

# **Epidemiologische Untersuchungen zum *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV) an Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.)**

## ***Epidemiological investigations on the European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV) on European mountain ash (Sorbus aucuparia L.)***

Janina Vincenz<sup>1\*</sup>, Martina Bandte<sup>1</sup>, Nicole Mielke<sup>2</sup>, Hans-Peter Mühlbach<sup>2</sup> und Carmen Büttner<sup>1</sup>

### ***Einleitung***

Im gesamten Verbreitungsgebiet der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) - von Nord- bis Mitteleuropa – lässt sich die „Ringfleckigkeit“ der Eberesche beobachten. Die Erkrankung an Ebereschensläsungen zeigt sich durch chlorotische Ringflecken und Scheckungen der Blätter und ist mit einem neuen RNA-Virus assoziiert, dem *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV). Das EMARAV repräsentiert eine neue Gattung der ssRNA-Viren, dem Emaravirus. Auf der Grundlage der Genomorganisation, Sequenzanalyse und Morphologie besteht eine gewisse Verwandtschaft zur Familie *Bunyaviridae* sowie ein Zusammenhang zu drei anderen nicht klassifizierten RNA-Viren, *Pigeon pea sterility mosaic virus* (PPSMV), *High Plains virus* (HPV) und *Fig mosaic-associated virus* (FMaV). Diese drei viralen Krankheitserreger werden durch Gallmilben (*Eriophyoidea*) übertragen. Für das nicht mechanisch übertragbare EMARAV ist bisher noch kein Vektor bekannt. Das vielfach beobachtete Auftreten zahlreicher Gallen auf den Blattunterseiten von erkrankten Ebereschensläsungen und die Übertragung der drei phylogenetisch verwandten Viren durch Gallmilben, führte uns dazu, die Übertragbarkeit des EMARAV durch Gallmilben zu prüfen.

### ***Material und Methoden***

Die Untersuchungen zur Übertragbarkeit des EMARAV durch Gallmilben wurden vor zwei Jahren initiiert. Dazu wurden insgesamt 300 zweijährige nicht-EMARAV-infizierte Ebereschensläsungen mit Gallmilben inokuliert, unter Freilandbedingungen weiter kultiviert und regelmäßig visuell kontrolliert. Zur Übertragung wurden Blätter mit Gallen von EMARAV-infizierten Ebereschensläsungen um den Stamm nicht-infizierter Ebereschensläsungen unterhalb der Blattknospen mit jeweils einer Holzklammer geklammert. Als Referenz wurden Ebereschensläsungen unter den gleichen Bedingungen kultiviert die a) mit Blättern mit Gallen von nicht EMARAV-infizierten Ebereschensläsungen inokuliert und b) keiner Behandlung unterzogen wurden. Das Inokulum wurde von Ebereschensläsungen des Forstamts Grunewald (Berlin) entnommen.

Zur Prüfung der Übertragung des EMARAV mit den Gallmilben wurde ein Jahr nach der Inokulation Blattmaterial dieser Ebereschensläsungen entnommen und einer Gesamt RNA-Isolierung (Mielke *et al.*, 2007) mit nachfolgender RT-PCR (Mielke *et al.*, 2008) unterzogen. Darüber hinaus wurden Milben aus Gallen, die sich an Blättern der Ebereschensläsungen gebildet hatten, isoliert und ebenfalls mit Hilfe einer RT-PCR auf eine Kontamination mit EMARAV geprüft. Mit der RT-PCR wird ein 204 bp langes Fragment aus der RNA 3, innerhalb der nicht-kodierenden Region des putativen Nucleocapsidproteins, amplifiziert.

### ***Ergebnisse und Diskussion***

Ein Jahr nach der Inokulation der Ebereschensläsungen wiesen etwa 5% der Pflanzen Gallen auf; an den unbehandelten Kontrollpflanzen waren keine Gallen zu erkennen. Virusverdächtige Blattsymptome konnten an keiner der 300 Versuchspflanzen beobachtet werden.

Ein Nachweis des EMARAV war dennoch sowohl aus Blättern als auch Milben mit Hilfe der RT-PCR möglich. Bisher wurden etwa 20% der inokulierten Sämlinge und Milben aus einer von 12 im Sommer 2009 entnommenen Gallen auf eine Infektion mit dem Erreger überprüft. Ein Sämling ist als EMARAV-infiziert anzusprechen (Abb.1). Die getesteten Milben aus einer Galle eines mit Milben einer EMARAV-infizierten Eberesche inokulierten Sämlings ließen nach gelelektrophoretischer Trennung der RT-PCR-Amplifikate ein Amplikon erkennen. Dieses Amplikon muss noch kloniert und sequenziert werden, um die Kontamination der Gallmilbe mit dem Erreger abzusichern.

Die Ebereschensämlinge werden weiterhin regelmäßig bonitiert, beprobt und molekularbiologisch auf eine Infektion mit EMARAV geprüft. Von Gehölzen ist bekannt, dass sich häufig erst Jahre nach der Infektion charakteristische virusinduzierte Symptome erkennen lassen. Die Übertragungsrate kann daher frühestens 2 Jahre nach der künstlichen Inokulation ermittelt werden.

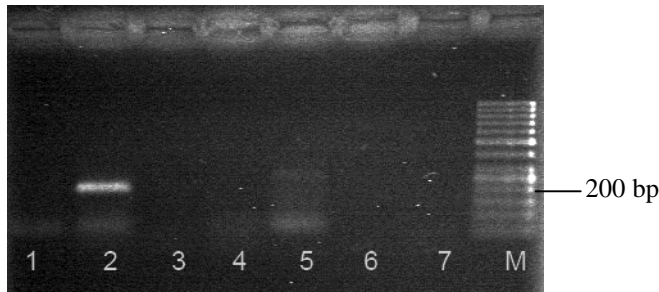


Abb. 1:  
Gelelektrophoretische Trennung von RT-PCR  
Amplifikaten aus Blattmaterial symptomloser  
mit Gallen EMARAV-infizierter Ebereschen  
inokulierte Sämlinge (Spur 2-7), Wasserkontrolle  
(Spur 1) und Marker (Spur M)

### **Zusammenfassung**

Zur Übertragung des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV) liegen noch keine gesicherten Daten vor. Das vielfach beobachtete Auftreten zahlreicher Gallen auf den Blattunterseiten von erkrankten Ebereschen und die Übertragung von drei phylogenetisch verwandten Viren durch Gallmilben, führte uns dazu, die Übertragbarkeit des EMARAV durch Gallmilben zu prüfen. Vor zwei Jahren wurden daher Übertragungsversuche an etwa 300 Ebereschensämlingen initiiert, indem nicht-EMARAV-infizierte Ebereschen mit Gallmilben inokuliert und unter Freilandbedingungen weiter kultiviert wurden. Von diesen Ebereschen wurden Blattmaterial und Gallmilben mittels einer RT-PCR auf eine Infektion/Kontamination mit EMARAV geprüft. Erste Untersuchungen bestätigen eine Kontamination der Gallmilben sowie eine Infektion des Blattgewebes inokulierter Ebereschen mit EMARAV.

### **Abstract**

So far there are no reliable data on the transmission of *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV). The occurrence of numerous galls on the lower surface of the leaves of infected mountain ash and the transmission of three phylogenetically related viruses by gall mites, caused us to initiate transmission experiments. Two years ago approximately 300 European mountain ash seedlings were inoculated with gall mites of EMARAV-infected respectively non-infected mountain ash and cultivated under field conditions. Leaf material and gall mites of these seedlings were tested in regard to an infection/a contamination with EMARAV by RT-PCR. First results confirm the contamination of gall mites as well as the infection of leaf material of inoculated seedlings with EMARAV.

### **Danksagung**

Dankenswerterweise dürfen wir unsere Arbeiten - seit Beginn der Großbaumaßnahmen an unserem Gebäude - am Julius Kühn-Institut in Dahlem durchführen und haben dort unseren vorübergehenden Sitz in der Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin

### **Literatur**

- 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 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.

### ***Adressen der Autoren***

<sup>1</sup>Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, FG Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, D-14195 Berlin

<sup>2</sup>Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Molekulare Phytopathologie und Genetik, Ohnhorststrasse 18, D-22609 Hamburg

\*Ansprechpartner: [phytomedizin@agrar.hu-berlin.de](mailto:phytomedizin@agrar.hu-berlin.de)