

## **Genetische Diversität der Population und Subpopulation des *Cherry leaf roll virus***

*Genetic diversity of population and subpopulation of Cherry leaf roll virus*

Rebenstorf, Kathrin<sup>1</sup>, Obermeier, C.<sup>2</sup>, von Barga, Susanne<sup>1</sup>, Büttner, Carmen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Fachgebiet Phytomedizin

<sup>2</sup> Warwick HRI, Wellesbourne, United Kingdom

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 enormen Anpassungsfähigkeit dieses Virus an verschiedene Wirtspflanzen und Umweltbedingungen sind bisher ungeklärt. Dies sowie die fehlenden Informationen zum Einfluss des Wirtspflanzenkreises und der geographischen Herkunft von CLRV-Populationen zur genetischen Diversität und zur Koevolution von Wirtspflanzen und Virus waren Anlass für die Untersuchungen.

Der Nachweis von CLRV erfolgte mittels Immunocapture - Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion (IC-RT-PCR). Dabei konnte CLRV in 20 verschiedenen Gehölzarten an 33 Standorten in Deutschland nachgewiesen werden. Außerdem wurden Isolate aus 6 anderen Ländern, die von Kollegen zur Verfügung gestellt worden waren, in die Untersuchungen einbezogen. Der Vergleich der Symptomausprägungen auf verschiedenen Testpflanzen zeigte keine auffälligen biologischen Unterschiede bei den gewonnenen CLRV-Isolaten.

Es wurde bereits für verschiedene CLRV-Isolate beschrieben, dass die Sequenzen der 3'UTR zwischen der RNA1 und RNA2 identisch bzw. fast identisch sind. Daher wurde angenommen, dass sich die verwendeten PCR-Primer an beide genomischen RNAs anlagern können, dadurch PCR-Produkte von beiden RNAs amplifiziert werden und die Sequenzunterschiede durch Sequenzierung nachgewiesen werden können. Um einschätzen zu können, wie heterogen die CLRV-RNA-Populationen der RNA1 und RNA2 in diesem Genombereich sind und ob die Sequenzierung einzelner oder weniger Moleküle eine Basenzusammensetzung widerspiegelt, die repräsentativ und charakteristisch für die Genompopulation einzelner CLRV-Isolate ist, wurde zunächst die Variabilität der mittels IC-RT-PCR amplifizierten Fragmente verschiedener CLRV-Isolate in der 3'UTR des Virusgenoms ermittelt. Untersuchungen zur RNA-Populationsstruktur, basierend auf einem 380 bp langen Teilbereichs der 3'-nicht-translatierten Region (3'UTR) der genomischen RNA1 und RNA2, zeigte eine homogene Basenzusammensetzung innerhalb der Virusisolate.

Durch phylogenetische Untersuchungen wurde die Bedeutung der natürlichen Original-Wirtspflanzenarten für die Diversität von CLRV-Isolaten ermittelt. Die phylogenetische Analyse von 280 bp langen Sequenzen der 3'UTR von 73 CLRV-Isolaten aus 20 verschiedenen Gehölzarten zeigte eine Gruppierung in sieben phylogenetische Gruppen, die zum großen Teil durch die natürliche Original-Wirtspflanzenart definiert war und Sequenzunterschiede bis zu 15,5 % aufwies. Die phylogenetische Gruppierung der CLRV-Isolate wird durch statistischen Analysen mittels  $G_{ST}$ -Koeffizient bzw. Mantel-Test unterlegt. Auch beim phylogenetischen Vergleich der Hüllprotein-Sequenzen für 9 CLRV-Isolate ergaben sich die gleichen Gruppen.

Aufgrund des sich aus diesen Analysen ergebenden möglichen Bedeutung der Wirtspflanze für die Variabilität der 3'UTR war es zunächst wichtig zu untersuchen, inwiefern die Vermehrung von CLRV-Isolaten in Indikatorpflanzen einen Einfluss auf die untersuchte Sequenz der 3'UTR hat. Es galt zu klären, ob Virusisolate, die wiederholt in Indikatorpflanzen vermehrt wurden, überhaupt Rückschlüsse auf die genetischen Eigenschaften von Viruspopulationen in den Original-Wirtspflanzenarten zulassen, oder ob durch den Einfluss der Indikatorpflanzen und die Anpassung des Virus sich das Virusgenom stark verändert hat. Die Ergebnisse zeigten, dass in der zur Vermehrung von CLRV-Isolaten verwendeten Indikatorpflanze *Chenopodium quinoa* auch bei jahrelanger Vermehrung über mehr als 20 Jahre im Gewächshaus, Veränderungen des Genoms im 3'UTR-Bereich eher selten sind und somit der Einfluss der zur Vermehrung eingesetzten Indikatorpflanzen auf die Diversität des Genomabschnitts im 3'UTR-Bereich von CLRV in der phylogenetischen Analyse vernachlässigt werden kann.

Durch die Untersuchungen zur Sekundärstruktur der Konsensus-Sequenz von 67 CLRV-Isolaten innerhalb der 3'UTR mittels Computer-Modellierung konnten zwei konservierte Stemloops innerhalb der 380 bp Sequenz identifiziert werden, die bei allen Isolaten identisch sind und die funktionelle Bedeutung der 3'UTR belegt. Die Funktion dieser Stemloops ist noch ungeklärt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die genetische Struktur von CLRV-Populationen vor allem durch den Einfluss der natürlichen Wirtspflanzenart bestimmt wird während der Einfluss der geographischen Distanz nur relativ gering ist. Möglicherweise ist die außergewöhnliche Populationsstruktur dieses Virus epidemiologisch begründet, da CLRV im Unterschied zu vielen anderen Pflanzenviren vorrangig durch Pollen und Samen übertragen wird, was artspezifische Übertragungsbarrieren zur Folge hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen zum ersten Mal einen Hinweis für eine wirtsbasierende Selektion der Viruspopulation für ein pollenbürtiges Virus dar. Die entwickelten Verfahren haben eine Grundlage für zukünftige detaillierte Untersuchungen zur Evolution und Epidemiologie des CLRV geschaffen.