

# Etablierung einer IC-RT-PCR zum Nachweis von CLRV in Pollen aus Birke (*Betula* spp.)

Ulrike Bütow, Maria Landgraf, Martina Bandte, Carl-Christian Bergmann, Heidrun Behrend, Peter Beyerlein, Janina Kneipp und Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften; Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

## Einleitung



Abb. 1: Beprobung von *Betula* spp. mit virustypischen Symptomen (a) Vermehrte Tumorbildung am gesamten Baumstamm (b) chlorotische Ringflecken (c) chlorotische Fleckung (d) Einsatz eines Baumkletterers, um Äste aus unterschiedlichen Baumhöhen zu entnehmen (e) reife Birkenkätzchen (f) Aufbereitung der Proben im Gewächshaus unter vollständiger Schutzkleidung der Mitwirkenden (g) Trennung des Pollens von den Kätzchen

## Material & Methoden

Im Frühjahr 2011 und 2012 wurde Pollen von 48 Birken (*Betula pendula*, *Betula pubescens* und Hybriden beider Arten) entnommen (Abb. 1). Es wurden Birken mit virustypischen Symptomen sowie solche ohne Symptome beprobt. Von diesen konnten insgesamt 69 Pollenproben mit zwei CLRV-spezifischen IC-RT-PCR Methoden vergleichend untersucht werden (Tab. 1). Blattmaterial von CLRV-infizierten *Chenopodium quinoa* ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) wurde in die IC-RT-PCR eingesetzt, um die Sensitivität der zwei Primerkombinationen zu testen.

Tab. 1: Übersicht beider IC-RT-PCR Methoden unter Angabe des eingesetzten Homogenats, der verwendeten Primer, der zu erwartenden Fragmentgröße und den PCR-Bedingungen (Methode A = nach Gentkow et al. (2007); Methode B = diese Arbeit)

	Methode A	Methode B
Verdünnung Homogenat	$10^{-1}$ , $10^{-2}$	$10^{-1}$ , $10^{-2}$
cDNA-Synthese	GTC GGA AAG ATT ACG TAA AAG G; Werner et al. (1997)	
Primer PCR	GTC GGA AAG ATT ACG TAA AAG G; Werner et al. (1997)	
	FW:	GTC GGA AAG ATT ACG TAA AAG G; Werner et al. (1997)
	RW:	TGGCGACCGTGTAAACGGCA Werner et al. (1997)
		<b>CATGCGACCGGTCTAGTAGTA</b> (diese Arbeit)
Fragmentgröße	420 bp	<b>353 bp</b>
PCR-Protokoll	2 min 94 °C; 30 x 1 min 94 °C, 45 s 55 °C, 1 min 72 °C; 5 min 72 °C	

## Ergebnisse

- Verwendung der neuen Primerkombination (Methode B) führt zu mindestens 10fach höheren Sensitivität der IC-RT-PCR (Abb. 2)
- Inhibierung der IC-RT-PCR bei einer Verdünnung des Pollenextraktes bei  $10^{-1}$ . Nachweis von CLRV erst in verdünnten Pollenextrakten von  $10^{-2}$  möglich (Abb. 3)
- Die modifizierte IC-RT-PCR führte bei gleichen Proben zu höheren Amplifikationsraten (Abb. 4).
- Die Modifikationen (Methode B) führten bei den gleichen Pollenproben zu 31 Proben mit CLRV-positivem Testergebnis (Tab. 1).
- Von 15 positiv getesteten Einzelbäumen konnte in beiden Kalenderjahren Pollen analysiert werden. 8 davon waren in beiden Jahren CLRV-positiv, während die Birkenpollen von den übrigen 7 Einzelbäumen nur in einem Kalenderjahr als CLRV-positiv anzusprechen waren
- Der CLRV-Nachweis in dem Pollen korreliert nicht mit der Symptomausprägung der Blätter

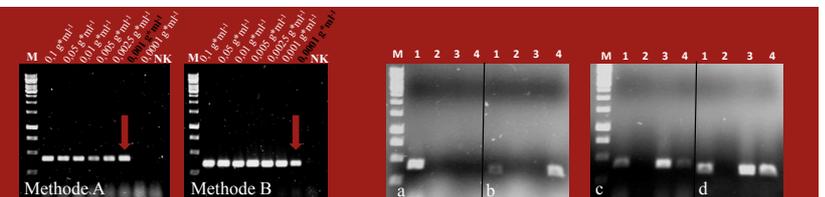


Abb. 2: Sensitivität der IC-RT-PCR in Abhängigkeit von den eingesetzten PCR-Primer; Methode A: Werner et al. 1997; Methode B: diese Arbeit

Abb. 3: Vergleich von vier IC-RT-PCR-Varianten zum Nachweis von CLRV aus Birkenpollen. Primer: (a;c) Werner et al. 1997; (b;d) diese Arbeit; Verdünnung Pollenextrakt: (a;b)  $10^{-1}$ , (c,d)  $10^{-2}$

Tab. 2: Anzahl CLRV-positiver Birkenpollen in Abhängigkeit vom Probenahmestandort und der gewählten IC-RT-PCR Methode (Methode A = nach Gentkow et al. (2007); Methode B = diese Arbeit)

Standort	Bäume	2011		2012		
		CLRv pos.		CLRv pos.		
		Methode A	Methode B	Methode A	Methode B	
Im Schwarzen Grund	5	1	4	10	2	4
Vogelsang	9	3	6	10	2	4
Grunewald	9	0	4	10	0	4
Vogelsang	3	0	1	13	1	4
Insgesamt	26	4	15	43	5	16

## Zusammenfassung

- Ein sensibler und zuverlässiger CLRV-Routinenachweis konnte etabliert werden
- Die CLRV-spezifische IC-RT-PCR ist mit der neuen Primerkombination sensibler
- Inhaltsstoffe im Pollenextrakt wirken inhibierend auf die IC-RT-PCR
- CLRV war im Pollen von symptomatischen und asymptomatischen Birken-Arten nachweisbar
- In fast der Hälfte der untersuchten Birken (23/48) war der CLRV-Nachweis über den Pollen positiv, was auf eine weite Verbreitung des Virus in Birkenpopulationen hindeutet

## Literatur

Bandte et al. (2009): *Jahrbuch der Baumpflege*, 215-221.  
Gentkow J et al. (2007): *Jahrbuch der Baumpflege*, 279-302  
Landgraf et al. (2010)  
Werner R et al. (1997): *Journal of Forest Pathology* 27, 309-318.

Wir bedanken uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Forschungsförderung (BU890/14-1, BU890/23-1).