

# Ein neuartiges Virus ist mit dem Ringfleckensyndrom der Stieleiche (*Quercus robur* L.) assoziiert

## *A novel virus is associated with the ringspot disorder in Common oak (Quercus robur L.)*

Marius Rehanek<sup>1\*</sup>, Susanne von Bargaen<sup>1</sup>, Hans-Peter Mühlbach<sup>2</sup>, Michael Kube<sup>3</sup>, Martina Bandte<sup>1</sup> und Carmen Büttner<sup>1\*</sup>

### **Einleitung**

Viruserkrankungen nehmen als Teil der komplexen Schadproblematik an Gehölzen einen zunehmend höheren Stellenwert ein. An Eichen wurden bereits in den 1970er Jahren virusverdächtige Symptome wie Scheckungen und chlorotische Ringflecken beschrieben (NIENHAUS 1975). Mit Hilfe moderner Hochdurchsatz-Sequenziermethoden (NGS) wurde aus Blättern einer erkrankten Stieleiche (*Quercus robur*) ein neuartiges Virus identifiziert, welches Ähnlichkeiten zu Vertretern der Gattung *Emaravirus* aufweist. Emaraviren besitzen mindestens vier monocistronische Genomsegmente, die jeweils für ein Virus-spezifisches Protein kodieren. Die RNA1 kodiert eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die RNA2 einen Glykoproteinvorläufer und die RNA3 das virale Nukleokapsidprotein. Die RNA4 kodiert für ein ca. 42 kDa großes Transportprotein. Ziel der Arbeit war es, die Assoziation des neuen Virus mit den beobachteten Symptomen zu untersuchen und die bisher identifizierten viralen RNAs in erkrankten Eichen nachzuweisen.

### **Material und Methoden**

Es wurden im Jahr 2016 Blattproben von Stieleichen entnommen. Bei den beprobten Eichen handelte es sich um Sämlinge einer Samenspenderanlage und um Bäume verschiedenen Alters von Forst- und Parkstandorten in Deutschland, Schweden und Norwegen. Es wurden sowohl Eichen mit typischen Ringflecken und Scheckungen, als auch solche ohne und atypischer Symptomatik untersucht (Abb. 1). Nach RNA-Isolierung aus den Blättern wurden die Proben mittels RT-PCR auf die viralen Genomsegmente getestet, wobei ein Primerpaar zum gattungsspezifischen Nachweis der viralen RNA1 eingesetzt wurde (ELBEAINO et al. 2013). Zum spezifischen Nachweis der weiteren Genomsegmente wurden Primer von den Contigs abgeleitet, welche im NGS-Datensatz identifiziert werden konnten. Diese Primer wurden in der vorliegenden Studie getestet und die amplifizierten PCR-Produkte durch Sequenzierungen überprüft. Zur Untersuchung der Spezifität des PCR-basierten Nachweises wurden neben Eichenproben auch Blattproben von Bäumen einbezogen, welche mit anderen Emaraviren infiziert waren. Dies beinhaltete unter anderem das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV), die namensgebende Spezies der Gattung *Emaravirus* (MIELKE-EHRET, MÜHLBACH 2007), das *Fig mosaic virus* (FMV) (ELBEAINO et al. 2009) sowie weitere Vertreter (nicht publiziert).

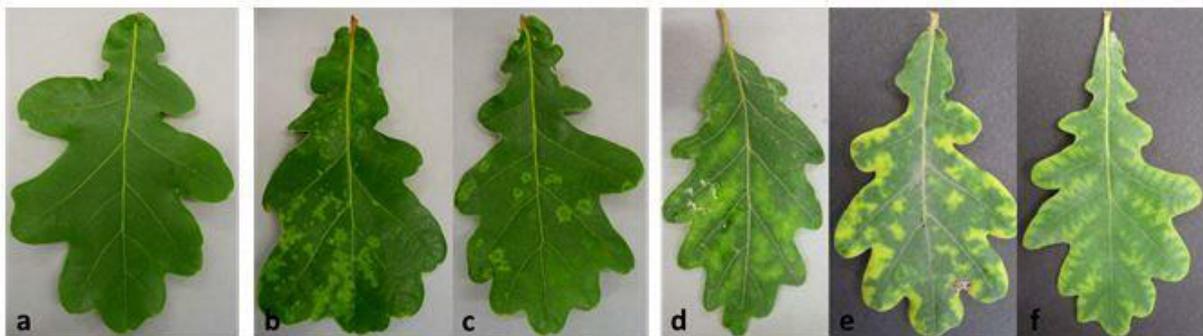


Abbildung 1: beobachtete Blattsymptome an Eichen 2016  
Blattproben (a) ohne Symptome, (b-c) mit chlorotischen Ringflecken, (d-f) mit atypischen Chlorosen

## Ergebnisse und Diskussion

Das neuartige Emaravirus konnte in symptomatischem Blattmaterial von Stieleichen verschiedener Standorte Deutschlands, Norwegens und Schwedens detektiert werden. Dies betraf Parkbäume, Bäume im urbanen Bereich und Forststandorte (Abb. 2). Auch Bäume der *Q. robur* Varietät "Fastigiata Koster" (Abb. 2f), welche aufgrund ihrer dekorativen Säulenform als Zierbaum geschätzt werden, zeigten Infektionen. Der Nachweis der viralen Genomsegmente war dabei spezifisch mit Eichen assoziiert, welche chlorotische Ringflecken und Scheckungen an den Blättern aufwiesen. Mit Hilfe des gattungsspezifischen Primerpaares gelang in den Eichenproben, in Übereinstimmung mit anderen Vertretern der Emaraviren wie EMARaV und FMV, der Nachweis der viralen RNA1. Zur Detektion der weiteren viralen Genomsegmente konnten RT-PCRs entwickelt werden, durch welche sich das Virus in Abgrenzung zu den anderen Vertretern der Gattung spezifisch in Eichen nachweisen ließ. Dies konnte durch Sequenzüberprüfung der amplifizierten PCR-Produkte bestätigt werden. Die RT-PCRs zum Nachweis der viralen RNA3 und RNA4 erwiesen sich als sehr spezifisch und waren somit am besten zur Detektion des neuen Virus in erkrankten Eichen geeignet.

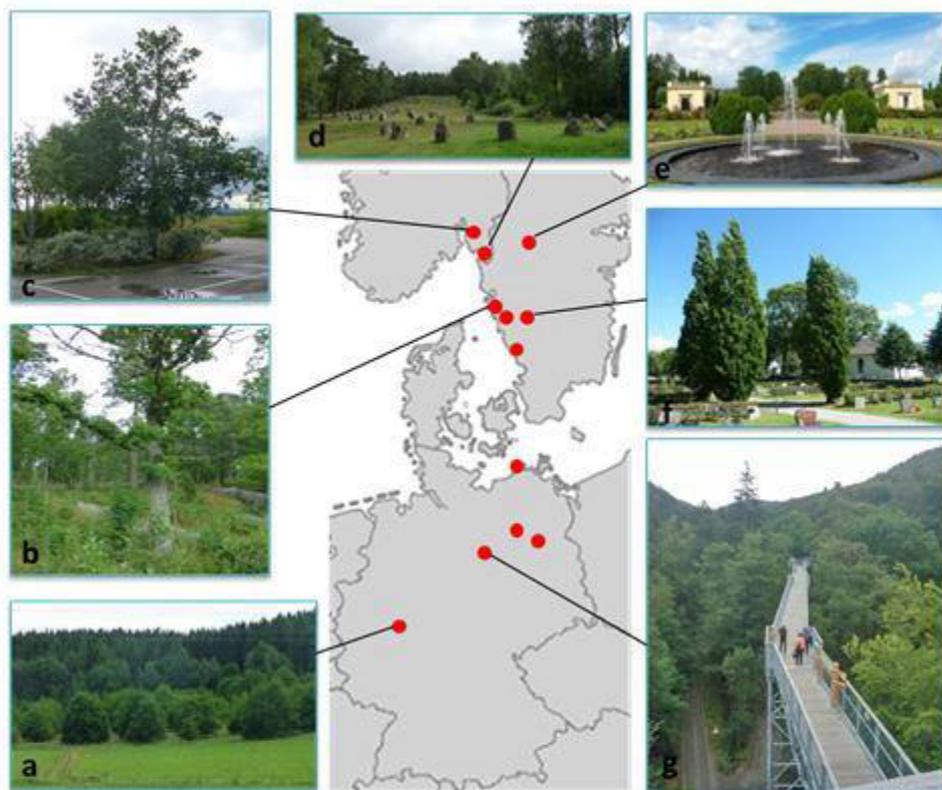


Abbildung 2: Virusnachweis 2016

**Das Virus wurde in erkrankten Stieleichen verschiedener Habitats in Deutschland, Norwegen und Schweden detektiert, einschließlich (a, b, d und g) Forstbäumen, (e) Parkbäumen sowie (c) Bäume im urbanen Bereich. Ebenso betroffen war die Varietät "Fastigiata Koster"(f).**

Nach wie vor ungeklärt bleiben die Übertragungswege, der Wirtskreis sowie die geografische Verbreitung des Virus. Es bedarf deshalb weiterer Untersuchungen zur Charakterisierung des Erregers, um seine phytopathologische Bedeutung und seine Auswirkungen auf die Eichenbestände beurteilen zu können. Bezüglich der komplexen Schadproblematik in Gehölzen allgemein und Eichen im Besonderen stellen die gesammelten Ergebnisse einen ersten Schritt dar, zukünftig diese Viruserkrankung in die Beurteilung von Schadfaktoren und ihren Auswirkungen auf Eichen und gegebenenfalls weiterer Wirtspflanzen mit einzubeziehen.

## **Zusammenfassung**

Untersuchungen zu viralen Erkrankungen gewinnen im Zuge der komplexen Schadproblematik in Gehölzen zunehmend an Bedeutung. Mit Hilfe moderner Hochdurchsatz-Sequenziermethoden konnte in Eichen (*Q. robur*) ein neuartiges Virus identifiziert werden, das nach erfolgter bioinformatischer Analyse der ermittelten Sequenzen höchste Ähnlichkeiten zu Vertretern der Gattung *Emaravirus* aufwies, in denen Pflanzenviren mit einem segmentierten Negativstrang RNA-Genom eingeordnet sind. Spezifische RT-PCRs zum Nachweis der vier identifizierten viralen Genomsegmente wurden entwickelt, durch welche das Virus in Eichen mit typischer Ringfleckensymptomatik detektiert werden konnte. In Abgrenzung zu anderen Vertretern der Gattung lassen sie sich zukünftig als diagnostische Marker für die Untersuchung einer Infektion von *Q. robur* einsetzen. Der häufige Virusnachweis in Eichenpopulationen verschiedener Standorte sowohl in Deutschland, als auch Südschweden und -norwegen lässt darauf schließen, dass das neuartige Emaravirus weit verbreitet ist.

## **Abstract**

Exploring the virome of deciduous tree species becomes more and more prominent and sheds light into the complex world of pathogens in woody plants. High-throughput sequencing technology (NGS) is a powerful tool to discover previously unidentified plant viruses. Applying such an approach to a diseased Common oak (*Quercus robur*) led to the discovery of such a new virus. Sequence analyses revealed closest relationship to emaraviruses, a yet unassigned genus of viruses with a segmented negative-stranded RNA genome. Specific RT-PCRs were established targeting the different identified genome segments of the putative novel emaravirus. They were applied to study the association of the virus with observed symptoms and to confirm the four putative viral RNAs in diseased oaks. Leaves from oak trees were sampled from sites in different European countries including a seed collection stand, park and forest trees. Virus detection was closely correlated with Common oaks exhibiting characteristic chlorotic ringspot symptoms. Showing a frequent infection of oaks in different locations indicates that it is widespread in oak populations in Germany, southern Sweden and Norway.

## **Literatur**

- ELBEAINO T, DIGIARO M, ALABDULLAH A, DE STRADIS A, MINAFRA A, MIELKE N, CASTELLANO MA, MARTELLI GP, 2009: A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *J. Gen. Virol.*, 90, 1281–1288
- ELBEAINO T, WHITFIELD A, SHARMA M, DIGIARO M, 2013: Emaravirus-specific degenerate PCR primers allowed the identification of partial RNA-dependent RNA polymerase sequences of Maize red stripe virus and Pigeonpea sterility mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 188, 37–40
- MIELKE-EHRET N, MÜHLBACH HP, 2007: A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *J. Gen. Virol.*, 88, 1337–1346
- MIELKE-EHRET N, MÜHLBACH HP, 2012: Emaravirus: A Novel Genus of Multipartite, Negative Strand RNA Plant Viruses. *Viruses*, 4, 1515-1536
- NIENHAUS F, 1975: Viren und virusverdächtige Erkrankungen in Eichen (*Quercus robur* und *Quercus sessiliflora*). *Z PflKrankh PflSchutz* 82, 739-749

## **Adressen der Autoren**

<sup>1</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

<sup>2</sup> Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Ohnhorststraße 18, 22609 Hamburg,

<sup>3</sup> Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, Eberswalder Chaussee 3a, 5377 Waldsiedersdorf

\* Ansprechpartner: B.Sc. Marius REHANEK, [phytomedizin@agrار.hu-berlin.de](mailto:phytomedizin@agrار.hu-berlin.de)

Prof. Dr. Hans-Peter MÜHLBACH, [hpmuehlbach@gmx.net](mailto:hpmuehlbach@gmx.net)