Charakterisierung des European mountain ash ringspotassociated virus (EMARaV) in Mehlbeerenarten (Sorbus spp.)

Dieckmann L, Robel J, von Bargen S, Büttner C

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, FG Phytomedizin phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einleitung

In der Schwedischen Mehlbeere (*Sorbus intermedia* (Ehrh.) Pers.) und der Echten Mehlbeere (*Sorbus aria* L.) wurde erstmals das *European mountain ash ringspotassociated virus* nachgewiesen (Robel et al. 2013). In der vorliegenden Studie erfolgte der Vergleich der RNA1, RNA2, RNA3 und des RNA4 kodierten p4-Gens der isolierten Virusvariante aus der Schwedischen Mehlbeere mit der publizierten vollständigen Sequenz des EMARaV aus Eberesche.

Die Schwedische Mehlbeere ist eine Dreifach-Hybride aus Eberesche (Sorbus aucuparia



L.), Echter Mehlbeere (*Sorbus aria* L.) und der Elsbeere (*Sorbus torminalis* L.) (Nelson-Jones et *al.* 2002). Sie ist im nördlichen Europa beheimatet und wird zu dekorativen Zwecken im Straßen- und Stadtgrün Europas angepflanzt. Während bei Ebereschen Symptome wie Scheckungen und chlorotische Ringflecken seit Jahrzehnten beschrieben werden, konnte im Jahr 2012 erstmals bei einer Schwedischen Mehlbeere chlorotische Linienmuster und Ringflecken (Abbildung 1H & I) sowie bei einer Echten Mehlbeere (Abbildung 1E & F) chlorotische Linienmuster beobachtet werden. Diese sind auf eine Infektion mit dem *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) zurückzuführen, einem Pflanzenvirus der Gattung *Emaravirus* (Mühlbach und Mielke-Ehret 2011).

Material und Methoden

Blattmaterial einer Schwedischen Mehlbeere sowie einer Echten Mehlbeere mit chlorotischen Ringflecken bzw. chlorotischen Linienmustern wurde im Jahr 2012 und 2013 in Västerås gesammelt. Aus den Mehlbeerenblättern wurde Gesamt-RNA (Mielke et *al.* 2007) isoliert und in einer reversen Transkription mit random Hexameren in cDNA umgeschrieben. In Einzel-PCRs konnten schrittweise bisher 7015 bp der RNA1 (Nukleotide 1 bis 7015), die gesamte RNA2, 1485 bp der RNA3 sowie der p4kodierende Bereich der RNA4 (699 bp) amplifiziert werden (Abbildung 2). Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mittels Clone Jet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BioEdit abgeglichen, Oligonukleotide entfernt und mit den publizierten EMARaV Sequenzen aus Ebereschenmaterial verglichen.

Abbildung 1: *S. aucuparia* mit Früchten (A, B); *S. aucuparia* Fiederblatt mit chlorotischen Ringflecken (C) bzw. Scheckungen (D); *S. aria* mit Früchten (E); *S. aria* Blätter mit chlorotischen Linienmuster (F); *S. intermedia* mit Blüte (G); *S. intermedia* Blatt mit chlorotischen Ringflecken (H) bzw. chlorotischen Linienmustern (I).

Ergebnisse

ACAGTG

- Es konnten alle vier Genomsegmente von EMARaV in dem Blattmaterial von S. intermedia und Sorbus aria nachgewiesen werden (Abbildung 3)
- Für die Charakterisierung der EMARaV Variante aus S. intermedia konnte bisher ein 7015 bp Fragment der RNA1 (7040 nt), die gesamte RNA2 (2335 bp), ein 1485 bp langes Fragment der RNA3 (1569 nt) sowie der p4-kodierende Bereich mit 699 bp der RNA4 amplifiziert werden
 - Die Identität der Nukleotidsequenzen
 - des 7015 bp Fragments der RNA1 von EMARaV aus S. intermedia beträgt im Vergleich zu S. aucuparia (NC013105) 98 %
 - der vRNA2 aus beiden Wirtspflanzen beträgt 99 % (Vergleichssequenz NC_013106.1)
 - der p3-kodierenden Region der RNA3 beträgt 98 % (Vergleichssequenz DQ831828)
 - der p4-kodierenden Region der RNA4 beider EMARaV-Sequenzen ergibt 100 % Vergleichssequenz DQ931831)

Zusammenfassung und Ausblick



Abbildung 2: Genomorganisation von EMARaV sowie Lage der Oligonukleotidpaare (blaue Pfeile) für den Nachweis der vier viralen RNAs; Bisher vorhandene Sequenzinformation der EMARaV Variante aus *S. intermedia* (violetter Balken).

Detektion aller vier Genomsegmente des Virus durch RT-PCR



Die RNA1, RNA2, RNA3 und RNA4 der EMARaV-Varianten aus *Sorbus aucuparia* und *Sorbus intermedia* weisen eine hohe Übereinstimmung von 98-100 % auf.

Für einen aussagekräftigen Vergleich der beiden Virusvarianten müssen die terminalen Bereiche der viralen RNAs mittels RACE-PCR untersucht werden.

Abbildung 3: gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente zum Nachweis der vier viralen RNAs.

Danksagung

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

Literatur

Mielke N, Mühlbach HP. 2007. Journal of General Virology 88: 1337-1346.
Mühlbach, H.-P. & Mielke-Ehret, N., 2011: Emaravirus. In: King, A.; Lefkowitz, E.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. (Hrsg.) Elsevier Academic Press, San Diego/USA, 767-770
Nelson-Jones EB, Briggs D, Smith AG. 2002. Theoretical Applied Genetics 105:953-963

GATCGTGAATACATCATTGATTATTGTGATTATCCATCTAATTCTGATTTGGAATCATTGGAATCGTGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCGTGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCGTGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCGTGAATACATCGTGAATACATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCATTGGAATCGTGAATCATTGGAATGGAATCATTG