
Molekulare Phytomedizin / Virologie / Bakteriologie / Mykologie

114 - Gibson Assembly: Eine Methode zur Konstruktion infektiöser Volllängklone von Tombusviren

Gibson Assembly: A method for constructing infectious full-length clones of tombusviruses

Hanna Rose, Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung
Phytomedizin, rose@ipp.uni-hannover.de

Infektiöse Volllängklone von Pflanzenviren schaffen die Möglichkeit zur Erzeugung und Charakterisierung einer Population, die sich aus einer definierten Ausgangssequenz etabliert hat. Weiterhin können gezielte Veränderungen der Sequenz, wie beispielsweise Deletionen, Mutationen, oder Markierungen mit Genen für Reporterproteine zur Funktionsanalyse von Genomen eingesetzt werden. Das Ziel dieses Projektes war die Konstruktion von Volllängklonen des Carnation Italian ringspot virus (CIRV, DSMZ PV-0069) (Rubino et al., 1995), Tomato bushy stunt virus (TBSV, DSMZ PV-0268) (Hearne et al., 1990) und Pelargonium necrotic spot virus (PNSV, DSMZ PV-0371) (Heinze et al., 2004). Die Viren sind Mitglieder des Genus *Tombusvirus* in der Familie *Tombusviridae* und beinhalten ein einzelsträngiges (+) RNA-Genom mit einer Länge von etwa 4,7 kb. Es wird durch verschiedene Expressionsstrategien wie Überlesen von Stopcodons, Bildung subgenomischer RNAs sowie „Leaky Scanning“ in die verschiedenen Proteine übersetzt.

Mit Hilfe des Gibson Assembly (Gibson et al., 2009) erfolgte von allen Viren die Erstellung eines Volllängklons, wobei das PNSV vollständig in einem Fragment amplifiziert und ligiert werden konnte, die CIRV und TBSV Genome in zwei Abschnitten. Nach *Rhizobium radiobacter* Infiltration in *Nicotiana benthamiana* verursachten alle drei Volllängklone systemische Symptome in Form von starken Chlorosen und Nekrosen sowie apikalem Umknicken. Ein Nachweis mittels RT-PCR bestätigte die Infektiosität der Klone, deren Konstruktion vorgestellt wird.

Literatur

- GIBSON, D. G., L. YOUNG, R. -Y. CHUANG, J. C. VENTER, C. A. HUTCHISON III, H. O. SMITH, 2009: Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6** (5), 343-345.
- HEARNE, P. Q., D. A. KNORR, B. I. HILLMAN, T. J. MORRIS, 1990: The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology*. **177** (1), 141-151.
- HEINZE, C., V. WOBBE, D. -E. LESEMANN, D. Y. ZHANG, P. WILLINGMANN, G. ADAM, 2004: Pelargonium necrotic spot virus: a new member of the genus *Tombusvirus*. *Arch Virol*. **149** (8), 1527-1539.
- RUBINO, L., J. BURGYAN, M. RUSSO, 1995: Molecular cloning and complete nucleotide sequence of carnation Italian ringspot tombusvirus genomic and defective interfering RNAs. *Arch Virol*. **140** (11), 2027-2039.

116 - Entwicklung von virus-induziertem Gene-Silencing (VIGS) auf Basis des Beet necrotic yellow vein virus und des Beet soil-borne mosaic virus

Development of virus-induced gene silencing (VIGS) based on the Beet necrotic yellow vein virus and Beet soil-borne mosaic virus

Hamza Mohammad¹, Marlene Laufer², Edgar Maiss¹, Mark Varrelmann²

¹Institute of Horticultural Production Systems Dept. Phytomedicine, Plant Virology, Leibniz University, 30419 Hannover, Germany; ²Institute of Sugar Beet Research, Dept. of Phytopathology, 37079 Göttingen, Germany

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) and *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV) are members of the genus *Benyvirus*. They are transmitted by the soil-borne fungus *Polymyxa betae* and possess a similar genome organisation, host range and morphology. BNYVV is the causal agent for rhizomania disease in sugar beet (*Beta vulgaris*) (Koenig and Lesemann, 2005). BNYVV has been first reported in Italy and up to date in most regions of the world, while BSBMV distribution is limited to the USA. BNYVV has a multipartite RNA genome, which contains four or five plus-sense single stranded RNAs (Tamada, 1999). RNA₁ and RNA₂ encode housekeeping genes involved in viral RNA replication, assembly and cell-to-cell movement. Proteins from RNA₃ are involved in formation of local lesions and in symptom development.

Gibson Assembly was used as one step cloning method to construct cDNA full-length clones of BNYVV under control of the 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* (Maiss et al., unpublished) and of BSBMV (Laufer et al., unpublished) for Agrobacterium-mediated infection (Gibson et al., 2009). Labelling of the RNA₂ cDNA full-length clone was achieved by replacement of the read through open reading frame (ORF) by a fluorescent marker gene (mRFP, GFP), which led to systemic infection of the plants and strong fluorescence. This insertion point was assayed for its suitability to use both full-length clones as virus induced gene silencing (VIGS) vectors. For this purpose, fragments (549 bp) of the magnesium chelatase H Subunit (ChIH) gene derived from *Nicotiana benthamiana* were cloned as sense or antisense constructs into RNA₂ of BNYVV as well as into RNA₂ of BSBMV. Agroinfection of *N. benthamiana* resulted in systemic infection and development of a photobleaching phenotype, indicative for ChIH-VIGS. The results show that the BNYVV or BSBMV based VIGS systems offer the capability to silence genes of interest in *N. benthamiana* within 21 days.

References

- Gibson, D. G., L. Young, et al. (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." *Nature methods* 6(5): 343-345.
- Koenig, R., Lesemann, D.E., 2005. Genus *Benyvirus*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy*, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London.
- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T. & Saito, M. (1999). RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* 89, 1000–1006.

117 - Molekulare Charakterisierung eines neuartigen Mycovirus der Ordnung Tymovirales, isoliert aus *Rhizoctonia solani* (AG 2-2 IV)

Molecular characterisation of a novel mycovirus belonging to the order Tymovirales isolated from Rhizoctonia solani (AG-2-2 IV)

Anika Bartholomäus, Mark Varrelmann

Institute of Sugar Beet Research Dept. of Phytopathology, 37079 Göttingen, Germany,
bartholomaeus@ifz-goettingen.de

Rhizoctonia solani is an important plant pathogen and the host of many different mycovirus species, as indicated by the frequent detection of dsRNA elements in natural populations of *Rhizoctonia* (Zanzinger *et al.* 1984). To date, eight different mycoviruses have been characterized in *Rhizoctonia* and some of them are reported to modulate its virulence. Here, we report the complete nucleotide sequence of a novel mycovirus, derived from a deep sequencing analysis of the dsRNA extract of a hypovirulent isolate of *Rhizoctonia solani* (AG 2-2 IV). The mycovirus has a single-stranded RNA genome of 10 620 nucleotides and is polyadenylated. It carries a single open reading frame, which encodes a putative protein of 3477 amino acids. The protein contains conserved domains of a viral methyltransferase, a helicase and a RNA-depending RNA polymerase (RDRP), which showed similarities to different viruses of the *Tymovirales*. The genome organization resembles that of *Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus* and the helicase domain shows similarities to *Botrytis virus X*, both belonging to the *Alphaflexiviridae*, but representing different genera. In contrast, the methyltransferase and the RDRP domain show similarities to *Botrytis virus F*, which is a member of the *Gammaflexiviridae*. It was possible to identify eight conserved motifs of the RDRP and a phylogenetic analysis of this area placed the virus in a separate clade, indicating that it might be a novel member of a so far uncharacterized family within the order *Tymovirales*.

Literatur

ZANZINGER, D. H., B. P. BANDY, S. M. TAVANTZIS 1984: High frequency of finding double-stranded RNA in naturally occurring isolates of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Virol* 65(9), 1601-1605.

119 - Symptome von *Cucumber mosaic virus* Pseudorekombinanten auf *Nicotiana benthamiana*

Symptoms of Cucumber mosaic virus pseudorecombinants on Nicotiana benthamiana

Niklas Bald-Blume, Sarah Trebing, Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, bald@ipp.uni-hannover.de

Die Symptomatologie von *Cucumber mosaic virus* (CMV) ist abhängig von der Wirtspflanzenart und -sorte und vom Virusstamm bzw. -isolat. Bei einer Infektion können keine sichtbaren Symptome vorliegen oder es können Mosaikmusterung, Chlorosen, Nekrosen, Deformationen der Blätter und Stauchungen der gesamten Pflanze in unterschiedlicher Ausprägung auftreten (Palukaitis *et al.*, 1992). Bei verschiedenen vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogenen CMV-Isolaten wurden entsprechende Beobachtungen auf *Nicotiana benthamiana* gemacht. Das Isolat PV-0184 aus Untergruppe II von CMV verursachte keine Symptome, während die beiden Isolate aus Untergruppe IB PV-0474 Blattdeformationen und PV-0506 gestauchtes Wachstum auslösten und das Isolat PV-0036 aus Untergruppe IA starke Chlorosen hervorrief. Dies passt zur generellen Ansicht, dass CMV aus Untergruppe

II, im Gegensatz zu CMV aus Untergruppe I, meistens keine oder nur schwache Symptome erzeugt (Mochizuki and Ohki, 2012). Von allen vier Isolaten wurden die drei genomischen RNAs 1-3 kloniert und infektiöse Vollängklone erstellt. Diese generierten die gleichen bzw. keine Symptome wie die entsprechenden Ausgangsisolate. In der Natur kommen Reassortanten und Rekombinanten der RNAs von verschiedenen CMV-Isolaten aus unterschiedlichen Untergruppen vor, was zu veränderter Symptomausprägung führen kann (Chen et al., 2007; Bonnet et al., 2005). Um die Bedeutung der verschiedenen RNAs als Symptomedeterminanten zu untersuchen, wurden Pseudorekombinanten mit jeweils zwei RNAs des symptomlosen Isolats PV-0184 und je einer RNA von den drei anderen Isolaten in allen neun möglichen Kombinationen erstellt und über Agroinfiltration in *N. benthamiana* gebracht. Alle Pseudorekombinanten infizierten erfolgreich die inokulierten Pflanzen. Dies wurde mittels RNA-Extraktion und RT-PCR bestätigt, da einige Pseudorekombinanten keine Symptome verursachten, während andere schwere Symptome hervorriefen. Die Pseudorekombinante aus RNA 1 von PV-0474 und RNA 2 und 3 von PV-0184 löste die gleichen schweren Blattdeformationen aus wie das Originalisolat PV-0474 und sein Vollängklon, während die anderen beiden Kombinationen dieser Isolate keine oder nur leichte Symptome bewirkten. Die Determinante für die starken Symptome von PV-0474 auf *N. benthamiana* wird folglich auf RNA 1 vermutet. Die drei Pseudorekombinanten aus den Isolaten PV-0506 und PV-0184 verursachten keine oder nur leichte Symptome, während alle drei Pseudorekombinanten von PV-0036 und PV-0184 schwere Chlorosen auslösten. Für das Isolat PV-0036 sind alle drei RNAs Determinanten für die starken Symptome auf *N. benthamiana* und für PV-0506 ließ sich die Determinante bisher nicht näher eingrenzen.

Literatur

- BONNET, J., A. FRAILE, S. SACRISTÁN, J. M. MALPICA, F. GARCÍA-ARENAL, 2005: Role of recombination in the evolution of natural populations of *Cucumber mosaic virus*, a tripartite RNA plant virus. *Virology* **332** (1), 359–368.
- CHEN, Y., J. CHEN, H. ZHANG, X. TANG, Z. DU, 2007: Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between *Cucumber mosaic virus* subgroup IA and II strains. *Virus genes* **35** (2), 405–413.
- MOCHIZUKI, T., S. T. OHKI, 2012: *Cucumber mosaic virus*: viral genes as virulence determinants. *Mol. Plant Path.* **13** (3), 217–225.
- PALUKAITIS, P., M. J. ROOSSINCK, R. G. DIETZGEN, R. I. B. FRANCKI, 1992: *Cucumber mosaic virus*. In: *Advances in Virus Research*. MARAMOROSCH, K., F. A. MURPHY UND A. J. SHATKIN, San Diego, Academic Press, 281–348 S.

120 - Molecular analyses of *Tobacco rattle virus* field strains isolated from potatoes in various parts of Germany

Molekulare Analyse von Tabak-Rattle-Virus – Isolaten aus Kartoffeln verschiedener Regionen Deutschlands

Kerstin Lindner¹, Inga Hilbrich¹, Renate Koenig²

¹Julius Kühn Institute, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Field Crops and Grassland, kerstin.lindner@julius-kuehn.de

²Julius Kühn Institute, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostic,

Tobacco rattle virus (TRV) is the causal agent of the corky ringspot disease ('Eisenfleckigkeit') of potatoes which is widespread in Germany and other European and also North American countries. Its genome consists of two RNA species. RNA₁ carries the genetic information for the replication of the virus, for its movement in infected plants and for a silencing suppressor protein. RNA₂ contains the viral coat protein and one or several genes necessary for the transmission of the virus by its nematode vector and possibly for additional functions. Epidemiological and molecular studies have now revealed that considerable differences may exist not only between different TRV RNA₂s, but also - to a

somewhat lesser extent, though - between different TRV RNA₁s. At least three major groups are recognized for TRV RNA₂s and also for TRV RNA₁s. In different parts of Germany we find different RNA₁/RNA₂ pairings. These different RNA₁/RNA₂ pairings might be the reason for the differences in the resistance behavior of various potato varieties in different parts of the country.

122 - Nachweis von *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) und Potyviren in Edelrosen (*Rosa hybrida* L.)

Detection of Raspberry ringspot virus (RpRSV) and potyviruses in hybrid roses (Rosa hybrida L.)

Rana Demiral, Susanne von Barga, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin

Aufgrund des Auftretens von virusverdächtigen Symptomen an Edelrosen (*Rosa hybrida* L., Standort: Insel Mainau), wurden im November 2014 unterschiedliche Rosensorten beprobt, die während der Vegetationsperiode Mosaik und chlorotische Adernbänderungen an Blättern sowie teilweise Wuchsdepressionen aufwiesen. Die Proben wurden sowohl mittels Transelektronenmikroskopie (TEM), Biotest als auch serologischer und molekularer Methoden auf virale Krankheitserreger untersucht. Eine Infektion mit Viren, die üblicherweise mit der „Rose mosaic disease“ (RMD) assoziiert werden, darunter *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV, Gattung *Nepovirus*), *Apple mosaic virus* (ApMV, *Ilarvirus*) sowie *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV, *Ilarvirus*) wurde mittels DAS-ELISA ausgeschlossen. Nach mechanischer Inokulation der Rosenhomogenate auf *Chenopodium quinoa* und *Nicotiana benthamiana* entwickelten diese nach wenigen Tagen Ringflecken, Chlorosen, Blattdeformationen und Degenerationserscheinungen. In dem aus symptomatischen Testpflanzen isoliertem Material konnten mittels TEM isometrische Partikel mit einem Durchmesser von 28 nm festgestellt werden. Aufgrund der an den Testpflanzen auftretenden Symptome und der unter dem TEM beobachteten isometrischen Form und Größe der Partikel, wurde eine Infektion der Rosen mit einem *Nepovirus* vermutet. Daraufhin wurden RT-PCRs zum Nachweis von *Nepoviren* der Subgruppen A und B durchgeführt. Die Sequenzen von spezifischen PCR-Produkten aus erkrankten Rosen und infizierten Biotestpflanzen ergab erstmalig eine Infektion mit dem *Raspberry ringspot virus* (RpRSV, *Nepovirus*). Der Nachweis konnte in Rosen der Sorten Escimo, Trier 2000, Alea, Kurfürstin Sophie und Leonardo da Vinci, als auch in Biotestpflanzen durch eine Spezies spezifische RT-PCR durch Amplifikation eines Fragments der viralen RNA₂ des RpRSV bestätigt werden (von Barga *et al.*, 2015). Zudem ergaben sich Hinweise auf eine (Misch-)Infektion einzelner Rosen mit Potyviren durch einen gattungsspezifischen ACP-ELISA (DSMZ RT-0-0573/1). Die Infektion der Rosen mit einem Potyvirus sowie die Identifikation des Erregers muss durch PCR und anschließende Sequenzierung validiert werden, da im TEM keine flexiblen Partikel darstellbar waren.

Literatur

VON BARGA S, DEMIRAL R, BÜTTNER C, 2015: First detection of *Raspberry ringspot virus* in mosaic diseased hybrid roses in Germany. *New Disease Reports* (2015) 32, 18. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.018>

122a - Infektion von Rosen mit Viren unter besonderer Berücksichtigung des *Rose rosette virus* und von Ilarviren

Infection of roses with plant viruses with special regard to Rose rosette virus and ilarviruses

Janine Stummer, Susanne von Barga, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin, phytomedizin@agr.ar.hu-berlin.de

Virus-verdächtige Symptome wie Scheckungen, chlorotische Ringflecken und Linienmuster, teilweise in Verbindung mit Wuchsstauchungen und Absterbeerscheinungen werden seit einigen Jahren in den Rosenbeständen einer Sorten-Sammlung beobachtet. Als Verursacher kommt eine Vielzahl an Pflanzenviren in Betracht, die Rosen infizieren können. Verschiedene Ilarviren (*Apple mosaic virus*, *Blackberry chlorotic ringspot virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Tobacco streak virus*) sowie Nepoviren (*Arabidopsis mosaic virus*, *Strawberry latent ringspot virus*, *Tobacco ringspot virus*, *Tomato ringspot virus*) sind in der Regel als Viruskomplex in unterschiedlichen Kombinationen in Rosen am weitesten verbreitet (Milleza et al. 2013). In Deutschland wurde zudem kürzlich das Raspberry ringspot nepovirus (RpRSV) in Rosen der Insel Mainau nachgewiesen (von Barga et al. 2015). Darüber hinaus wurden weitere Viren in Rosen beschrieben, darunter das in den Vereinigten Staaten weit verbreitete *Rose rosette virus* (RRV, Gattung *Emaravirus*), welches dort beträchtliche Ertragsverluste in allen Bereichen der Rosenkultivierung verursacht (Babu et al. 2016).

Blattproben von verschiedenen Sorten, darunter Teehybriden, Kletterrosen, Foribunda bzw. Polyanthrosen mit genannten Symptomen wurden auf eine Virus-Infektion mittels DAS-ELISA bzw. RT-PCR-Verfahren unter Verwendung gattungsspezifischer Oligonukleotide in Verbindung mit Sequenzierung der PCR-Produkte untersucht. Bei der Untersuchung von 8 Rosenproben verschiedener Sorten mit Virus-verdächtigen Blattsymptomen konnte eine Infektion mit RRV sowohl durch den Einsatz gattungsspezifischer (Elbeaino et al. 2013) als auch durch RRV-spezifische Oligonukleotide (Laney et al. 2011) zum Nachweis der viralen RNA₁ mittels RT-PCR ausgeschlossen werden. Weitere Ergebnisse dieser Studie zur Detektion von Ilarviren werden vorgestellt und diskutiert.

Literatur

- Babu, B., A. Jeyaprakash, D. Jones, T. S. Schubert, C. Baker, B. K. Washburn, S. H. Miller, K. Poduch, G. W. Knox, F. M. Ochoa-Corona, M. L. Paret, 2016: Development of a rapid, sensitive TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of Rose rosette virus using multiple gene targets. *J. Virol. Meth.* 235, 41-50.
- von Barga S., R. Demiral, C. Büttner, 2015: First detection of Raspberry ringspot virus in mosaic diseased hybrid roses in Germany. *New Disease Reports* 32, 18.
- Elbeaino, T., A. Whitfield, M. Sharma, M. Digiario, 2013: Emaravirus-specific degenerate PCR primers allowed the identification of partial RNA-dependent RNA polymerase sequences of Maize red stripe virus and Pigeonpea sterility mosaic virus. *J. Virol. Meth.* 188, 37-40.
- Laney, A. G., K. E. Keller, R. R. Martin, I. E. Tzanetakis, 2011: A discovery 70 years in the making: characterization of the Rose rosette virus. *J. Gen. Virol.* 92, 1727-1732.

122b - Viruserkrankungen an Birken im urbanen Bereich - eine Studie im Berliner Bezirk Steglitz-Zehlendorf

Viral diseases in birch in urban areas – a study in Berlin Steglitz-Zehlendorf

Janna Gröhner¹, Andrea Martinez-Oliver¹, Maria Landgraf¹, Juliane Langer¹, Martina Bandte¹, Susanne von Bargaen¹, Martin Schreiner², Barbara Jäckel², Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin

²Pflanzenschutzamt Berlin, Mohriner Allee 137, 12347 Berlin, phytomedizin@agr.ar.hu-berlin.de

In 2016 wurden an erkrankten Straßenbäumen der Gattung *Betula* im Berliner Bezirk Steglitz-Zehlendorf Untersuchungen zu Viruserkrankungen an ausgewählten Einzelbäumen durchgeführt – in Ergänzung an die Studie von 2015 -. Die Auswahl der Bäume und die entsprechende Probennahme erfolgten anhand virusverdächtiger Symptome auf Blättern und nach Bonitur des Gesamthabitus des Baumes, wie sie für Viruserkrankungen an Laubgehölzen bekannt sind. *Cherry leaf roll virus* (CLRV) und *Apple mosaic virus* (ApMV) sind die bisher bekanntesten Viren in *Betula*. Im Rahmen dieser Studie sollte aufgeklärt werden, ob bisher bekannte Viren in den erkrankten und absterbenden Bäumen nachzuweisen sind oder ob Infektionen mit neuen, bisher nicht beschriebenen Viren vorliegen könnten. Straßenbäume sind je nach Standort einem extremen abiotischen Stress durch beispielsweise Wasser- und/oder Nährstoffmangel bzw. Emissionen ausgesetzt sowie interagierenden biotischen Stressfaktoren wie Pilzen, Bakterien, Insekten, Milben und Nematoden. Es wurden Birken verschiedener Altersstufen und Herkunft anhand der Daten im Baumkataster (gemäß § 2 Abs. 2 Nr. 3 Berliner Straßengesetz (BerlStrG)) in die Untersuchung einbezogen. Die Ergebnisse aus den Laboruntersuchungen mittels molekularbiologischer Methoden (RNA Extraktion, RT-PCR) werden vorgestellt und Konzepte für ein Managementprogramm wie mit infizierten Bäumen umzugehen ist, diskutiert.

Literatur

- Bandte M., A.K. Schuster, S. von Bargaen, C. Büttner, 2011: Viren an *Betula pendula* (Roth.) Analyse des Artenspektrums der Ordnung Hemiptera und Nachweis von *Cherry leaf roll virus* (CLRV) in potentiellen Vektoren. In: Dujesiefken, D. (Ed.), Jahrbuch der Baumpflege, Haymarket Media, Braunschweig.
- von Bargaen S., J. Langer, J. Robel, A. Rumbou, C. Büttner 2012: Complete nucleotide sequence of *Cherry leaf roll virus* (CLRV), a subgroup C nepovirus. *Virus Research* 163, 678-683.
- Büttner C., S. von Bargaen, M. Bandte, H.-P. Mühlbach, 2013: Forest diseases caused by viruses. Chap. 3 In: *Infectious forest diseases*. Gonthier P., Nicolotti G. (eds), CABI, pp. 50-75.
- Büttner C., S. von Bargaen, M. Bandte, A. Myrta, 2011: *Cherry leaf roll virus*. In: *Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits*. (Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W.) APS PRESS, St. Paul, USA.
- Eisold A-M., M. Bandte, J. Langer, M. Rott, C. Büttner, 2014: Phytopathogene Viren im Urbanen Grün. In: Dujesiefken, D. (Ed.), Jahrbuch der Baumpflege, Haymarket Media, Braunschweig, 217-227.

123 - Auftreten des *Elm mottle virus* (EMoV) und eines putativen Carlavirus in der Gattung *Ulmus* Norddeutscher Standorte

Occurrence of Elm mottle virus (EMoV) and a putative Carlavirus in the genus Ulmus in northern Germany

Isabelle Jurke, Susanne von Bargaen, Anne-Mareen Eisold, Artemis Rumbou, Markus Rott, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Im norddeutschen Raum wurden Ulmen mit virusverdächtigen Symptomen, wie Scheckungen, chlorotischen Ringflecken, Linienmustern, Nekrosen und Mosaik bonitiert und symptomtragendes Blattmaterial molekularbiologisch analysiert. Einige dieser Ulmen wiesen eine Infektion mit dem *Elm mottle virus* (EMoV) auf. Es handelt sich hierbei um ein ssRNA(+) Virus mit isometrischer Partikelmorphologie aus der Gattung *Illavirus* (BUJARSKI *et al.* 2012) und konnte bereits in unterschiedlichen Ulmenarten nachgewiesen werden (BÜTTNER *et al.* 2013). Zum Nachweis des EMoV wurden sowohl RNA₁- bzw. RNA₂-basierte Primerpaare eingesetzt als auch spezifische Primer für die RNA₃ synthetisiert, welche das Transportprotein und das virale Hüllprotein kodiert. Des Weiteren wurden die 3'-terminalen Bereiche des tripartiten EMoV-Genoms vervollständigt. In symptomtragenden Ulmen wurden zudem experimentell filamentöse Viruspartikel nachgewiesen, was auf eine Infektion mit einem weiteren Virus hinweist (EISOLD *et al.* 2014). Erste Daten aus einer Hochdurchsatzsequenzierung von Gesamt-RNA Präparationen lassen vermuten, dass es sich um ein putatives Carlavirus handelt (RUMBOU *et al.* 2015). Zur Detektion dieses neuartigen Virus' wurden ebenfalls Primer entwickelt. Alle Proben wurden mit Hilfe einer internen RT-PCR Kontrolle zum Nachweis des konstitutiv exprimierten Transkripts des pflanzlichen nad5-Gens (MENZEL *et al.* 2002) überprüft, um falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Um erste Hinweise auf Vorkommen und Verbreitung der viralen Erreger in Ulmen zu erhalten und Korrelationen mit dem Auftreten der Symptome herzustellen, wurden neben Ulmen mit den oben genannten virusverdächtigen Symptomen auch solche ohne sichtbare Merkmale untersucht. Ergebnisse zum Auftreten, der Verbreitung der Erreger und Assoziation des EMoV bzw. des neuartigen Carlavirus mit den bonitierten virusverdächtigen Symptomen an den Ulmen werden präsentiert und bewertet.

Literatur

- BUJARSKI, J., FIGLEROWICZ, M., GALLITELLI, D., ROOSSINCK, M.J. AND SCOTT, S.W. 2012: Family Bromoviridae. In: Virus Taxonomy:
Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens E.B., Lefkowitz, E.J., eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam, 965-976.
- BÜTTNER, C., VON BARGEN S., BANDTE, M., MÜHLBACH, H-P. 2013: Forest diseases caused by viruses. In: Infectious forest diseases.
Gonthier P., Nicolotti G. (eds), CABi, 50-75.
- EISOLD, A.-M., ROTT, M., VON BARGEN, S., BANDTE, M., BÜTTNER, C., 2014: Ringfleckigkeit an Flatterulme - Untersuchung assoziierter Pathogene. Julius-Kühn-Archiv 447, 167.
- MENZEL W, JELKMANN W, MAISS E, 2002: Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99, 81-92.
- RUMBOU A, VON BARGEN S, BÜTTNER C 2015: Virus discovery using NGS in trees from urban/forest ecosystems. 1st conference of the COST action FA1407 DIVAS, 16-18.11.in Ljubljana, Slowenien.

125 - Studien zur Interaktion des p₃ und p₄ Proteins des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV)

Interaction study of the p₃ and p₄ proteins of the European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV)

Thomas Gaskin¹, Jenny Roßbach¹, Susanne von Bargaen¹, Hans-Peter Mühlbach², Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin. phytomedizin@agrار.hu-berlin.de

²Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek; Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg

Das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) gehört zur Gattung *Emaravirus* und besitzt 4 Negativ-orientierte, einzelsträngige RNA-Genomsegmente, die für jeweils 1 Protein (p₁ – p₄) kodieren (Mielke und Mühlbach 2007). EMARaV ist in Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) Nord- und Mitteleuropas weitverbreitet (Büttner et al., 2013, Roßbach et al., 2015).

Die Funktion der RNA₁-, RNA₂- und RNA₃-kodierten Proteine (p₁ – p₃) konnte mit Hilfe von Sequenzabgleichen zugeordnet werden. Das RNA₄-kodierte p₄-Protein zeigt keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen (Mielke und Mühlbach 2007). Es wird vermutet, dass es sich bei diesem Protein um ein Transportprotein handelt. Transportproteine ermöglichen eine systematische Ausbreitung des Virus in der Wirtspflanze und sind für eine erfolgreiche Infektion essentiell (Seron und Haenni, 1996). Für Transportproteine verschiedener Tospoviren wurden Protein-Protein-Interaktionen mit sich selbst sowie mit dem Nucleocapsidprotein gezeigt (Leastro et al., 2015). Auch für EMARaV wird die Ausbildung von tubulären Strukturen vermutet. Die damit einhergehende Multimerisierung des p₄-Proteins sowie die Interaktion mit dem Nucleocapsidprotein (p₃) von EMARaV soll mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems untersucht werden. Dazu wurden die EMARaV-Proteine p₃ und p₄ in die Hefe-Vektoren pAS2 und pACT2 kloniert, *Saccharomyces cerevisiae* mit den Konstrukten transformiert und bezüglich einer Protein-Protein-Interaktion analysiert. Erste Ergebnisse werden vorgestellt und diskutiert.

Literatur

- Büttner, C., V B, S., Bandte, M., Mühlbach, H-P.: Forest diseases caused by viruses. In: Infectious forest diseases. Gonthier, P. und G. Nicolotti, Oxfordshire, CABI, 50-75 S.
- Leastro, M. O., V. Pallás, R. O. Resende, J. A. Sánchez-Navarro, 2015: The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associated with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins. *Virology* 478, 39-49.
- Mielke, N., H-P. Mühlbach, 2007: A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *J. Gen. Virol.* 88, 1337-1346.
- Seron K., A. L. Haenni, 1996: Vascular movement of plant viruses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 9, 435-442.
- Roßbach J., H-L. Dieckmann, T. Büttner, H-P. Mühlbach, S. von Bargaen, C. Büttner, 2015: Genetic variability and phylogeny of European mountain ash ringspot-associated virus RNA₃ and RNA₄. *Forests*, 6, 4072-4087.

125a - Eine erste Studie zum Einsatz einer elektrolytischen Wasserdesinfektion zur Behandlung von Nährlösung in einem Gewächshausbetrieb

A first study on the application of an electrolytic water disinfection of nutrient solution in a greenhouse production site

Stellan Zytur¹, Martina Bandte¹, Hans-Marlon Rodriguez^{1, 2}, Yuan Gao³, Susanne von Barga¹, Uwe Schmidt⁴, Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

²Francisco de Paula Santander University, Agricultural Sciences Faculty, San José de Cúcuta, Kolumbien

³newtec Umwelttechnik GmbH; Am Borsigturm 62, 13507 Berlin

⁴Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Biosystemtechnik; Albrecht-Thaer-Weg 3, 14195 Berlin

Die Wiederverwendung von Wasser und Nährlösung hat einen hohen ökologischen und ökonomischen Stellenwert im Gartenbau. Begrenzt wird diese Wiederverwendung durch die potentielle Übertragung und Verbreitung von Pflanzenkrankheitserregern. So steigt das Risiko einer Infektion mit bodenbürtigen bzw. die Wurzel infizierenden Erregern bei der Rückführung von Beregnungswasser und Nährlösung (Moorman et al., 2014). Zur Desinfektion dieses Wassers stehen verschiedene physikalische und chemische Verfahren zur Verfügung. Mit Ausnahme einer sehr energieaufwändigen thermischen Behandlung vermag keines der Verfahren, die verschiedenen Erregergruppen - Pilze, Bakterien und Viren - zu inaktivieren.

Wir haben ein neues sensorgestütztes Desinfektionssystem auf seine Eignung zur Inaktivierung pflanzenpathogener Viren (Bandte et al., 2016) und Pilze in rezirkulierender Nährlösung im Gewächshausanbau von Tomaten und Zierpflanzen geprüft. Das Verfahren basiert auf einer kompakten Anlage zur elektrolytischen Vor-Ort-Produktion eines chlorhaltigen Desinfektionsmittels, welches aus Kaliumchlorid (KCl) und Wasser generiert wird. Die produzierte Desinfektionslösung enthält dabei maximal 0,8 % Kaliumhypochlorit (KClO) bzw. freies Chlor in einer Konzentration bis 8000 mg/l. KClO liegt in wässriger Lösung bei pH Werten unter 7 als hypochlorige Säure (HClO) mit hoher Desinfektionsleistung; das bei höherem pH-Wert vorliegende Hypochlorit (ClO⁻) hat eine geringere Desinfektionsleistung. In dem üblicherweise schwach-sauren Gießwasser ist daher eine Desinfektionsleistung von etwa 80-100% zu erwarten. Die Behandlung der Nährlösung bzw. des Gießwassers erfolgt durch eine sensorgesteuerte, stoßweise Dosierung des elektrolytisch erzeugten Desinfektionsmittels. Die dabei eingesetzte Goldringelektrode mit potentiostatischer Zweistabmesskette zur Messung des freien Chlors gewährleistet eine sehr hohe Dosiersicherheit.

Erste Erfahrungen mit dem Desinfektionssystem werden vorgestellt. Dabei kommt der Handhabbarkeit des Verfahrens im Praxisbetrieb sowie dem Auftreten von Pflanzenkrankheiten und ggf. verfahrensbedingten Pflanzenschäden eine besondere Bedeutung zu.

Literatur

Bandte M, Rodriguez MH, Schuch I, Schmidt U, Büttner C, 2016: Plant viruses in irrigation water: reduced dispersal of viruses using sensor-based disinfection. *Irrig Sci* 34(3), 221-229.

Moorman GW, Gevens AJ, Granke LL, Hausbeck MK, Hendricks K, Roberts PD, Pettitt TR, 2014: Sources and distribution systems of irrigation water and their potential risks for crop health. In: *Biology, detection and management of plant pathogens in irrigation water* (eds. Hong C, Moorman GW, Wohanka W, Büttner C), APS Press, Minnesota, USA, 3-12.

125b - Colonization of crop plants by *Salmonella enterica* – the goals of the *plantinfect* consortium.

Schierstaedt, J.¹, Fornefeld, E.², Ott, E.², Jechalke, S.³, Grosch, R.¹, Smalla, K.², Schikora, A.²

¹IGZ, 14979 Grossbeeren, Germany

²JKI, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, 38104 Braunschweig, Germany, adam.schikora@julius-kuehn.de

³JLU, Institute for Phytopathology, 35392 Giessen, Germany

In the last years, salmonellosis outbreaks were increasingly associated with contaminated fruits and vegetables. This indicates that plants could be suitable vectors for this bacterium. Contamination of produce can occur along the whole production chain also, for instance, during plant growth. The survival of *Salmonella* in soil is an essential precondition for the colonisation of plants, an avoidance or suppression of the host immune system another. However, so far the knowledge about factors influencing its persistence in the plant environment is scarce, and the question whether *Salmonella* use plants as opportunistic bacterium or if it behaves as a plant pathogens is still controversially discussed. We analysed, the influence of preadaptation, soil fertilization and soil sterilisation on the survival of *Salmonella* in soil. At the same time, we analysed the immune response of relevant crop plants, such as tomato and lettuce, to a colonisation with those bacteria. Preadaptation of *Salmonella* was simulated by cultivation in a new-developed lettuce medium. In summary, despite an initial decline, our data indicated a long-term survival of *Salmonella* in agricultural soil. Preadaptation promoted the survival of *Salmonella*, while competition by the indigenous soil microbial community reduced its survival. On the other hand, both crop plants reacted to colonisation with an induction of the immune system, reflected by higher expression of *PR*-genes. Particularly interesting was the fact that the response was dependent on the plant species and also on the bacterial serovar. Together, our results indicate that soil is a reservoir for *Salmonella* posing a risk of contamination of produce in the agricultural environment. The fact that *Salmonella* use plants as alternative hosts strongly suggests that plants represent a much larger reservoir for animal pathogens than so far estimated.