Die 3´ nicht-kodierenden Regionen des *Cherry leaf roll virus* (CLRV) – identisch oder variabel?

Jenny Robel, Juliane Langer, Susanne von Bargen, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Email: phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

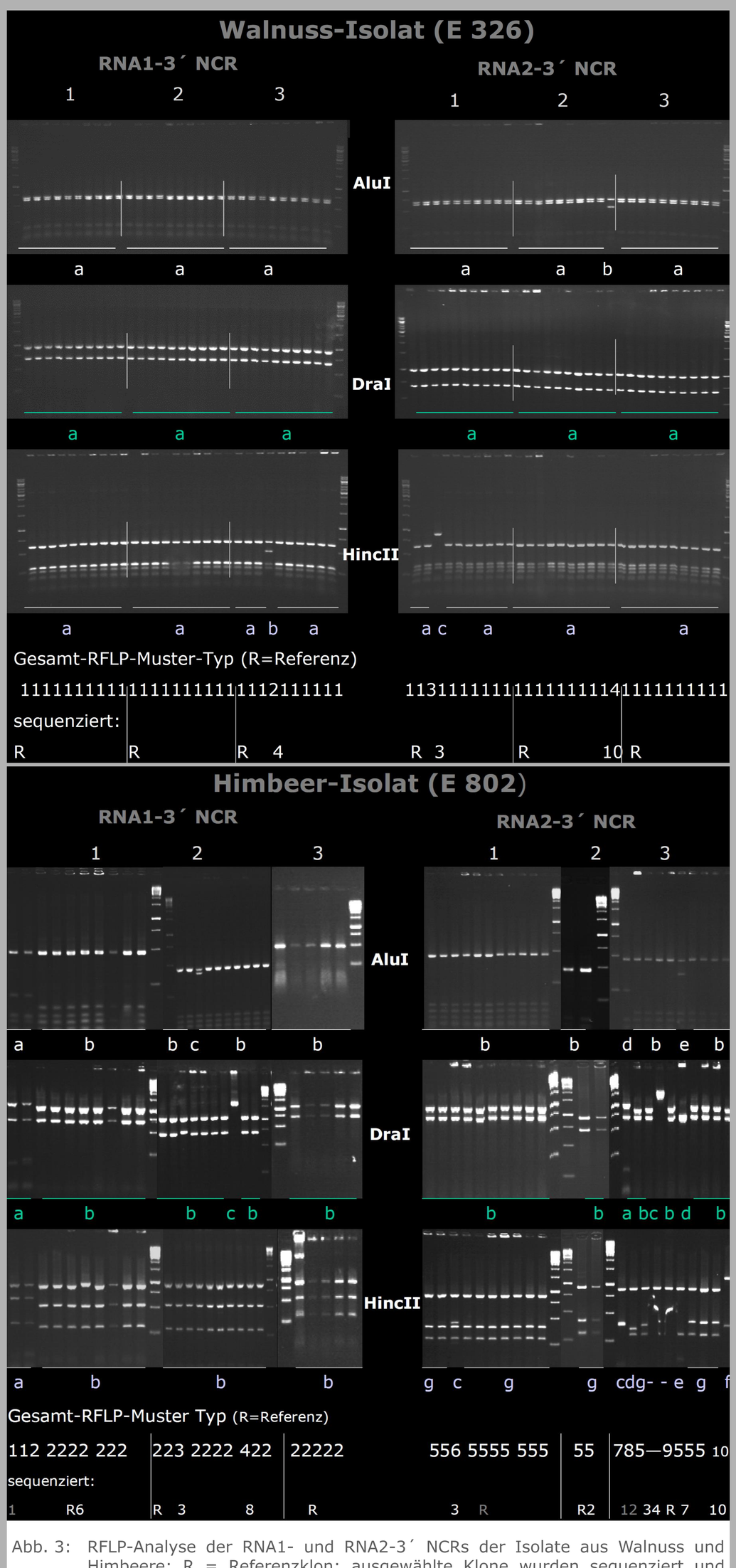

Abb. 3: RFLP-Analyse der RNA1- und RNA2-3´ NCRs der Isolate aus Walnuss und Himbeere; R = Referenzklon; ausgewählte Klone wurden sequenziert und eine Mastersequenz abgeleitet; grau = Klone, deren Sequenz bisher nicht vorliegt.

Tab. 2: Identitätsvergleich der erstellten Mastersequenzen (1538-1613 nt) der 3´ NCR der RNA1 und RNA2 der CLRV-Isolate aus Walnuss (E326), Kirsche (E327), Rhabarber (E395), Holunder (E603) und Himbeere (E802), **hervorgehoben** ist der Identitätsvergleich der 3´ NCR der RNA1 und RNA2 innerhalb eines Isolates

		RNA1-3´ NCR					RNA2-3´ NCR			
		E326	**E327**	**E395**	**E603**	**E802**	**E326**	**E327**	**E395**	**E603**
RNA1	**E326**									
	E327	77,5%								
	E395	83,5%	75,9%							
	E603	81,8%	74,8%	79,0%						
	E802	78,8%	72,8%	77,7%	90,7%					
RNA2	**E326**	**99,6%**	77,4%	83,4%	81,9%	78,8%				
	E327	76,4%	**98,0%**	74,7%	73,9%	72,1%	76,5%			
	E395	83,2%	75,6%	**98,5%**	78,5%	77,4%	83,2%	75,2%		
	E603	81,2%	74,3%	78,2%	**98,5%**	90,5%	81,2%	74,0%	78,6%	
	E802	80,1%	73,4%	78,2%	91,9%	**96,5%**	80,2%	73,3%	78,7%	92,4%

Danksagung

Dieses Projekt wird finanziell durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (BU 890/12-1) unterstützt.

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.

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 (Abb. 1). Die genomischen RNAs des CLRV besitzen die längste 3' nicht-kodierende Region (3' NCR) aller derzeit charakterisierten Nepoviren (Fam. Secoviridae).

Bislang wurde davon ausgegangen, dass zum Erhalt funktioneller Strukturen und der Replikationsfähigkeit die 3´ NCRs beider RNAs eines Isolates generell identisch sind.

Die Untersuchung von jeweils 10 Klonen aus 3 unabhängigen RNA1- und RNA2-spezifischen Amplifikationen der 3´ NCRs sollen Aufschluss über die Homogenität der CLRV 3´ NCRs von RNA1 und RNA2 geben.

M & M

Von verschiedenen CLRV-Isolaten aus Walnuss, Rhabarber, Kirsche, Holunder und Himbeere wurde aus drei unabhängigen Gesamt-RNA-Präparationen die 3´ NCRs der viralen RNAs mit RNA1- und RNA2-spezifischen *Primern* amplifiziert und kloniert. Von bis zu 10 der klonierten 3´ NCR-Fragmente erfolgte ein Verdau mit den Restriktionsenzymen AluI, DraI und HincII (RFLP-Analyse). Repräsentative Klone mit individuellen Bandenmustern wurden sequenziert. Erhaltene 3´ NCR-Sequenzen wurden verglichen und die Identitäten innerhalb eines Isolats sowie nach Erstellung einer Mastersequenz die Inter-Isolat-spezifischen Ähnlichkeiten berechnet.

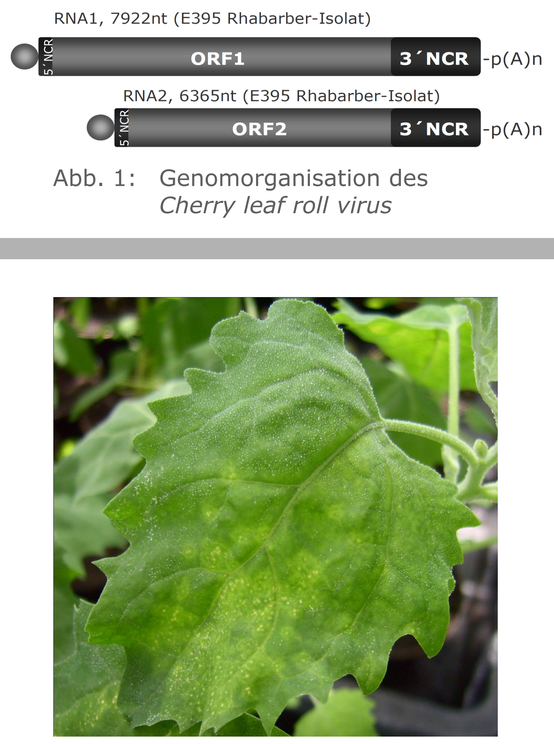

Abb. 1: Genomorganisation des *Cherry leaf roll virus*

Abb. 2: CLRV-infizierte *C. quinoa*

Tab. 1: Anzahl der individuellen Restriktionsmuster der 3´ NCR der RNA1 und RNA2 für fünf untersuchte CLRV-Isolate. Die Anzahl der Bandenmuster, die sowohl in der RNA1 als auch auf der RNA2 vorkommen, sind unter RNA1/2 vermerkt.

CLRV-Isolat aus	**vorkommende individuelle 3´ NCR -Restriktionsmuster**	**AluI**	**DraI**	**HincII**	**RFLP gesamt**	**RFLP/ untersuchter Klon in %**	**untersuchte Klone (n)**
Walnuss E 326	**RNA1**	0	0	1	1	3	30
	RNA1/2	1	1	1	1		
	RNA2	1	0	1	2	7	30
Kirsche E 327	**RNA1**	0	2	3	4	13	30
	RNA1/2	1	1	1	1		
	RNA2	1	0	0	1	5	20
Rhabarber E 395	**RNA1**	3	1	0	4	13	30
	RNA1/2	1	1	1	1		
	RNA2	1	2	1	2	9	23
Holunder E 603	**RNA1**	1	0	2	5	33	15
	RNA1/2	2	3	1	0		
	RNA2	5	5	8	12	46	26
Himbeere E 802	**RNA1**	2	0	2	5	20	25
	RNA1/2	1	3	0	0		
	RNA2	2	1	5	6	27	22

Ergebnisse

Es bestehen Isolat-abhängige Unterschiede in der Homogenität der Restriktionsmuster der RNA1- und RNA2-3´ NCRs von CLRV (Abb. 3). Die Restriktion der 3´ NCRs der Virus-Isolate aus Walnuss, Rhabarber und Kirsche führte zu einheitlichen Restriktionsmustern der RNA1- und RNA2-Populationen. Sowohl das Himbeer-Isolat als auch das Holunder-Isolat zeigten dagegen eine größere Heterogenität der generierten Bandenmuster (Tab. 1). Die Isolate aus Holunder und Himbeere wiesen im Gegensatz zu den drei anderen Isolaten kein Konsensus-Restriktionsmuster der beiden genomischen 3´ NCRs auf.

Der Vergleich der Mastersequenzen (Tab. 2) der fünf CLRV-Isolate bestätigten die RFLP-Untersuchungen nur bedingt. Die 3´ NCRs eines Isolats zeigten hohe Sequenz-Identitäten von 96,5-99,6 %. Der Sequenzvergleich der RNA1- und RNA2-3´ NCRs zwischen den Isolaten führte zu geringeren Ähnlichkeiten von 72,1-91,9 %.

Schlussfolgerungen

Die RFLP-Analyse der 3´ NCRs der viralen RNA1 und RNA2 aus drei unabhängigen RNA-Populationen zeigte, dass CLRV-Isolate aus Rhabarber, Walnuss und Kirsche innerhalb dieses Genombereiches homogen sind.

Die RFLP-Analyse deutet auf das Vorhandensein von mehreren stabilen Sequenzvarianten innerhalb des Himbeer- und Holunder-Isolates hin.

Die RFLP-Analyse ermöglicht es, vorherrschende Sequenzvarianten in den untersuchten 3´ NCR-Populationen zu ermitteln.

Die Sequenzierung ausgewählter 3´ NCRs mit heterogenen Restriktionsmustern bestätigt die hohe Konservierung des bipartiten CLRV-Genoms innerhalb dieser Region bei allen fünf untersuchten Isolaten.

RFLP-Analyse und Sequenzierung lassen Isolat-spezifische Unterschiede in der Sequenzvariabilität innerhalb der 3´ NCRs von CLRV erkennen.