Detektion und Diversität des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) in Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) in Norwegen

Theresa Büttner[1], Jenny Robel[1], Hans-Peter Mühlbach[2], Susanne von Bargen[1], Carmen Büttner[1]
[1] Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, D-14195; phytomedizin@agrar.hu-berlin.de
[2] Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek; Ohnhorststr. 18, D-22609

Einleitung

Das ***European mountain ash ringspot-associated virus*** (EMARaV) ist ein negativ-orientiertes einzelsträngiges RNA Virus, welches 4 Genomsegmente enthält (Mielke und Mühlbach, 2007). Das Virus konnte mit Symptomen wie **chlorotischen Ringflecken und Scheckungen** an Blättern von Ebereschen assoziiert werden. Die weite Verbreitung von EMARaV und der beschriebenen Symptome ist für Deutschland, Finnland, Großbritannien, Österreich, Russland, Schweden und Tschechien dokumentiert (Robel *et al*. 2013a/b). Als möglichen **Vektor** des Virus wird die Birnenpockenmilbe, ***Phytoptus pyri***, diskutiert, die an Ebereschenblättern typische **Gallen** induziert (Mielke-Ehret *et al*., 2010)

Das Ziel dieser Studie war der Erstnachweis von EMARaV in Blattproben von *Sorbus aucuparia* aus Norwegen mit Blatt-Symptomen wie chlorotischen Ringflecken, Scheckungen, Gallen, Deformationen und chlorotischen Linienmustern.

Material und Methoden

- Untersuchung von 30 Ebereschen verschiedener norwegischer Standorte mit Symptomen (Abb. 1) sowie 1 symptomfreie Blattprobe
- Isolierung von Gesamt-RNA (Mielke *et al*., 2008)
- cDNA Synthese mit random Hexameren
- Nachweis der viralen RNA2 und RNA3 mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Mielke *et al*., 2008)
- Sequenzierung der PCR-Produkte
- Sequenzvergleich mittels BioEdit
- Phylogenetische Analyse der Nukleotidsequenzen mittels ClustalX 2.1

Ergebnisse

- In 9 von 31 Blattproben konnte eine EMARaV Infektion nachgewiesen werden
- Sequenzvergleich mit bereits veröffentlichten Sequenzen konnte die Infektion von 9 Bäumen bestätigen
- Identitäten der Nukleotidsequenzen der 259 bp langen Fragmente aus dem proteinkodierenden Bereich der RNA2 lagen zwischen 94,9-100 %
- Identitäten der Nukleotidsequenzen des 159 bp langen RNA3 Fragmentes der 3´ untranslatierten Region (3´ UTR) lagen zwischen von 67,2-100 % untereinander bzw. zu bereits veröffentlichten Sequenzen
- Erstmals konnte für eine Genomregion des EMARaV (RNA3, partielle 3´ UTR) eine erhöhte Sequenzdiversität gezeigt werden, die zur Bildung von 2 Gruppen innerhalb der norwegischen EMARaV-Varianten führte (Abb. 2)

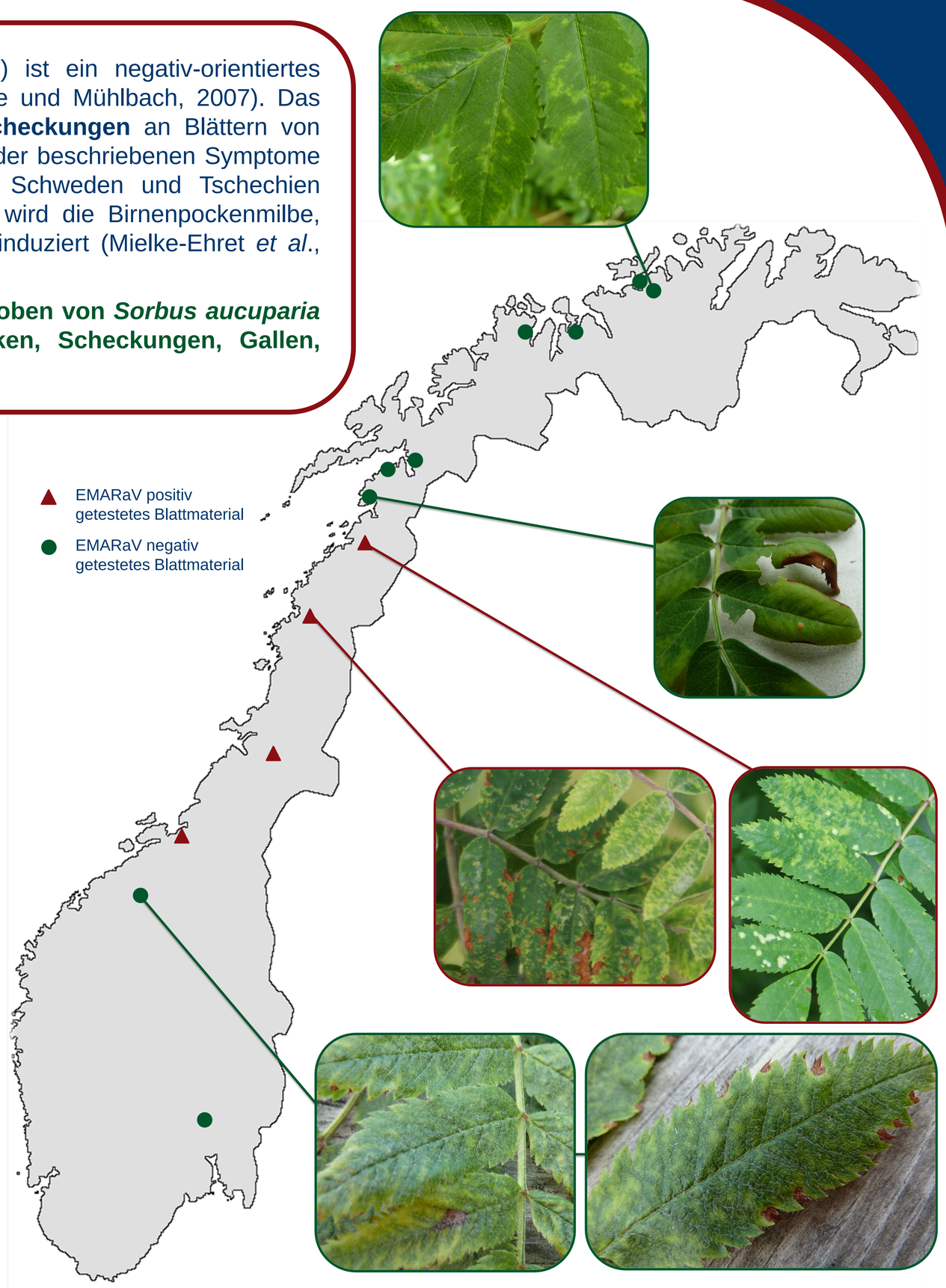

Abb. 1: Karten der beprobten Standorte in Norwegen mit zugeordneten Symptombildern

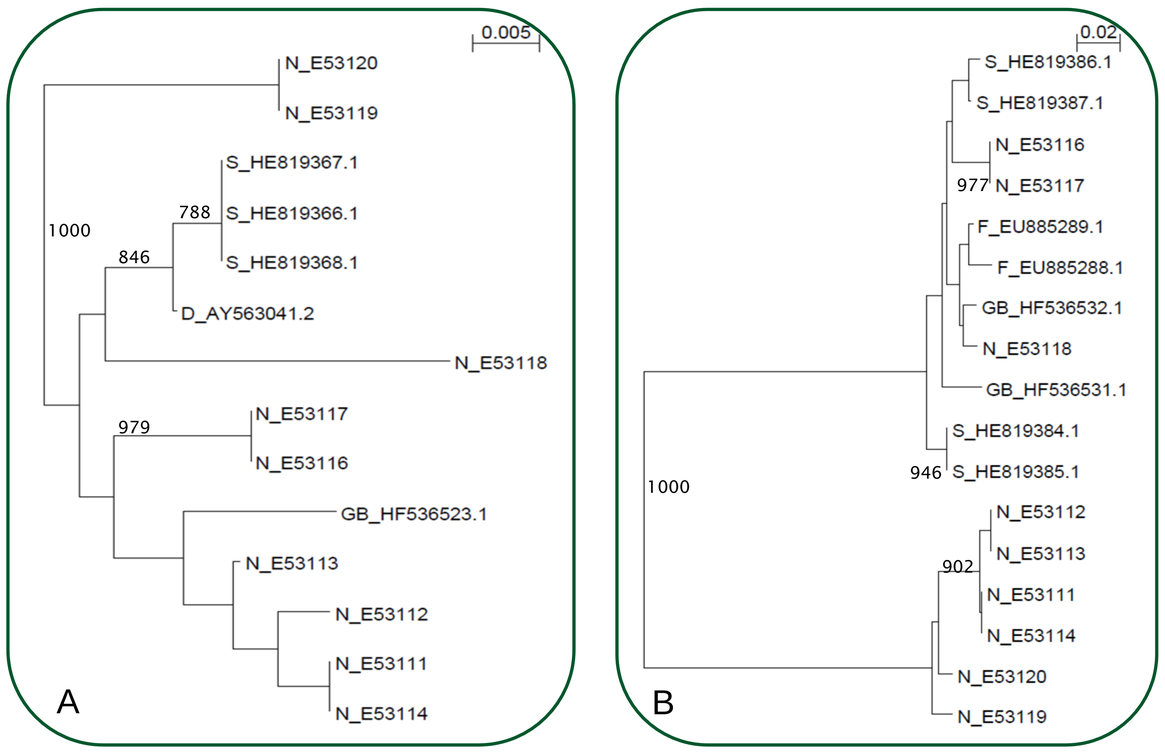

Abb. 2: Phylogenetische Stammbäume (*neighbour-joining*, mit Angabe der *bootstrap* Werte über 750 (n=1000)) **der Nukleotidsequenzen des 259 bp Fragments der RNA2** (A) **und des 159 bp Fragments der RNA3** (B)

Diskussion

Warum konnte nur in 9 von 31 untersuchten Proben EMARaV nachgewiesen werden?

- Probenahme zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Ebereschen von Nord nach Süd beinhalten eine unterschiedliche Symptomausprägung & haben womöglich Einfluss auf den Virustiter und damit die Nachweisbarkeit von EMARaV
- Einfluss von Transport und Konservierung

Woher stammt die erstmalig beschriebene höhere genetische Variabilität der RNA3 3´UTR (67,2-100 %)?

- Für schwedische und finnische EMARaV Varianten wurden bisher mindestens Identitäten von 94 % der 3´ UTR dokumentiert (Kallinen *et al*., 2009; von Bargen *et al*., 2013)

Ausblick

- **erneute Probennahme in Norwegen & Bestimmung der Gallmilbenart in Proben von norwegischen Standorten**
- **Etablierung neuer, zuverlässiger Detektionsmethoden in Hinblick auf die festgestellte höhere genetische Variabilität der EMARaV-Varianten aus Norwegen**

Quellen

Kallinen A.K., Lindberg I.L., Tugume A.K., Valkonen J.P.T. 2009 Detection, Distribution, and genetic Varibility of *European mountain ash ringspot-associated virus*, Phytopathology 99, 344-352

Mielke N., Mühlbach H.P. 2007 A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.), Journal of General Virology 88, 1337-1346

Mielke-Ehret N., Thoma J. Schlatermund N., Mühlbach H.P. 2010 Detection of *European mountain ash ringspot-associated virus*-specific RNA and protein P3 in the pear blister mite *Phytoptus pyri* (*Eriophyisae*), Achieves of Virology 155, 987-991

Mielke N., Weber M., Khan S. Mühlbach H.P. 2008 Detection of *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) in *Sorbus aucuparia* L. by a specific antiserum and reverse transcription-PCR, Forest Pathology 38, 371-380

Robel, J., Bandte, M., Mühlbach,H-P., von Bargen, S., Büttner, C. 2013,a Ein neuartiges Virus in *Sorbus aucuparia* L.: Nachweis und Verbreitung des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV). In: Dujesiefken, D. (Ed.), Jahrbuch der Baumpflege, Haymarket Media, Braunschweig, 47-53.

Robel, J., Dieckmann, L., von Bargen, S., Büttner C. 2013,b First detection of *European mountain ash ringspot associated virus* in rowan trees in Scotland. New Disease Reports 27, 13. [http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2013.027.013]

von Bargen, S., Arndt, N., Robel, J., Jalkanen, R., Büttner C. 2013, Detection and genetic variability of *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) in Sweden. *Forest Pathology* 43, 429-432.

Danksagung

Dieses Projekt ist durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (BU890/27-1, BU890/14-1 & MU559/13-1)