Vergleich von molekularen und serologischen Eigenschaften verschiedener Kirschenblattrollvirus – Varianten

Gentkow, J.; Rebenstorf, K.; von Bargen, S. und Büttner, C.
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften,
Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin-Dahlem
phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einführung

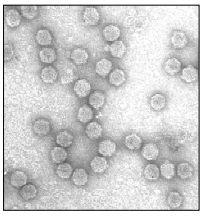

Abb. 1 CLRV E395, aufgereinigte Viruspartikel (TEM, Vergrößerung 80000 x)

Das Kirschenblattrollvirus (*Cherry leaf roll virus*, CLRV) aus der Gattung *Nepovirus* (Sub-gruppe C, Fam. *Comoviridae*) ist ein weltweit verbreiteter Erreger an Obstgehölzen, Zier- und Gemüsepflanzen (z.B. *Prunus avium*, *Juglans regia*, *Sambucus spec.*, *Rheum rhabarbarum*). Die natürliche Übertragung erfolgt hauptsächlich durch Samen und Pollen. CLRV (Abb. 1) besitzt ein bipartites, einzelsträngiges, positiv orientiertes RNA-Genom (Jones 1985, Giersiepen 1993).

Untersuchungen haben gezeigt, dass sich CLRV-Stämme aus unterschiedlichen Wirtspflanzen in ihren RNA-Sequenzen und ihren serologischen Eigenschaften unterscheiden. Die Untersuchung einer 280 bp langen Sequenz innerhalb des hochkonservierten Genomabschnitts am 3'-Ende teilte die dabei untersuchten CLRV-Isolate aus 17 Gehölzarten wirtspflanzenspezifisch in sieben verschiedene Gruppen ein (Abb. 2). Diese molekularbiologischen Ergebnisse wurden durch serologische Untersuchungen bestätigt (Rebenstorf 2005).

Acht ausgewählte CLRV-Isolate (Abb. 2) aus diesen Gruppen wurden hinsichtlich ihrer biologischen, molekularbiologischen und serologischen Eigenschaften untersucht.

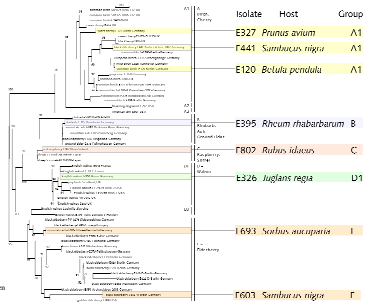

Abb. 2 CLRV-Stammbaum (basierend auf Sequenzunterschieden in der 3' NCR) mit den acht ausgewählten Isolaten

Morphologische Untersuchungen

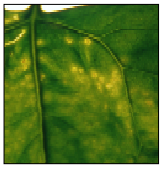

Abb. 3 , 4 *Chenopodium quinoa*: chlorotische und nekrotische Lokalläsionen induziert durch CLRV E693

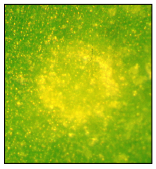

Abb. 5 Lokalläsion im Detail (Lichtmikroskopie)

Zum Vergleich der Symptome einer CLRV-Infektion wurden Testpflanzen (*Chenopodium quinoa*) mit den acht verschiedenen CLRV-Isolaten infiziert. Alle CLRV-Isolate verursachten innerhalb von fünf Tagen deutliche Symptome wie chlorotische und nekrotische Lokalläsionen auf den inokulierten Blättern (Abb. 3, 4, 5) und breiteten sich systemisch in *C. quinoa* aus.
Die Viruspartikel wurden mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht und wiesen eine einheitliche, CLRV-typische Morphologie auf (Abb. 1).

Für serologische und molekularbiologische Untersuchungen wurden die Viruspartikel aus den infizierten Pflanzen aufgereinigt.

Serologische Untersuchungen

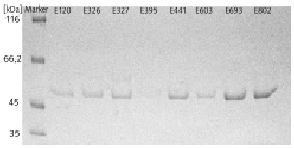

Abb. 6 Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit typischen CLRV-Hüllproteinbanden (52,4 kDa)

Bei der Analyse der CLRV-Strukturproteine durch SDS-PAGE konnten keine Unterschiede in der Größe der Hüllproteine der acht untersuchten Isolate festgestellt werden (Abb. 6). Es wurde eine Molekülmasse von 52,4 kDa für das CLRV-Hüllprotein berechnet.

Desweiteren wurde ein polyklonales Antiserum (pAb E603) gegen ein CLRV-Isolat aus Holunder hergestellt und zum Test mehrerer CLRV-Isolate im Double Antibody Sandwich (DAS)-ELISA und Western Blot eingesetzt. Mit Hilfe dieses Antiserums konnten aufgereinigte CLRV-Isolate im Western Blot nachgewiesen werden und bestätigten die durch die SDS-PAGE ermittelte Molekülmasse für das CLRV-Hüllprotein. Beim Einsatz von pAb E603 in der IC-RT-PCR konnten die acht ausgewählten CLRV-Isolate im Pflanzenmaterial nachgewiesen werden (Tab. 1).
Die Ergebnisse des DAS-ELISA weisen jedoch auf serologische Unterschiede der verschiedenen Isolate hin, da sich mit pAB E603 lediglich zehn von zwanzig untersuchten Isolaten nachweisen ließen. So konnten zum Beispiel die Isolate E327 und E395 im DAS-ELISA nicht nachgewiesen werden, während mit der empfindlicheren IC-RT-PCR ein Nachweis gelang (Tab. 1).

Tab. 1 Ergebnisse aus DAS-ELISA und IC-RT-PCR mit polyklonalen Antikörpern gegen E603 aus Holunder (graue Zellen kennzeichnen die acht ausgewählten CLRV-Isolate), Abkürzung n: nicht getestet

CLRV-Isolat	E111	E120	E325	E327	E441	E806	E395	E676	E802	E326	E156	E443	E485	E492	E568	E576	E583	E603	E622	E693	E804
Gruppe	A1	A1	A1	A1	A1	A1	B	B	C	D1	D2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
DAS-ELISA mit pAb E603	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
IC-RT-PCR mit pAb E603	n	n	-	+	+	n	+	n	+	+	-	n	n	n	n	n	n	+	n	+	n

Molekularbiologische Untersuchungen

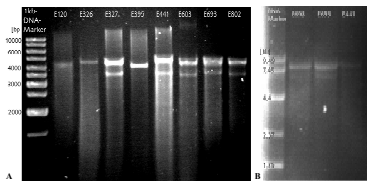

Abb. 7 RNA-Gelelektrophorese mit aufgereinigten CLRV-Partikeln unter nativen Bedingungen (A) sowie unter denaturierenden Bedingungen (B, mit Glyoxal)

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der viralen RNA im nativen Agarosegel (Abb. 7A) zeigten sieben der acht untersuchten CLRV-Isolate einheitliche RNA1- und RNA2-Banden. Lediglich Isolat E395 wies im Vergleich etwas niedriger laufende RNA-Banden auf. Zur Ermittlung der Gesamtgenomlänge wurden zwei ausgewählte, gereinigte CLRV-Isolate unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch nach Größe getrennt (Abb. 7B). Für die CLRV-RNA1 wurde eine Länge von 8,17 kb errechnet, die Länge von CLRV-RNA2 betrug 6,59 kb.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Hüllproteinsequenzfragmente von vier CLRV-Isolaten aus unterschiedlichen Gruppen sequenziert und miteinander sowie mit weiteren CLRV-Hüllproteinsequenzen verglichen. Die Ergebnisse bestätigen die Gruppierung der CLRV-Isolate abhängig von der Original-Wirtspflanzenart.

Zusammenfassung

Sieben der acht untersuchten Virusisolate sind bezüglich ihrer Genomgröße und -organisation sowie der Größe des Hüllproteins typische CLRV-Isolate.

Das Isolat E395 zeigt untypische RNA-Banden, verfügt aber über ein typisches Hüllprotein. Zudem werden in der RT-PCR CLRV-spezifische Sequenzen amplifiziert.

Der Vergleich von Hüllproteinsequenzfragmenten aus vier CLRV-Isolaten unterstützt die wirtspflanzenspezifische Gruppierung verschiedener CLRV-Isolate aufgrund nichtkodierender Sequenzbereiche des 3'-Terminus der viralen RNA.

Literatur: Rebenstorf,K. (2005): Untersuchungen zur Epidemiologie des *Cherry leaf roll virus* (CLRV): genetische und serologische Diversität in Abhängigkeit von der Wirtspflanzenart und der geographischen Herkunft. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
Giersiepen, R. (1993): Untersuchungen zur Charakterisierung des Kirschenblattrollvirus (CLRV) als Ursache einer Eschenvirose. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn
Jones, A.T. (1985): Cherry leaf roll virus CM/AAB, Description of Plant Viruses, 306