

Elektronenmikroskopischer Nachweis von virusähnlichen Teilchen in Extrakten von Fichtennadeln

Autor(en): **Gugerli, Paul / Voss, Andreas / Benz, Georg**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen = Swiss forestry journal
= Journal forestier suisse**

Band (Jahr): **137 (1986)**

Heft 3

PDF erstellt am: **29.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-765152>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Elektronenmikroskopischer Nachweis von virusähnlichen Teilchen in Extrakten von Fichtennadeln

Von Paul Gugerli*, Andreas Voss** und Georg Benz**

Oxf.: 444:174.7 Picea

* Station Fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH—1260 Nyon,

** Entomologisches Institut, Eidgenössische Technische Hochschule, CH—8092 Zürich

Einleitung

Beobachtungen über das Vorkommen von Schäden an Fichten in unseren Wäldern weisen gelegentlich auf infektiöse Ursachen hin. Die universelle Verbreitung von Viruskrankheiten auf landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Nutz- und Zierpflanzen lässt eine Beteiligung von Viren an diesen Erkrankungen als wahrscheinlich erscheinen. Erste virologische Untersuchungen an Nadelbäumen gehen auf die sechziger Jahre zurück. Virusähnliche Teilchen wurden tatsächlich in Nadelproben von kranken Bäumen in der Tschechoslowakei, in der DDR sowie in Grossbritannien nachgewiesen (Cech *et al.*, 1961; Schmelzer *et al.*, 1966; Biddle und Tinsley, 1968). In jüngeren Arbeiten im Zusammenhang mit dem Fichtensterben in Deutschland wurden ebenfalls virusähnliche Teilchen in Proben von kranken Fichten gefunden (Nienhaus, 1985; Frenzel, persönliche Mitteilung). Der kausale Zusammenhang zwischen dem Vorkommen dieser Teilchen und bestimmten Krankheiten der Fichte ist jedoch noch nicht erbracht. Da Viren in vielen Fällen durch Insekten von Pflanze zu Pflanze übertragen werden, muss auch die Waldfauna diesbezüglich untersucht werden. Am Entomologischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich wurde daher auf Initiative des letztgenannten Autors eine Forschungsarbeit über die Beteiligung von Insekten am Ursachenkomplex des Waldsterbens, insbesondere des Fichtensterbens in ihrer Rolle als Überträger von pflanzenpathogenen Primitivorganismen in erkrankten Fichten eingeleitet. Im Sinne einer besseren Charakterisierung des hierfür benötigten Pflanzenmaterials unternahmen wir die in dieser Arbeit beschriebenen virologischen Untersuchungen an krank- und gesundaussiehenden Fichten. Dabei fanden wir, ähnlich wie deutsche Forscher, virusähnliche Teilchen mit verschiedenen Strukturen. Neu ist hingegen der Nachweis von bisher nicht beschriebenen Teilchen, von welchen die einen morphologisch den Closteroviren und die anderen dem

Kernteil von tierischen Paramyxoviren gleichen. Das überraschend stete Vorkommen der closterovirusähnlichen Teilchen in Nadelproben von kranken jungen und alten Fichten drängt nach weiteren ätiologischen und epidemiologischen Untersuchungen.

Material und Methoden

Unsere Analysen umfassten Proben aus der Deutsch- und Westschweiz sowie aus Süddeutschland:

- a) Birmensdorf (ZH): junge bis zu 10jährige Fichten aus der Baumschule der Eidgenössischen Anstalt für das forstliche Versuchswesen (EAFV), rund 550 m ü.M.
- b) Bremgarten (AG): bis zu 10jährige Fichten aus einem ehemaligen Vermehrungsquartier der EAFV, rund 400 m ü.M.
- c) Suhr (AG): 5- bis 10jährige Fichten aus vier kranken Beständen im Suret, rund 380 m ü.M.
- d) Genolier (VD): etwa 10jährige Fichten aus einer Gartenhecke, rund 600 m ü.M.
- e) Schönau im Schwarzwald: etwa 50jährige Fichten bei Haldenhof, rund 1000 m ü.M.

Die elektronenmikroskopische Betrachtung erfolgte an Extrakten von Fichtennadeln gemäss einer für den Nachweis von Reboviren entwickelten Methode (Gugerli *et al.*, 1984). Es handelt sich dabei um eine chemische und physikalische Klärung von Zellsäften sowie eine Anreicherung von partikulären Zellsubstanzen durch Ultrazentrifugation. Die Teilchen wurden mit Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert und im Elektronenmikroskop bei 30- bis 60tausendfacher Vergrösserung betrachtet.

Resultate

Die beobachteten virusähnlichen Teilchen konnten wir in vier Strukturklassen einteilen:

Typ 1: Feine, stark flexible Fäden mit einem Durchmesser von ungefähr 9 nm und einer Länge von bis zu 1500 nm, teilweise sogar länger (*Abbildungen 1a, 1b, 2b und 2c*). Diese Teilchen gleichen den sogenannten Closteroviren. Charakteristisch für die beobachteten Teilchen ist die gut sichtbare Segmentierung und die hohe Flexibilität, welche sich oft im Bilden von engen Schlaufen äussert (*Abbildung 1a*). Durch ihren geringeren Durchmesser unterscheiden sie

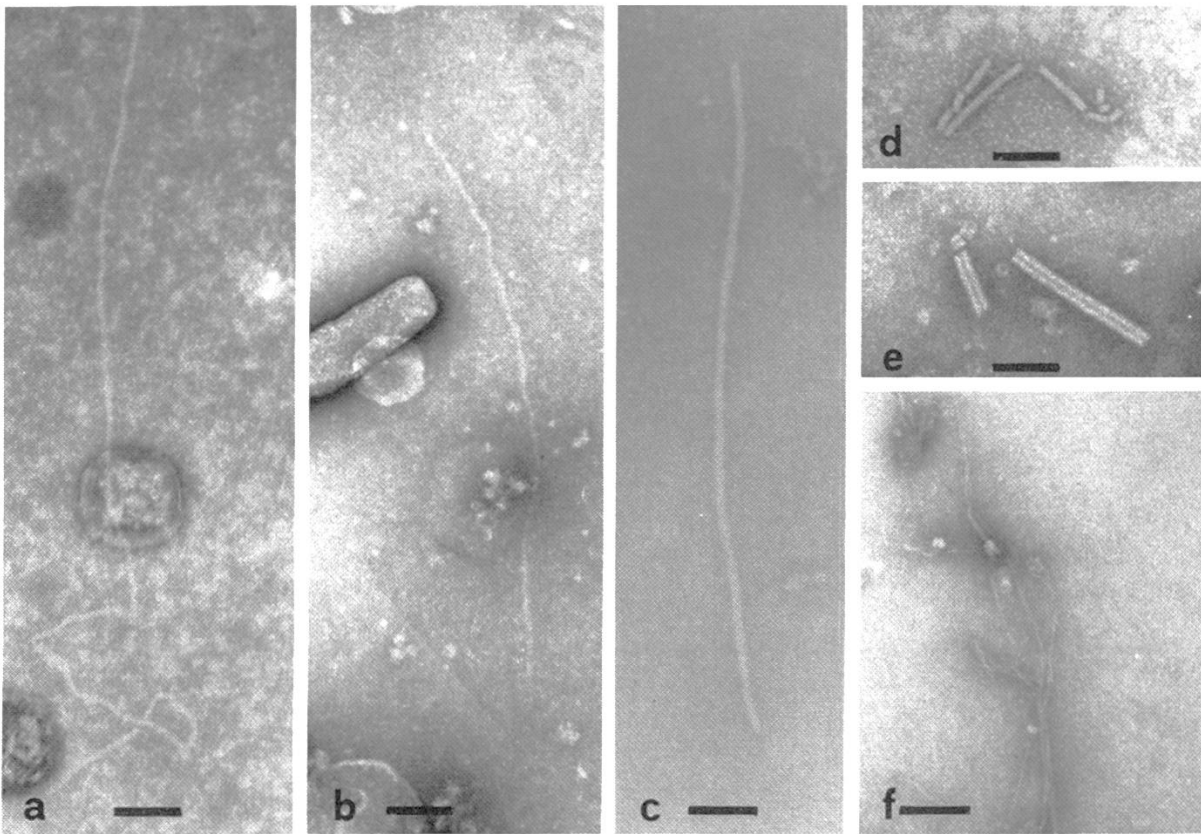


Abbildung 1. Elektronenmikroskopische Abbildung virusähnlicher Teilchen aus Extrakten von Fichtennadeln: a) und b) Typ 1, closterovirusähnliche Teilchen; c) Typ 2, fadenförmige Teilchen; d) Typ 3, stäbchenförmige Teilchen; e) Typ 4, stäbchenförmige Teilchen mit auffallendem Zentralkanal und äusserer Segmentierung; f) Fasern von gesunden Pflanzen (Vergrößerung: Balken = 100 nm).

sich jedoch sehr deutlich von Closteroviren der Rebe (Abbildung 2a). Von den Fasern, die auch in Präparaten von gesunden Pflanzen gefunden werden (Abbildung 1f), unterscheiden sie sich durch ihre Länge, viel höhere Flexibilität, deutliche Segmentierung und den regelmässigeren Durchmesser sowie durch das freie Vorliegen in den Säften, während Fasern oft gebündelt oder verknüpft vorkommen (Abb. 1f). Allfällige Flagellen von kontaminierenden Bakterien sind weniger flexibel (nur gewellt), dicker und ohne Segmentierung. Eine Verwechslung ist allenfalls möglich mit linearen Aggregaten des Chloroplastenzym «Ribulose-Biphosphat-Karboxylase». Diese Aggregate haben aber, wenn sie überhaupt vorkommen, weder die Länge noch die Flexibilität der hier beschriebenen closterovirusähnlichen Teilchen. Sehr kurze Fragmente mögen aber einander gleichen.

Typ 2: Fadenförmige, weniger flexible Teilchen mit einem Durchmesser von ungefähr 13 nm und einer variablen Länge von 200 bis über 1000 nm (Abbildung 1c). Diese Teilchen gleichen den fadenförmigen Kartoffelviren.

Typ 3: Kurze, starr erscheinende Stäbchen mit einem Durchmesser von etwa 13 nm und einer unterschiedlichen Länge von häufig weniger als 200 nm (Abbildung 1d). Diese Stäbchen weisen keinen erkennbaren Zentralkanal auf.

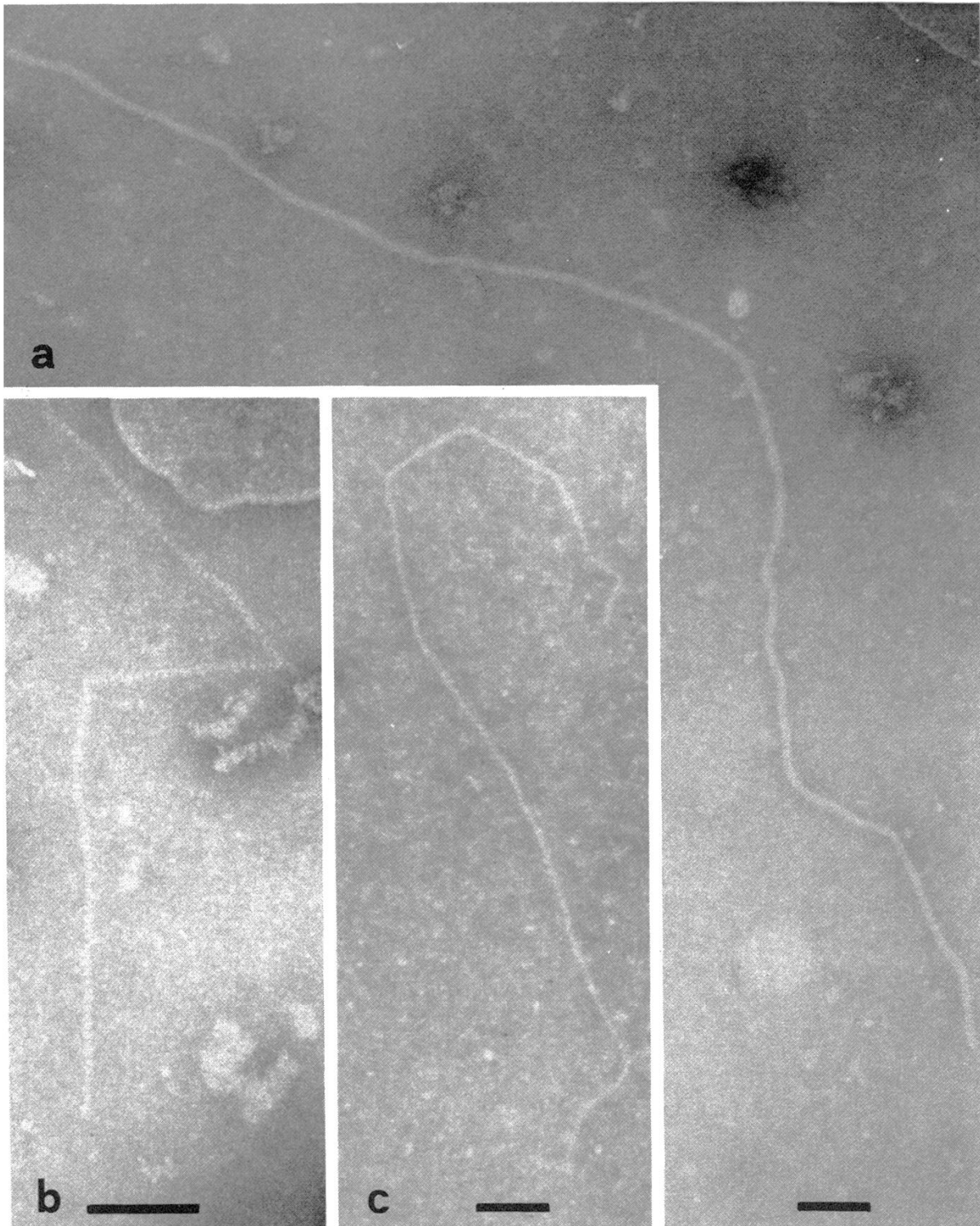


Abbildung 2. Elektronenmikroskopischer Vergleich closterovirusähnlicher Teilchen von Rebe und Fichte: *a*) Closterovirusteilchen von Rebe mit Blattrollsymptomen; *b*) und *c*) closterovirusähnliche Teilchen von Fichte bei gleicher und stärkerer Vergrößerung (Balken = 100 nm).

Es könnte sich hierbei eventuell um Bruchstücke des oben beschriebenen zweiten Teilchentyps handeln. In unseren Präparaten war die Anhäufung von vielen sehr kurzen Teilchen jedoch typisch.

Tabelle 1. Elektronenmikroskopischer Nachweis von virusähnlichen Teilchen in Extrakten von Fichtennadeln.

Nr.	Probenbezeichnung	Herkunft	Symptome	Elektronenmikroskopischer Befund: Partikeltyp		
1	EAFV 7	Birmensdorf	Chlorose, teilw. Nekrose	1	3	4
2	EAFV I/9.7.85/8	Birmensdorf	Chlorose	1	2	3
3	EAFV/9.8.85/7	Birmensdorf	Chlorose, teilw. Nekrose	1	2	3
4	EAFV 5/17.6.85	Birmensdorf	Chlorose	1	2	3
5	EAFV I/9.7.85/1	Birmensdorf	Chlorose, kurze dichte Nadeln	1		4
6	EAFV Sämlinge	Birmensdorf	keine			
7	EAFV/23.9.85/6	Birmensdorf	Chlorose (in Beet mit Nr. 8)	1		
8	EAFV/23.9.85/8	Birmensdorf	keine (in Beet mit Nr. 7)	1		
9	EAFV/K 2	Birmensdorf	Chlorose	1		
10	BRE C44/14/2	Bremgarten	Chlorose ?	1		
11	AG 5/7.8.85/1	Suhr	Chlorose, abstehende Nadeln	1		
12	AG2/7.8.85/3	Suhr	Chlorose, abstehende Nadeln	1		
13	AG1/7.8.85/2	Suhr	Chlorose, kurze dichte Nadeln	1	2	3
14	AG2/7.8.85/2	Suhr	Chlorose, teilw. Mosaik	1	2	3
15	AG/10.8.85 (35/2)	Suhr	Chlorose	1	2	
16	AG1/7.8.85/1	Suhr	Chlorose	1		
17	AG5/10.8.85/2	Suhr	Chlorose			
18	AG1/19.9.85/2	Suhr	keine			
19	AG5/19.9.85/1	Suhr	keine			
20	AG2/19.9.85/2	Suhr	keine			4
21	AG2/19.9.85/3	Suhr	keine			
22	Hecke Süd GE2	Genolier	keine			
23	Hecke Süd Mitte	Genolier	keine			
24	Hecke Ost	Genolier	Chlorose	1		
25	S1/30.7.85	Schwarzwald	Chlorose	1	2	3
26	S2/30.7.85	Schwarzwald	Chlorose	1	2	3
27	S3/30.7.85	Schwarzwald	Chlorose	1		

Typ 4: Stäbchen mit gut erkennbarem Zentralkanal und deutlicher äusserer Segmentierung. Diese Teilchen besitzen einen Durchmesser von ungefähr 26 nm und eine variable Länge von 50 bis zu über 200 nm (*Abbildung 1e*). In unseren Präparaten waren sie teilweise kettenartig miteinander verknüpft. Diese Teilchen entsprechen grob betrachtet dem Tabakrattlevirus. Die kettenartige Verknüpfung und die bei der hier verwendeten Kontrastierung für das Tabakrattlevirus nicht übliche äussere Segmentierung sind aber eher charakteristisch für das Nukleoprotein von tierischen Paramyxoviren.

In einer Probe wurden im weiteren isometrische Teilchen gesehen, die durch ihren dunklen, vom Kontrastmittel imprägnierten Kern, gewissen Nepoviren der Rebe ähnlich waren. Sie lagen aber in zu niedriger Konzentration vor, um sie von Artefakten sicher abtrennen zu können, und wurden daher in der Zusammenstellung der Resultate vorläufig nicht erwähnt.

Der elektronenmikroskopische Nachweis von virusähnlichen Teilchen in den verschiedenen Proben ist in *Tabelle 1* zusammengefasst. Die closterovirusähnlichen Teilchen fanden wir am häufigsten in Proben von erkrankten Pflanzen. In den positiven Proben schwankte die Anzahl von Teilchen beträchtlich (zwischen 1 bis über 20 Teilchen pro Quadrat eines «400 mesh»-Gitters). Ein negativer Befund muss daher mit Vorsicht bewertet werden. Virusähnliche Teilchen des zweiten und dritten Typs beobachteten wir, wie die closterovirusähnli-

chen Teilchen, in Proben sowohl aus der Baumschule als auch aus älteren natürlichen Beständen. Die auffallenden Teilchen des vierten Typs fanden wir in nur zwei Proben. Das Vorkommen dieser Art sowie der closterovirusähnlichen Teilchen bei der Fichte ist nach unserem Wissen hiermit erstmals beschrieben worden.

Diskussion

Die Häufigkeit, mit welcher wir virusähnliche Teilchen in Proben aus verschiedenen geographischen Regionen gefunden haben, weist auf eine weite Verbreitung hin. Die untersuchten Fichten waren zum Zeitpunkt der Probeentnahme sehr unterschiedlich geschädigt. Die als krank eingestuftten Bäume erschienen allgemein gesamthaft chlorotisch. Auffallendere Vergilbungen, Nekrosen oder Mosaikerscheinungen waren jedoch vorwiegend auf mehrjährigen Nadeln feststellbar. Die Symptome waren ausserdem unregelmässig über die Pflanzen verteilt. Diese unterschiedlichen Symptome und das komplexe Muster von virusähnlichen Teilchen lassen noch keine eindeutigen Beziehungen erkennen.

Im Gegensatz zu vielen Pilzen befallen Viren nicht vorrangig geschwächte Pflanzen. Gewisse virusübertragende Insekten mögen zwar von solchen Pflanzen angezogen werden. Die strenge Abhängigkeit des Virus von einem gesunden Zellstoffwechsel würde dann allerdings die Infektionswahrscheinlichkeit erniedrigen. Virusinfektionen beginnen in der Regel auf wachsendem, daher gesundem, Pflanzengewebe, da dort die für die Virusvermehrung notwendigen zellulären Aufbauprozesse im vollen Gange sind. Die Virusinfektion führt dann meistens zu einer Störung des normalen Stoffwechsels. Wachstumsstörungen und Schmälerung der Photosynthese sind die Folgen und führen schliesslich zur Schwächung der Pflanzen. Absterben der Pflanze ist seltener, da sonst auch das Überleben des Virus, wegen seinem meistens engen Wirtskreis, gefährdet wäre.

Obwohl der Beweis für die infektiöse und pathogene Natur der von uns und anderen Forschern beobachteten virusähnlichen Teilchen noch aussteht, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den untersuchten Fichten tatsächlich um virusinfizierte Pflanzen handelte. Es ist aber sehr wohl möglich, dass die beobachteten Krankheitssymptome teilweise oder vollständig durch Viren verursacht waren. Mögliche Wechselwirkungen mit anderen biotischen und abiotischen Schadursachen müssen natürlich mitberücksichtigt werden. Studien über solche Wechselwirkungen sowie weitere ätiologische und epidemiologische Untersuchungen setzen die Entwicklung von einfacheren Nachweisverfahren voraus. Moderne serologische Methoden, wie sie im landwirtschaftlichen Pflanzenschutz in jüngster Zeit eingesetzt wurden, sind hier anzustreben. Um einer

weiteren Verbreitung von allfälligen Viruskrankheiten entgegenzuwirken, könnten solche serologischen Virusnachweisverfahren später ebenfalls für die Auslese von gesunden Jungpflanzen nutzbringend angewendet werden.

Dank

Wir danken den Herren Dr. J. B. Bucher, A. Burkart und E. Frehner von der EAFV für die Zurverfügungstellung von Pflanzenmaterial sowie Fräulein Sabine Bonnard und Herrn E. Scheinpflug für ihre exakte technische Hilfe.

Résumé

Mise en évidence par microscopie électronique de particules virales dans des extraits d'aiguilles d'épicéa

Des structures ressemblant à des particules de virus sont visibles par microscopie électronique dans des extraits d'aiguilles d'épicéa montrant des anomalies telles que chlorose, mosaïque ou nécrose. Nous distinguons 4 types de particules:

- des filaments très flexibles et segmentés ayant une longueur jusqu'à 1500 nm et un diamètre d'environ 9 nm
- des filaments peu flexibles de 200 à 1000 nm de longueur et d'environ 13 nm de diamètre
- des bâtonnets généralement plus courts que 200 nm et d'environ 13 nm de diamètre
- des bâtonnets plus épais de 50 à 200 nm de longueur et d'environ 26 nm de diamètre avec un canal central et une ségmentation extérieure bien visible.

Les particules du premier type ressemblent à celles des closterovirus. Leur diamètre est toutefois nettement inférieur à celui d'un closterovirus typique de la vigne. Elles sont les plus fréquemment observées, seules ou en complexe avec d'autres particules décrites. Sur la base de ces résultats il ne nous est pas encore possible d'associer l'un ou l'autre type de particule à un type de symptôme observé sur les aiguilles suspectes. Une étude étiologique et épidémiologique plus approfondie suppose la mise au point de techniques de détection sensibles et rapides telles que les tests sérologiques modernes.

Literatur

- Biddle, P.G. und Tinsley, T.W.* (1968): Virus diseases of conifers in Great Britain. *Nature* 219, 1387-1388.
- Cech, M., Kralik, O. und Blattny, C.* (1961): Rodshaped particles associated with virosis of spruce. *Phytopathology* 51, 183-185.
- Gugerli, P., Brugger, J.-J. und Bovey, R.* (1984): L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 16, 299-304.
- Nienhaus, F.* (1985): Infectious diseases in forest trees caused by viruses, mycoplasma-like organisms and primitive bacteria. *Experientia* 41, 597-603.
- Schmelzer, K., Schmidt, H.E. und Schmidt, H.B.* (1966): Viruskrankheiten und virusverdächtige Erscheinungen an Forstgehölzen. *Arch. Forstwesen* 15 107-120.