

**ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR LEBENSMITTEL-
VETERINÄR- UND AGRARWESEN**



„Pflanzenschutz als Beitrag zur Ernährungssicherung“



Tagungsbericht 2013

BERICHT

ALVA – Jahrestagung 2013

„Pflanzenschutz als Beitrag zur Ernährungssicherung“

23. - 24. Mai 2013

Tagungsort

LFZ für Wein- und Obstbau,

Klosterneuburg

Wiener Straße 74

3400 Klosterneuburg

Tel: +43 (0) 2243 37910

Fax: +43 (0) 2243 26705

www.weinobstklosterneuburg.at

Impressum

Herausgeber

Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen

Präsident

Univ.-Doz. Dr. Gerhard Bedlan

Für den Inhalt verantwortlich

Die Autoren

Zusammengestellt von

Mag. Astrid Plenk

Druck

RepaCopy Wien DC, Triesterstraße 122, 1230 Wien

© 2013 Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen

ISSN 1606-612X

Etablierung eines RT-PCR basierenden Nachweises von *Cherry leaf roll virus* in Birkenpollen (*Betula* spp.)

Establishment of a RT-PCR based detection method of *Cherry leaf roll virus* in birch pollen (*Betula* spp.)

Ulrike Bütow¹, Maria Landgraf¹, Martina Bandte¹, Michael Kube¹, Carl-Christian Bergmann², Heidrun Behrend³, Peter Beyerlein⁴, Janina Kneipp⁵ & Carmen Büttner¹

Einleitung

Cherry leaf roll virus (CLRV) ist ein weitverbreitetes Nepovirus aus der Familie der Secoviridae und zählt zu einem der bedeutendsten pflanzenpathogenen Viren an *Betula* spp. (BANDTE et al. 2009). Die natürliche Übertragung erfolgt durch Samen und Pollen. Der Routinenachweis von CLRV in Gehölzen erfolgt über eine IC-RT-PCR, die Primer binden an die hoch konservierte 3' nicht-kodierende Region im Virusgenom (BÜTTNER et al. 2011, WERNER et al. 1997). Bisher wurde Pollen für den CLRV-Nachweis noch nicht verwendet. Es zeigte sich, dass die IC-RT-PCR nur begrenzt geeignet war um CLRV in Pollen von Moor-Birke (*Betula pendula*), Hängebirke (*Betula pubescens*) und Hybriden beider Arten zu detektieren. Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Etablierung eines sensitiven CLRV-Nachweises in Birkenpollen.

Material und Methoden

Im Frühjahr 2011 und 2012 wurde Pollen von 48 Birken (*B. pendula*, *B. pubescens* und Hybriden beider Arten) an vier verschiedenen Standorten in Berlin entnommen. Es wurden Bäume mit virustypischen Symptomen und solchen ohne Symptome beprobt. Von diesen konnten insgesamt 69 Pollenproben mittels zweier CLRV-spezifischen IC-RT-PCR-Methoden nach GENTKOW et al. (2007) vergleichend untersucht werden. Der Nachweis erfolgte über ein ca. 420 bp langes (Werner et al. 1997) und ein 353 bp langes DNA-Fragment (diese Arbeit) aus der 3' nicht-kodierenden Region. Unterschiedliche Verdünnungen des Pollenextraktes (10^{-1} - 10^{-2}) wurden in die IC-RT-PCR eingesetzt, um das Vorhandensein von Inhibitoren zu testen. Um die Sensitivität der zwei Primerkombinationen zu vergleichen, wurde CLRV-infiziertes Blattmaterial von *Chenopodium quinoa* (10^{-1} - 10^{-4}) in die IC-RT-PCR eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass Inhaltsstoffe im Pollenextrakt die IC-RT-PCR inhibieren. Bei einer Verdünnung des Pollenextrakts von 10^{-1} wurde die Amplifikation inhibiert. Erst ab einer Verdünnung von 10^{-2} konnte das spezifische DNA-Fragment in der gelelektrophoretischen Auswertung bestätigt werden. Die Kombination des neuen universellen CLRV-Primers mod RW2 mit dem Primer RW1 (353 bp) führte zu einer mindestens 10fach höheren Sensitivität verglichen mit dem Primerpaar RW2/RW1 (420 bp). Mit der IC-RT-PCR nach Gentkow et al. (2007) war CLRV in 9 von insgesamt 69 untersuchten Pollenproben nachweisbar. Die modifizierte IC-RT-PCR unter Verwendung von 10^{-2} verdünnten Pollenextrakt und der neuen Primerkombination mod RW2/RW1 führte bei der Analyse der gleichen Pollenproben zu 31 CLRV-Positiven. In fast der Hälfte der untersuchten Birken (23/48) war der CLRV-Nachweis über den Pollen positiv. Von 15 positiv getesteten Einzelbäumen konnte in beiden Kalenderjahren Pollen analysiert werden. Acht davon waren in beiden Jahren CLRV-positiv, während die Birkenpollen von den übrigen sieben Einzelbäumen nur in einem Kalenderjahr als CLRV-positiv anzusprechen waren. Der CLRV-Nachweis in dem Pollen korrelierte nicht mit der Symptomausprägung der Blätter. Die etablierten Modifikationen der CLRV-spezifischen IC-RT-PCR sind eine Voraussetzung für zukünftige Studien, die auf ein sensitives und zuverlässiges CLRV-Nachweisverfahren in Pollen von *Betula* spp. angewiesen sind (Landgraf et al., 2011).

Zusammenfassung

Das pollen- und samenübertragbare Cherry leaf roll virus zählt zu den bedeutendsten pflanzenpathogenen Viren an *Betula* spp. Für den CLRV-Nachweis über Birkenpollen konnte eine modifizierte IC-

RT-PCR etabliert werden. Während mit der IC-RT-PCR nach Gentkow et al. (2007) CLRV in 9 von 69 Pollenproben nachweisbar war, ergab die Analyse der gleichen Pollenproben mit der modifizierten IC-RT-PCR 31 Proben mit CLRV-positiven Testergebnis. Im Vergleich zum Primerpaar RW2/RW1 weist die neue Primerkombination mod RW2/RW1 eine mindestens 10fach erhöhte Sensitivität auf. CLRV war sowohl im Pollen von symptomatischen als auch asymptomatischen *Betula* spp. an allen vier untersuchten Standorten nachweisbar.

Abstract

The pollen- and seed borne Cherry leaf roll virus is one of the most important viruses infecting *Betula* spp. For the CLRV-proof by birch pollen a modified IC-RT-PCR could be established. With the IC-RT-PCR by Gentkow et al. (2007) CLRV was detectable in 9 out of 69 investigated pollen samples. Testing the same samples with the modified IC-RT-PCR applying pollen extracts in a 10^{-2} dilution in combination with the new primer combination resulted in 31 CLRV-positives. In comparison with the primer pair RW2/RW1, the new primer combination mod RW2/RW1 led to an at least 10fold higher sensitivity. CLRV was detectable in pollen of both symptomatic and asymptomatic *Betula* spp. at all four sites studied.

Danksagungen

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

Literatur

- BANDTE M, VON BARGEN S, ARNDT N, GRUBITS E, JALKANEN R, BÜTTNER C, 2009: Bedeutende Viren an Birke - Fallbeispiele aus Deutschland, Finnland und den USA. Dujesiefken D, In: Jahrbuch der Baumpflege, Haymarket Media, Braunschweig, 215-221.
- BÜTTNER C, VON BARGEN S, BANDTE M, MYRTA A, 2011: Cherry leaf roll virus. In: Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits. APS PRESS, St. Paul, USA, 119-125.
- GENTKOW J, VON BARGEN S, PETRIK K, BÜTTNER C, 2007: Möglichkeiten zur Detektion des Kirschenblattrollvirus (CLRV) in Gehölzen durch serologische und molekulare Methoden. Dujesiefken D und Kockerbeck P, In: Jahrbuch der Baumpflege, Haymarket Media, Augsburg, 279-302.
- LANDGRAF M, VON BARGEN S, BANDTE M, JALKANEN R, KUBE M, KNEIPP J, VOGEL L, BEHRENDT H, BERGMANN K-CH, BÜTTNER C, 2010: Alteration of allergen potential by Cherry leaf roll virus (CLRV) in infected birch pollen. Botaniker Tagung "Diversity makes the difference", 18.-23. Sep., Berlin
- WERNER R, MÜHLBACH H P, BÜTTNER C, 1997: Detection of cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immunecapture RT-PCR using a conserved primer pair. In: Journal of Forest Pathology 27, 309-318.

Adressen der Autoren

¹ Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin

² Allergie-Centrum-Charité, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Luisenstr. 2, 10117 Berlin

³ ZAUM - Zentrum Allergie und Umwelt - Technische Universität München, Biedersteiner Str. 29, 80802 München

⁴ Technische Hochschule Wildau, Bioinformatik, Informatik, Bahnhofstraße Haus 13 15745 Wildau

⁵ Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie, Optische Spektroskopie und Prozessanalytik, Brook-Taylor-Strasse 2, 12489 Berlin

* Ansprechpartnerin: B.Sc. Ulrike Bütow, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de