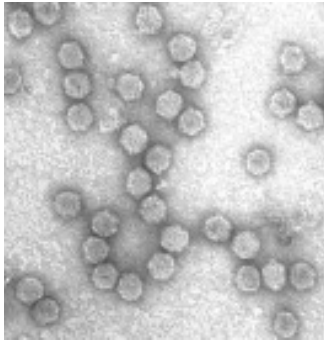


Vergleich von molekularen und serologischen Eigenschaften verschiedener Kirschenblattrollvirus-Varianten



J. Gentkow, K. Rebenstorf, M. Bandte, S. von Bargen und C. Büttner
 Fachgebiet Phytomedizin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Humboldt-Universität Berlin
 Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin-Dahlem, jana.gentkow@student.hu-berlin.de



Kirschenblattrollvirus
 (*cherry leaf roll virus*, CLRV)

Systematik: Familie Comoviridae, Gattung Nepovirus, Subgruppe C
Morphologie: isometrische Partikel, 28nm Durchmesser
Genom: bipartites Genom aus einzelsträngiger, positiv orientierter RNA
Verbreitung: weltweit verbreiteter Erreger an Obstgehölzen, Zier- und Gemüsepflanzen (z.B. Kirsche, Walnuss, Holunder, Birke, Rhabarber)
Übertragung: (natürlich) durch Pollen und Samen

Abb. 1
 CLRV-Partikel (Isolat E395) nach Aufreinigung
 Foto: TEM, 8000fache Vergrößerung

Einleitung

CLRV-Stämme, die aus unterschiedlichen Gehölzarten isoliert wurden, unterscheiden sich in ihren RNA-Sequenzen und ihren serologischen Merkmalen. (JONES, 1985; GIERSIEPEN, 1993)
 Die Analyse einer 280bp langen Sequenz innerhalb des hochkonservierten Genomabschnitts am 3'-Ende der viralen RNA teilte die dabei untersuchten CLRV-Isolate aus 17 Gehölzarten in sechs Gruppen ein. Zehn ausgewählte Isolate aus diesen sechs Gruppen wurden hinsichtlich ihrer biologischen, serologischen und molekularbiologischen Eigenschaften untersucht.

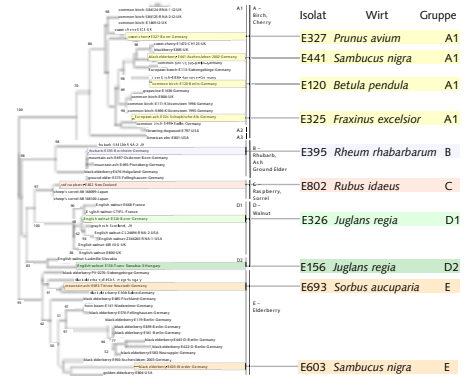


Abb. 2: CLRV-Stammbaum auf Grundlage von Sequenzunterschieden in der 3' NCR und zehn ausgewählte Virusisolate

Morphologische Untersuchungen

Zum Vergleich der Symptome einer CLRV-Infektion wurden Pflanzen der Art *Chenopodium quinoa* mit zehn verschiedenen CLRV-Isolaten (Abb. 2b) infiziert und bonitiert. Des weiteren wurden aus infizierten Pflanzen Viruspartikel aufgereinigt. Die Virusaufreinigungen wurden mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) untersucht. Die Infektion verlief bei neun der zehn Isolate systemisch und zeigte nach 3-5 Tagen typische Symptome wie chlorotische, zunehmend nekrotische Lokalläsionen (Abb. 4, 5). Bei jüngeren Blättern konnten vom Blattstiel ausgehende, sich über das Blatt ausbreitende flächige Chlorosen beobachtet werden (Abb. 3). Im Gegensatz dazu bewirkte Isolat E156 aus Walnuss nur eine lokale Infektion, die sich nicht systemisch in der Pflanze verbreitete. Bei allen zehn Virusaufreinigungen waren im TEM Partikel mit der typischen Morphologie zu erkennen (Abb.1).



Abb. 3 vom Blattstiel ausgehende Chlorose auf *Chenopodium quinoa*, CLRV-Isolat E802



Abb. 4 chlorotische und nekrotische Lokalläsionen auf einem Blatt von *C. quinoa*, CLRV-Isolat E693

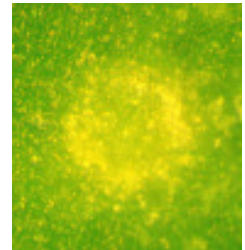


Abb. 5 chlorotische Lokalläsion mit beginnender ringförmiger Nekrose, CLRV-Isolat E693 (lichtmikroskopische Aufnahme)

Serologische Untersuchungen

Für serologische Analysen wurde ein polyklonales Antiserum gegen aufgereinigte Viruspartikel des Isolats E603 aus Holunder hergestellt. Dieses wurde zum Test aller zehn Isolate im Double Antibody Sandwich (DAS)-ELISA eingesetzt. Zusätzlich wurde das Antiserum in einer Immunocapture-Reverse Transcription-PCR (IC-RT-PCR) eingesetzt, einer Kombination molekularbiologischer und serologischer Methoden. Virale Strukturproteine gereinigter Viruspartikel wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Durch den Antikörper ließen sich nicht alle Isolate nachweisen, sondern nur Angehörige der Gruppen E und D1 (Abb. 6), was auf Unterschiede der Hüllproteine der verschiedenen CLRV-Isolate hinweist. Unterschiede im Nachweis der verschiedenen Virusisolate durch den erzeugten Antikörper konnte zudem in der IC-RT-PCR beobachtet werden (Abb. 7). Acht Isolate wiesen in der SDS-PAGE keine Unterschiede in der Größe des Hüllproteins, die bei 52-53 kDa lag, auf. Bei zwei Virusaufreinigungen wurden Hüllproteine mit stark abweichender Größe von 28,3 kDa (E156) und 16,6 kDa (E325) errechnet (Abb. 8).

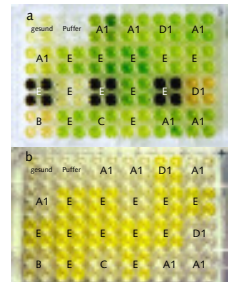


Abb. 6 DAS-ELISA mit Antikörper gegen E603 a: CLRV-infiziertes Probenmaterial (Gruppen A-E) b: 1h nach Substratzugabe

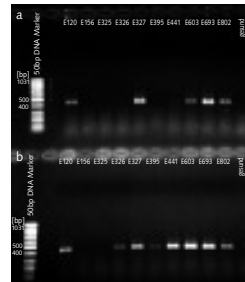


Abb. 7 IC-RT-PCR mit aufgereinigten Viruspartikeln a: Immunocapture mit CLRV-Antiserum b: nur RT-PCR ohne Immunocapture

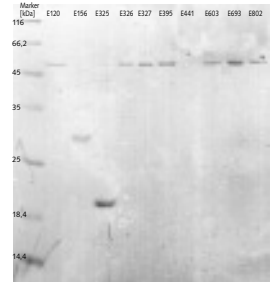


Abb. 8 SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung Marker: Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)

Molekularbiologische Untersuchungen

Zum Vergleich der Gesamtgenome wurden gereinigte Viruspartikel unter nativen Bedingungen im Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Um die Molekulargewichte der RNA1 und RNA2 von CLRV zu ermitteln, wurde RNA aus Partikelreinigungen mittels denaturierender Glyoxal-Gelelektrophorese analysiert. Im nativen Agarosegel (Abb. 9 und 10) zeigten sieben Virusisolate einheitliche RNA1- und RNA2-Banden. Das Isolat E395 wies nur eine einzelne RNA-Bande auf, die etwa zwischen RNA1 und RNA2 der anderen Isolate lag. Eine große Abweichung gab es bei den Virusaufreinigungen E156 und E325, die sich von den anderen untersuchten Isolaten durch deutlich niedriger laufende RNA-Banden unterschieden (Abb. 10). Die errechneten Größen für RNA1 und RNA2 der im Glyoxalgel (Abb. 11) untersuchten typischen CLRV-Isolate lagen bei 8,2-8,4 kb und 6,9-7,3 kb, wobei geringe Unterschiede der Laufweite der beiden RNA-Banden zwischen den Proben beobachtet werden konnten.

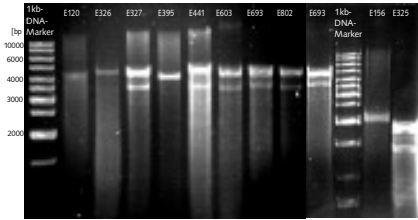


Abb. 9 und 10: RNA-Gelelektrophorese von Partikelreinigungen der unterschiedlichen Virusisolate unter nativen Bedingungen GeneRuler™ DNA-Marker (Fermentas)

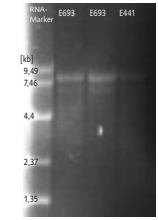


Abb. 11 Denaturierendes RNA-Gel mit ausgewählten Isolaten RNA-Marker (Invitrogen™)



Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sieben der zehn untersuchten Virusaufreinigungen typische CLRV-Isolate sind.

Aus Isolat E395, welches ein typisches Hüllprotein aufweist, sind in der PCR auch CLRV-spezifische Sequenzen amplifizierbar. Es zeigt jedoch eine atypische RNA-Bande.

Bei den aufgereinigten Partikeln von E156 und E325 handelt sich vermutlich nicht um CLRV-Isolate.