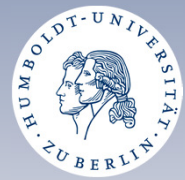


# Nachweis verschiedener Genomregionen des *Cherry leaf roll virus* (CLRV) in gepfropften Moorbirken finnischer Herkunft mittels (*semi*-) *nested* RT-PCR



METLA

<sup>1</sup>Demiral R., <sup>1</sup>Rumbou A., <sup>2</sup>Jalkanen R., <sup>1</sup>von Barga S., <sup>1</sup>Büttner C.

<sup>1</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

<sup>2</sup>The Finnish Forest Research Institute (METLA), Rovaniemi Research Unit, Rovaniemi, Finland

## Einleitung

Seit 2002 werden an Birken in Finnland zunehmend CLRV-typische Symptome wie Adernbänderung, Blattrollen, Chlorosen und stellenweise Nekrosen beobachtet, die mit Degenerations- und Absterbeerscheinungen einhergehen (JALKANEN *et al.* 2007, BÜTTNER *et al.* 2013, Abb. 3). Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) ist ein *Nepovirus* der Subgruppe C (Familie *Secoviridae*). Es besteht aus einem bipartiten, ss (+) RNA-Genom (Abb. 4). Bisherige Studien haben gezeigt, dass es trotz hoch sensitiver Methoden, wie die der PCR, schwierig bzw. nicht immer möglich ist, CLRV in Moorbirken, insbesondere finnischer Abstammung, nachzuweisen (BREUHAHN *et al.*, 2013). Aufgrund dieser Problematik wurden (*semi*-) *nested* RT-PCRs entwickelt und getestet.



Abb. 1: Versuchsstandort der gepfropften Birken in Berlin

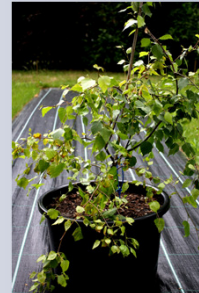


Abb. 2: gestauchtes Wachstum (Zwergwuchs)



Abb. 3: CLRV-typische Symptome an gepfropften Birken - Adernbänderung sowie Blattrollen und kleine Blätter

## Material und Methoden

Mit CLRV infizierte Birkenreiser (*B. pubescens*) finnischer Herkunft wurden im Jahr 2011 auf zweijährige Birkensämlinge deutscher Herkunft (*B. pubescens*) gepfropft. Die Bäume wurden auf CLRV Symptomausprägung (Abb. 4) in der Vegetationsperiode von März bis August 2013 regelmäßig bonitiert (Abb. 1 und 2). Es wurden Blätter unterschiedlicher Astregionen entnommen und zur RNA-Isolierung verwendet. Gesamt-RNA wurde in 3 verschiedenen (*semi*-) *nested* RT-PCR Verfahren eingesetzt. Die verwendeten *Primer*-Kombinationen sind spezifisch für drei partielle Genomregionen des Virus (CP, RdRp, Abb.4, 3' UTR, nicht gezeigt). Amplifizierte Genombereiche des CLRV wurden kloniert, sequenziert und mit bisher charakterisierten Sequenzen verglichen.

## Ergebnisse

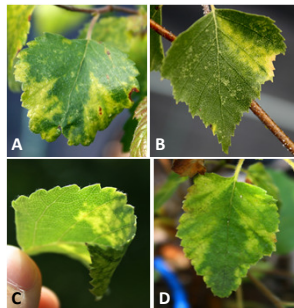


Abb. 4: CLRV-typische Symptome an gepfropften Moorbirken finnischer Herkunft, Vegetationsperiode Juli bis August.

A Scheckungen B Adernbänderung C Blattrollen und Scheckungen D Scheckungen

**Tabelle 1:** CLRV-infizierte Spenderbäume finnischer Herkunft (JALKANEN *et al.* 2007); Anzahl der überlebenden gepfropften Sämlinge; Anzahl der gepfropften Sämlinge, die CLRV-Symptome zeigten und Anzahl der 2013 CLRV-positiv getesteten gepfropften Moorbirken

Spenderbaum	Gepfropfte Sämlinge	CLRV-Symptome	CLRV-positiv getestet mittels <i>nested</i> RT-PCR
<i>B. pubescens</i> 3	7	6	7
<i>B. pubescens</i> 4	2	1	1
<i>B. pubescens</i> 7	5	3	5
<i>B. pubescens</i> 12	1	1	1
<i>B. pubescens</i> 20	2	1	2
<i>B. pubescens</i> 320	2	2	2

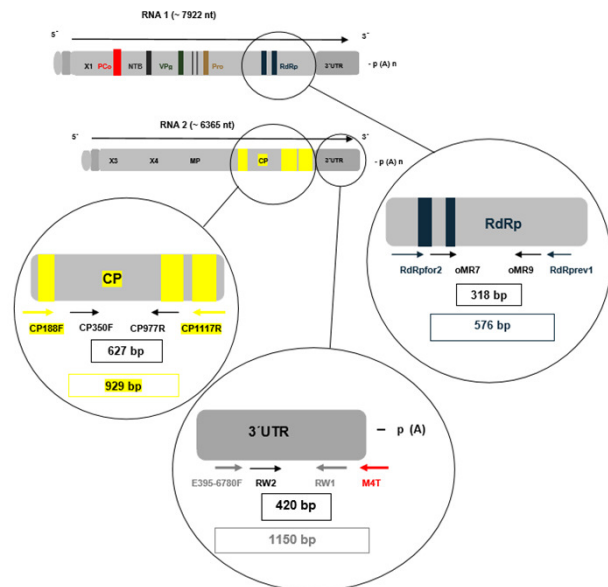


Abb.4: Genomorganisation des CLRV und *Primer*-Bindungsstellen der 1. und 2. CLRV (*semi*-) *nested* RT-PCR

PCo = Proteinase Cofaktor; NTB = NTP - Bindungs Protein; VPg = Virales Genom gebundenes Protein, Pro = Proteinase; Pol. (RdRp) = Polymerase; MP = Movement Protein (Transportprotein); CP = Coat Protein (Hüllprotein); 3' UTR = untranslated region (Nicht-translatierte Region); p (A) = Poly-A-Schwanz; X1/X3/X4 = putative Proteine

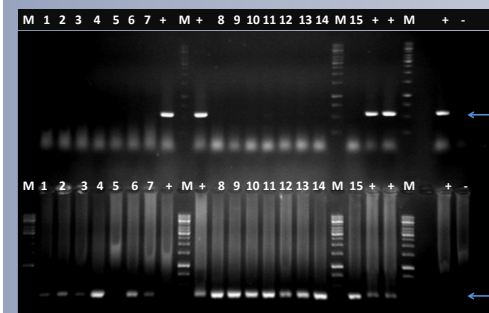


Abb. 5: CLRV-Nachweis in Blattmaterial finnischer Birken durch Amplifikation eines 318 bp langen Fragments der RdRp-kodierenden Region mittels *nested*-PCR; (+) Positivkontrolle-deutsche *B. pendula*, (-) Negativkontrolle-MilliQ H<sub>2</sub>O, (1-15) finn. Birkensämlinge, (M) Größenstandard 1 kb

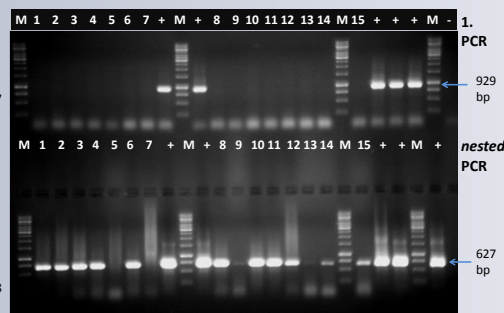


Abb. 6: CLRV-Nachweis in Blattmaterial finnischer Birken durch Amplifikation eines 627 bp langen Fragments der CP-kodierenden Region mittels *nested*-PCR; (+) Positivkontrolle-deutsche *B. pendula*; (-) Negativkontrolle-MilliQ H<sub>2</sub>O; (1-15) finn. Birkensämlinge; (M) Größenstandard 1 kb

## Fazit

➤ 74 % der bonitierten gepfropften Moorbirken aus Finnland entwickelten in der Vegetationsperiode März bis August CLRV-typische Symptome (Abb. 4).

➤ In 18 von 19 finnischen Moorbirken konnte mindestens eine der drei Genomregionen des CLRV amplifiziert und somit eine Infektion mit dem Virus gezeigt werden (Abb. 5 und 6).

➤ Mindestens ein gepfropfter Sämling von jedem Spenderbaum war CLRV infiziert, darunter auch Bäume ohne CLRV-typische Symptome (Tab. 1).

➤ Ein Sequenzvergleich mit bisher charakterisierten CLRV-Isolaten aus der Datenbank des NCBI zeigte, dass die CLRV-Varianten in den gepfropften Moorbirken überwiegend der phylogenetischen Gruppe A (REBENSTORF *et al.* 2006) zuzuordnen waren.

## Danksagung

Finanziell wurde das Projekt BU 890/15-1 durch die DFG unterstützt.

## Literatur

BREUHAHN, M., *et al.* 2013: Übertragung des *Cherry leaf roll virus* (CLRV) aus Birken deutscher und finnischer Standorte mittels Pflanzung. ALVA-Tagungsbericht 2013, p. 284-285.  
 BÜTTNER, C., *et al.* 2013: chapter 3: Forest diseases caused by viruses. In: Infectious forest diseases. Gonther P, Nicolotti G. (eds), CAB, 50-75.  
 REBENSTORF, K., *et al.*, 2006: Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, *Cherry leaf roll virus*. Journal of Virology 80, 2453-2462.  
 JALKANEN, R. *et al.*, 2007. *Cherry leaf roll virus* abundant on *Betula pubescens* in Finland. Silva Fennica 41: 755-762.