

IC-RT-PCR-RFLP zur Differenzierung von CLRV-Isolaten unterschiedlicher Phylogenie



J. Buchhop, S. von Bargaen, C. Büttner

FG Phytomedizin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Humboldt-Universität zu Berlin
 phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einleitung

Das Kirschenblattrollvirus (*Cherry leaf roll virus*, CLRV) ist ein weltweit verbreitetes Pathogen, das neben Gehölzen auch krautige Pflanzen infiziert. Bislang wurde das Virus in 17 verschiedenen Gehölzgattungen nachgewiesen.

Isolate aus unterschiedlichen Wirtspflanzen differieren bezüglich ihrer RNA-Sequenzen und ihrer serologischen Erkennbarkeit. Eine Einteilung in sechs phylogenetische Gruppen anhand einer Teilsequenz der viralen 3'NCR ist möglich. Die genetische Diversität der Isolate wird dabei vorwiegend durch die natürliche Wirtspflanzenart bestimmt.

Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, um CLRV-Isolate unterschiedlicher Herkunft direkt in ihren Original-Wirtspflanzen nachzuweisen und diese dabei genetisch gemäß der phylogenetischen Gruppierung aufgrund der 3'NCR zu differenzieren.

Tabelle 1: Gerundete Fragmentgrößen (bp) nach in silico Restriktionsanalyse der PCR amplifizierten RW1/RW2-Produkte der 3'NCR von CLRV-Isolaten

Is. = Isolat(e), Gr. = Gruppe
 a anhand der Sequenz des 375 bp Fragmentes der 3'NCR nach Rebenstorf et al. 2006

Phylogenetische Gruppe ^a	AluI	RsaI	Bsp143I
A (18 Is.)	ungeschnitten oder eine Schnittstelle	ungeschnitten oder eine Schnittstelle	120, 300 (16 Is.) oder 100, 120, 200 (2 Is.)
B (8 Is.)	150, 270	80, 330	ungeschnitten
E (9 Is.)	100, 150, 170	ungeschnitten	ungeschnitten
E (7 Is.), D2 (1 Is.), C (4 Is.)	150, 270	ungeschnitten oder 60, 350 (Is. E950, Gr. E)	ungeschnitten oder 70, 340 (Is. E568, Gr. E)
D1 (8 Is.), A (2 Is.)	ungeschnitten	ungeschnitten	ungeschnitten

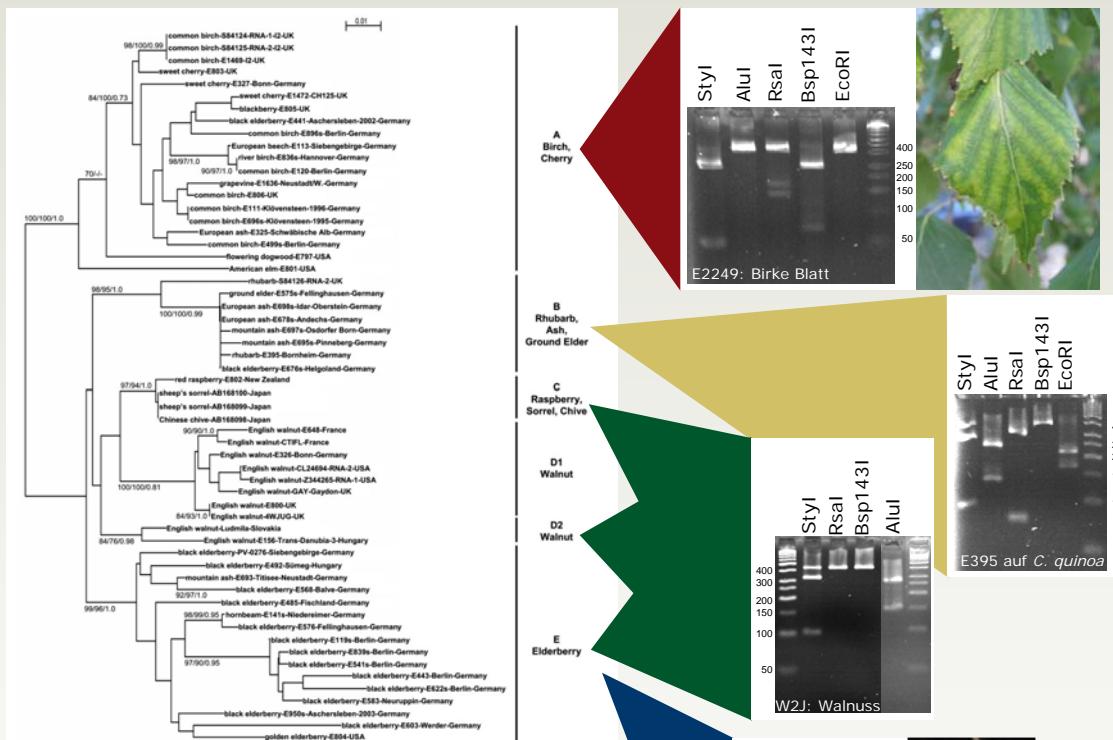


Abbildung 1: Stammbaum und phylogenetische Gruppen anhand der Sequenz des 375 bp Fragmentes der 3'NCR (Rebenstorf et al. 2006) und Restriktionsmuster unterschiedlicher Isolate

Material und Methoden

Klonierte Fragmente der CLRV 3' NCR (420 bp, Werner et al. 1997) von 37 Isolaten aus 5 phylogenetischen Gruppen wurden durch PCR mit den Primern RW1 und RW2 reamplifiziert und nachfolgend mit den Restriktionsenzymen StyI, AluI, RsaI, Bsp143I und EcoRI verdaut.

Mittels IC-RT-PCR-RFLP wurden bisher nicht charakterisierte CLRV-Isolate direkt aus den Originalwirtspflanzen Walnuss, Holunder und Birke untersucht. Eine Sequenzierung der RW1/RW2-Fragmente wurde vorgenommen, um die phylogenetische Einordnung, die anhand des Restriktionsmusters vorgenommen wurde, zu verifizieren.

Rebenstorf, K., Candresse, T., Duluca, M. J., Büttner, C., Obermeier, C. 2006. Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, *Cherry leaf roll virus* (CLRV). *J. Virol.* 80, 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 primerpair. *Eur. J. For. Pathol.* 27, 309-318

Ergebnisse

Der Verdau von RW1/RW2 3'NCR Fragmenten ergab, dass je nach Restriktionsmuster der Enzyme Bsp143I, AluI und RsaI eine Zuordnung der Isolate zu phylogenetischen Gruppen möglich ist (siehe Tabelle 1). StyI und EcoRI ermöglichten keine Differenzierung. Isolate der Gruppe B ließen sich aufgrund ihres Restriktionsmusters eindeutig differenzieren. Für die Einordnung bedingt möglich.

Mithilfe der IC-RT-PCR-RFLP wurde ein Holunder-Isolat (E2016) der Gruppe E, und ein Birken-Isolat (E2249) der Gruppe A zugeordnet. Die Gruppenzugehörigkeit eines Walnuss-Isolates (W2J) konnte auf die Gruppen C, D2 und E eingegrenzt werden. Die Sequenzierung der RW1/RW2 Fragmente bestätigte die Gruppierung und ordnete das Walnuss-Isolat der Gruppe D2 zu.

Die IC-RT-PCR-RFLP konnte erfolgreich auf die CLRV Isolat-Differenzierung aus Originalwirtspflanzen angewendet werden.

Die Möglichkeit des Nachweises direkt aus Holzigen Wirtspflanzen ist stark davon abhängig, dass das Amplifikat eine ausreichende Konzentration besitzt. Wirtspflanzenart und Wahl des Probenmaterials (Frucht, Blatt) sind hier von Einfluss.

Um eine eindeutige Zuordnung für sämtliche Isolate durch die IC-RT-PCR-RFLP zu ermöglichen ist eine Erweiterung mit weiteren Restriktionsenzymen anzustreben. Die Ergebnisse sollten weiter validiert werden.