

# Entwicklung einer diagnostischen RT-PCR zum Nachweis von Carla- und Badnaviren in Birke

## *Development of diagnostic RT-PCR for the detection of Carla- and Badnavirus in birch*

Kaja Pack<sup>1\*</sup>, Maria Landgraf<sup>1</sup>, Martina Bandte<sup>1</sup>, Susanne von Bargaen<sup>1</sup>, Martin Schreiner<sup>2</sup>,  
Barbara Jäckel<sup>2</sup> und Carmen Büttner<sup>1</sup>

### **Einleitung**

In den letzten Jahren wurden viele neue pflanzliche Genome bzw. Transkriptome von Pflanzen veröffentlicht, nicht zuletzt unter Nutzung des Next Generation Sequencing (NGS). Die Sequenzen aus dem NGS liefern neue Daten zu den enthaltenen Pathogenen insbesondere auch zum Virom. So wurden 2015 zwei neue Viren (aus den Gattungen *Carla*- und *Badnavirus*) in Birke entdeckt. Badnaviren sind dsDNA-Viren und können unter bestimmten Bedingungen ins Genom der Pflanze integrieren, während es sich bei den Carlaviren um (+)ssRNA handelt, die dazu nicht in der Lage sind. Einer Erforschung der Epidemiologie und Interaktion dieser Viren mit dem Wirt geht eine gründliche Entwicklung von Methoden zur Identifikation und Detektion voraus. Für die Einbeziehung dieser Detektionsmethoden in die Differentialdiagnose im Stadtgrün ist es grundlegend wichtig, dass die Spezifität und Sensitivität dieser Verfahren optimiert sind (LANDGRAF et al. 2016). Insbesondere die RT-PCR ist in der Lage, die Ansprüche an ein sensitives und spezifisches Nachweisverfahren zu gewährleisten. In den Jahren 2015 und 2016 wurden aus der Sequenzierung für Stammbaumanalysen vorhandene Oligonukleotide genutzt, um mittels RT-PCR erstmals Carla- und Badnaviren in Birken unterschiedlicher Standorte nachzuweisen. Die Eignung von neu entwickelten diagnostischen Oligonukleotiden für den Nachweis von Carla- und Badnaviren wird vorgestellt und erste Ergebnisse für Proben aus Birken präsentiert. Der spezifische Nachweis soll dazu beitragen, die Bedeutung der Carla- und Badnaviren im 2015 und 2016 nachgewiesenen Viruskomplex zu klären.

### **Material und Methoden**

Untersucht wurde virusverdächtiges Pflanzenmaterial aus *Betula* sp., welches an verschiedenen Standorten in Europa zwischen den Jahren 2014 und 2016 darunter auch Korsika gesammelt wurde (LANDGRAF et al. 2016). Die Gesamt-RNA-Isolierung wurde nach einer modifizierten Methode von BOOM (1990) durchgeführt. Hierfür wurde von jeder Probe zwischen 0,1-0,3 g gefrorenem Blattmaterial homogenisiert. Ausgehend von Sequenzen aus der Hochdurchsatzsequenzierung (Next Generation Sequencing) wurden verschiedene Primer-Kombinationen entworfen, die spezifisch für die Carla- und Badnaviren ausgewählt wurden. Die NGS-Sequenzen wurden hierfür mit bekannten Sequenzen aus der Datenbank beim NCBI (National Center for Biotechnology Information) und über das Programm BioEdit 7.1.3.0-Version mit dem Algorithmus ClustalW in einem Alignment verglichen. In einer konservierten Genomregion eines Polyproteins wurden bei geeigneten biophysikalischen und stereochemischen Eigenschaften Primer ausgewählt. Interne Strukturen wie Haarnadeln und Kreuzhybridisierungen wurden mithilfe des Online-Programms OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator ausgeschlossen. Die isolierte RNA wurde mit einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die PCR für die jeweiligen Primerpaare der beiden Viren durchgeführt.

### **Ergebnisse und Diskussion**

In den ersten Studien in 2015 und 2016 unter Verwendung der Oligonukleotide, die für die Stammbaumanalyse entwickelt wurden, konnten Badna- und Carlaviren in einigen Proben nicht eindeutig ausgeschlossen werden und es zeigten sich mitunter unspezifische PCR-Amplifikate (dargestellt in Abb. 3), die nicht auswertbar waren. Es konnte gezeigt werden, dass sich die ausgewählten Viren mit den neu entwickelten Primern an Birken verschiedener Standorten spezifisch nachweisen ließen. Die Symptome zeigten jedoch eine große Bandbreite, sodass sich diese nur schwer den jeweiligen Viren zuordnen lassen (siehe Abb. 1).

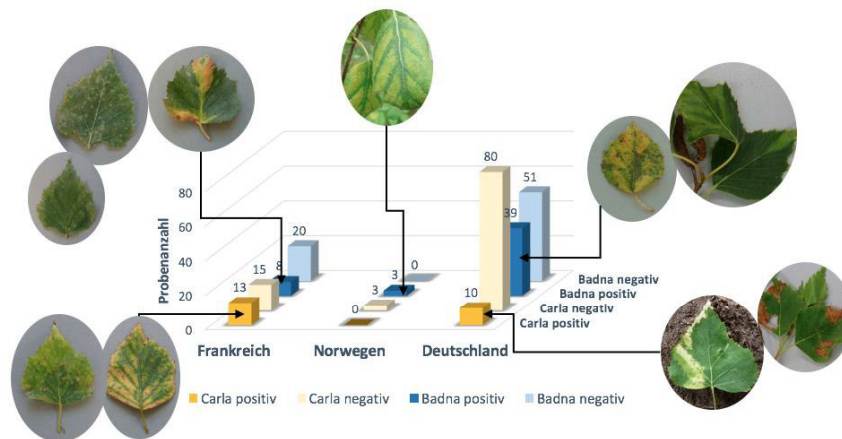


Abbildung 1: Übersicht der Ergebnisse aller getesteten Proben für Standorte in Frankreich (n=28), Norwegen (n=3) und Deutschland (n=90) mit exemplarischer Dokumentation der ausgewählten Blattproben

Bei der Nukleinsäureextraktion aus verdächtigem Blattmaterial wird nicht nur virale Ribonukleinsäure, sondern auch RNA des pflanzlichen Wirtes isoliert. Die RT-PCR basiert auf sehr spezifischen Primern, so dass nur die Viren damit erfasst werden. Dies wurde mittels Sequenzierung überprüft. Für die Identifikation der Badnaviren speziell an *Betula* sp. konnten zwei RT-PCR-Systeme entwickelt werden. Das erste Primerpaar, welches ausgehend von NGS-Daten einer erkrankten Birke aus Korsika (Frankreich) entwickelt wurde, amplifiziert ein 300bp großes Fragment und das Primerpaar basierend auf NGS-Daten von Birken aus Berlin erzeugt ein 242bp langes Amplikon. Beide liegen im Bereich des Polyproteins. Für die Carlaviren konnte aufgrund der wenig konservierten Sequenzinformation nur ein Primerpaar entwickelt werden. Diese RT-PCR amplifiziert ein 197bp langes Fragment und befindet sich im Bereich der Polymerase. Für die Optimierung wurde die Temperatur der Primeranlagerung für jedes Primerpaar um zwei Grad erhöht und die Zyklenanzahl von 35 auf 30 herabgesetzt. Für die Anlagerungstemperatur der Primerpaare (BadnaK-FW/-RV und CarlaK-FW/-RV) ausgehend aus den korsischen NGS-Daten ergab sich ein Optimum bei 53 °C und für das Primerpaar (BadnaSG-FW/-RV), welches aus deutschen Hochdurchsatzsequenzierungen entspringt, eine optimale Temperatur bei 55 °C. Um eine genaue Aussage über die genetische Variabilität der Badna-Viren treffen zu können, wurden die RT-PCR-Amplifikate sequenziert und mit der bekannten Sequenz aus dem NGS verglichen (siehe Abb. 2). Es wurden acht RT-PCR-Produkte sequenziert und mit der BioEdit 7.1.3.0-Version (HALL et al. 1999) durch den Algorithmus ClustalW ausgewertet (THOMPSON et al. 1994).

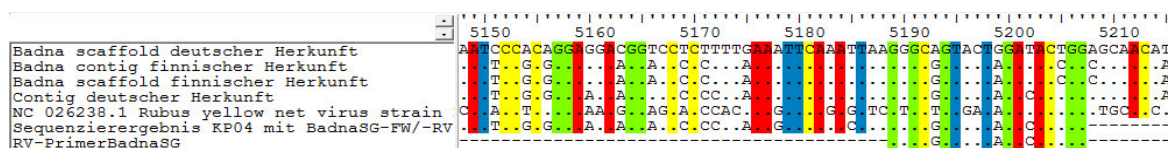


Abbildung 2: Sequenzalignment mit dem Genom des *Rubus yellow net virus* (NC026238.1) und NGS-Daten aus deutschen und finnischen Proben und der Sequenz des PCR-Produktes eines korsischen Probe aus 2016 und der Sequenz des BadnaSG-FW-Primers.

Da die Viren erstmals an Gehölzen nachgewiesen wurden (Ergebnisse in Abb. 3), eröffnet sich ein weites Forschungsfeld zur Bewertung der Pathogenität der Viren und eines geeigneten Umgangs mit diesen Virusinfektionen. In der Abbildung 3 zeigt sich die Spezifität durch eine klare Bande auf der in Material und Methoden-Teil beschriebenen Höhe. Die RT-PCR-Primer werden weiterhin an anderen Pflanzenfamilien getestet und es soll untersucht werden, ob sich das pararetrovirale Badnavirus ins Genom der Pflanze integriert hat. Die Verbreitung an anderen Standorten müsste weiter untersucht werden und verschiedene Isolate sollen zukünftig besser voneinander abgegrenzt werden. Der Verfall von virusinfizierten Birken wird in Berlin schon länger beobachtet, aber Empfehlungen zur Behandlung fehlen bislang, aufgrund der ungeklärten Ursache. Neben einem gezielten Nachweis von pathogenen Viren müssen für die Entwicklung eines Managementkonzeptes zuerst die untersuchten Viren

hinsichtlich ihrer Pathogenität bewertet werden. Auch dafür bietet ein optimierter Nachweis mittels RT-PCR die Grundlage.

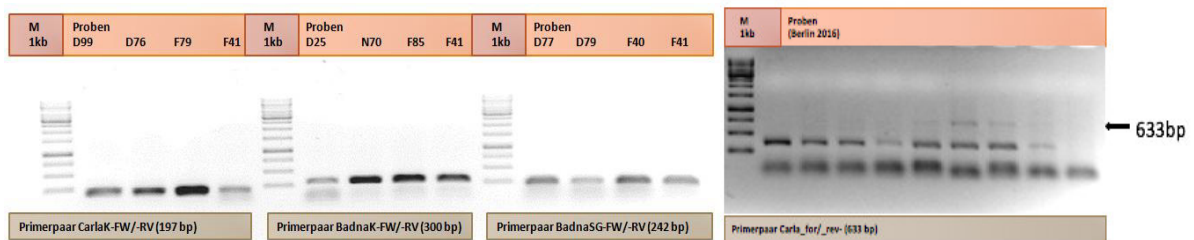


Abbildung 3: **Detektion von Badnaviren durch gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte mit dem Primerpaar CarlaK-FW/-RV mit einer Amplifikationsgröße von 197bp, BadnaK-FW/-RV mit einem 300bp-langem Amplikon und BadnaSG-FW/-RV, welches ein 242bp-großes Fragment amplifiziert, im 1%igen Agarosegel für Proben aus Deutschland D99, D76, D25 und D79 (2016), Norwegen N70 (2016) und Frankreich F79, F41, F85 und F40 (2014 und 2016). Im Vergleich dazu rechts die Amplifikationsprodukte des Primerpaars Carla\_for/\_rev der vorherigen Studien aus 2015 und 2016 von Proben aus Deutschland mit einer erwarteten Fragmentgröße von 633bp mit unspezifischen Amplifikaten**

### **Zusammenfassung**

Erstmals konnte eine spezifische RT-PCR für neuartige Carla- und Badnaviren, die in Birke nachgewiesen wurden, entwickelt werden. Durch die Optimierung lässt sich die Verbreitung der Viren oder des Viruskomplexes in den Birken genauer untersuchen. Es konnte an ersten ausgewählten Proben gezeigt werden, dass das Detektionssystem spezifisch ist.

### **Abstract**

For the first time it was possible to develop a specific method to detect Carla- and Badnavirus in birch by molecular methods. Using optimized RT-PCR-systems, chance is given to investigate the distribution of these viruses or virus-complexes in birch. On the basis of several samples it was shown that the detection-system is specific.

### **Literatur**

- BOOM, R.; SOL C. J.; SALIMANS M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VANDER DER NOORDAA, J. 1990: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3): 495-503
- HALL, T.A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT
- LANDGRAF, M.; JOHANNES, G.; RUMBOU, A.; BANDTE, M.; VON BARGEN, S.; SCHREINER, M.; JÄCKEL, B.; BÜTTNER, C. 2016: Absterbende Birken im urbanen Grün Berlins – eine Studie zur Virusinfektion
- LANGER, J.; RUMBOU, A.; FAUTER, A.; VON BARGEN, S.; BÜTTNER, C. 2016: High genetic variation in a small population of *Cherry leaf roll virus* in *Betula* sp. of montane origin in Corsica
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994: Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice

### **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> Pflanzenschutzamt Berlin, Mohriner Allee 137, 12347 Berlin

\* Ansprechpartnerin: Kaja PACK, [packkaja@hu-berlin.de](mailto:packkaja@hu-berlin.de)