

Möglichkeiten zur Detektion des Kirschenblattrollvirus (CLRV) in Gehölzen durch serologische und molekulare Methoden



J. Gentkow, S. von Bargaen, K. Petrik, C. Büttner
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin,
Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin, Phytomedizin@agr.ar.hu-berlin.de

Einleitung

Das Kirschenblattrollvirus (*Cherry leaf roll virus*, CLRV) ist ein Nepovirus (*Comoviridae*) der Untergruppe C. Die ikosaedrischen Viruspartikeln (Abb. 1) weisen einen Durchmesser von 28 nm auf. Das einzelsträngige, lineare RNA-Genom ist bipartit und wird getrennt enkapsidiert. CLRV ist weltweit in Gehölzen und krautigen Pflanzen verbreitet und in Deutschland vor allem in Holunder, Birke, Kirsche und Walnuss zu finden. Die natürliche Übertragung erfolgt durch Pollen und Samen sowie mechanisch durch Verletzungen. In den Abbildungen 3-6 sind typische Symptombespiele dargestellt.

Eine phylogenetische Rekonstruktion auf Grundlage der Sequenzunterschiede im Bereich der nicht kodierenden Region am 3'Ende (3'NCR) beider RNAs ergab eine Gruppierung der untersuchten Isolate in 5 Gruppen, die durch die Wirtspflanzenart definiert werden und mit den beobachteten Serogruppen korrelieren (REBENSTORF *et al.*, 2006).

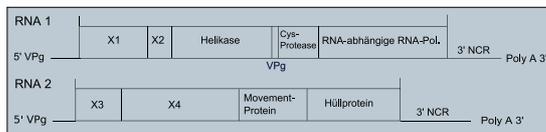
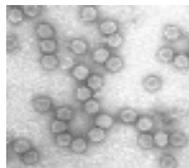


Abb. 2: Schematische Darstellung der CLRV-Genomorganisation

Abb. 1: TEM-Aufnahme aufgereinigter Partikel eines CLRV Isolates aus Rhabarber bei 40000facher Vergrößerung

Abb. 3-6: Symptombespiele bei CLRV-Infektion

Abb. 3: Ringfleck auf Rhabarberblatt

Abb. 4: symptomatische Laubblätter bei Birke

Abb. 5: Birkenlaubblatt mit Bänderung entlang der Blattadern

Abb. 6: Scheckung auf Holunderlaubblatt



Abb. 3

Abb. 4

Abb. 5

Abb. 6

Methoden des CLRV-Nachweises

Zum Nachweis von CLRV in Gehölzen kommen sowohl serologische als auch molekulare Verfahren zur Anwendung. Eine schnelle Diagnose ist mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, Abb. 1) möglich. Der DAS-ELISA eignet sich zum Testen großer Probenmengen sowie zur serologischen Differenzierung unterschiedlicher CLRV-Isolate. Die serologische Differenzierung korrelierte beim Einsatz eines polyklonalen Antikörpers gegen das CLRV-Isolat E603 aus Holunder mit der Gruppierung der Isolate auf Grundlage der Sequenzanalyse eines 420 bp großen Fragments aus dem Bereich der 3' NCR (Tab. 1). Durch die Kombination serologischer und molekularer Methoden in Form einer IC-RT-PCR (Immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction) nach WERNER *et al.* (1997) ist das Virus in Gehölzen und krautigen Pflanzen mit hoher Spezifität und Effektivität nachweisbar. So war ein CLRV-Nachweis in der optimierten IC-RT-PCR bis zu einer Konzentration von 1pg/µl möglich (Abb. 7). Durch den Immunocapture-Schritt werden Viruspartikeln aus dem Pflanzenmaterial aufkonzentriert und sekundäre Pflanzenstoffe, die störend auf die anschließenden Reaktionen wirken, durch die Waschschriffe entfernt. Mit dieser Methode konnten im Unterschied zum DAS-ELISA alle untersuchten CLRV-Isolate detektiert werden (Abb. 8). Als Testmaterial sind Laubblätter, Blüten, Knospen, Samen und Früchte geeignet (Abb. 9).

CLRV-Isolate	Originalwirt	Reaktion mit pAb E603 im DAS-ELISA	Phylogenetische Gruppe nach Rebenstorf <i>et al.</i> 2006
E111	<i>Betula pendula</i> Roth	-	A
E120	<i>Betula pendula</i> Roth	-	A
E356	<i>Betula pendula</i> Roth	-	A
E325	<i>Juglans regia</i> L.	+	D
E348	<i>Prunus avium</i> L.	-	A
E327	<i>Rhus typhina</i> L.	-	B
E395	<i>Rhus typhina</i> L.	-	A
E392	<i>Rhus typhina</i> L.	-	A
E441	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	C
E443	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	A
E485	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E482	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E568	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E576	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E583	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E603	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E622	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E676	<i>Sambucus nigra</i> L.	+	E
E684	<i>Sambucus danubensis</i> 'Aurea'	+	E
E693	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	+	E

Tab. 1: Serologische Differenzierung von CLRV-Isolaten aus unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen mittels DAS-ELISA beim Einsatz des polyklonalen Antikörpers pAb E603

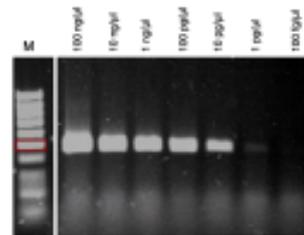


Abb. 7: Bestimmung der Nachweisgrenze der optimierten IC-RT-PCR. Proben: Verdünnungsreihe mit gereinigten CLRV-Partikeln des Holunder-Isolates E603. Marker: 50 bp DNA Ladder (Fermentas), rot umrandet: 500bp

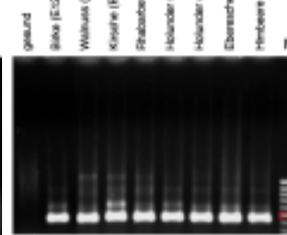


Abb. 8: Nachweis von CLRV-Isolaten aus verschiedenen Wirtspflanzen durch IC-RT-PCR mit pAb E603 und Amplifikation eines 420 bp Fragmentes. Proben: CLRV-Isolate im Experimentalmwirt *Chenopodium quinoa*. Marker: 50 bp DNA Ladder (Fermentas), rot umrandet: 500bp

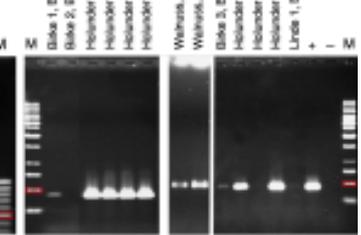


Abb. 9: CLRV-Nachweis in Gehölzenproben durch Amplifikation eines 420 bp Fragmentes in der IC-RT-PCR. Proben: B = Blättermaterial, F = Früchte. Marker: 1 kb DNA Ladder (Fermentas), rot umrandet: 500bp

Schlussfolgerungen

Die IC-RT-PCR als universeller und empfindlichster CLRV-Nachweis ist die bevorzugte Methode zum Screening großer Pflanzenbestände. Eine anschließende Differenzierung der Isolate im Hinblick auf die Serogruppen und die biologischen Eigenschaften kann darüber hinaus sinnvoll sein, wenn epidemiologische Folgeuntersuchungen notwendig sind. Ein Beispiel dafür wäre die Evaluierung des Risikos einer CLRV-Übertragung z.B. aus Parks, Wildgehölzquartieren oder Randbegrünung auf Obstplantagen bzw. forstwirtschaftlich relevante Bestände. Durch eine schnelle Überprüfung symptomatischer Bäume können in solchen Fällen rechtzeitig Maßnahmen zur Verhinderung der Verbreitung von CLRV in Gehölzen von Baumschulen, öffentlichem Grün und Forst ergriffen werden. Das umfasst beispielsweise das Entfernen erkrankter Pflanzen aus dem Bestand und die Dekontamination der Arbeitsgeräte (BANDTE & BÜTTNER, 2006).

Literatur:

- Bandte, M.; Büttner, C., 2006: Desinfektion zur Dekontamination von Viren. In: Dujesiefken, D.; Kockerbeck, P. (Hrsg.), 2006: Jahrbuch der Baumpflege, Thalacker Verlag, Braunschweig, 288 S
Rebenstorf, K.; Candresse, T.; Dulucq, M.J.; Büttner, C.; Obermeier, C., 2006: Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, cherry leaf roll virus. *J. Virol.* 80(5), 2453-2462.
Werner, R.; Mühlbach, H.-P.; Büttner, C., 1997: Detection of cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immunocapture RT-PCR using a conserved primer pair. *Eur. J. For. Pathol.* 27, 309-318.