Entwicklung einer diagnostischen RT-PCR zum Nachweis von *Carla*- und *Badna*viren in Birke

K. PACK[1*], M. LANDGRAF[1], M. BANDTE[1], S. VON BARGEN[1], M. SCHREINER[2], B. JÄCKEL[2] UND C. BÜTTNER[1]

[1] Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin

[2] Pflanzenschutzamt Berlin, Mohriner Allee 137, 12347 Berlin

[*] Ansprechpartnerin: Kaja PACK, packkaja@hu-berlin.de

phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einleitung & Zielstellung

2015 konnten zwei neuartige Viren (aus den Gattungen *Carla*- und *Badna*virus) in Birke durch NGS (Next Generation Sequencing) entdeckt werden (2015 RUMBOU et al.). Besonders an diesen Gattungen ist die Tatsache, dass es sich bei **Badnaviren** um dsDNA-Viren handelt, die unter bestimmten Bedingungen ins Genom der Pflanze integrieren können. Das erfordert also die Detektion aktiver, wie auch stationärer Viren. **Carlaviren** hingegen sind (+)ssRNA-Viren, die zur Genomintegration nicht in der Lage sind und somit ständig aktiv in ihrer transkriptionellen Phase vorliegen. In den Studien nach LANDGRAF et al. (2015 und 2016) konnten Badna- und Carlaviren in einigen Proben nicht eindeutig ausgeschlossen werden, da sich unspezifische Amplifikate zeigten (siehe *Abbildung 1*). Die Zielstellung dieser Arbeit ist ein eindeutiger Nachweis der Viren durch eine neuartige RT-PCR in Birken unterschiedlicher Standorte um die Bedeutung und eine mögliche Managementstrategie zu entwickeln.

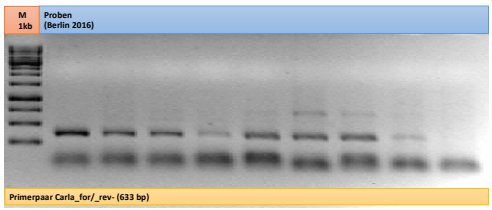

Abbildung 1: **Amplifikationsprodukte des Primerpaars Carla_for/_rev der vorherigen Studien aus 2015 und 2016 von Proben aus Deutschland mit einer erwarteten Fragmentgröße von 633bp mit unspezifischen Amplifkaten**

Material & Methoden

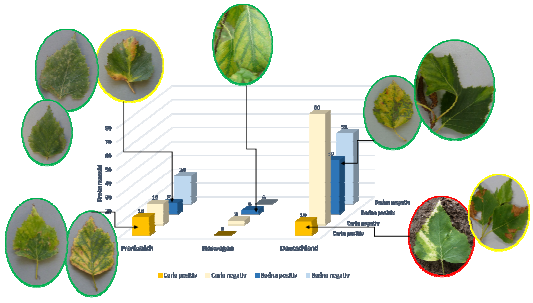

Abbildung 2: **Übersicht der Ergebnisse aller getesteten Proben für Standorte in Frankreich (n=28), Norwegen (n=3) und Deutschland (n=90) mit exemplarischer Dokumentation der ausgewählten Blattproben. Die Symptome lassen sich dabei nicht eindeutig dem jeweiligen Virus zuordnen. Es zeigten sich beispielsweise Blattchlorosen (grün umrandet), Nekrosen der Blattfläche (gelb umrandet) und ein weißlich, chlorotisches Linienmuster (rot umrandet). Die gelben Säulen zeigen die Ergebnisse für die Detektion von Carlaviren, während die blauen die der Badnaviren aufzeigen.**

Abbildung 3: **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.**

Material: Untersucht wurden 121 Proben virusverdächtigen Pflanzenmaterials aus *Betula* sp. von verschiedenen Standorten in Europa zwischen 2014 und 2016, darunter 28 Proben aus Frankreich (LANGER et al. 2016), drei Proben aus Norwegen und 89 Blattproben aus Berlin und eine aus Niedersachsen. Die Symptome im Probenumfang zeigten eine große Bandbreite (siehe *Abbildung 2*). Es konnten unter anderem weißlich, chlorotische Linienmuster, Nekrosen der Blattflächen, Blattchlorosen bis hin zur Kleinblättrigkeit beobachtet werden. Die zum Primerdesign verwendeten Daten ergaben einen Umfang von 19 NGS-Sequenzen aus Frankreich, 54 NGS-Sequenzen aus Deutschland

Methoden: Verschiedene Primerkombinationen wurden spezifisch für die Carla- und Badnaviren aus den Sequenzen der NGS-Daten entworfen. Die Primer wurden komplementär zu einer konservierten Genomregion ausgewählter Sequenzen und mit geeigneten biophysikalischen und stereochemischen Eigenschaften entworfen. 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 (dargestellt in *Abbildung 3*). 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. Das System wurde an denen in *Material* genannten Proben getestet, hierfür wurde die Gesamt-RNA-Isolierung nach einer modifizierten Methode von BOOM (1990) durchgeführt.

Tabelle 1: **Übersicht der funktionierenden Primerpaare für das jeweilige Virus, die Bezeichnung des Primers, zugehörige Schmelztemperatur, Fragmentgröße und das entsprechende Zielgen aus dem die Primersequenz stammt**

Virus	Primer	Schmelztemperatur	Fragmentgröße	Zielgen
Carla	CarlaK-FW	52,7 °C	197 bp	Polymerase
Korsika	CarlaK-RV	54,9 °C		
Badna	BadnaK-FW	52,9 °C	300 bp	Polyprotein
Korsika	BadnaK-RV	52,8 °C		
Badna	BadnaSG-FW	56,5 °C	242 bp	Polyprotein
Berlin	BadnaSG-RV	55,2 °C		

Ergebnisse und Diskussion

Nach Abgleich der Sequenzen aus der Hochdurchsatzsequenzierung (NGS) mit den bekannten Sequenzen aus der NCBI, konnte nur aus wenigen Sequenzen Primer abgeleitet werden. Es konnten insgesamt drei RT-PCR-Systeme basierend auf spezifischen Primern (siehe Tabelle 1) für die viralen Genome der neuartigen Badna- und Carlaviren entwickelt werden. Hierfür wurden ausschließlich nur Sequenzen verwendet, die eine Ähnlichkeit von über 80 % aufweisen konnten. In der *Abbildung 4* zeigt sich nun die Spezifität durch eine klare Bande. Die amplifizierten Fragmente wurden sequenziert und ergaben eine deutlich klare Übereinstimmung mit den NGS-Daten des erwarteten Virus-Isolats. Auffällig oft ließen sich Badnaviren im Vergleich zu den Carlaviren detektieren, obwohl für letztere wesentlich mehr Arten beschrieben sind. Die Proben, die in Abb. 1 unspezifische Amplifikate zeigten, wurden mit den neuen Primer getestet und konnten nun spezifische Banden aufweisen (Ergebnisse nicht gezeigt). Da den Viren bisher kein klares Symptom zugeordnet werden konnte, bietet der molekularbiologische Nachweis eine optimale Methode zur Detektion. Die Viren wurden erstmals an Gehölzen nachgewiesen (Ergebnisse in *Abb. 4)*, wodurch sich ein weites Forschungsfeld zur Bewertung der Pathogenität der Viren und eines geeigneten Umgangs mit diesen Virusinfektionen eröffnet. Der eindeutige Nachweis ermöglicht nun weitere Untersuchungen und bietet somit den grundlegenden Schritt zur Bewertung der Pathogenität und schlussendlich zur Behandlung der neuartigen Carla- und Badnaviren.

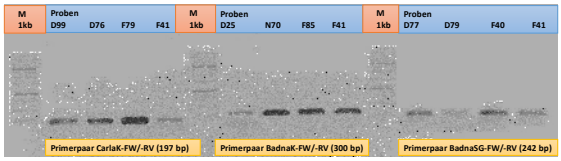

Abbildung 4: **Detektion von Badnaviren durch gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte mit dem Primerpaar CarlaK-FW/-RV mit einer Amplifikationsgröße von 197bp, BadnaK-FW/-RV mit einem 300bp-langem Amplikon und BadnaSG-FW/-RV, welches ein 242bp-großes Fragment amplifiziert, im 1%igen Agarosegel für Proben aus Deutschland D99, D76, D25 und D79 (2016), Norwegen N70 (2016) und Frankreich F79, F41, F85 und F40 (2014 und 2016).**

Fazit

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.

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