pflanzenproduzenten und dem Bundessortenamt mit dem Ziel des Nachweises und der Charakterisierung bzw. Identifizierung der darin vorkommenden Viren an die BBA gesandt. Die primäre Diagnose erfolgte in der Regel elektronenmikroskopisch bzw. immunelektronenmikroskopisch und durch Übertragung auf differenzierte Spektren von Testpflanzen. Dabei wurden zum einen bekannte Viren in lange etablierten Kulturen nachgewiesen. Zum anderen wurden in neu nach Deutschland eingeführten vegetativ vermehrten Zierpflanzen und Stauden sowohl bekannte als auch unbekannte Viren detektiert.

Neben einem kurzen Überblick über die 2005/2006 detektierten Viren, wird in dem Vortrag im Wesentlichen über Hosta infizierende Viren berichtet. Nachdem 2005 zum ersten Mal das Hosta Virus X in Hostapflanzen in Deutschland nachgewiesen wurde, wurden Hostapflanzen aus ganz Deutschland auf Virusinfektionen untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen, sowie die durch die unterschiedlichen nachgewiesenen Viren hervorgerufenen Symptome werden in dem Vortrag vorgestellt.

46–7 – Mikona, C.; Jelkmann, W.
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau

Genetische Variabilität und Populationsstruktur von Grapevine leafroll-associated virus–1 Isolaten

Genetic variability of Grapevine leafroll–associated virus 1

Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV–1) gehört zur Gattung Ampelovirus der Familie Closteroviridae. Von mehreren Phloem limitierten Closteroviren ist GLRaV–1 ein Erreger der Blattrollkrankheit mit enger phylogenetischer Verwandtschaft zu Grapevine leafroll–associated virus 3 (GLRaV–3). Die Organisation des Einzelstrang RNA–Genoms mit zehn offenen Leserastern ist typisch für die Familie Closteroviridae, wobei GLRaV–1 als Besonderheit zwei Kopien des Hüllprotein–Duplikats besitzt. Begrenzte Sequenzinformationen einiger GLRaV–1 Isolate sind verfügbar. Bislang wurde ein Isolat (AF 195822) komplett sequenziert.

Die genetische Variabilität und potentiellen Rekombinationsereignisse sollten an einer Population von 48 Isolaten aus 14 verschiedenen Ländern untersucht werden. Dafür wurden spezifische Primerpaare in Genbereichen ausgesucht, die für die RNA abhängige RNA–Polymerase (RdRp), das Heatshock–70 Protein–Homolog (HSP70h) und das Hüllprotein (CP) kodieren.

Die Silica–capture–Methode wurde zur Totalnukleinsäure–Extraktion angewendet. Die virale RNA wurde mit Random Primern umgeschrieben und anschließend mittels PCR mit den spezifischen Primern amplifiziert. Die so erhaltene cDNA wurde kloniert und mittels Einzelstrang Konformations Polymorphismus (SSCP)–Methode und Sequenzierung analysiert.

Mit Hilfe der ClustalX –Software (Vers. 1.83) konnten die Nukleinsäuresequenzen verglichen werden. Die online verfügbare SNAP–Software ermöglichte die Ermittlung der Anzahl synonymer und nicht–synonymer Substitutionen.

Die SSCP Polyacrylamidgele zeigten zahlreiche Muster hinsichtlich des amplifizierten CP–Fragments. Für 35% der Isolate bestand dieses Muster aus mehr als drei Banden, vermutlich aufgrund der Infektion mit mehr als einer Variante von GLRaV–1 in diesen Isolaten. Zur Überprüfung wurden mehrere Klone dieser mischinfizierten Isolate sequenziert. Abweichungen in den Nukleinsäuresequenzen bestätigten das Vorhandensein unterschiedlicher Virusvarianten. Bisher konnte keine Hauptvariante festgestellt werden, weder innerhalb eines Isolats noch zwischen verschiedenen Isolaten. Das SSCP Muster ist sehr inhomogen und weist auf eine komplexe Populationsstruktur hin. Bisher wurden 60 Klone von 10 unterschiedlichen Isolaten sequenziert.

Innerhalb von 550 Nukleotide reichen die synonymen Substitutionen von Null bis 82.5 (15%) während die niedrigste und höchste Anzahl nicht–synonymer Substitutionen Null bzw. 32.5 (6%) ist. Die Substitutionsrate ist das Verhältnis beobachteter zu potentiellen Substitutionen. Sie liegt für synonyme Substitutionen bei durchschnittlich K_s=0.3 und für nicht–synonyme bei K_a=0.04, was auf einen hohen Selektionsdruck im CP–Genom hinweist. Das Verhältnis dieser Werte (K_a/K_s) war 0.13 und gleicht damit dem entsprechenden Wert einer genetischen Variabilitätsstudie an GLRaV–3.

Weitere SSCP–Analysen müssen zeigen, ob ähnliche Variabilitätswerte in der HSP70h– oder der RdRp–Domäne auftreten. Der Selektionsdruck sollte im genomischen Bereich des CP–Gens niedriger sein als in den anderen Regionen, da die Virusübertragung und –verbreitung hauptsächlich über Pfropfung / Vermehrung und Handel mit Reben geschieht und natürliche Vektoren dabei kaum eine Rolle spielen.

46–8 – Gentkow, J.[1]; Bargen, S. von[1]; Rebenstorf, K.[1]; Candresse, T.[2]; Büttner, C.[1]
[1] Humboldt–Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich–Gärtnerische Fakultät,
Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin
[2] INRA Bordeaux–Aquitaine, BP 81

Cherry leaf roll virus – Wirtspflanzenspezifische genetische Struktur eines pollenbürtigen Pflanzenvirus

Cherry leaf roll virus – Host–species–dependent genetic structure of a pollen–borne plant virus

Das Cherry leaf roll virus (CLRV) ist ein weltweit verbreitetes Pflanzenvirus, das Laubgehölze und Stauden natürlich infiziert. CLRV ist bislang das einzige bekannte Pflanzenvirus, das solch einen weiten Wirtspflanzenkreis an Gehölzen aufweist. Die Grundlagen der Anpassungsfähigkeit dieses Virus an verschiedene Wirtspflanzen und Umweltbedingungen sind bisher ungeklärt.

Phylogenetische Untersuchungen einer 375 bp langen Sequenz der 3'NCR (3´ non coding region) haben gezeigt, dass die untersuchten 56 CLRV–Proben aus 19 Wirtspflanzenarten in sechs phylogenetische Gruppen differenzierbar sind, die zum großen Teil durch die natürliche Original–Wirtspflanzenart definiert werden. Die phylogenetischen Gruppen stimmten dabei für die untersuchten Proben zum großen Teil mit der serologischen Gruppierung bei Testung von 24 Isolaten mit 7 monoklonalen Antikörpern überein, die gegen ein französisches Walnuss–Isolat des CLRV produziert worden waren (Rebenstorf et al., 2006).

Die genetische Diversität der CLRV–RNA1 und –RNA2 wurde anhand spezifischer kodierender Sequenzabschnitte (RNA1: RdRP, RNA2: Hüllprotein) untersucht. Beim Vergleich eines 523 Nukleotide umfassenden Bereichs der RdRP–Sequenz von vier CLRV–Isolaten aus unterschiedlichen Wirtspflanzen verschiedener Herkunft wurden Sequenzunterschiede zwischen 9–21% festgestellt, die Unterschiede in der entsprechenden Aminosäuresequenz von 1–10% determinieren. Die vollständige Sequenz des Hüllproteins wurde für 8 CLRV–Isolate ermittelt. Auf Nukleotidebene wurden Sequenzunterschiede zwischen 1–23%, auf Aminosäureebene zwischen 1–15% ermittelt. Im Vergleich zu den untersuchten kodierenden Genomabschnitten weist die 3'NCR von 56 untersuchten Isolaten einen höheren Grad der Sequenzkonservierung auf (maximal 17% Unterschied). Die Sequenzähnlichkeiten sowohl der RdRP– als auch der Hüllproteinsequenz der untersuchten CLRV–Isolate entsprechen der von Rebenstorf et al. (2006) beschriebenen phylogenetischen Gruppierung anhand der nicht kodierenden Region. Sie unterstützen den Befund, dass die genetische Struktur von CLRV–Populationen vor allem durch den Einfluss der natürlichen Wirtspflanzenart bestimmt wird, während der Einfluss der geographischen Distanz vergleichsweise gering ist. Möglicherweise ist die Populationsstruktur dieses Virus epidemiologisch begründet, da CLRV im Gegensatz zu anderen Pflanzenviren vorrangig durch Pollen und Samen übertragen wird, was offenbar artspezifische Übertragungsbarrieren zur Folge hat. Die Ergebnisse dieser Arbeiten stellen einen Hinweis für eine Wirts–basierende Selektion der Viruspopulation für ein pollenbürtiges Virus dar, die sowohl RNA1 bzw. RNA2 spezifische als auch kodierende bzw. nicht kodierende Abschnitte des CLRV–Genoms beeinflusst.

Literatur

Rebenstorf, K., Candresse, T., Dulucq. 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.