

Versuche zur molekularen Charakterisierung von dsRNA aus Stieleichen (*Quercus robur* L.)



Hahn, S.; Rott, M.; von Bagen, S.; Bandte, M.; Büttner, C.
Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin.
E-mail: phytomedizin@agrar.hu-berlin.de



Abb. 1: Blattausschnitt einer Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken

Einleitung

Virusverdächtige Blattsymptome werden seit Mitte der 60er Jahre an Stieleichen beschrieben (Schmelzer et al., 1966). Am häufigsten tritt das Symptombild der chlorotischen Ringflecken auf (Abb. 1). Untersuchungen aus den 90er Jahren zeigen, dass sich diese Symptome durch Pflanzung auf gesunde Eichensämlinge übertragen lassen (Büttner und Fühling, 1996). Diese Eigenschaften deuten auf eine Viruserkrankung hin. Da das symptomverursachende Agens noch unbekannt ist, konzentrieren sich unsere Arbeiten auf die Isolierung und anschließende nähere Charakterisierung der Erreger.

Über 90 % der Pflanzenviren besitzen ein RNA Genom. Viren mit einem einzelsträngigem (ss) RNA Genom, bilden während der Replikation Formen und Intermediate aus, die eine teilweise doppelsträngige (ds) oder vollständig durchgepaarte dsRNA aufweisen. Diese können nach gelelektrophoretischer Auftrennung zur Diagnose herangezogen werden, da anhand des Bandenmusters die Zuordnung zu einer bestimmten Virusgruppe möglich ist. Als weitere Formen von dsRNA sind genomische RNAs von kryptischen Viren und Phytoreoviren, virale Satelliten RNA und endogen pflanzliche dsRNA bekannt.



Abb. 2: Probenahmestandorte (●) in Deutschland

Material und Methoden

Die Isolierung der dsRNA wurde nach Benthack (2001) und Mielke (1999) vorgenommen und basiert auf der spezifischen Bindung von dsRNA an CF-11 Cellulose bei einem Ethanolgehalt von 16 %. dsRNA wurde aus Rindengewebe, Blättern und Knospen erkrankter sowie symptomloser Stieleichen isoliert, die an verschiedenen Standorten in Nord- und Mitteldeutschland beprobt wurden (Abb. 2). Mit Hilfe einer DOP-PCR und einer cDNA Klonierung sollte die dsRNA amplifiziert bzw. kloniert werden (Abb. 3 und 5).

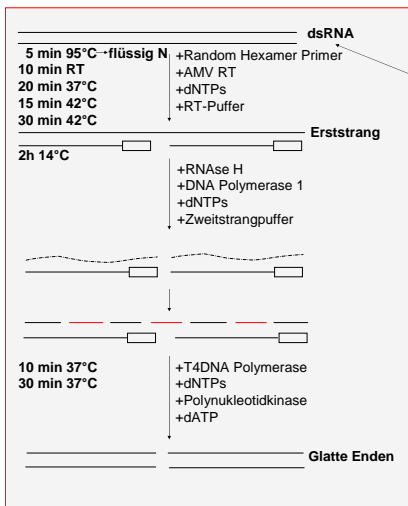


Abb. 3: Schema der cDNA Synthese modifiziert nach Promega (1996)

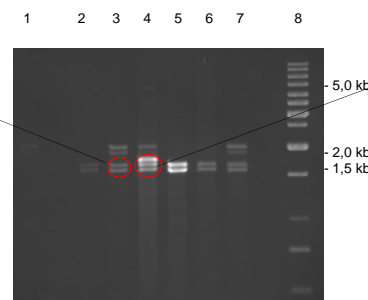


Abb. 4: Gelelektrophoretische Trennung von 10 µl dsRNA aus jeweils 50 g Blattmaterial im 1% igen Agarosegel. 1, 2: Mischprobe, Stieleiche Ringflecken, (SN, Dresden, 06/2003) 3: Einzelprobe, Stieleiche Ringflecken (NRW, Niedereimer, 06/2003) 4: Mischprobe Stieleiche Ringflecken (NDS, Hopels, 06/2003) 5: Einzelprobe, Stieleiche Ringflecken (NRW, Niedereimer, 6/2003) 6: Einzelprobe, Stieleiche ohne Symptome (B, 05/2003) 7: (Mischprobe Stieleiche Ringflecken (B, 10/2003) 8: 1 kb DNA Marker

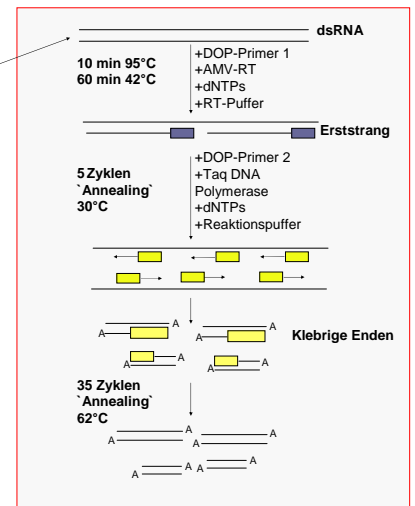


Abb. 5: Schema der DOP-PCR modifiziert nach Roche (1999)

Ergebnisse und Diskussion

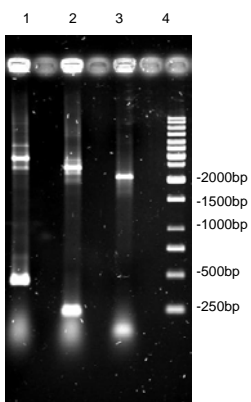


Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung von Fragmenten einer Klonierung mit Klonen (Spuren 1-3), die in einer cDNA Synthese von dsRNA aus Blättern einer erkrankten Stieleiche (Niedersachsen, Hopels) gewonnen wurden. 4: 1kb DNA Marker

- Aus Blättern, Rinde und Knospen von Stieleichen mit virusverdächtigen Blattsymptomen sowie aus Pflanzenmaterial symptomloser Stieleichen konnten dsRNA Banden der Größen 2000 bp, 1800 bp und 1500 bp, 1400 bp isoliert werden. Zusätzliche dsRNA Fragmente mit Größen von 3500 bp sowie 1700 bp und 5000 bp (Abb. 4, Spur 4) konnten aus Rindengewebe bzw. Blattmaterial erkrankter Stieleichen von zwei verschiedenen Standorten gewonnen werden.
- Mit Hilfe der DOP-PCR und der cDNA Klonierung konnten aus dsRNA DNA Fragmente gewonnen werden (Abb. 6 und 7). Diese wurden kloniert und sequenziert.
- Im Sequenzvergleich mit den Internetdatenbanken NCBI und EMBL zeigte ein Klon aus der DOP-PCR (Abb. 7, Spur 2) in 436 Nukleotiden eine 61 % ige Übereinstimmung mit der RNA abhängigen RNA Polymerase (RdRp) des *Beet Cryptic Virus 3* (BCV 3). Zwei Klone [Klon 1: 353 bp (Abb. 6, Spur 1), Klon 2: 448 bp] aus der cDNA Klonierung stimmten zu 67 % mit dieser Sequenz überein.
- Für eine diagnostische RT-PCR wurden Primerpaare aus den Sequenzen der dsRNA abgeleitet. Diese amplifizierten sowohl aus dsRNA als auch von aufgereinigten Nukleokapsiden von Stieleichen mit Proteingrößen von 53 kDa ein Fragment von 654 bp, deren Sequenzen zu 99 % mit der des Klons aus der DOP-PCR übereinstimmten.

Literatur:

- Benthack, W.; 2001: Klonierung und partielle Sequenzierung des unbekanntes Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (*sorbus aucuparia* L.) anhand doppelsträngiger RNA. Dissertation, Universität Hamburg, S. 152
- Büttner, C., Fühling, M., 1996: Studies on Virusinfections of diseased *Quercus robur* (L.) from forest stands in Northern Germany. Ann. Sci. For. 53, 383-388
- Mielke, N., 1999: Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren aus Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) mit virusähnlichen Krankheitssymptomen. Diplomarbeit Universität Hamburg, 82 S.
- Promega, 1996: Technical Manual, Universal Riboclone cDNA Synthesis System
- Roche, 1999: Technical Manual, DOP PCR Master
- Schmelzer, K., Schmidt, H.E., Schmidt, H.B., 1966: Viruskrankheiten und virusverdächtige Erscheinungen an Forstgehölzen. Arch. Forstwesen 15, 2, 107-120

Dieses Projekt wird unterstützt vom Berliner Programm zur Förderung von Frauen in Forschung und Lehre.

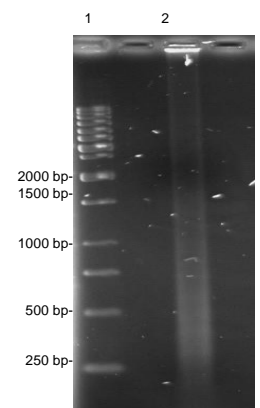


Abb. 7: Gelelektrophorese eines DOP-PCR-Produktes. 1: 1 kb DNA- Marker 2: DOP-PCR Produkt aus dsRNA von Blättern einer erkrankten Stieleiche (Baum A, Niedereimer, NRW).