

Vergleich der 3' nicht-kodierenden Regionen ausgewählter *Cherry leaf roll virus* Varianten

Comparison of the 3' non-coding regions of certain Cherry leaf roll virus isolates

Jenny Robel*, Juliane Langer, Susanne von Bargaen und Carmen Büttner

Einleitung

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) ist ein weltweit verbreitetes Pflanzenvirus mit umfangreichem Wirtsspektrum, darunter zahlreiche Forst- und Obstgehölze.

Das bipartite CLRV-Genom weist zwei positivorientierte, einzelsträngige und getrennt verpackte RNA-Moleküle auf. Die CLRV-RNAs besitzen sowohl die längste 3' nicht-kodierende Region (3' NCR, 1538-1602 nt), als auch die kürzeste 5' NCR (11 nt) aller derzeit charakterisierten Nepoviren. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die 3' NCRs beider RNAs bei Nepoviren nahezu identisch sind, um wichtige funktionelle Elemente in diesem Genombereich zu konservieren. Dieses wurde durch die Sequenzierung einzelner RNA1- und RNA2- spezifischer 3' NCRs für 4 CLRV-Isolate, die verschiedene phylogenetische und serologische Gruppen repräsentieren (Rebenstorf et al. 2006), überprüft. Bis auf das Isolat Himbeere (Sequenzidentität von 73,4%) waren die beiden 3' NCRs der drei CLRV-Isolate aus Rhabarber, Kirsche und Holunder nahezu identisch.

Daher soll die Variabilität dieses Genombereichs durch die Sequenz-Analyse von mehreren unabhängigen Amplifikationsprodukten der 3' NCRs verschiedener CLRV-Varianten näher untersucht und die Sequenz-Stabilität innerhalb der RNA-Populationen der CLRV-Isolate miteinander verglichen werden.

Material und Methoden

CLRV-Isolate aus Rhabarber, Walnuss, Kirsche, Holunder und Himbeere wurden auf *Chenopodium quinoa* vermehrt. Je Isolat wurde aus drei infizierten Pflanzen Gesamt-RNA gewonnen. Anschließend wurde die gesamte virale 3'NCR mit RNA1- und RNA2-spezifischen Primern mittels *Polymerase chain reaction* (PCR) amplifiziert.

Die erhaltenen Fragmente wurden in den pGEM-Teasy-Vektor ligiert und in chemokompetente *E. coli*-Stämme transformiert. Durch Blau-Weiß-Selektion und Kolonie-PCR wurden die Transformanten auf korrekte Insertion der 3' NCR-Fragmente in den Vektor selektiert und jeweils 10 individuelle Klone ausgewählt. Aus den Klonen wurden die inserierten CLRV - 3' NCR-Bereiche reamplifiziert, nachfolgend mit AluI, DraI bzw. HincII restringiert und nach Elektrophorese im 2 %igen Agarosegel miteinander über die Bandenmuster verglichen (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP-Analyse).

Ergebnisse und Diskussion

Die Restriktionsmuster geben erste Hinweise auf das Vorhandensein von 3' NCR-Varianten, die von den aus bekannten Sequenzen abgeleiteten Mustern (*in silico* Restriktion) abweichen. Im Vergleich zu den Restriktionsmustern der anderen Isolate ist das des Virus-Isolates aus Walnuss sehr homogen. Eine der RNA1-3' NCRs und zwei der RNA2-3' NCRs weichen vom Bandenmuster der anderen CLRV-Walnuss-3' NCRs ab. Tab. 1 zeigt eine Zusammenfassung der Anzahl variabler Restriktionsmuster innerhalb dieses Genombereichs von fünf untersuchten CLRV-Isolate, die mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen untersucht wurden. Die Virus-Isolate aus Rhabarber, Walnuss und Kirsche haben zwischen 0 und 3 Abweichungen vom jeweiligen Konsensus-Restriktionsmuster in der 3' NCR der RNA1 und RNA2. Das Holunder-Isolat ist deutlich variabler. Die HincII-Restriktion der 3'NCR ergibt z.B. für die RNA2 des CLRV-Isolates aus Holunder 6 zusätzliche Restriktionsmuster. Es treten zudem bei den drei verwendeten Restriktionsenzymen jeweils 2 Konsensus-Restriktionsmuster der 3'

NCR in gleicher Häufigkeit (n = 15 bzw. 17) auf, so dass hier keine Konsensus-Sequenz definiert werden kann.

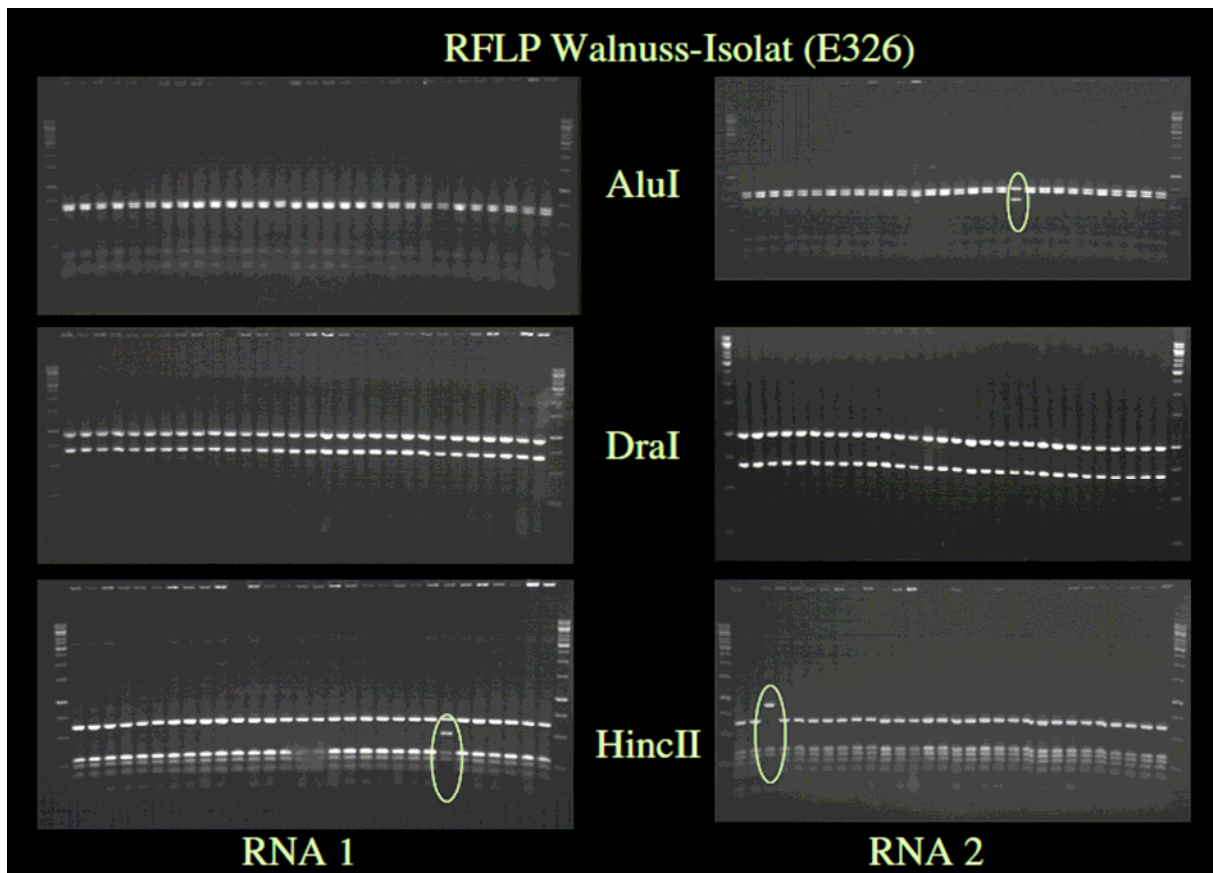


Abbildung 1: RFLP mit den Restriktionsenzymen AluI, DraI, HincII der 3'NCR der RNA1 und RNA2 des Walnuss-Isolats von jeweils 10 Klonen aus drei unterschiedlichen RNA-Populationen

Tabelle 1: Anzahl der individuellen Restriktionsmuster der 3' NCR der RNA1 (rot) und RNA2 (grün) für 5 untersuchte CLRV-Isolate. Die Anzahl der Bandenmuster, die sowohl in der RNA1 als auch in der RNA2 auftreten, sind in der Schnittmenge vermerkt. n.a. nicht analysiert

RFLP CLRV-Isolat	Alu I		Dra I		Hinc II	
	RNA1	RNA2	RNA1	RNA2	RNA 1	RNA2
E 395 Rhabarber	2	2	2	2	0	2
E 326 Walnuss	0	1	0	0	1	1
E 603 Holunder	2	4	1	3	1	6
E 327 Kirsche	0	1	3	0	3	0
E 802 Himbeere	3	n.a.	3	n.a.	3	n.a.

Die Überprüfung der Heterogenität der 3' NCR des CLRV-Isolates aus Himbeere konnte noch nicht abgeschlossen werden, da die RNA2-spezifischen 3' NCRs noch nicht vollständig untersucht sind. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die gesamte 3' NCR zwischen RNA1 und RNA2 nicht zwingend konserviert sein muss, um funktionelle Strukturen bzw. die Replikationsfähigkeit des Virus zu erhalten.

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Sequenzvariabilität der 3' nicht-kodierenden Regionen (NCR) fünf verschiedener CLRV-Isolate mittels RFLP-Analyse unterstützen die auf Einzel-Sequenzinformation beruhenden Untersuchungen hinsichtlich der Sequenzidentität zwischen RNA1 und RNA2 nur bedingt. Drei der fünf untersuchten Isolate erwiesen sich in je 3 unabhängig amplifizierten RNA-Populationen als homogen innerhalb dieses Genombereichs. Beim CLRV-Isolat aus Holunder zeigt dagegen der Vergleich der RNA-Populationen eine große Variantenvielfalt innerhalb der 3' NCRs. Für das Virus-Isolat aus Himbeere liegen derzeit noch nicht ausreichend Klone der RNA2-3' NCR vor, um eine abschließende Aussage über die tatsächliche Heterogenität der beiden 3' NCRs in diesem Isolat treffen zu können. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf CLRV-Isolat-spezifische Unterschiede in der Sequenzvariabilität bzw. -stabilität innerhalb der 3' NCR hin. Die Sequenzierung der insgesamt identifizierten 3' NCR-Varianten wird weitere Informationen über die Variabilität der CLRV-3' NCR liefern können.

Abstract

Analysis of sequence variability within the 3' non-coding region (NCR) of five CLRV-isolates using RFLP-analysis supported only partially the comparison of the single-sequence based informations concerning the sequence identity between RNA1 and RNA2 of given isolates. Three out of five isolates exhibit homogeneous restriction patterns within this part of the genome using three independently amplified RNA populations. The elderberry isolate of CLRV shows the highest 3' variability within the RNA populations. The analyses regarding the 3' NCR-RNA2 of the CLRV-isolate originating from raspberry is not completed, though it is not possible to estimate the overall heterogeneity between the 3' NCRs of RNA1 and RNA2. However, preliminary results indicate towards CLRV-isolate-specific differences within sequence stabilities of the 3' NCRs. Subsequent sequencing of the 3' NCR variants will provide more information about the sequence variability of CLRV-3' NCRs.

Literatur

REBENSTORF K, CANDRESSE T, DULUCQ M, BÜTTNER C, OBERMEIER C, 2006: Host Species-Dependent Population Structure of a Pollen-Borne Plant Virus, *Cherry Leaf Roll Virus*. *Journal of Virology* 80, 2453-2462.

Danksagung

Dankenswerterweise dürfen wir unsere Arbeiten - seit Beginn der Großbaumaßnahmen an unserem Gebäude- am Julius Kühn-Institut in Dahlem durchführen und haben dort unseren vorübergehenden Sitz in der Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin

Adresse der Autoren

Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin; c/o Julius-Kühn-Institut, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin, Deutschland

* Ansprechpartner: Jenny Robel, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de