkeit des serologischen Tests begnügten wir uns nicht mit einem parallelen Gurkentest, sondern überprüften alle Bäume mit negativem Befund auch noch durch eine Blütenbonitierung und anschließenden Shirofugen-Test. Hierdurch konnten wir feststellen, daß Ende März/Anfang April sowohl im Serumtest als auch im Gurkentest neubefallene Sauerkirschenbäume nur dann sicher erkannt werden, wenn das Virus bereits mehr als 50% der Krone erfaßt hat.

Die vollständige Erfassung aller PNRV-Infektionen bei tragenden Steinobstbäumen ist allerdings ein Problem, das auch bei den anderen bekannten Testverfahren auftritt. Da das Virus pollenübertragbar ist, sind jedes Jahr Neuinfektionen während der Blüte möglich. Sie lassen sich aber im Shirofugen-Test des gleichen Jahres noch nicht nachweisen. Es ist deshalb bereits ein Fortschritt, wenn durch den Serumtest wenigstens ein Teil der neuerkrankten Bäume schon vor der nächsten Blüte ermittelt werden kann. Um mit Sicherheit Vermehrungsmaterial ohne Stecklenberger Krankheit aus einer tragenden Anlage zu erhalten, ist ein doppelter Test notwendig. Durch einen Massentest der Anlage werden zunächst Bäume ermittelt, die für eine Vermehrung geeignet sind. Von diesen Bäumen werden dann Reiser oder Augen auf einige gesunde Unterlagen veredelt, um spätere Infektionen über die Blüte zu verhindern. Die herangezogenen Jungpflanzen, die das Ausgangsmaterial für die weitere Vermehrung darstellen, müssen dann noch einmal getestet werden.

Unter Berücksichtigung dieser Umstände hat sich der serologische PNRV-Nachweis im März oder April bei Sauerkirschen als so zuverlässig erwiesen, daß er als Vortest auf Stecklenberger Krankheit in die Richtlinien zur Anzucht von virusgetesteten Obstgehölzen (Biologische Bundesanstalt 1967) aufgenommen werden sollte. Da genügend PNRV-Antiserum zur Abgabe an die Pflanzenschutzämter zur Verfügung steht, sollte dieses einfache, zeit- und raumsparende Verfahren so bald wie möglich angewandt werden.

Abweichend von den Angaben von Schade (1967) führte in unseren Versuchen die Verwendung von Knospen- und Blattmaterial, das unter natürlichen Bedingungen im Freiland ausgetrieben war, ebenfalls zu befriedigenden Ergebnissen im Serumtest (Versuchsreihe 4). Es wird aber noch zu prüfen sein, ob wegen des relativ warmen Aprils im Jahre 1971 besonders günstige klimatische Bedingungen vorlagen oder ob die Veränderungen im Testverfahren zu diesen Ergebnissen führten.

Nach den Berichten anderer Autoren ist der serologische PNRV-Nachweis auch bei anderen Steinobstarten ohne Schwierigkeiten möglich. Eigene Voruntersuchungen (Versuchsreihe 3) sprechen ebenfalls dafür. Damit wären für den serologischen Serientest auf PNRV drei Einsatzmöglichkeiten gegeben:

1. Als Vortest bei der Auswahl gesunder Mutterpflanzen für die weitere Vermehrung.
2. Als Stichprobentest bei der Überwachung von Baumschulpflanzen und Jungbäumen.
3. Als regelmäßige Kontrolle auf Neuinfektionen über den Pollen in virusgetesteten Muttergärten und Samenspenderanlagen.

Gerade für den letztgenannten Fall wäre ein einfacher serologischer Test auf PNRV von großem Interesse, weil dieses Virus viel häufiger mit dem Pollen übertragen wird als das ebenfalls pollenübertragbare prune dwarf virus.

Sauerkirschenbäume, die von der Stecklenberger Krankheit befallen waren, wurden mit dem serologischen Test untersucht. Der Test wurde im März/April mit Knospenmaterial von im Gewächshaus vorgetriebenen Reisern durchgeführt. Im Freien unter natürlichen Bedingungen ausgetriebene Knospen wurden im Mai geprüft. Bei serienmäßiger Anwendung wurden mit dem serologischen Test aus einer Gesamtzahl von 190 Bäumen zuverlässig alle vom Prunus necrotic ring spot virus infizierten Bäume erkannt, sofern mehr als 50% der Baumkrone befallen waren. Erst zum Teil erkrankte Bäume wurden im serologischen Test nur erfaßt, wenn zufällig genügend Reiser aus dem befallenen Kronenteil entnommen wurden.

Mit dem Abreibetest auf Gurkenkeimblättern durchgeführte Vergleiche ergaben völlige Übereinstimmung der Ergebnisse. Durch Blütensymptome erkannter Teilbefall wurde durch Shirofugentest nach der Blüte bestätigt.

Die Testmethode wird mit Einzelheiten beschrieben. Es wird vorgeschlagen, diese Methode als Vortest in die Richtlinien zur Anzucht von virusgetesteten Obstgehölzen aufzunehmen.

Summary

Forced buds of *Prunus cerasus* L. (190 trees) have been tested for PNRV (Stecklenberg disease) with the serological agar test. All diseased trees were identified with high reliability, if more than 50% of the tree were infected. The results were in agreement with the results obtained in the infectivity test on cucumber cotyledons.

Details about the method are given. It is proposed to use the serological method for indexing of nursery trees.

Literatur

- Biologische Bundesanstalt: Richtlinien zur Anzucht von virusgetesteten Obstgehölzen. I. Testverfahren. – Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **19**, 1967, 66–73.
- Casper, R., Albrechtova, L. und Schulze, E.: Untersuchungen über das *Prunus necrotic ring spot virus*: Partielle Reinigung des Antigens, Antiserumherstellung und serologischer Test. – *Phytopath. Z.* **72**, 1971, 225–234.
- Davidson, T. R. and George, J. A.: Spread of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses in Niagara Peninsula orchards. – *Canad. J. Plant. Sci.* **44**, 1964, 471–484.
- George, J. A. and Davidson, T. R.: Pollen transmission of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses from tree to tree. – *Canad. J. Plant Sci.* **43**, 1963, 276–288.
- George, J. A. and Davidson, T. R.: Further evidence of pollen transmission of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses in sour cherry. – *Canad. J. Plant Sci.* **44**, 1964, 383–384.
- Kunze, L.: Der Einfluß der Stecklenberger Krankheit auf den Ertrag von Sauerkirschen. – *Der Erwerbsobstbau* **11**, 1969, 1–3.
- Ouchterlony, O.: Diffusion-in-gel-methods for immunological analysis. – *Progress in Allergy* **5**, 1958, 1–78.
- van Regenmortel, M. H. V. and Engelbrecht, D. J.: The rapid diagnosis of necrotic ring spot virus infection of stone fruits by serological means. – *South African J. Agric. Sci.* **5**, 1962, 607–613.
- Schade, C.: Untersuchungen zum serologischen Nachweis des Nekrotischen Ringfleckenvirus der Sauerkirsche. I. Der serologische Routinetest bei Steinobst. – *Phytopath. Z.* **59**, 1967, 352–371.
- Schuch, K., Mischke, W. und Kunze, L.: Die Ausbreitung der Stecklenberger Krankheit in einer Sauerkirschenanlage. – *Mitt. Biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem*, **121**, 1967, 162–167.

Eingegangen am 28. September 1971