Studien zur Detektion eines unbekannten Agens an Flatterulme (*Ulmus laevis* Pall.)

Anne-Mareen Eisold, Markus Rott, Martina Bandte, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin
Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin
phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Seit dem Jahr 2000 wird ein Bestand von ca. 150-jährigen Flatterulmen (*Ulmus laevis* Pall.) im Schlosspark Caputh (Brandenburg, Abb. 1) regelmäßig bonitiert. Von 30 Ulmen weisen 16 Bäume virustypische Symptome wie chlorotische Blattscheckungen, Blattflecken, Mosaik und Ringflecken auf (Abb. 3 A-F). In vorangegangenen Untersuchungen wurden pilzliche und bakterielle Pathogene als Verursacher der Symptome ebenso ausgeschlossen wie an Gehölzen häufig auftretenden Viren wie *Arabis mosaic virus* (ArMV) und *Cherry leaf roll virus* (CLRV) (Bandte *et al*., 2004).

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung des unbekannten, putativ viralen, pathogenen Agens an Ulmus laevis.

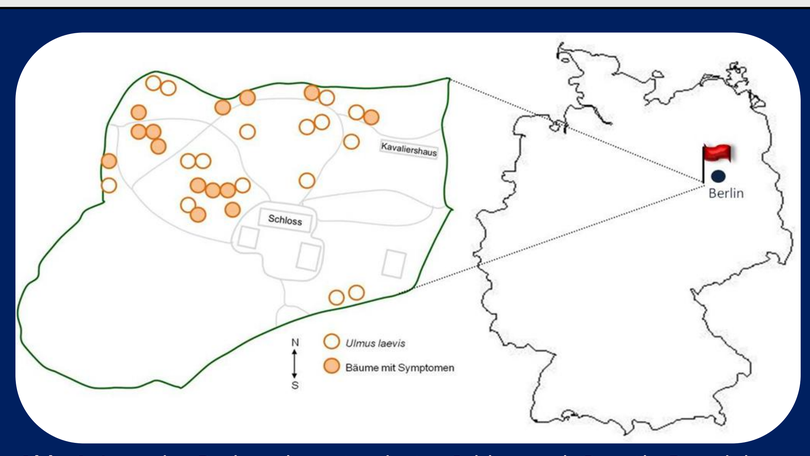

Abb. 1: Lage des Probenahmestandortes Schlosspark Caputh, Brandeburg.

I Mechanische Übertragung

Reiser von symptomtragenden Astpartien erkrankter Ulmen wurden auf *U. laevis* Sämlinge gepfropft. In der folgenden Vegetationsperiode entwickelten 11 von 26 Unterlagen die gleichen Symptome wie die Spenderbäume. Es zeigten sich Chlorosen (Abb. 3 A, B), chlorotische Linienmuster (Abb. 3 C, F) und chlorotische Ringflecken (Abb. 3 D, E).

Die Biotestpflanze *Chenopodium quinoa* wurde mit einem Homogenat von Knospen symptomtragender Astpartien von *U. laevis* inokuliert. Die Indikatorpflanzen entwickelten Blattdeformationen, Chlorosen und Wuchsdepressionen (Abb. 2). Die mechanische Übertragbarkeit und die Ausprägung der Symptome deuten auf eine Infektion mit einem Virus hin.

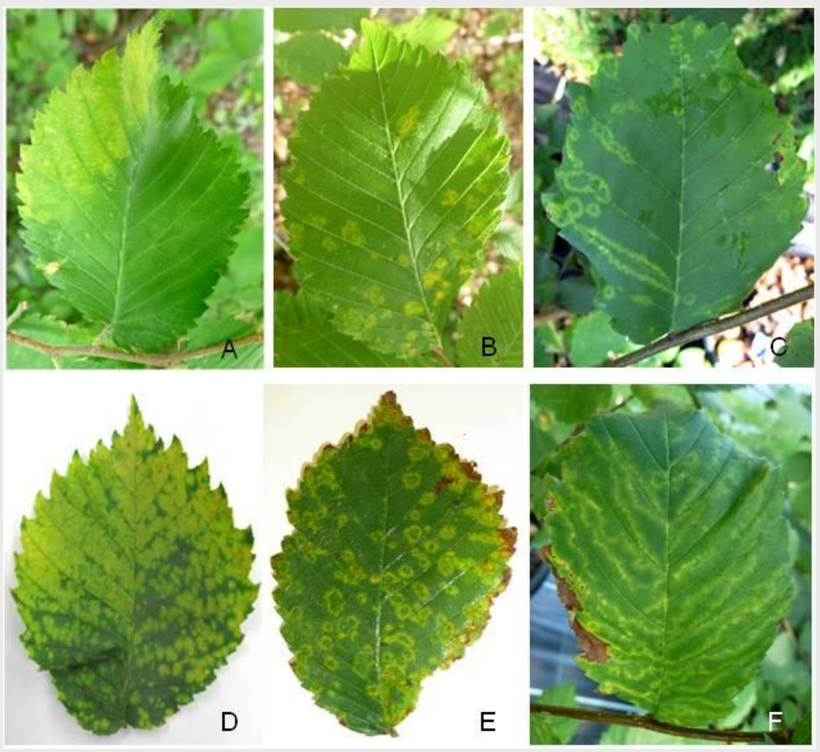

Abb. 2 (oben): Symptome an *C. quinoa* nach mechanischer Inokulation mit Knospenmaterial symptomtragender Ulmen. A: Blattdeformationen; B: Chlorosen; C: Wuchsdepression (rechts) im Vergleich zur nicht-inokulierten Kontrolle (links).

Abb. 3 (links): Symptome an *U. laevis*. A-C: Blätter mit Symptomen vom Originalstandort Caputh; D-F: Blätter gepfropfter Flatterulmen im Folgejahr nach erfolgreicher Verwachsung.

II Virusanreicherung

Viren aus Blattmaterial von inokulierten *C. quinoa* wurden nach Dijkstra und de Jager (1998) angereichert. Die Partikelmorphologie wurde im TEM dargestellt. Es konnten sowohl isometrische Partikel mit einem Durchmesser von 25 – 30 nm, als auch filamentöse Partikel mit einer Länge von etwa 400 nm dargestellt werden (Abb. 4).

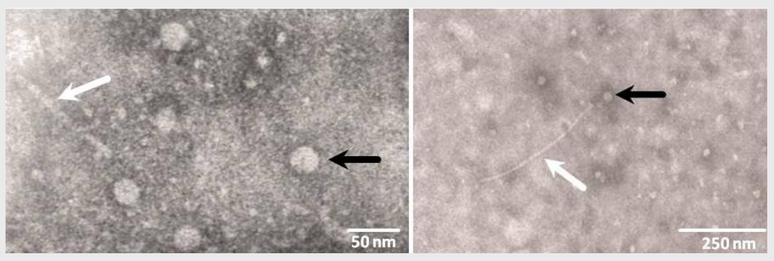

Abb. 4: TEM-Aufnahme einer Virusanreicherung aus inokulierten *C. quinoa*. Schwarze Pfeile: isometrische Partikel (ø ca. 25-30 nm); weisse Pfeile: filamentöse Partikel (ca. 400 nm).

III Proteinfraktionierung

Mittels SDS-PAGE konnte in der Virusanreicherung ein putatives virales Hüllprotein mit einer molekularen Masse von ca. 25 kDa dargestellt werden (Abb. 5).

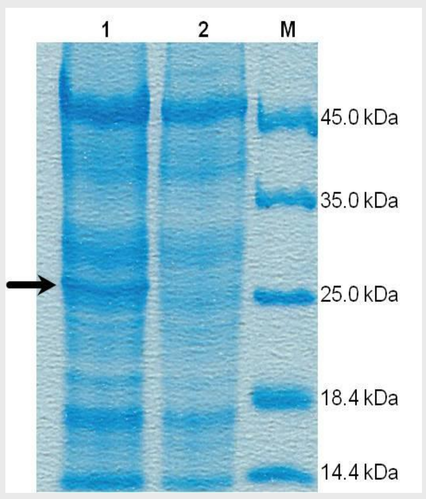

Abb. 5: Proteinfraktionierung der Virusanreicherung im SDS-PA-Gel.
1: Proteinfraktionierung einer Virusanreicherung aus inokulierten *C. quinoa*;
2: Proteinfraktionierung aus Virusanreicherung einer nicht-inokulierten *C. quinoa*;
3: Größenstandard (Unstained Protein ladder, Thermo Scientific), Pfeil: Das inokulierte Material zeigt ein putatives virales Hüllprotein mit einer molekularen Masse von ca. 25 kDa.

IV Random PCR

Aus der Virusanreicherung wurde RNA isoliert und für eine random PCR nach Froussard (1992) eingesetzt. Amplikons wurden kloniert und sequenziert. Der Sequenzabgleich mit der NCBI-Datenbank mittels BLAST zeigte Übereinstimmungen mit Sequenzen der RNA1 und RNA3 des *Elm mottle virus* (EMoV).

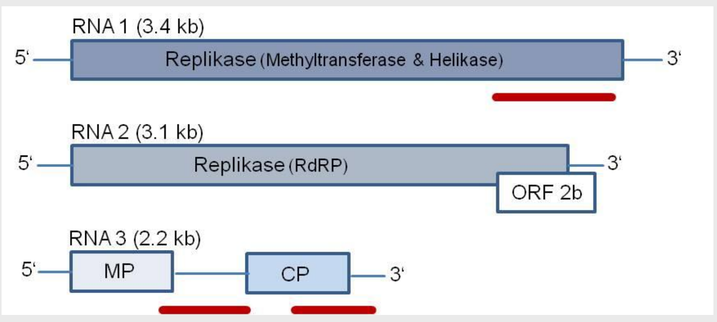

Abb. 6: Genomorganisation des EMoV unter Angabe der mittels rPCR amplifizierten Genomregionen (rote Unterlegungen).

V Carlavirus-spezifische PCR

Die Morphologie und Größe der fadenförmigen Partikel deuten im Zusammenhang mit Ergebnissen von Voruntersuchungen auf eine mögliche Infektion mit Carlaviren hin.

Mit aus Blättern symptomtragender Ulmen, sowie aus Blattmaterial inokulierter *C. quinoa* isolierter RNA wurde eine PCR mit degenerierten Carlavirus-spezifischen Primern durchgeführt (Nie *et al*., 2008). Eine Infektion mit Carlaviren konnte jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 7).

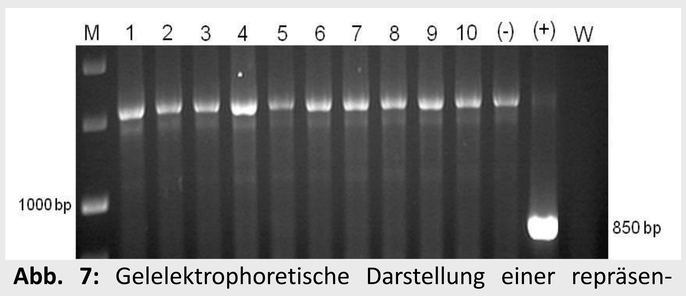

Abb. 7: Gelelektrophoretische Darstellung einer repräsentativen PCR mit Carlavirus-spezifischen degenerierten Primern. M: 1 kb DNA-ruler (Thermo Scientific); 1-10: mit Knospenhomogenat symptomtragender Ulmen inokulierte *C. quinoa*; (-): nicht inokulierte *C. quinoa*; (+): *Potato virus M* (PVM); W: Wasserkontrolle. Neben unspezifischen Fragmenten von etwa 1600 bp konnte keine Carlavirus-spezifische DNA amplifiziert werden.

VI Phytoplasmen-spezifische PCR

Zur Analyse von in Ulmen auftretenden Phytoplasmen wurde eine *nested* PCR mit 16S rRNA-spezifischen Primern durchgeführt (Lee *et al*., 2004, Abb. 8). Nach Sequenzierung der Amplikons und Abgleich mit der NCBI-Datenbank mittels BLAST zeigte sich, dass sowohl einige symptomtragende Bäume aus dem Schlosspark Caputh, als auch symptomfreie *U. laevis*-Sämlinge mit *Candidatus phytoplasma ulmi* infiziert sind. Eine Korrelation der Phytoplasmeninfektion zur Symptomausprägung wurde nicht festgestellt.

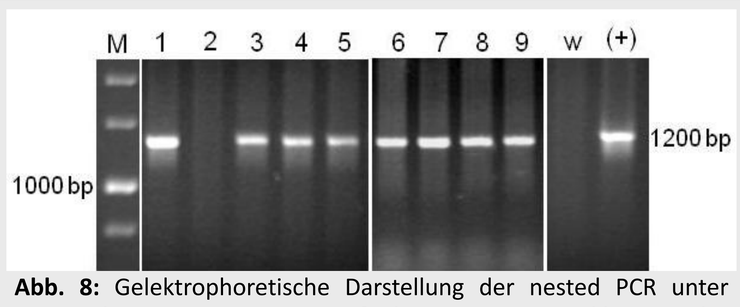

Abb. 8: Gelektrophoretische Darstellung der nested PCR unter Verwendung von 16S rRNA-spezifischen Primern. M: 1 kb DNA-ruler (Thermo Scientific); 1-5: Flatterulmen vom Standort Caputh; 6-9: symptomfreie *U. laevis*-Sämlinge; W: Wasserkontrolle; (+): AY1, *elm yellows group* Isolat aus *Vinca rosea*.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die ***mechanische Übertragbarkeit*** des kausalen Agens der Erkrankung der Flatterulmen am Standort Caputh, sowie die ***charakteristische Symptomausprägung*** deuten auf eine Virusinfektion hin. Die Darstellung von ***isometrischen Partikeln*** mit einer Größe von 25-30 nm, das ***putative coat protein*** mit einer Größe von ca. 25 kDa, sowie der Nachweis von ***EMoV-spezifischer RNA*** lassen den Schluss einer ***Infektion mit EMoV*** der Bäume am Standort Caputh zu.

Die untersuchten Ulmen sind offensichtlich mit mehr als nur einem Pathogen infiziert. Die im TEM gezeigten ***fadenförmigen Partikel*** weisen auf mindestens ***ein weiteres Virus hin***, das in zukünftigen Arbeiten identifiziert werden soll.

Es konnte zudem eine ***Besiedlung mit Phytoplasmen*** der *elm yellows group* gezeigt werden.

Ein großer Dank gilt Dr. Joachim Hamacher (AGRO-HORTI-Testlabor) für die TEM Untersuchungen, sowie Dr. Wulf Menzel (DSMZ Braunschweig) für die Bereitstellung virusinfizierten Referenzmaterials. Wir danken außerdem Dr. Michael Kube für die Hilfe bei der Diagnose der Phytoplasmen.

Bandte *et al*. (2004), Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales 13, 65-69.
Dijkstra & de Jager (1998), Practical plant virology: protocols and exercises.
Lee *et al*. (2004), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 337-347
Froussard (1992), Nucleic Acids Research 20, 2900.
Nie *et al*. (2008), Journal of Virological Methods, 209-216.