

# Eine Fallstudie zum *Elm mottle virus* (EMoV) an Ulme (*Ulmus* sp.)

A case study of *Elm mottle virus* (EMoV) in elm (*Ulmus* sp.)

von Carmen Büttner, Susanne von Barga, Anne-Mareen Eisold, Martina Bandte und Markus Rott

### Zusammenfassung

Die rückläufigen Bestände der Flatterulme (*Ulmus laevis* PALL.) sind durch Viren zusätzlich gefährdet. In Ulmenbeständen sind verschiedene Viren seit langer Zeit bekannt, deren Verbreitung und Bedeutung ist allerdings unzureichend dokumentiert. Das Auftreten von Scheckungen, chlorotischen Ringflecken und Linienmustern an Blättern erkrankter Flatterulmen im Raum Berlin-Brandenburg wird vorgestellt. Bedeutung und Eigenschaften des mit diesen Symptomen assoziierten und in mehreren Ulmenarten verbreiteten *Elm mottle virus* (EMoV) werden erläutert. Diese Untersuchungen stellen die Grundlage für die Entwicklung effektiver Maßnahmen zur Diagnose und Prävention im Rahmen eines erforderlichen Gesundheitsmanagements dar.

### Summary

While the number of European white elms (*Ulmus laevis* PALL.) is continuously decreasing, the trees are in addition endangered by virus infections. Viruses infecting elms have been known for long, but their distribution and overall impact is not yet elucidated sufficiently. The occurrence of mottle, chlorotic ringspots and line pattern observed in diseased elms in the area of Berlin-Brandenburg is presented. The importance and characteristics of *Elm mottle virus* (EMoV) known to infect several elm species and found to be associated with the symptoms are described. This study constitutes a basis for the development of effective diagnostic and preventive measures in the frame of an imperative plant health management system.

## 1 Einleitung

In der Studie wurde der Frage nachgegangen, welches verursachende Agens die chlorotischen Ringflecken, Scheckungen und Linienmuster an 150-jährigen Flatterulmen (*Ulmus laevis* PALL.) im Schlosspark Caputh in Brandenburg verursacht. Auch auffällige Astverkahlungen und Absterbeerscheinungen wurden in langjährigen Bonituren beobachtet. Entsprechend der Symptome und der Erfahrung mit Virose an Gehölzen haben wir eine Virusinfektion vermutet.

## 2 Vorkommen und Bedeutung der Flatterulme

Die Flatterulme ist wegen ihrer markanten Kronenausbildung im Einzelstand ein beliebter Parkbaum und ein wichtiges Element im Zuge der Parkgestaltung (beispielsweise Englische Landschaftsgärten). Sie wird zudem sehr als Straßenbaum geschätzt, da sie sehr widerstandsfähig gegenüber Nässe bzw. moderater Trockenheit ist und sowohl Bodenverdichtung als auch erhöhte Streusalzgehalte und Luftverschmutzung toleriert. Darüber hinaus ist diese Art im Gegensatz zu den beiden anderen in Europa heimischen Ulmenarten (Feldulme, *U. minor* MILL. und Bergulme, *U. glabra* HUDS.) seltener von *Ophiostoma*

*ulmi* bzw. *O. novo-ulmi* betroffen, den Pilzen, die als Hauptursache des Ulmensterbens (Dutch elm disease) gelten (COLLIN 2003).

Die natürliche Verbreitung der Flatterulme erstreckt sich von den Auwäldern der Niederungen bis hin zu den Wäldern in niedrigeren Lagen der Gebirge insbesondere Zentral- und Osteuropas. In Deutschland ist diese Art nicht flächendeckend repräsentiert. Der Schwerpunkt der Verbreitung von *U. laevis* liegt in den nordostdeutschen Bundesländern. Vorwiegend durch die enorm fortschreitende anthropogen bedingte Einschränkung dieser natürlichen Habitats ist der Bestand seit langem rückläufig. Die Restriktionen des Lebensraumes in Zusammenhang mit dem durch Krankheiten verursachten Rückgang führten dazu, dass die Flatterulme heutzutage häufig nur noch in kleinen isolierten Beständen vorkommt. Diese Umstände haben wiederum eine zunehmende genetische Verarmung der Spezies zur Folge (COLLIN 2003). Um dieser fortschreitenden Entwicklung entgegenzuwirken, ist es zwingend erforderlich, gefährdende Faktoren zu determinieren und zu charakterisieren, welche das Fortbestehen der Flatterulme in ihrem Bestand weiter einschränken können.

### 3 Virusinfektionen in Ulme

Virusverdächtige Symptome in Ulmen, darunter Feld-, Berg- und Flatterulme, sind vielfältig und seit vielen Jahren bekannt. Sie treten in Deutschland regelmäßig auf und sind auch in anderen Ländern innerhalb des Verbreitungsgebietes der Flatterulme beschrieben worden (CABI 2008). Auffällige Farbveränderungen wie Scheckungen, Mosaik, chlorotische Linienmuster und Flecken an den Ulmenblättern werden von verschiedenen Viren verursacht.

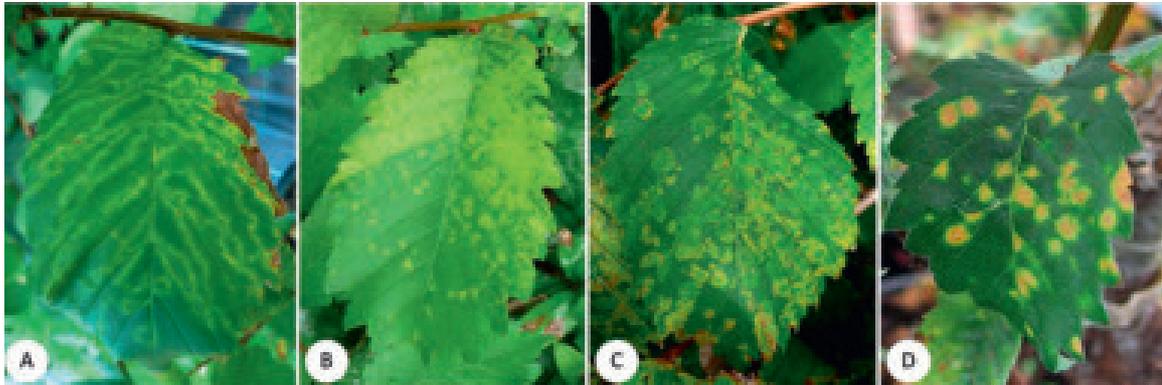
Seit mehr als 70 Jahren ist das *Cherry leaf roll virus* (CLRV, *Nepovirus*, *Secoviridae*) in Ulmen als Verursacher von Blattmosaik beschrieben. Weiterhin wurde das verwandte *Tomato ringspot virus* (ToRSV) ebenso wie *Tomato bushy stunt tombusvirus* (TBSV *Tombusviridae*) und das zu den Ilarviren zählende *Elm mottle virus* (EMoV, *Bromoviridae*) in erkrankten Ulmenarten detektiert (BÜTTNER et al. 2013). Diese Viren weisen alle eine isometrische Partikelmorpho-

logie auf. Es wurden auch filamentöse Partikel in erkrankten Flatterulmen mit Scheckungen und chlorotischen Ringflecken auf den Blättern nachgewiesen (BANDTE et al. 2004). Dies weist darauf hin, dass weitere bisher nicht identifizierte virale Erreger in Ulmen vorliegen, die mit den beobachteten Symptomen assoziiert sind. Solche Virusinfektionen können durch Vitalitätsverlust ursächlich für die Herabsetzung der Widerstandsfähigkeit der betroffenen Bäume gegen andere biotische sowie abiotische Faktoren sein (EISOLD et al. 2014).

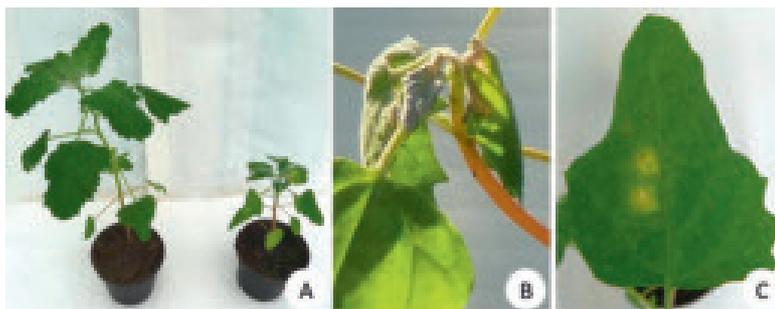
### 4 Identifizierung von Viren in erkrankten Flatterulmen im Raum Berlin-Brandenburg

In Berlin ist die Flatterulme regelmäßig im Straßenbegleitgrün sowie in Parks und im Forst anzutreffen. An verschiedenen Standorten (Berlin-Mitte und südwestliche Bezirke) sind seit Jahren virustypische Symptome wie Blattscheckungen, nekrotisierende Blattflecken sowie chlorotische Linienmuster und Ringflecken in den Flatterulmen zu beobachten (Abbildung 1). Seit dem Jahr 2000 wird ein Bestand von ca. 150-jährigen *Ulmus laevis* im Schlosspark Caputh (Brandenburg) untersucht und regelmäßig bonitiert. Von 30 Ulmen weisen 16 Bäume regelmäßig virusverdächtige Symptome auf. Aus Blatthomogenaten solcher erkrankter Ulmen ließen sich mit dem Elektronenmikroskop filamentöse Viruspartikel mit einer Länge von ca. 800 nm darstellen (Abbildung 3a).

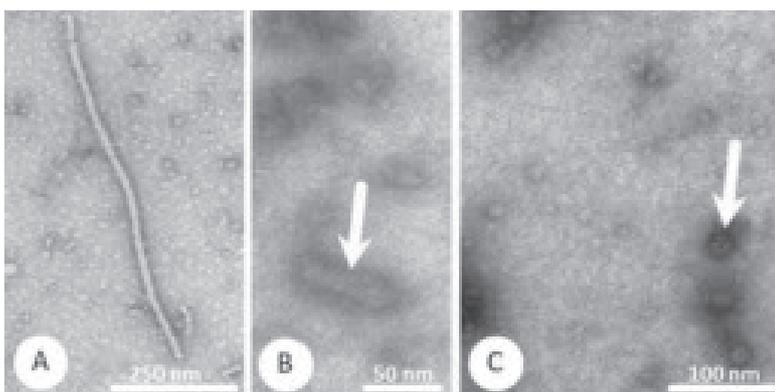
Zur Identifizierung der putativen viralen Erreger wurden *Chenopodium quinoa* WILLD mit Homogenaten von Blattknospen inokuliert. Nach ca. sieben bis zehn Tagen traten chlorotische Flecken und Scheckungen auf den Blättern sowie ein gestauchtes Wachstum auf (Abbildung 2). Das vermutlich virale Agens wurde mittels verschiedener Methoden untersucht, indem sowohl dsRNA isoliert (BENTHACK et al. 2005) als auch eine Virusanreicherung (DIJKSTRA & DE JAGER 1998) aus Blattmaterial infizierter *C. quinoa* durchgeführt wurde. Die elektronenoptische Überprüfung angereicherter Viruspartikel bestätigte das Vorhandensein flexibler Partikel. Zudem konnten bacilliforme (Länge ca. 70 nm) und quasi-isometrische Partikel (Durchmesser 25–30 nm) dargestellt werden (Abbildung 3 b und c).



**Abbildung 1:** Symptomausprägung an Blättern erkrankter Flatterulmen (*Ulmus laevis*). Chlorotische Linienmuster (A), Scheckung und chlorotische Flecken (B), chlorotische Ringflecken im Juni/Juli (C) und nekrotisierende Ringflecken im August (D)



**Abbildung 2:** Symptome an *C. quinoa* nach mechanischer Inokulation mit Knospenmaterial symptomtragender Ulmen (A, rechts) im Vergleich zur nicht-inokulierten Kontrolle (A, links) sowie durch das virale Agens induzierte Spitzennekrose (B) und chlorotische Flecken (C)



**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopische Darstellung von Viruspartikeln verschiedener Morphologien. Filamentöse Partikel (ca. 800 nm) aus Blatthomogenaten erkrankter Flatterulmen (A), bacilliforme Partikel (Länge ca. 70 nm, weißer Pfeil, B) und quasi-isometrische (Ø ca. 25–30 nm, weißer Pfeil, C) aus einer Virusanreicherung von inokulierten *C. quinoa*

Nach RNA-Isolierung aus der Virusanreicherung wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt, mittels sequenzunabhängiger PCR nach dem Protokoll von FROUSSARD (1992) amplifiziert und kloniert. Die Sequenzierung der klonierten Fragmente und der nachfolgende Ver-

gleich mit der Sequenzdatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ identifizierten das *Elm mottle virus* (EMoV, Ulmenscheckungsvirus) in der Probe. Es konnten Fragmente der viralen RNA1 bzw. RNA3 des Virus identifiziert werden (Abbildung

4). Die Sequenzergebnisse korrelierten mit dem Nachweis bacilliformer bzw. quasi-isometrischer Partikel, da diese Partikelmorphologie typisch für Vertreter der Gattung *Ilarvirus* ist, denen das EMoV zugeordnet ist (KING et al. 2012). Die Identifizierung des filamentösen Partikels (Abbildung 3a) gelang mit dieser Methode nicht, allerdings belegt der wiederholte Nachweis von Partikeln dieser Morphologie in Zusammenhang mit der Detektion des EMoV eindeutig eine Infektion mit mindestens zwei Virus-Spezies unterschiedlicher Taxa.

### 5 Charakteristika des *Elm mottle virus* (EMoV)

EMoV wurde bisher sowohl in Feldulme als auch in Bergulme detektiert. Die Symptome ähneln denen, die wir an den Flatterulmen im Park Caputh seit 2000 beobachten. Der natürliche Wirtspflanzenkreis des Virus umfasst zudem die Ziergehölze Flieder (*Syringa vulgaris* L.), Hortensie (*Hydrangea macrophylla* SER.) und Forsythie (*Forsythia intermedia* ZABEL). EMoV-infizierte Pflanzen dieser Arten zeigen Mosaik und chlorotische Ringflecken der Blätter (JONES & SCOTT 2004; SCOTT et al. 2003). EMoV gilt sowohl in Deutschland als auch in England als weit verbreitet und wurde zudem in mehrere Länder Osteuropas eingeführt (CABI 2008). Das Virus wurde als pollenübertragbar und samenbürtig in Bergulme beschrieben (JONES & MAYO 1973). Die Samenübertragbarkeit des EMoV korreliert mit unseren Beobachtungen an Flatterulmen in Berlin-Brandenburg, da wir die Symptome häufig an jungen Sämlingen feststellen konnten, die unter

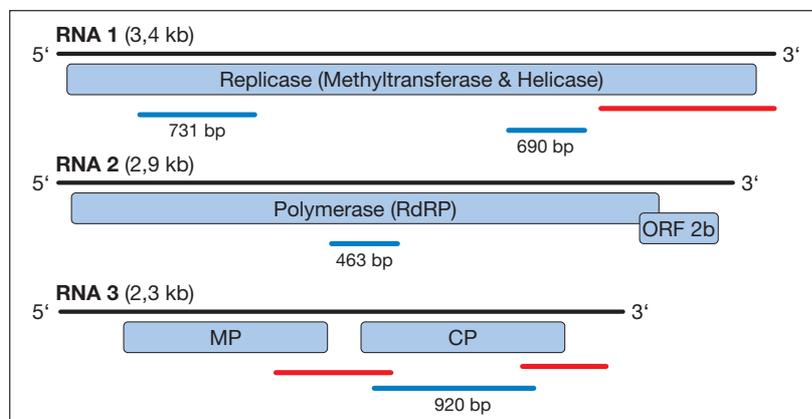
den Altbäumen aufwachsen, und eine weite Verbreitung beobachteten. Das Virus ist mechanisch leicht übertragbar. So wurden 66 verschiedene Pflanzenarten aus 22 Familien, darunter viele Vertreter aus den *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* und Leguminosen, als Wirtspflanzen beschrieben, von denen die Mehrzahl systemisch infiziert wird und Symptome entwickelt. Das Virus kann zudem durch vegetative Vermehrung z. B. Pfropfung übertragen werden.

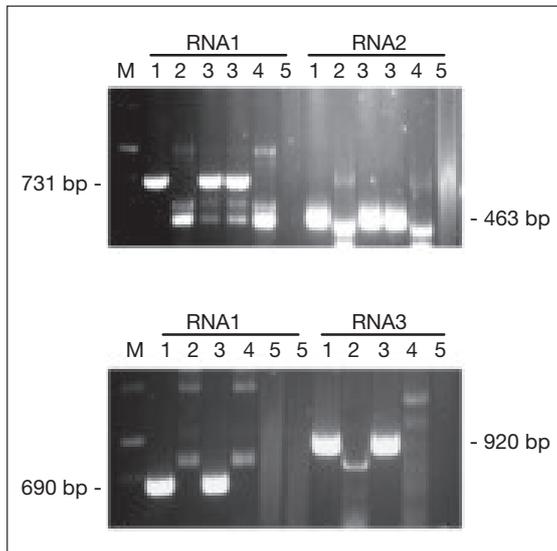
Das *Elm mottle virus* ist ein einzelsträngiges RNA-Virus mit einem dreigeteilten Genom (Abbildung 4). Die Genomsegmente sind unterschiedlich lang und kodieren für Proteine, die für das Virus essentiell sind. RNA1 und RNA2 kodieren für Proteine, die an der Replikation des Virus beteiligt sind (Methyltransferase, Helicase, Polymerase). Das 2b Protein stellt vermutlich einen viralen RNA-silencing Suppressor dar, der die Pflanzenabwehr beeinflusst und an der Ausbreitung des Virus in der Wirtspflanze beteiligt ist. Auf der RNA3 sind die Gene für das virale Transportprotein (MP) bzw. das Hüllprotein (CP) enthalten. Das Hüllprotein multimerisiert und bildet das Capsid aus, in welches die viralen RNAs verpackt werden. Je nach Größe des enkapsidierten Genomsegmentes werden quasi-isometrische bzw. längliche Partikel gebildet.

### 6 Nachweis des *Elm mottle virus* (EMoV) mittels RT-PCR

Zur verlässlichen Detektion des EMoV in Flatterulmen mit virusverdächtigen Symptomen müssen empfindliche Nachweismethoden entwickelt werden,

**Abbildung 4:**  
Genomorganisation des tripartiten EMoV unter Angabe der mittels random PCR amplifizierten Genomregionen (rote Linien) und der Lage der mittels diagnostischer RT-PCR amplifizierten Genomfragmente (blaue Linien)





**Abbildung 5: Gelelektrophoretische Darstellung der RT-PCR-Produkte zum Nachweis der 3 Genomsegmente des EMoV unter Verwendung von vier verschiedenen Primersets.**

**Im Vergleich dargestellte Proben sind:**

- (1) Virusanreicherung inokulierte *C. quinoa*,
- (2) Virusanreicherung nicht-inokulierte *C. quinoa*,
- (3) Blattmaterial inokulierte *C. quinoa*,
- (4) Blattmaterial nicht-inokulierte *C. quinoa*,
- (5) Wasserkontrolle. MGeneRuler 1 kb ladder (Thermo Scientific) diente als Größenstandard

um abschätzen zu können, inwieweit das Virus an der Ätiologie der viralen Ulmenerkrankung beteiligt ist. In einem ersten Schritt wurden daher RT-PCR-Verfahren zum Nachweis aller drei Genomsegmente (Abbildung 4) des Virus getestet. Zum Nachweis der viralen RNA1 bzw. RNA2 wurden Primer eingesetzt, die von SCOTT et al. (2003) beschrieben wurden. Zum Nachweis der RNA3 wurden die Primer EMoV3-910F (5'-CTCACTTACCACGGCAGATGA-3') und EMoV3-1829R (5'-GCCTTCACTTCGGAAACTG-3') entwickelt. Die Gesamt-RNA aus Blattmaterial von *C. quinoa* wurde nach BOOM et al. (1990) extrahiert. Die RNA-Isolierung aus Virusanreicherungen erfolgte mittels InviTrap Spin Plant RNA Kit nach Herstellerangaben (Stratec). Die cDNA-Synthese unter Verwendung von random Hexameren erfolgte mit Revert-Aid Premium Reverse Transcriptase (ThermoScientific) nach Herstellerangaben ebenso wie die PCR mit Velocity Poly-

merase (Bioline) in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers durchgeführt wurde.

Unter Verwendung der 4 Primersets bei einer Anlagerungstemperatur von 59 °C konnte das Virus in Gesamt-RNA-Präparationen aus infizierten Biotestpflanzen (*C. quinoa*) mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 5). Die Amplifikation von RNA1-, RNA2- und RNA3-Fragmenten des EMoV konnte durch Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte bestätigt werden, was eine zukünftige Anwendung des Verfahrens zum EMoV-Nachweis in Flatterulmen ermöglichen wird.

## 7 Fazit

In dieser Studie wurde gezeigt, dass filamentöse Partikel und das quasi-isometrische *Elm mottle virus* mit erkrankten Flatterulmen assoziiert sind. Es ist daher von einer Infektion der Bäume im Raum Berlin-Brandenburg mit mindestens zwei verschiedenen Virus-Spezies auszugehen, die ursächlich für Scheckungen, chlorotische und nekrotische Ringlecken und Liniemuster der Blätter sein und auch als Mischinfektion vorliegen können.

Viren haben im Rahmen der auf Pflanzen einwirkenden Faktoren eine besondere Stellung als prädisponierende Faktoren. Sie nehmen Einfluss auf den Stoffwechsel des Wirtes und beeinträchtigen seine Vitalität und Widerstandskraft gegenüber einwirkenden Stressfaktoren. Diese Studie sowie der bisherige Kenntnisstand zu Viren in Gehölzen geben Anlass zur Vermutung, dass die nanogroßen Krankheitserreger weit häufiger verbreitet sind und weit mehr Schaden hervorrufen als bisher bekannt. Das liegt zum einen an der Schwierigkeit, dass virologische Forschungsarbeiten an diesen Gehölzen sehr langwierig sind und zum anderen daran, dass man nicht unbedingt bisher bekannte Erreger identifiziert. Die Charakterisierung neuer Viren aus Gehölzen und die Erfüllung der Koch'schen Postulate stellen daher eine besondere Herausforderung dar.

Ein integriertes Programm zum Schutz der Flatterulme mit Maßnahmen zur Überwachung, Eindämmung und Impfung gegen Pathogene sowie Neuan-

pflanzungen kann nur langfristig Erfolg versprechend sein. Ein solches Konzept erfordert zunächst vor allem einen Erkenntniszuwachs zum komplexen Zusammenspiel von prädisponierenden und auslösenden Krankheitserregern, dem Wirt, den Standortfaktoren und der Bewirtschaftung.

### Danksagung

Wir bedanken uns bei *Dr. Katja Richert-Pöggeler* (Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Julius Kühn-Institut für Kulturpflanzen, Braunschweig) und *Dr. Joachim Hamacher* (Agro-Horti Testlabor, Universität Bonn) für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

### Literatur

- BANDTE, M.; ESSING, M.; OBERMEIER, C.; BÜTTNER, C., 2004: Investigations on virus-diseased elm trees (*Ulmus laevis* PALL.) in eastern Germany. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 65–69.
- BENTHACK, W.; MIELKE, N.; BÜTTNER, C.; MÜHLBACH, H. P., 2005: Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Archives of Virology* 150, 37–52.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J., 1990: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495–503.
- BÜTTNER, C.; VON BARGEN, S.; BANDTE, M.; MÜHLBACH, H. P., 2013: Forest diseases caused by viruses. In: GONTHIER, P.; NICOLOTTI, G. (Hrsg.): *Infectious Forest Diseases*, CAB International, 50–75.
- CABI 2008: Elm mottle virus. CABI datasheet 20843. *Invasive Species Compendium*. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/20843>.
- COLLIN, E., 2003: EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for European white elm (*Ulmus laevis*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 S.
- DIJKSTRA, J.; DE JAGER, C. P., 1998: *Practical plant virology: protocols and exercises*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 238–273.
- EISOLD, A.-M.; BANDTE, M.; LANGER, J.; ROTT, M.; BÜTTNER, C., 2014: Phytopathogene Viren im Urbanen Grün. In: DUJESIEFKEN, D. (Hrsg.): *Jahrbuch der Baumpflege*. Haymarket Media, Braunschweig, 217–227.
- FROUSSARD, P., 1992: A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Research* 20, 2900.
- JONES, A. T.; MAYO, M. A., 1973: Purification and properties of elm mottle virus. *Annals of Applied Biology* 75, 347–357.
- JONES, A. T.; SCOTT, S. W., 2004: aab/DPV descriptions no. 404. Elm mottle virus. *Association of Applied Biologists*.
- KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J., 2012: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, 1327 S.
- SCOTT, S. W.; ZIMMERMAN, M. T.; GE, X., 2003: Viruses in subgroup 2 of the genus Ilarvirus share both serological relationships and characteristics at the molecular level. *Archives of Virology* 148, 2063–2075.

### Autoren

*Dr. Martina Bandte*, *Dr. Susanne von Barga* und *Dr. Markus Rott* sind wissenschaftliche Mitarbeiter in dem von *Prof. Carmen Büttner* geleiteten Fachgebiet Phytomedizin am Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften der Humboldt-Universität zu Berlin. *Dipl.-Biol. Anne-Mareen Eisold* ist Doktorandin im Fachgebiet.

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

