
Molekulare Phytomedizin / Virologie / Bakteriologie / Mykologie

130 - Organisation von Laborvergleichsuntersuchungen für Pflanzenviren

Organization of proficiency tests for plant viruses

Wulf Menzel, Stephan Winter

Leibniz Institut DSMZ, Abteilung Pflanzenviren

Die regelmäßige Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) ist für Labore, die nach ISO 17025 akkreditiert sind, verpflichtend, um ihre Kompetenz zum Nachweis bestimmter Erreger unter Anwendung der jeweils in ihren Laboren etablierten Nachweisverfahren unter Beweis zu stellen. In den letzten Jahren ist die Anzahl der akkreditierten Labore in Deutschland und auch weltweit stark angestiegen. Dies hat zur Folge, dass der Bedarf an entsprechenden LVUs somit auch gleichermaßen gestiegen ist.

Die Abteilung Pflanzenviren des Leibniz Institut DSMZ ist seit Jahren erfolgreich in die Organisation von LVUs mit überwiegend europäischen Teilnehmern eingebunden. Diese umfassen Proben für serologische und molekulare Tests mit den Schwerpunkten Kartoffelviren, Viroide, sowie verschiedene Obst- und Gemüseviren. Aufgrund zunehmender Anfragen aus dem In- und Ausland und der verzeichneten großen Diversität der benötigten Materialien für teilweise nur wenige Labore z. B. innerhalb der EU ist für eine sachgerechte Abdeckung des Bedarfs eine bisher fehlende umfassende Bedarfsermittlung und Koordinierung, idealerweise weltweit, wünschenswert. Dies würde es ermöglichen, die vorhandenen Kapazitäten durch geeignete Kooperationen effizient zu nutzen und durch größere Teilnehmerzahlen entsprechend niedrigere Kosten bei der Organisation erreichen zu können und unnötige Redundanzen zu vermeiden.

131 - Einsatz eines reversen genetischen Systems bei Rizomania zum besseren Verständnis der Rz1 Resistenzüberwindung

Application of a reverse genetic system to understand Rz1 resistance breaking in the rizomania disease complex

Sebastian Liebe¹, Edgar Maiss², Mark Varrelmann¹

¹Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin

²Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin

Das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) ist der Verursacher der Rizomania-Krankheit an Zuckerrübe. Infizierte Pflanzen zeigen eine vermehrte Seitenwurzelbildung, einen verkleinerten Rübenkörper sowie Vergilbungen am Blattapparat. Die Virusübertragung erfolgt durch den bodenbürtigen Protisten *Polymyxa betae*. BNYVV besitzt eine hohe wirtschaftliche Bedeutung und wird im Anbau hauptsächlich durch ein dominantes Resistenzgen (*Rz1*) kontrolliert. Die langjährige Nutzung von *Rz1* führte zu einem hohen Selektionsdruck, infolge dessen sich BNYVV Populationen mit Resistenz überwindenden Eigenschaften entwickelt haben. Diese Populationen weisen eine Mutation im RNA3 kodierten Pathogenitätsfaktor P25 (Aminosäureposition 67-70) auf. Ebenso konnte man eine zusätzliche RNA-Komponente (RNA5) identifizieren, die unabhängig von der Mutation im P25, eine Resistenzüberwindung vermitteln soll. Für den tatsächlichen Nachweis einer

resistenzüberwindenden Mutation/RNA-Komponente müssen diese jedoch unabhängig vom Vektor und der Viruspopulation geprüft werden. Dies ist nur mit reversen genetischen Systemen, sogenannten infektiösen cDNA Klonen, möglich. Für das BNYVV wurde ein solches System zur Resistenztestung etabliert. Zunächst wurde bestätigt, dass der infektiöse cDNA Klon des BNYVV das *Rz1* Resistenzgen nicht überwinden kann. Anschließend wurden verschiedene Mutationen im P25, die mit einer Resistenzüberwindung assoziiert sind, in den Klon eingebaut. Mit Hilfe des Testsystems konnten die resistenzüberwindenden Eigenschaften der Mutationen bestätigt werden. Darüberhinaus wurde eine Resistenzüberwindung durch das Vorhandensein der RNA5 des BNYVV nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass das System dazu geeignet ist Mutationen, die eine Resistenzüberwindung vermitteln, bereits frühzeitig in der Viruspopulation zu identifizieren.

132 - Molekulare Charakterisierung unterschiedlicher TRV-Herkünfte und Analyse der Wechselwirkungen von Virus, Nematode und Kartoffelsorte als Basis für die Resistenzzüchtung

Molecular characterization of different Tobacco rattle virus (TRV) field strain isolates and analyses of interactions between virus, nematode and potato cultivar to establish the basis for TRV resistance research

Kerstin Lindner¹, Johannes Hallmann², Christina Hieronymus², Hans-Reinhard Hofferbert³, Bernd Truberg⁴, Silke Wagener⁵, Stefan Lütke Entrup⁶

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland

²Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

³Böhm-Nordkartoffel-Agrarproduktion GmbH & Co. OHG

⁴Norika Nordring-Kartoffelzucht- und Vermehrungs-GmbH

⁵SaKa Pflanzenzucht GmbH & Co. KG

⁶Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovationen e.V.

Mit dem Ziel, das zunehmende Auftreten der stark qualitätsmindernden virösen Eisenfleckigkeit bei Speisekartoffeln einzudämmen, haben sich Vertreter von Ressortforschung und Züchtung zusammengetan, um in einem von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung geförderten Forschungsprojekt die Grundlagen hierfür zu erarbeiten.

Ursache der Eisenfleckigkeit sind verschiedene Stämme des *Tobacco rattle virus* (TRV), die durch unterschiedliche Nematoden-Arten aus den Gattungen *Trichodorus* und *Paratrichodorus* übertragen werden. Die derzeit einzige mögliche Maßnahme zur Eindämmung dieser Krankheit ist der Anbau von virus-resistenten Sorten. Die Entwicklung solcher Sorten erfordert eine genaue Kenntnis der in unterschiedlichen Regionen auftretenden TRV-Stämme sowie ihrer übertragenden Nematodenarten. Dazu sind zunächst umfassende Untersuchungen auf molekularer Ebene sowohl für die verschiedenen Virusstämme als auch für die übertragenden Nematodenarten notwendig. Auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse soll der Einfluss unterschiedlicher TRV-Stämme und Nematoden-Arten auf die Widerstandsfähigkeit von Kartoffel-Genotypen untersucht werden und damit eine Grundlage für eine Resistenzzüchtung mittels einer Marker-gestützten Selektion geschaffen werden.

Die Arbeiten dazu erfolgen sowohl als molekulargenetische Untersuchungen im PCR-Labor als auch in Form von Freiland- und Gewächshausversuchen.

In den von den Kartoffelzüchtern durchgeführten Freilandversuchen in 2017 (6 Versuche × 15 Kartoffelgenotypen × 4 Wiederholungen) entsprach die festgestellte TRV-Resistenz der

geprüften Sorten der von den Züchtern erwarteten Einstufung. Lediglich in einem Fall wich die Sortenresistenz einer Sorte nachhaltig von der Einschätzung der Züchter ab. In den Freilandversuchen wurden zudem die Besatzdichten der Trichodoriden ermittelt. Sie schwankten zwischen 0 und 63 Tieren/100 ml Boden. Die mittlere Besatzdichte betrug 7 Tiere/100 ml Boden. Anhand adulter Tiere wurde eine Artbestimmung anhand morphologischer Merkmale vorgenommen. Die vorherrschende Art war *Trichodorus primitivus* gefolgt von *Paratrichodorus pachydermus*, *T. viruliferus* und *T. cylindricus*. Mit Ausnahme eines Standortes kamen zwischen zwei und drei Arten gleichzeitig vor. Ein Standort wies mit sechs nebeneinander vorkommenden Arten die höchste Diversität auf.

Auf der Basis einer optimierten TRV Nachweismethode und einer weiterentwickelten Analytik konnten für jeden Versuchsstandort die vorherrschenden Virusisolate charakterisiert werden. Zudem liegen erste Ergebnisse für eine Virusisolate-Gruppenbildung vor. In den Freiland- und Gewächshausuntersuchungen zum Einfluss von Kartoffelsorte und Standort auf die Genomvariabilität konnte festgestellt werden, dass TRV Isolate die von Kartoffeln der zu untersuchenden Sorten an einem Standort isoliert wurden, einem Genommuster zuzuordnen waren. TRV Isolate von unterschiedlichen Standorten hingegen wiesen zum Teil voneinander unterschiedliche Genommuster auf.

133 - Herstellung von infektiösen cDNA Vollängenklonen des Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) und Übertragungsversuche mit der Erdbeerhaarknotenlaus (*Chaetosiphon fragaefolii*)

Production of full length infectious cDNA clones of Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) and transmission trials with the strawberry aphid (Chaetosiphon fragaefolii)

Wilhelm Jelkmann, Constanze Berwarth

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau

Von drei Gewächshaus- und vier Freilandisolaten des Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) wurden insgesamt 41 infektiöse cDNA Klone hergestellt. Nach Infektion verschiedener Erdbeerindikatorpflanzen mittels Agrobakterium konnten typische Symptome der Blattrandvergilbung der Erdbeere beobachtet werden. Ziel der Arbeiten ist die Aufklärung der für ein Potexvirus ungewöhnlichen Übertragung durch die Erdbeerhaarknotenlaus (*Chaetosiphon fragaefolii*). Hierzu wurden Übertragungsversuche von Pflanzen der drei Gewächshaus- und von einem Freilandisolat durchgeführt. Von allen Isolaten wurden Übertragungsversuche nach Agroinfektion eingeleitet. Da für die Läuseübertragung des SMYEV unter Feldbedingungen eine Interaktion mit dem Strawberry Polerovirus 1 möglich erscheint, wurden ebenso mit zwei vorliegenden Herkünften dieses Virus Übertragungsversuche mit *Chaetosiphon fragaefolii* durchgeführt. Über die Ergebnisse wird berichtet.

134 - Ausbreitung von rekombinanten Plum Pox Potyvirus (PPV-Rec)-Stämmen in Südwestdeutschland

Spread of recombinant Plum Pox Potyvirus (PPV-Rec)-strains in Southwest Germany

Wolfgang Jarausch, Miriam Runne, Alexandra Baßler, Nannu Molla

RLP AgroScience

Im Jahre 2000 wurden zum ersten Mal PPV M-Stämme in Pflaume in Westdeutschland nachgewiesen (Jarausch et al., 2002). Die Mehrzahl dieser Isolate wurde jetzt molekular mit Hilfe spezifischer Primer nach der Methode von Šubr et al. (2004) als PPV-Rec identifiziert.

PPV-Rec Stämme sind durch eine Rekombination von PPV-D und PPV-M entstanden und breiten sich von Osteuropa immer weiter nach Westen aus. PPV-Rec wird vor allem auf Pflaume gefunden, wo dieser Stamm stärkere Blatt- und Fruchtsymptome hervorruft als der am weitesten verbreitete Stamm PPV-D. PPV-Rec kann auch in fruchttoleranten Pflaumen-Sorten zu Ertrags- und Qualitätseinbußen führen (Jarusch et al., 2004b). In Deutschland wurde dieser Stamm in weiteren Untersuchungen bis 2004 nur lokal in der Ortenau gefunden (Jarusch et al., 2004a). Im Rahmen eines vom Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) im Programm INTERREG V geförderten Projekts (InvaProtect) wurde nun die aktuelle Ausbreitung dieses invasiven PPV Stammes in Südwestdeutschland neu untersucht. Der Nachweis von PPV und die Stammtypisierung erfolgten mit universellen und spezifischen Primern für PPV-D, PPV-M und PPV-Rec (Wetzel et al., 1991; Candresse et al., 1998; Šubr et al., 2004). Die aktuellen Untersuchungen zeigten eine starke Ausbreitung von PPV-Rec in der südlichen Ortenau: während PPV-Rec bis 2004 in 54 % der untersuchten Pflaumenanlagen nachgewiesen wurde, war dies 2017 in 100 % der getesteten und nach 2004 gepflanzten Pflaumenanlagen der Fall. Es konnte auch eine weitere Ausbreitung nach Norden in die mittlere Ortenau festgestellt werden, die bis 2004 noch nicht betroffen war. Hier waren 40 % der getesteten Anlagen auch mit PPV-Rec infiziert. Während PPV-Rec in der südlichen Ortenau mittlerweile der dominante Stamm ist (94 % der Proben) ist dies in der mittleren Ortenau noch der PPV-D Stamm (67 % der Proben). Beide Stämme wurden auch als Mischinfektionen gefunden. Dagegen konnte PPV-Rec 2017 nicht in der nördlichen Ortenau oder in der Pfalz nachgewiesen werden. In diesen Gebieten wurde nur PPV-D gefunden.

Literatur

- Candresse, T., M. Cambra, S. Dallot, M. Lanneau, M. Asenio, M.T. Gorris, F. Revers, G. Macquaire, A. Olmos, D. Boscia, J.B. Quiot, J. Dunez, 1998: Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathol.* **88**, 198-204.
- Jarusch, W., A. Baßler, N. Molla, T. Wetzel, G. Krczal, 2002: Use of a new extraction kit for the molecular typing of Plum Pox Potyvirus isolates in Germany. *Plant's Health* **6**, 52-54.
- Jarusch, W., A. Baßler, N. Molla, G. Krczal, 2004a: First Detection and Molecular Characterisation of PPV-M Strains in Plum Orchards in South-Western Germany. *Acta Hort.* **657**, 159-164.
- Jarusch, W., N. Molla, G. Krczal, 2004b: Bedeutung und Verbreitung von *Plum Pox Potyvirus* (PPV) M-Stämmen in Südwestdeutschland. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft.* **396**, 549.
- Šubr, Z., S. Pittnerová, M. Glasa, 2004: A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum Pox Virus isolates. *Acta virol.* **48**, 173 – 176
- Wetzel, T., T. Candresse, M. Ravelonandro, J. Dunez, 1991: A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* **33**: 355-365.

135 - Nachweis zweier neuartiger Viren in Birke an urbanen und natürlichen Standorten in Europa

Detection of two novel virus variants in birch of urban and native origins in Europe

Kaja Pack¹, Maria Landgraf¹, Bright Opoku¹, Martina Bandte¹, Susanne von Bargaen¹, Artemis Rumbou¹, Martin Schreiner², Barbara Jäckel², Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin

²Pflanzenschutzamt Berlin

In virologischen Untersuchungen an viruserkrankten Birken ist es mit Hochdurchsatzsequenzierung (*Next Generation Sequencing*, NGS) gelungen, im Jahr 2015 neben dem Nachweis von *Cherry leaf roll virus* (CLRV) (BÜTTNER et al. 2011) und *Apple mosaic virus* (ApMV) zwei neue Virusarten (aus den Gattungen Carla- und Badnavirus) in Birken nachzuweisen. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass Virusinfektionen die Vitalität der Bäume maßgeblich beeinträchtigen und zu vorzeitiger Seneszenz,

Sekundärinfektionen mit weiteren Pathogenen und zum Absterben des Baumes führen können (JALKANEN et al. 2007). Es wird vermutet, dass die beiden neuen Viren wesentlich zur Blattrollerkrankung der Birke beitragen. Beide Viren sind zum ersten Mal in *Betula*-Arten gefunden worden (RUMBOU et al. 2015). Bei Badnaviren handelt es sich um dsDNA-Viren der Familie Caulimoviridae. Viren dieser Familie gehören zu den Pararetroviren und haben die Fähigkeit, ins Genom der Pflanze zu integrieren. Bei Carlaviren handelt es sich um (+)ssRNA-Viren der Familie Betaflexiviridae. An Gehölzen, wie der Pappel, konnte das Carlavirus *Poplar mosaic virus* in Verbindung mit einer erhöhten Ausprägung von Blattsymptomen gebracht werden (KONTZOG et al. 1992). Die neuartigen Viren wurden mittels Abgleich der assemblierten Contigs bzw. Scaffolds mit der Proteindatenbank des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) identifiziert. Die Analyse bestätigt eine Infektion der untersuchten Blattproben mit einem Komplex verschiedener bisher völlig unbekannter Viren (OPOKU et al. 2018). Für diese Studie wurden zur spezifischen Detektion des neuartigen Carla- und Badnavirus mittels RT-PCR neue Primer entwickelt. Insgesamt wurde das Carlavirus in 24 von 130 getesteten Birkenblattproben aus verschiedenen Standorten in Europa nachgewiesen. Für den Nachweis von Badnaviren wurden zwei unterschiedliche Primerpaare, die von zwei verschiedenen Sequenzvarianten des neuartigen Badnavirus von Standorten in Korsika (Frankreich) beziehungsweise in Berlin (Deutschland) abgeleitet werden, entworfen. In 50 von 130 Blattproben wurde in der RT-PCR ein Fragment für Badnaviren erzeugt. Bisher konnte den Virusvarianten aufgrund der Vielfalt an Symptomen an unterschiedlichen Standortbedingungen ein Symptom noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Des Weiteren müsste die Verbreitung an anderen Standorten weiter untersucht werden und verschiedene Isolate sollen zukünftig besser voneinander abgegrenzt werden. Der Verfall von virusinfizierten Birken wird in Berlin schon länger beobachtet, aber Empfehlungen zur Behandlung fehlen aufgrund der ungeklärten Ursache bislang.

Literatur

- BÜTTNER, C.; VON BARGEN, S.; BANDTE, M.; MYRTA, A. 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.
- JALKANEN, R.; BÜTTNER, C.; VON BARGEN, S. 2007: *Cherry leaf roll virus* Abundant on *Betula pubescens* in Finland. *Silva Fennica* 41(4), pp. 755-762.
- KONTZOG, H.-G.; EBRAHIM-NESBAT, F. 1992: Ermittlung und Bewertung quantitativer Virusresistenz von Pappeln nach Inokulation mit Pappelmosaik-Virus (*Poplar mosaic virus*, PopMV).
- OPOKU, B.; LANDGRAF, M.; PACK, K.; BANDTE, M.; VON BARGEN, S.; SCHREINER, M.; JÄCKEL, B.; BÜTTNER, C. 2018: Emerging plant viruses in urban green – detection of the virome in birch (*Betula sp.*). In the *Horticulture Journal* 2018.
- RUMBOU, A.; VON BARGEN, S.; JALKANEN, R.; BÜTTNER, C. 2015: The "birch-leafroll disease" emerging in forests and urban parks in Fennoscandia – Viral agents associated with the disease. Oral Presentations in Pest and Diseases in Trees XVIII.

136 - Investigation of viral diseases in declining birch trees in Berlin

Virologische Untersuchungen an erkrankten Birken im Raum Berlin

Elisha Bright Opoku¹, Maria Landgraf¹, Martina Bandte¹, Susanne von Bargaen¹, Martin Schreiner², Barbara Jäckel², Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin

²Pflanzenschutzamt Berlin

Data from next generation sequencing indicate the complexity of the birch virome in the urban landscape of Berlin. It is well known that plant viruses are widespread and contribute to the decline of birch trees. The occurrence and frequency of mixed viral infection by *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Apple mosaic virus* (ApMV) and two newly

discovered viruses from the genus *Badna-* and *Carlavirus* were investigated in Southern Berlin (Steglitz-Zehlendorf) in 2015 and 2016. To gain a more detailed view on epidemiology of this viral complex in birch, the study was enlarged in 2017 including eight districts all over Berlin with the exception of Friedrichschain-Kreuzberg, Pankow and Lichtenberg. New birch trees with symptoms like defoliation and degeneration were selected for detection of viral pathogens by molecular biological methods. Different combinations of these plant viruses in single and mixed infection were detected by RT-PCR. 80 % of investigated birch leaf samples in 2017 confirmed to be infected by plant viruses. Out of the four tested plant viruses from 72 symptomatic birch leaf samples, *Badnavirus* was recorded as the most prominent virus in the investigated trees followed by CLRV, ApMV and *Carlavirus* respectively. CLRV and *Badnavirus* combinations have shown to be distinct and widely distributed. Currently we try to correlate observed leaf symptoms with known viruses. A protocol has been setup to study the pattern of detected viruses by visualizing tissue prints of leaf material by smiFISH with a fluorescence microscope.

137 - Untersuchungen zur Verbreitung eines neuartigen Emaravirus in Sämlingen der Stieleiche (*Quercus robur* L.)

*Studies on the distribution of a novel emaravirus in seedlings of Common oak (*Quercus robur* L.)*

Marius Rehanek, Franziska Otto, Susanne von Barga, Martina Bandte, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin

Virusverdächtige Symptome werden an Eichen oft beobachtet, aber der verursachende Erreger konnte lange nicht identifiziert werden (Nienhaus, 1975; Büttner et al., 2013). Durch Pfropfung lassen sich die Symptome auf Eichensämlinge übertragen (Büttner und Führling, 1996). In der oft mit Eichen vergesellschafteten Eberesche wurde mit EMARaV der erste Vertreter einer neuen Virusgattung identifiziert (Mielke und Mühlbach, 2007). Seither wurden Emaraviren in zahlreichen weiteren wirtschaftlich und ökologisch wichtigen Pflanzenarten beschrieben (Mielke-Ehret und Mühlbach, 2012). Eine Möglichkeit zur Untersuchung viraler Krankheiten stellen moderne Hochdurchsatzsequenzier-Methoden (HTS) dar. Sie bieten die Möglichkeit der Virusidentifizierung in Pflanzen ohne vorherige Kenntnisse des Erregers. Erstmals ist es gelungen, mittels HTS in einer erkrankten Stieleiche (*Q. robur*) mit chlorotischen Ringflecken an den Blättern ein neuartiges Emaravirus zu identifizieren. Das Virus besitzt wie alle bisherigen Vertreter ein segmentiertes multipartites RNA-Genom, wobei jedes Segment für ein virusspezifisches Protein kodiert. Mit Hilfe spezifischer RT-PCRs zur Detektion der identifizierten viralen Genomsegmente kann das Virus in erkrankten Eichen nachgewiesen werden. Der häufige Virusnachweis in Eichenpopulationen verschiedener Standorte sowohl in Deutschland, als auch Südschweden und -norwegen lässt darauf schließen, dass das neuartige Emaravirus weit verbreitet ist. Die virusverdächtigen Symptome an erkrankten Bäumen können an allen Blättern gleichmäßig verteilt sein oder nesterweise nur in einigen Bereichen auftreten. Um die Verteilung des Virus innerhalb des Wirtes zu verstehen, wurde Blattmaterial von infizierten Eichensämlingen durch RT-PCRs zur Detektion verschiedener Genomsegmente auf eine Infektion getestet. Während an einigen Sämlingen das Virus nur in Blattbereichen mit chlorotischen Ringflecken nachweisbar war, gelang an anderen Sämlingen auch der Nachweis in Bereichen ohne Symptome. Für die Diagnostik der Infektion ist die genaue Bonitur der Bäume auf vorhandene Symptome ebenso die Voraussetzung wie die Detektion des Erregers mittels eines sensitiven Nachweisverfahrens.

Literatur

- BÜTTNER, C., M. FÜHRLING, 1996: Studies on virus infection of diseased *Quercus robur* (L.) from forest stands in northern Germany. *Ann. For. Sci.* **53** (2-3), 383-388.
- BÜTTNER, C., S. VON BARGEN, M. BANDTE, H. P. MÜHLBACH, 2013: Forest diseases caused by viruses. In: *Infectious Forest Diseases*. GONTHIER, P. und G. NICLOTTI, Grugliasco, CAB International, 50-75 S.
- 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** (4), 1337–1346.
- MIELKE-EHRET, N., H. P. MÜHLBACH, 2012: Emaravirus: A Novel Genus of Multipartite, Negative Strand RNA Plant Viruses. *Viruses* **4** (9), 1515-1536.
- NIENHAUS, F., 1975: Viren und virusverdächtige Erkrankungen in Eichen (*Quercus robur* und *Quercus sessiliflora*). *ZPflKrankh PflSchutz* **82**, 739-749.

138 - Untersuchungen zum Auftreten eines neuartigen Virus der Esche (*Fraxinus excelsior*) und Vervollständigung der RNA1-Sequenz

*Study to Occurance of a new Virus in European Ash (*Fraxinus excelsior*) and Completion of the RNA1 Sequence*

Thomas Gaskin¹, Susanne von Bargaen¹, Martina Bandte¹, Jean-Sébastien Reynard², Hans-Peter Mühlbach³, Jenny Roßbach¹, Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin

²Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil, Schweiz

³Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek

Mithilfe der Hochdurchsatzsequenzierung wurde ein neuartiges Virus in der Esche (*Fraxinus excelsior*), welches vermutlich zur langjährig untersuchten Gattung Emaravirus (Fam. *Fimoviridae*, Ord. *Bunyvirales*) gehört, entdeckt. Das *European mountain ash ringspot-associated emaravirus* (EMARaV) ist die Typspezies der Gattung und in Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) in Nord- und Mitteleuropa weit verbreitet. Es führt an Blättern zu charakteristischen Symptomen, wie chlorotischen Ringflecken und Scheckungen (Büttner et al., 2013, Roßbach et al., 2015). Alle Emaraviren besitzen mindestens vier negativ-orientierte, einzelsträngige RNA-Genomsegmente, die jeweils ein Protein kodieren. RNA1 kodiert eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, RNA2 einen Glykoproteinvorläufer, RNA3 das Nukleokapsidprotein und die RNA4 ein virales Transportprotein. Bis zu 8 Genomsegmente wurden bei anderen Vertretern der Gattung Emaraviren gefunden und deuten auf eine Plastizität des Genoms hin (DiBello et al., 2015). Segmente besitzen außerdem konservierte, selbstkomplementäre 3'- und 5'-Termini und sind meist von einer Doppelmembran umhüllt (Mielke und Mühlbach 2007). Kürzlich wurde ein putatives Emaravirus in symptomatischem Blattmaterial der Esche (*Fraxinus excelsior*) an Standorten in Deutschland, der Schweiz und Schweden detektiert. Symptomatische Bäume zeigten chlorotische Flecken und Blattverformung, wie eine Fadenblättrigkeit. 5 RNA-Segmente des neuen Virus wurden in weiteren Untersuchungen identifiziert und eine Korrelation mit der Blattverformung wurde festgestellt (von Bargaen et al., 2018). In der vorliegenden Studie wurden neue Primerpaare anhand vorhandener Sequenzinformation der RNA1 entwickelt, um mittels einer RT-PCR die Sequenz der RNA1 zu vervollständigen. Zudem wurden Studien zur Verbreitung des neuen Virus in der Esche durchgeführt. 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.
- DiBello, P. L., Ho, T., Tzanetakis, I. E., 2015: The evolution of emaraviruses is becoming more complex: seven segments identified in the causal agent of Rose rosette disease, *Virus Research* **210**, 241-244.

- 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.
- 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.
- Von Bargaen S., Tischendorf M., Landgraf M., Blystad D-R., Gindro K., Reynard J-S., Büttner C, 2018: Viruses affecting Ash (*Fraxinus* sp.) in Europe – genome organization and geographic distribution of a putative novel emaravirus In: Progr. Heft des 50. DPG-Arbeitskreistreffens Viruskrankheiten der Pflanze, 19.-20.3. 2018 in Bad Herrenalb, DPG, 19-20 S.

139 - Mikrobielle Antagonisten gegen das Eschentriebsterben

Microbial Antagonists Against Ash Dieback

Kristina Ulrich¹, Regina Becker², Andreas Ulrich², Michael Kube¹

¹Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, AB Resistenzforschung

²Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF), AG Mikrobielle Biogeochemie

Das durch den Ascomyceten *Hymenoscyphus fraxineus* verursachte Eschentriebsterben gefährdet durch das Absterben ganzer Bestände die forstliche Zukunft der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*). Die Applikation von Fungiziden stellt keine Möglichkeit zur Bekämpfung dar und resistente Genotypen sind bisher nicht etabliert. Neben dem Pflanzengenotyp stellen auch Unterschiede im Mikrobiom Ursachen für das Auftreten einer herabgesetzten Anfälligkeit oder einer vermittelten Resistenz einzelner Eschen dar.

Basierend auf einer komparativen Analyse der kultivierbaren Mikrobiota anfälliger und resistenter Eschen werden epi- und endophytische Pilze und Bakterien ausgewählt, die potentiell eine Infektion durch eine Kolonisationsresistenz verhindern. Parallel erfolgt eine kulturunabhängige Analyse der Mikrobiome durch die Hochdurchsatz-Sequenzierung von ribosomalen Markersequenzen.

Bisher wurden Kulturen von ca. 2.500 Bakterien- und 1.500 Pilzstämmen gewonnen, phylogenetisch klassifiziert und *in vitro* durch Ko-Kultivierung mit dem Pathogen auf ihre antagonistische Wirkung getestet.

Erste Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede in der bakteriellen und pilzlichen Besiedlung anfälliger und widerstandsfähiger Eschen. So wurden Isolate der Gattungen *Luteimonas*, *Achromobacter* und *Papiliotrema*, die auch in anderen Systemen als Bestandteil des Kernmikrobioms gesunder Pflanzen beschrieben wurden, verstärkt in widerstandsfähigen Eschen nachgewiesen. In der Dualkultur konnten zudem verschiedene Bakterien- und Pilzisolat mit hoher antimykotischer Wirkung gegen *H. fraxineus* identifiziert werden.

Literatur

BARAL, H.-O., V. K. QUELOZ, T. S. HOSOYA, 2014: *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in europe. *IMA Fungus* 5 (1): 79–80.

139a - Das Rhizosphärenmikrobiom als potentieller Initiator der gesteigerten Resistenz in Gerste

The rhizosphere microbiome as potential initiator for enhanced resistance in barley

Nina Bziuk, Desirée Lauterbach, Adam Schikora, Kornelia Smalla

Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

Die mikrobielle Rhizosphärengemeinschaft birgt das Potential, die Toleranz der Pflanze gegenüber abiotischen und biotischen Stressfaktoren zu erhöhen (Priming). Dabei kommt es zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort. Vorherige Studien konnten zeigen, dass unterschiedliche landwirtschaftliche Bodenbearbeitungen die mikrobielle

Gemeinschaft der Rhizosphäre signifikant beeinflussen. Wir nehmen an, dass die landwirtschaftliche Bodenbearbeitung zudem das Priming-Potential des Rhizosphärenmikrobioms beeinflusst. Ein experimentelles Design zur Untersuchung der Primingkapazität von mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaften aus verschiedenen landwirtschaftlichen Böden wurde entwickelt und an der Gerstensorte „Golden Promise“ gegenüber dem Phytopathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* im Gewächshaus getestet. Das extrahierte Rhizomikrobiom der Gerste, kultiviert in Feldboden, wurde in Töpfe mit einem Substrat/Sand Gemisch inokuliert, die mit Gerstenkeimlingen bepflanzt wurden. Die Pflanzen wurden im Wachstumsstadium 13 mit *B. graminis* infiziert (Kontrollpflanzen wurden entsprechend nicht behandelt). Die Zusammensetzung der prokaryotischen Rhizosphärengemeinschaft wurde mittels Sequenzierung der 16S rRNA Genfragmente aus der *total community-DNA* amplifiziert. Die Primingkapazität wurde durch einen *detached leaf assay* bestimmt, sowie durch Analyse der Expressionsmuster der Gene *PR1b* und *PR17b*, die in die Pflanzenimmunantwort involviert sind. Zwar konnte die Resistenz gegenüber *B. graminis* nicht verbessert werden, jedoch zeigten die mit der Rhizosphärengemeinschaft inokulierten Pflanzen im Vergleich zu der uninokulierten Kontrolle eine stärkere und schnellere Immunantwort. Weiterhin konnte ein Einfluss auf die relative Abundanz verschiedener prokaryotischer Taxa durch das Rhizosphäreninokulum als auch durch den Pilzbefall gezeigt werden. Unsere Ergebnisse lassen auf eine Steigerung der Pflanzenimmunantwort durch das Rhizosphäreninokulum und damit dessen Primingkapazität schließen. Das entwickelte experimentelle Design wird für weitere Untersuchungen zur Primingkapazität von prokaryotischen Rhizosphärengemeinschaften in Abhängigkeit der landwirtschaftlichen Bearbeitung genutzt werden.

140 - Simple and rapid detection of *Tilletia controversa* causing dwarf bunt in wheat seeds

*Ein einfacher und schneller Nachweis für *Tilletia controversa*, dem Verursacher des Zwergsteinbrands von Weizen*

Somayyeh Sedaghatjoo¹, Monika K. Grundler², Andreas J. Geissler³, Ludwig Niessen³, Petr Karlovsky⁴, Berta Killermann², Wolfgang Maier¹

¹Julius Kühn-Institut, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics

²Institute for Crop Science and Plant Breeding, Bavarian State Research Center for Agriculture

³Technical University of Munich, Chair of Technical Microbiology

⁴Georg-August-University Göttingen, Molecular Phytopathology and Mycotoxin Research

Dwarf bunt is a disease of wheat caused by the fungus *Tilletia controversa* Kühn. Seeds of diseased plants are converted to so-called bunt balls where the entire interior of the seeds is filled with teliospores, resulting in losses in both yield and quality. In addition, dwarf bunt is under quarantine regulation in several countries, making its correct identification a high priority for plant health professionals and for wheat exporters. The current international diagnostic protocol in wheat seeds adopted by the International Seed Testing Association (ISTA) is based on morphological features of teliospores obtained by a filtration method. The method is however laborious and requires expertise. The aim of this study was to develop a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *T. controversa* and test its application on naturally contaminated wheat seeds.

To design specific primers for the detection of *T. controversa*, the whole genomes of 4 *T. caries* strains, 5 *T. controversa* strains and 2 strains of *T. laevis* were sequenced. Genomes of single-spore isolates were sequenced on an Illumina HiSeq 4000 platform. Additionally one

of the *T. controversa* strains was sequenced employing PacBio Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing (GATC Biotech, Germany). The genomes were *de novo* assembled and pooled with published GenBank data, namely; *T. caries* (GCA_001645005), *T. controversa* (GCA_001645045), *T. horrida* (GCA_001006505), *T. indica* (GCA_001645015), and *T. walkeri* (GCA_001645055). Using Blast Diagnostic Gene Finder (BADGE v1.2) 11 potential species-specific gene regions could be identified. We designed a LAMP primer set consisting of 4 primers that specifically detects *T. controversa*. The assay was validated using 137 *Tilletia* specimens and 46 other wheat fungal pathogens.

This LAMP assay was then tested on 22 naturally contaminated wheat seed samples received from the ISTA accredited seed testing lab of the Bavarian State Research Center for Agriculture (LfL). Contamination levels of the seed lots were determined using the filtration method according to the ISTA working sheet modified by section IV Seeds of VDLUFA. The collected teliospores were morphologically identified and counted. Twelve samples were contaminated with *T. controversa* from 4.9 to 132.6 teliospores per grain and 10 samples with *T. caries* from 0.4 to 128.7 teliospores per grain. The same samples were used for the LAMP test. The spores were washed off from wheat grains using the above-mentioned protocol with a few modifications and collected by centrifugation instead of filtration. DNA from the collected spores was extracted (Qiagen DNeasy PowerPlant Pro Kit) and the LAMP assay was run. For the end-point detection neutral red was used. Using this LAMP assay, contamination of wheat seed samples with ≥ 21.9 spores of *T. controversa* per grain could be detected. The simple and fast procedure of the LAMP assay developed in this work and the easy readout by colour reaction will enable the use of the assay in high throughput diagnosis; extensive validation is however necessary before the assay can be used in seed testing facilities.

Literatur

ISTA, International Seed Testing Association, 1984. Working Sheet No. 53, *Triticum aestivum*, *Tilletia controversa* Kühn, *T. caries* (DC) Tul., *T. foetida* (Wallr.) Liro. In: International Seed Testing Association (Hrsg.) ISTA Handbook on Seed Health Testing, Zurich, Switzerland: 1-4.

141 - Peronospora-Arten an Salvia

Peronospora-species on Salvia

Mascha Hoffmeister¹, Marco Thines², Wolfgang Maier¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

²Biodiversity and Climate Research Centre (BiK-F), Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung

Peronospora salviae-officinalis, der Falsche Mehltau des Echten Salbeis (*Salvia officinalis*), verursacht in den letzten Jahren zunehmend Verluste im deutschen Salbeianbau. Über die Epidemiologie und Infektionsbiologie des Erregers, der erst 2009 als eine eigene Art klassifiziert wurde (Choi et al. 2009), ist nur wenig bekannt. Auch liegen weder Informationen über das Ursprungsgebiet des Pathogens noch über potentielle weitere Wirtspflanzen vor. Neben *S. officinalis* wird in Deutschland auch *S. sclarea* (Muskatellersalbei) als Zierpflanze in kleinem Maßstab angebaut und *S. pratensis* (Wiesensalbei) ist Teil der natürlichen Flora. Auch an diesen Salbeiarten ist Falscher Mehltau zu finden: Sie könnten somit potentielle Inokulumquellen für *P. salviae-officinalis* darstellen. Um dies zu überprüfen wurden gezielt Pflanzen von *S. sclarea* und *S. pratensis* untersucht, die einen Befall mit Falschem Mehltau aufwiesen.

Die *Peronospora*-Arten an *S. pratensis* und *S. sclarea* wurden bislang als die Arten *P. lamii* bzw. *P. swinglei* identifiziert (GAPONENKO 1972, DUDKA 2004; MULENKO et al. 2008; MÜLLER 2008). Einige Autoren verwenden die beiden *Peronospora*-Arten als Synonyme (BRANDENBURGER & HAGEDORN 2006). Dies entspricht der langjährigen Praxis Falsche

Mehltaupilze an Lamiaceen unter *Peronospora lamii* zusammen zu fassen. Auch *P. salviae-officinalis* und *P. belbahrii* an *Ocimum basilicum* wurden lange dieser „Sammelart“ zugeordnet. Mikroskopische und molekularphylogenetische Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es sich bei diesen zwei Falschen Mehltaupilzen um eigene Arten handelt und nicht um *P. lamii* (THINES et al. 2009; CHOI et al. 2009). Analog zeigen unsere Untersuchungen der *Peronospora*-Arten an *S. sclarea* und *S. pratensis*, dass auch bei diesen Falschen Mehltaupilzen die bisherige Art-Zuordnung nicht korrekt war. Vielmehr scheint es sich bei der *Peronospora*-Art an *S. pratensis* um eine bislang unbeschriebene *Peronospora*-Art zu handeln. Die mikroskopischen und molekularbiologischen Daten legen nahe, dass der Falsche Mehltau auf dem Muskatellersalbei *P. salviae-officinalis* ist. Somit erweitert sich der bekannte Wirtskreis für *P. salviae-officinalis*. Ob der Muskatellersalbei die ursprüngliche Quelle des Pathogens darstellt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht abgeleitet werden. Es scheint jedoch sinnvoll, diesen Wirt näher zu untersuchen, da er eine wichtige Inokulumquelle darstellen könnte.

Literatur

- Brandenburger, W. and G. Hagedorn (2006). Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig.
- Choi, Y. J., et al. (2009). "Two novel *Peronospora* species are associated with recent reports of downy mildew on sages." *Mycological Research* 113(Pt 12): 1340-1350.
- Dudka, I. O. H., V.P.; Tykhonenko, Y.Y.; Andrianova, T.V.; Hayova, V.P.; Prydiuk, M.P.; Dzhagan, V.V.; Isikov, V.P. (2004). Fungi of the Crimean Peninsula, M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine.
- Gaponenko, N. I. (1972). The family Peronosporaceae of Middle Asia and south Kazakhstan: a classification key. *Inst. Bot. Acad. Sci. Izbek SSR*.
- Mulenko, W., et al. (2008). A preliminary checklist of micromycetes in Poland. Krakau, W. Szafer Institute of Botany.
- Müller, J. K., P. (2008). "Erweitertes Verzeichnis der Falschen Mehltaupilze Mährens und tschechisch Schlesiens." *CZECH MYCOL.*: 91–104.
- Thines, M., et al. (2009). "Identity of the downy mildew pathogens of basil, coleus, and sage with implications for quarantine measures." *Mycological Research* 113(5): 532-540.

142 - Molecular characterisation of *Ascochyta fabae* isolates, causal agent of ascochyta blight on faba beans

Molekulare Charakterisierung von Ascochyta fabae Isolat, Erreger der Ascochyta-Blattfleckenkrankheit der Ackerbohne

Sai Vivek Chinna Peketi, Stefanie Remer, Wolfgang Link, Birger Koopmann

Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz

Ascochyta blight is one of the most common and destructive disease of faba beans (*Vicia faba*) with yield losses up to 35% (Hampton, 1980). A very little is known about the genetic diversity in the population of *Ascochyta fabae* in Germany. Here we study the genetic diversity in a collection of *A. fabae* isolates originating from Northern Germany by applying PCR based DNA-fingerprinting techniques like Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR, Variable Number Tandem Repeats (VNTR) PCR and Amplified Fragment Length (AFLP). To expand our knowledge about the existence of teleomorph *Didymella fabae* (anamorph *A. fabae*) in Germany, we analyse mating-types by applying PCR based techniques which determine compatible MAT1-1 and MAT1-2 idiomorphs.

Literature

- HAMPTON, J.G., 1980. Titel. The significance of *Ascochyta fabae* in broad beans in the Manawatu, and methods for its control. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*. **8**, 305-308.