



Phylogenetische Analyse von 63 verschiedenen Kirschenblattrollvirus-Isolaten aus 17 unterschiedlichen Wirtspflanzenarten

K. Rebenstorf¹, C. Obermeier², S. von Bargaen¹, C. Büttner¹

¹ Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin
² Sustainable Disease Resistance Team, Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick, UK, CV35 EF

Ein Weg zur phylogenetischen Analyse

Umfangreiche Probenahmen haben gezeigt, dass das Kirschenblattrollvirus (CLR) deutschlandweit verbreitet ist (Abb. 1). Der Nachweis erfolgte mittels Immuno capture-Reverse Transcription-PCR (IC-RT-PCR). Bei der Auftrennung der PCR-Fragmente im Agarosegel konnten kleine Größenunterschiede festgestellt werden (Abb. 2). Solche Größenunterschiede der Amplifikate verschiedener CLR-Isolate deuten auf genomische Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten in diesem Bereich des Virusgenoms hin. Daher wurden mehrere mittels IC-RT-PCR amplifizierte Einzelkopien-DNA-Fragmente in *E. coli* kloniert. Nach erfolgreicher Klonierung der virus-spezifischen DNA wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA sequenziert. Anschließend wurden die erhaltenen Nukleinsäuresequenzdaten mit Hilfe des Computerprogramms ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) miteinander verglichen (Abb. 3). Der Sequenzvergleich wurde nach dem Neighbor joining-Verfahren mit Hilfe des Computerprogramms ClustalX 1.8 unter Ausschluss von Lückenpositionen und Korrektur von multiplen Substitutionen durchgeführt. Die graphische Darstellung des Stammbaumes erfolgte mit dem Computerprogramm NJPlot (beide Programme sind frei im Internet erhältlich).

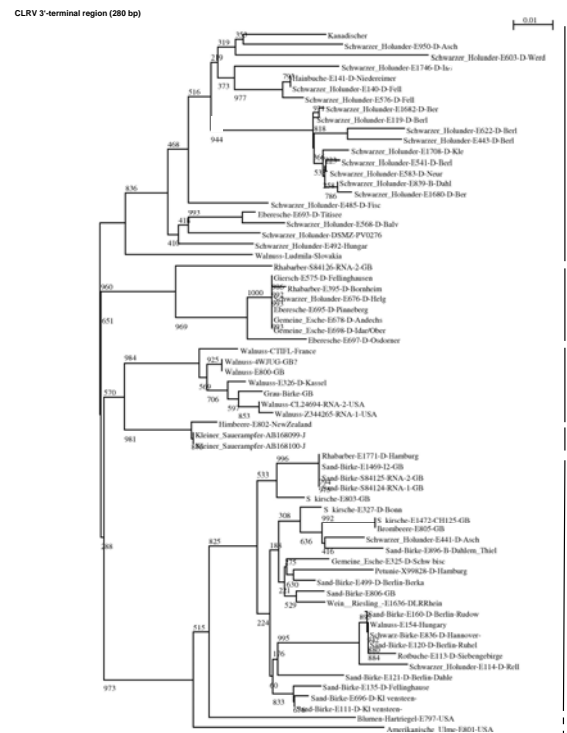
Die Sequenzierungsergebnisse bestätigen die Beobachtungen, dass verschiedene CLR-Isolate unterschiedliche Sequenzlängen aufweisen und zeigen, dass die Unterschiede in der Basenabfolge isolatspezifisch sind. Der Stammbaum zeigt, dass sich die Isolate nach ihren natürlichen Wirtspflanzen gruppieren. Die Sequenzabfolge der Isolate innerhalb einer phylogenetischen Gruppe ist zu 93% bis 100% identisch und die Sequenzunterschiede zwischen den Gruppen liegen bei 7% bis 13% (Abb. 4).

Die beschriebenen molekulare Verfahren eignen sich zur einfachen phylogenetischen Charakterisierung von CLR-Isolaten in Kultur- und Wildpflanzen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine ausgeprägte wirtsspezifische Selektion der Viruspopulationen für das Cherry leaf roll virus erfolgt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der phylogenetischen Gruppierung der Viruspopulationen bei vielen anderen Pflanzenviren. Aufgrund der ausschließlichen durch Samen und Pollen erfolgenden natürlichen Übertragung des Cherry leaf roll virus ist eine Übertragung zwischen verschiedenen Pflanzenarten stark eingeschränkt. Dieses steht möglicherweise im direkten Zusammenhang mit der großen genetischen wirtsspezifischen Diversität der CLR-Populationen. Zur Untersuchung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen zur Populationsgenetik des CLR geplant.



Abb. 1: Verbreitung des Kirschenblattrollvirus in Deutschland, Standorte der positiv auf CLRV getesteten Proben.

Phylogenetischer Stammbaum



Hollunder, Hainbuche

84 % bis 93% Sequenzhomologie zwischen den Gruppen

Rhabarber, Eberesche, Esche

Walnuss

Himbeere

Birke, Süßkirsche, Buche

Hartweige, Ulme

93% bis 100% Sequenzhomologie innerhalb einer Gruppe

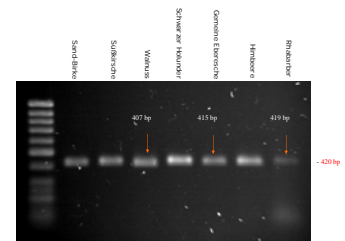


Abb. 2: Nachweis von CLRV mittels IC-RT-PCR. Im 1%igen Agarosegel wurden amplifizierte Fragmente verschiedener CLR-Isolate nebeneinander aufgetragen. Hierbei zeigten sich leichte Größenunterschiede in der Sequenzlänge.

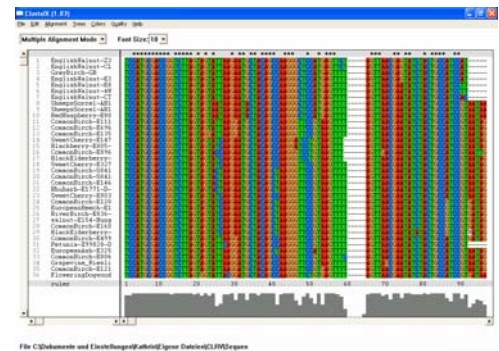


Abb. 3: Beispiel eines Nukleinsäuresequenzdatenvergleiches mit Hilfe des Computerprogramms ClustalX.

Abb. 4: Phylogenetischer Vergleich der 280 bp langen Sequenzen der 3'-terminalen nicht-kodierenden Region verschiedener CLR-Isolate erstellt mit ClustalX und NJPlot

