

Im Nachauflauf fielen die Unterschiede zwischen ZEPPLIN® und REBELL® deutlich geringer aus, da zu diesem Termin eine dreimalige Anwendung von jeweils 0,83 l/ha ZEPPLIN® mit dem Mischungspartner SPECTRUM® zugelassen werden soll. In dieser Kombination, die auch bei REBELL mit denselben Aufwandmengen zugelassen ist, waren nennenswerte Wirkungsnachteile von ZEPPLIN® gegenüber REBELL® nur bei Ackersenf, Hederich und Kleiner Brennnessel erkennbar.

Durch die Rücknahme der Chloridazon-Aufwandmenge ergaben sich im Vor- wie im Nachauflauf bei ZEPPLIN® Vorteile in der Kulturpflanzenverträglichkeit. Aus der Selektivitätsprüfung mit doppelten Aufwandmengen lässt sich ableiten, dass gleiche Produkt-Aufwandmengen von ZEPPLIN® und REBELL® etwa vergleichbare Symptomausprägungen verursachen bzw. dass bei den Zulassungs-Aufwandmengen ZEPPLIN® nur ein halb so hohes Schädigungspotenzial aufweist wie REBELL®.

Da bei den in Deutschland verbreiteten Nachauflauf-Spritzsystemen in der Regel zwei bis vier Rübenherbizide gemeinsam ausgebracht werden, ist in der Praxis die Leistungsfähigkeit von ZEPPLIN® als Systemkomponente wichtiger als die Wirkung des Produkts alleine. Deshalb wurde ZEPPLIN® als Ersatz von REBELL® in praxisnahen Tankmischungen gemeinsam mit GOLTIX® SC und BETANAL® EXPERT jeweils mit und ohne SPECTRUM® über drei Jahre geprüft. Dabei erwies sich ZEPPLIN® mit 3 x 0,8 l/ha trotz reduzierter Chloridazon-Menge als vollwertiger Ersatz von REBELL®.

## Sektion 45 – Molekulare Phytomedizin

45-1 - Körbelin, J.; Adam, G.; Willingmann, P.; Heinze, C.  
Biozentrum Klein Flottbek

### **OHIOV: Ein ungewöhnliches Tobamovirus, welches die auf Nukleinsäuresequenzen basierende Taxonomie in Frage stellt**

Das Virusisolat OHIOV aus dem Genus Tobamovirus wurde 1969 als ein *Tobacco mosaic virus* (TMV) beschrieben. Es fiel auf, da es resistenzbrechende Eigenschaften gegenüber Tomatenzuchtlinien besaß. In einer ersten molekularen Charakterisierung stellte sich heraus, dass der Bereich des Hüllproteingens von OHIOV gegenüber dem entsprechenden Bereich beim TMV vulgare in 13 % der Nukleotide differierte. Da die überwiegende Anzahl von Austauschungen in der dritten Position eines kodierenden Triplets liegen, resultiert daraus eine Abweichung von lediglich 5 % in der Aminosäuresequenz. Weitere Sequenzierungen des gesamten Genoms ergaben für alle kodierenden Bereiche eine ähnliche Situation, während die nicht-kodierenden und funktionellen Bereiche hohe Übereinstimmungen mit TMV vulgare aufwiesen. Aufgrund des Wirtsspektrums, der Genomorganisation, der Serologie und der Aminosäure-sequenzen aller kodierten Proteine ist OHIOV ein Isolat des TMV. Wendet man dagegen weitere Kriterien des ICTV an, ist, aufgrund der Nukleinsäureabweichung von mehr als 10 % über das gesamte Genom, die eindeutige Zuordnung des Isolates OHIOV zu TMV nicht möglich. Demnach wäre OHIOV nach diesem Kriterium des ICTV eine neue Tobamovirus Spezies. Diese Betrachtung wird unterstützt, da auch das Sequenzmotiv im Bereich der Polymerase, welches Gibbs et al. (2004) als eindeutiges Kriterium für die Zuordnung zu einer Tobamovirus Spezies vorgeschlagen haben, für das Isolat OHIOV nicht zutrifft. Mögliche Ursachen für die Anhäufung von stillen Mutationen werden diskutiert.

45-2 - Langer, J.<sup>1)</sup>; Rumbou, A.<sup>2)</sup>; Gentkow, J.<sup>3)</sup>; Von Bargen, S.<sup>1)</sup>; Büttner, C.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Humboldt-Universität zu Berlin; <sup>2)</sup> NAGREV, Griechenland; <sup>3)</sup> Leibniz-Institut für Pflanzenbiotechnologie

### **Die Genomorganisation des *Cherry leaf roll virus***

Genome organisation of *Cherry leaf roll virus*

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) der Gattung *Nepovirus* (picornaähnliche Virusgruppe) ist weltweit in einer Vielzahl von verschiedenen Wirtspflanzenarten, vornehmlich in Gehölzen, verbreitet. Ausgewählte CLRV-Isolate sollen molekularbiologisch charakterisiert werden, um mögliche genetische Determinanten z. B. für die Wirtsadaptation, die Pathogenität und Ausbreitung des CLRV in der Pflanze zu identifizieren.

Das bipartite, einzelsträngige (+) RNA-Genom konnte erstmals für ein CLRV-Isolat aus Rhabarber vollständig sequenziert werden. Die RNA1 ist 7922 nt und die RNA2 6335 nt lang. Beide RNAs sind polyadenyliert und am 5' Ende an das VPg kovalent gebunden. Erste Sequenzvergleiche mit anderen Nepoviren bestätigen eine typische Genomorganisation beider CLRV-RNAs mit jeweils einem offenen Leserahmen, der durch eine 5' und eine 3' nicht-kodierende Region (NCR) begrenzt ist. Die RNA1 kodiert für einen Protease Cofaktor, das VPg, ein NTP-

bindendes Protein, eine Protease und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die RNA2 kodiert für ein Protein, über dessen Funktion bisher nichts bekannt ist, das Transportprotein und ein Hüllprotein. Die CLRV-kodierten Genprodukte werden als Polyprotein translatiert und nachfolgend durch die virale Protease in die funktionellen Einheiten gespalten. Die CLRV-3'NCR ist zwischen 1538 und 1602 Nukleotide lang, hochkonserviert und auf RNA1 und RNA2 eines CLRV-Isolates nahezu identisch. Die 5' NCRs aller untersuchten CLRV-Isolate sind 11 Nukleotide kurz und auf beiden RNAs identisch. Das daran anschließende erste AUG-Kodon liegt im sogenannten Kozak-Sequenzkontext (AAA AUGG) und stellt daher das potentielle Startcodon für die Translationsinitiation da.

Über die 5' terminale Sequenzidentität der RNA1 und RNA2 hinaus weisen auch die kodierenden Genomregionen (offener Leserahmen) für die korrespondierenden Polyproteine 1 und 2 eine 5' proximale Sequenzhomologie über mehr als 600 Nukleotide auf. Die Funktion des putativen homologen Genproduktes der beiden RNAs ist bislang nicht bekannt.

45-3 - Smalla, K.<sup>1)</sup>; Heuer, H.<sup>1)</sup>; Wohanka, W.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Julius Kühn-Institut; <sup>2)</sup> Forschungsanstalt Geisenheim

### ***Pseudomonas savastanoi* – Ursache einer neuen Bakteriose an *Mandevilla sanderi*: Molekulare Charakterisierung und Diagnostik**

Das Gram-negative pflanzenpathogene Bakterium *Pseudomonas savastanoi* gehört zum *Pseudomonas syringae*-Komplex. Basierend auf der Pathogenität und dem Wirtsbereich zählen mehr als 50 Pathovaren zu diesem Komplex, und die Ergebnisse von Multi-Locus-Sequenzierungen haben gezeigt, dass *P. savastanoi*-Isolate zur Genomospezies 2 gehören (Sakar *et al.*, 2006). Die Nutzung molekularbiologischer Techniken und insbesondere der Vergleich vollständig sequenzierter Genome verschiedener Isolate des *P. syringae*-Komplexes haben neue Einblicke in die Diversität von Pathogenitäts- und Virulenzdeterminanten ermöglicht (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010).

Seit einigen Jahren wurden in Vermehrungs- und Gartenbaubetrieben Blattflecken, absterbende Triebspitzen und krebsartige Verdickungen der Stängel an *Mandevilla sanderi* beobachtet. Isolierte Erreger wurden zunächst mit BIOLOG als *P. savastanoi* identifiziert. Bislang ist *P. savastanoi* nicht als Erreger von Bakteriosen bei *Mandevilla sanderi* beschrieben. Da *P. savastanoi* häufig zu Krankheitssymptomen an Oliven und Oleander führen und Jungpflanzenbetrieben oft in der Nachbarschaft zu Oliven- und Oleanderbeständen liegen, sollte die molekulare Ähnlichkeit zu diesen und weiteren Stämmen aus Liguster und Jasmin überprüft und ein Nachweisverfahren entwickelt werden. Dazu wurde die genomische DNA aus Isolaten von Mandevilla, Oliven, Oleander, Liguster und Jasmin sowie von einem DSMZ-Stamm isoliert. Sowohl die ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis)-Muster als auch die BOX-Fingerprints zeigten, dass die Stämme identisch oder zumindest sehr ähnlich waren. Da Pathogenitäts-determinanten bei Isolaten des *P. syringae*-Komplexes zumeist auf Plasmiden lokalisiert sind (Pérez-Martínez *et al.*, 2008), wurde die Plasmid-DNA aus allen Stämmen isoliert und nach Verdau mit Restriktionsenzymen verglichen. Während die Stämme auf der Ebene der BOX-Muster nicht zu unterscheiden waren, konnten nunmehr die Isolate klar differenziert werden. Mit Hilfe von Primern, die an das rep-Gen von Plasmiden anlagern, wurden nur Amplikons von den Isolaten aus *Mandevilla sanderi* erhalten. Dieses PCR System könnte für eine schnelle Diagnostik genutzt werden. Die Southern Blot-Hybridisierungen zeigten jedoch, dass alle untersuchten Isolate mit der rep-Sonde hybridisierten. Die Größe der hybridisierenden Fragmente war in Abhängigkeit von der Wirtspflanze verschieden. Obwohl *P. savastanoi*-Isolate von *Mandevilla sanderi* auch an Oleander Blattflecken und Stängelverdickungen hervorriefen und umgekehrt, waren diese Isolate nach den Plasmid-Restriktionsmustern und Southern Blot-Hybridisierungen nicht identisch. Allerdings kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Stämme mehrere Plasmide enthalten. Eine weitere Charakterisierung der Plasmide ist notwendig, um die durch die Plasmide vermittelte Diversität der Symptome und des Wirtsbereichs abzuklären.

#### Literatur

- [1] Pérez-Martínez, I., Zhao, Y., Murillo, J., Sundin, G.W., and Ramos, C. (2008) Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *J Bacteriol* 190: 625-635.
- [2] Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I.M., Murillo, J., López-Solanilla, Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Mosquera, M.E., Penyalver, R., R., López, M.M., Quesada, J.M., Biehl, B.S., Perna, N.T., Glasner, J.D., Cabot, E.L., Neeno-Eckwall, E., and Ramos, C. (2010) Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environ Microbiol* 1604-1620.
- [3] Sakar, S.F., Gordon, J.S., Martin, G.B., and Guttman, D.S. (2006) Comparative genomics of host specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genet* 174: 1041-1056.

45-4 - Jarausch, W.<sup>1)</sup>; Jarausch, B.<sup>1)</sup>; Peccerella, T.<sup>1)</sup>; Dollt, C.<sup>1)</sup>; Lauterer, P.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> RLP AgroScience GmbH; <sup>2)</sup> Moravian Museum Brno

### **Entwicklung spezifischer Primer zur molekularen Bestimmung von *Cacopsylla picta*, dem Hauptüberträger der Apfeltriebsucht**

Die Apfeltriebsucht ist eine wirtschaftlich bedeutende Phytoplasnose des Apfels, die durch Psylliden übertragen wird. Als Hauptüberträger wurde *Cacopsylla picta* identifiziert. Eine genaue Bestimmung dieser Spezies anhand morphologischer Merkmale ist jedoch nur durch Spezialisten möglich. Andererseits kann eine Risikoanalyse, ob *C. picta* mit Phytoplasmen infiziert ist, nur durch den molekularen Nachweis der Phytoplasmen mittels PCR erfolgen. Da hierfür eine Gesamt-DNA-Extraktion einzelner Insekten nötig ist, lag es nahe, eine Methode zur molekularen Identifizierung von *C. picta* zu entwickeln, mit der in einem DNA-Extrakt die Spezies identifiziert und der Infektionsgrad mit Phytoplasmen bestimmt werden kann.

Zu Beginn dieser Arbeiten standen für eine Markerentwicklung bei Psylliden nur Sequenzdaten für das hochkonservierte wingless (wg) Gen zur Verfügung. Auf Basis dieser Daten wurden zunächst Primer entwickelt, mit deren Hilfe eine Vielzahl von Sequenzdaten vor allem von *Cacopsylla* Spezies generiert werden konnten. Aus diesen Sequenzdaten konnten spezifische Primer für *C. picta* entwickelt werden. Die Spezifität der Primer wurde gegenüber mehr als 40 verschiedenen Psylliden-Arten getestet. Die Primer reagierten mit Populationen von *C. picta* von 33 unterschiedlichen geographischen Herkünften aus Deutschland, Frankreich, Italien und Tschechien und können somit als universelle molekulare Marker für *C. picta* angesehen werden.

45-5 - Thurau, T.<sup>1)</sup>; Blanck, T.<sup>1)</sup>; Beyer, M.<sup>2)</sup>; Verreet, J.-A.<sup>1)</sup>; Cai, D.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Christian-Albrechts-Universität Kiel; <sup>2)</sup> Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann

### **Identifizierung und Charakterisierung von vier Don- und Fungizidresponsiven Membrantransporter-Genen in *Fusarium graminearum***

*Fusarium graminearum* ist der Haupterreger der *Fusarium*-Taubährigkeit bei Weizen. In einem Biotest konnte gezeigt werden, dass *F. graminearum* weitgehend resistent gegenüber Trifloxistrubin ist, Azol-Fungizide jedoch zur vollständigen Abtötung des Pilzes führen. Zudem ist der Pilz erwartungsgemäß gegenüber seinem eigenen Toxin Deoxynivalenol (DON) unempfindlich.

Um die molekularen Hintergründe des Detoxifikations-Mechanismus des Pilzes aufzuklären, wurden aus Sequenzdatenbanken 42 putative Membrantransporter ausgesucht. Mittels qRT-PCR wurde die transkriptionelle Aktivität der selektierten Gene bei Behandlung des Pilzes nach Fungizidapplikation untersucht. Zudem wurde die Expression nach Behandlung mit DON bestimmt. Vier der untersuchten Gene wiesen eine signifikant gesteigerte Expression nach DON-Behandlung auf. Alle diese 4 Gene reagieren auf Deoxynivalenol und auf das Strobilurin-Fungizid Trifloxystrobin, nicht jedoch auf die Behandlung mit Azolpräparaten. Die hochregulierten Gene werden unterschiedlichen Transporter-Klassen zugeordnet. Zwei der Gene sind der Klasse der MfS-Transporter zuzuordnen, eines der Klasse der ABC-Transporter, eines fungiert als putativer Peptid-Transporter. Trotz der unterschiedlichen Struktur der Moleküle DON und Trifloxystrobin scheint *F. graminearum* über einen gemeinsamen Signal- und Regulationsweg der Detoxifikation zu verfügen. Die molekulare und funktionelle Charakterisierung der selektierten Gene ist zurzeit in Bearbeitung.

45-6 - Becher, R.; Deising, H.B.; Wirsal, S.G.R.

Martin Luther Universität Halle

### **Untersuchung der genomweiten transkriptionellen Änderungen in *Fusarium graminearum* nach Azolbehandlung**

*Fusarium graminearum* verursacht in Getreide, vor allem Weizen, partielle Taubährigkeit und ist auf Grund der produzierten Mycotoxine problematisch für Mensch und Tier. Durch Azol-Behandlung während eines engen Zeitfensters während der Blüte konnte bisher diese Krankheit wirksam bekämpft werden. Partielle Verluste der Sensitivität wurden allerdings schon bei Feldisolaten beschrieben und es ist zu befürchten, dass diese zukünftig zunehmen. Allerdings fehlen breitenwirksame Alternativen.

Zur Aufklärung von Wirkstoff- bzw. Resistenzmechanismen werden DNA-Microarrays zur genomweiten Transkriptionsanalytik im medizinischen Bereich schon erfolgreich genutzt. Durch den statistischen Vergleich der Transkriptionsmuster bei verschiedenen physiologischen Zuständen oder in verschiedenen Geweben können Gene entdeckt werden, die einer spezifischen Regulation unterliegen. In der Phytomedizin haben solche Untersuchungen

bisher kaum Anwendung gefunden. *F. graminearum* bietet diesbezüglich den großen Vorteil, dass sein Genom sequenziert wurde, was die Entwicklung von Microarrays erlaubte. Wir haben diese Technologie verwendet, um genomweite transkriptionelle Änderungen nach Behandlung mit Azolen zu erfassen. Wir haben für ein Dutzend interessanter Gene qRT-PCR Experimente durchgeführt, mit denen die durch den Microarray-Ansatz erzeugten Daten überprüft wurden. Unsere Arbeiten belegen exemplarisch, dass der Einsatz von Microarrays in der Phytomedizin Fortschritte bei der Aufklärung von Wirkstoff- bzw. Resistenzmechanismen gestattet, was bei der Testung neuer Substanzen hilfreich sein wird.

45-7 - Kassemeyer, H.-H.<sup>1)</sup>; Weitbrecht, K.<sup>2)</sup>; Leubner, G.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Staatliches Weinbauinstitut Freiburg; <sup>2)</sup> Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

### **Expression von PR-Proteinen bei der Weinrebe: Kinetik und Aktivität einer *Vitis*-Glucanase nach Infektion durch biotrophe Pathogene**

Expression of PR-Proteins in grapevine: Kinetic and activity of a *vitis*-Glucanase as a response to an infection by a biotrophic pathogen

Die Sorten der Weinrebe (*Vitis vinifera*) sind gegenüber dem Erreger des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) hoch anfällig, während amerikanische Wildarten eine mehr oder weniger ausgeprägte Resistenz aufweisen. Möglicherweise beruhen Resistenz bzw. Anfälligkeit der unterschiedlichen *Vitis*-Genotypen auf der Dynamik, mit welcher die Abwehrantwort nach einer Infektion durch *P. viticola* einsetzt. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Kinetik und Aktivität einer  $\beta$ -1,3-Glucanase aus *Vitis* nach einer Challenge Infektion durch das biotrophe Pathogen in resistenten und anfälligen Genotypen der Weinrebe untersucht. Dazu wurden Blätter von *Vitis vinifera* cv. 'Müller-Thurgau' (anfälliger Genotyp) und *Vitis riparia* (resistenter Genotyp) mit einer definierten Menge an Sporangien von *P. viticola* inokuliert und unter kontrollierten Bedingungen inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen, und es wurde nach Extraktion der RNA und cDNA-Synthese die Menge an Transkript der *Vitis*-Glucanase mit spezifischen Primern mittels quantitativer PCR bestimmt. Aus den Proben wurde auch das Gesamtprotein extrahiert und die Expression der korrespondierenden *Vitis*-Glucanase zu den verschiedenen Stadien des Pathogens im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Im resistenten Genotyp war 12 Stunden nach Inokulation ein signifikanter Anstieg der Transkriptmenge zu beobachten, während im anfälligen Genotyp keine erhöhte Transkription in diesem Zeitraum zu beobachten war. Etwas zeitversetzt war im resistenten Genotyp eine erhöhte Menge an Protein der  $\beta$ -1,3-Glucanase aus *Vitis* nachzuweisen, im anfälligen dagegen stieg die Menge an diesem Protein nicht an. Die einzelnen Entwicklungsstadien von *P. viticola* im Wirtsgewebe wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Ein Vergleich der Expressionsdaten mit den Entwicklungsstadien des Pathogens zeigte, dass der Anstieg der Transkription der Glucanase im resistenten Genotyp gleichzeitig mit der Ausbildung der ersten Haustorien stattgefunden hat. Im anfälligen Genotyp wurde die Glucanase erst zu einem sehr späten Stadium exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt war das Wirtsgewebe bereits vollständig besiedelt und *P. viticola* hatte ein weitverzweigtes Myzel ausgebildet.

45-8 - Conrath, U.

Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

### **„Priming“ von Pflanzen für Stresstoleranz: aus Labor und Feld**

„Priming“ plants for stress resistance: from the lab and the field

Die induzierte Resistenz von Pflanzen gegen biotischen und abiotischen Stress ist oft mit dem so genannten „Priming“ verbunden. „Priming“ bezeichnet einen Zustand, in dem Pflanzen bereits auf geringe Stressreize mit einer schnellen und starken Abwehrantwort reagieren und folglich eine erhöhte Stressresistenz zeigen. Die molekularen Mechanismen des „Primings“ waren bislang vollkommen unbekannt. Unsere Arbeiten zeigen, dass die Akkumulation der beiden so genannten MAP-Kinasen MPK3 und MPK6, die beim „Priming“ in inaktiver Form anhäufen, ein wichtiger Mechanismus beim „Priming“ ist. Nach Stressexposition werden in „geprimten“ Pflanzen mehr MPK3- und MPK6-Moleküle aktiviert, als dies in nicht-geprimten Pflanzen der Fall ist. Damit ist eine erhöhte Aktivierung von Abwehrgenen und eine gesteigerte Stressresistenz verbunden. Das Potenzial des „Primings“ für den angewandten Pflanzenschutz wird am Beispiel des Strobilurin-Fungizids Pyraclostrobin verdeutlicht.