
Sektion 29

Virologie/Bakteriologie/Mykologie

29-1 - Untersuchung der Anfälligkeit Apfeltriebsucht-resistenter *Malus sieboldii*-Hybride gegenüber latenten Apfelviren im Gewebekultursystem

Study of the susceptibility of apple proliferation-resistant Malus sieboldii hybrids towards latent apple viruses in the in vitro system

Wolfgang Jarausch, Annerie Liebenberg, Michelle Fritz, Thierry Wetzell

AlPlanta-IPR, RLP AgroScience, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Deutschland

Eine viel versprechende Bekämpfungsstrategie der Phytoplasma Apfeltriebsucht (AT) besteht in der Verwendung resistenter Unterlagen. Eine natürliche Resistenz wurde in *Malus sieboldii* und seinen Abkömmlingen gefunden, welche in einem Züchtungsprogramm in agronomisch wertvolle Unterlagen-Sorten eingekreuzt wurde (Bisognin *et al.*, 2008; Seemüller *et al.*, 2008; Jarausch *et al.*, 2011). Während des Resistenz-Screenings der Kreuzungsnachkommen, das sowohl im Freiland als auch im *in vitro* System durchgeführt wurde, traten unerwartete Absterbeerscheinungen der inokulierten Pflanzen auf, welche auf eine hypersensitive Reaktion (HR) hindeuten. Eine Ko-Infektion mit den latenten Apfelviren Apple stem grooving virus (ASGV) und Apple stem pitting virus (ASPV) konnte für diese HR verantwortlich gemacht werden (Seemüller *et al.*, 2008). Für eine genauere Untersuchung wurden *in vitro* Kulturen von Apfel etabliert, die mit definierten Stämmen von ASGV und ASPV infiziert waren (Liebenberg *et al.*, 2013). Mit Hilfe dieser Virus-infizierten Kulturen konnte gezeigt werden, dass beide Viren über *in vitro* Pfropfinokulation auf Testpflanzen übertragen werden konnten und auch alleine eine HR bei *Malus sieboldii* auslösen konnten. Mittels *in vitro* Pfropfung wurden verschiedene definierte Inokula von Virusisolaten mit oder ohne Ko-Infektion mit *Ca. Phytoplasma mali*-Stämmen hergestellt. Mit Hilfe dieser Inokula wurde untersucht, ob eine Ko-Infektion mit Viren die Phytoplasma-Symptome verstärkt und/oder ob durch eine Ko-Infektion mit Phytoplasmen die HR verstärkt wird. Es konnte ein ASGV ko-infiziertes Phytoplasma-Inokulum selektiert werden, mit dem ein *in vitro*-Screening auf Virustoleranz bzw. Hypersensitivität aller zur Verfügung stehenden AT-resistenten Genotypen durchgeführt werden konnte. Es wurden AT-resistente *M. sieboldii*-Hybride selektiert, die virustolerant sind und nun für weitere agronomische Prüfungen über Gewebekultur vermehrt werden.

Literatur

- BISOGNIN, C., B. SCHNEIDER, H. SALM, M.S. GRANDO, W. JARAUSCH, E. MOLL, E. SEEMÜLLER, 2008: Apple proliferation resistance in apomictic rootstocks and its relationship to phytoplasma concentration and simple sequence repeat genotypes. *Phytopathol.* **98**,153-158.
- JARAUSCH, W., C. BISOGNIN, B. SCHNEIDER, S. GRANDO, R. VELASCO, E. SEEMÜLLER, 2011: Breeding apple proliferation-resistant rootstocks: durability of resistance and pomological evaluation. *Bull. Insectol.* **64**, S275-S276.
- LIEBENBERG, A., A. KAPPIS, J. BARTH, M. WEITER, M. HERDEMERTENS, T. WETZEL, W. JARAUSCH, 2013: Use of micropropagated *Malus* to study latent apple viruses. *Petria* **22** (3), 393-398.
- SEEMÜLLER, E., E. MOLL, B. SCHNEIDER, 2008: Apple proliferation resistance of *Malus sieboldii*-based rootstocks in comparison to rootstocks derived from other *Malus* species. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**, 109-119.

29-2 - Charakterisierung und Auswirkungen des *Yam bean mosaic virus*

Characterisation and impact of yam bean mosaic virus

Heiko Ziebell, Bettina Heider², Jan Kreuze², Segundo Fuentes²

Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

²Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Peru

Als neu entdecktes Virus bedroht das yam bean mosaic virus (YBMV) den Anbau von Yambohnen (*Pachyrhizus* spp.) in Südamerika. Ziel dieser Kooperation mit dem International Potato Center (CIP) in Lima, Peru war die Charakterisierung des YBMV und dessen Auswirkungen auf den Ertrag von Yambohnen. Zur Diagnose von YBMV wurden polyklonale Antikörper zum serologischen Nachweis sowie loop-mediated isothermal amplification Protokolle zum molekularbiologischen Nachweis entwickelt. Wirtskreisuntersuchungen ergaben einen sehr engen Wirtskreis, der auf *Pachyrhizus* spp. sowie *Phaseolus* spp. beschränkt zu sein scheint. Desweiteren ergaben sich keine Hinweise auf einen Samenübertragbarkeit des Virus, wie es bei nahen Verwandten des YBMV der Fall ist. Die Auswirkungen der Virusinfektion auf den Ertrag von Yambohnen wurden in Feldversuchen in Peru untersucht.

29-3 - Untersuchungen zur Vektorübertragbarkeit von *Cherry leaf roll virus*

Studies on vector transmission of Cherry leaf roll virus

Juliane Langer, Susanne von Barga, Carmen Büttner

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

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) ist durch seinen breiten gattungsübergreifenden Wirtskreis innerhalb der Laub-, Obst- und Ziergehölze und seiner weltweiten Verbreitung von ökonomischer und ökologischer Bedeutung. Gerade mit aktuellem Bezug erstens zum Auftreten des CLRV in den forstwirtschaftlich bedeutenden Birkenbeständen Finnlands mit außergewöhnlich starker Symptomausprägung bis hin zu Absterbeerscheinungen, und zweitens zur deutschlandweiten Verbreitung in Birken und Holunder, kommt der Klärung der Übertragungsmechanismen des CLRV eine besondere Bedeutung zu. Neben den bekannten natürlichen Übertragungswegen über Pollen und Samen oder auch durch Wasser ist die Frage nach der Vektorübertragbarkeit des CLRV bislang nicht geklärt. In systematischen Studien untersuchen wir deshalb eine mögliche Beteiligung von biologischen Vektoren an der CLRV-Verbreitung. Erste Ergebnisse zu potentiellen Vektorspezies werden vorgestellt und diskutiert.

29-4 - Entwicklung eines Nachweisverfahrens für Pflanzenviren mittels Luminex xTAG® Technologie am Beispiel von Tospoviren und Cucumber mosaic virus

Development of a detection method for plant viruses like tospoviruses and Cucumber mosaic virus using the Luminex xTAG® Technology

Niklas Bald, Jan Bergervoet², Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, Deutschland

²Wageningen UR, Plant Research International, Biointeractions and Plant Health, Droevendaalsesteeg 1, 6708PB Wageningen, Netherlands

Es wird ein nukleinsäure-basierter Test für den Nachweis von Pflanzenviren entwickelt, der die Luminex xTAG® Technologie nutzt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass gleichzeitig bis zu 100 verschiedene Ziele nachgewiesen werden können (Dunbar 2006). Virale RNA wird in DNA transkribiert und mittels PCR vervielfältigt, während virale DNA direkt amplifiziert wird. In einer zweiten PCR wird biotinyliertes dCTP in die DNA eingebaut und es werden spezifische Primer verwendet, die Tags aus Oligonukleotiden an ihrem 5'-Ende tragen. Diese Tags sind komplementär zu Anti-Tags auf der Oberfläche von MagPlex-TAG™ Mikrokugeln, die mit unterschiedlichen Farbstoffen gefüllt sind. Die amplifizierte Ziel-DNA hybridisiert an eine bestimmte Mikrokugel über eine Interaktion des Tags mit dem Anti-Tag. Das Reporterprotein Streptavidin-R-Phycoerythrin bindet an das eingebaute Biotin in der DNA. Im Analyseinstrument regt ein roter Laser den Mikrokugelfarbstoff und ein grüner Laser das Reporterprotein zum Fluoreszieren an, was zusammen einen Nachweis für das Vorhandensein von Ziel-Nukleinsäuren ergibt. Im humanmedizinischen Bereich wurde diese Methode für den Nachweis verschiedener respiratorischer Viren benutzt (Mahony et al. 2007) und im phytopathologischen Sektor wurde sie für die Detektion von Begomoviren wie *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) und ihren Vektor *Bemisia tabaci* eingesetzt (van Brunschot et al. 2014).

Dieses Verfahren soll benutzt werden, um Cucumber mosaic virus (CMV) und die fünf Tospoviren Tomato spotted wilt virus (TSWV), Capsicum chlorosis virus (CaCV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Iris yellow spot virus (IYSV) und Wassermelone silver mottle virus (WSMoV) nachzuweisen. CMV ist ein ökonomisch bedeutsamer Krankheitserreger und weist mit mehr als 1200 Arten in über 100 Familien das größte Wirtsspektrum bei Pflanzenviren auf (Edwards & Christie 1991). Tospoviren sind allgemein von zunehmender Relevanz, da sie sich zusammen mit ihren Vektoren (Thripsen) weltweit ausbreiten (Prins & Goldbach 1998) und zu erheblichen Schäden an Kulturpflanzen führen können. Die fünf hier erwähnten Tospoviren sind im Gartenbau von Bedeutung, stellen aber nur eine erste Auswahl dar. Der Test soll später weitere Tospoviren umfassen. Bei Luminex-Tests konnten mit generischen CMV-Primern alle 22 getesteten CMV-Isolate der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in inokulierten Pflanzen nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Tospoviren wurden Primer erstellt, die alle 13 Tospoviren bzw. Tospovirus-Isolate der DSMZ erkannten oder spezifisch für eines der fünf oben aufgeführten Tospoviren waren. Diese Primer werden nun in Luminex-Tests eingesetzt.

Literatur

DUNBAR, S. A., 2006: Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin. Chim. Acta* **363** (1-2), 71-82.

EDWARDS, J. R., R. G. CHRISTIE: *CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes*. Boca Raton, CRC Press, 294-303.

MAHONY, J., S. CHONG, F. MERANTE, S. YAGHOUBIAN, T. SINHA, C. LISLE, R. JANECZKO: Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay. *J. Clin. Microbiol.* **45** (9), 2965-2970.

PRINS, M., R. GOLDBACH, 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiol.* **6** (1), 31-35.

van Brunschot, S. L., J. H. W. Bergervoet, D. E. Pagendam, M. de Weerd, A. D. W. Geering, A. Drenth, R. A. A. van der Vlugt, 2014. A bead-based suspension array for the multiplexed detection of begomoviruses and their whitefly vectors. *J. Virol. Methods* **198**, 86-94.

29-5 - Blütentest hat sich zur Prüfung von Feuerbrandmitteln bewährt

Detached blossom test is well-suited for assessment of fire blight control agents

Stefan Kunz

Bio-Protect GmbH

Der Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* verursacht an Apfel und Birne große wirtschaftliche Schäden. Im Extremfall müssen Bäume oder ganze Obstanlagen gerodet werden. Wichtiges Element der Feuerbrandbekämpfung sind sanitäre Maßnahmen um das Erregerpotenzial niedrig zu halten. Trotzdem kann es während der Blüte zu einer starken Vermehrung und Ausbreitung des Erregers und damit zu flächendeckendem Befall kommen. Monitoring des Erregers in der Blüte unterstützt die anhand von Wetterdaten errechnete Vorhersage von Infektionsterminen (Hinze et al.). Um diese Infektionen zu verhindern, benötigt der Obstbau Präparate und Strategien zur Bekämpfung von Blüteninfektionen. Seit den 1990ern werden Alternativen zum Antibiotikum Streptomycin gesucht und in Freilandversuchen mit künstlicher Inokulation wurden seither von verschiedenen Versuchsanstellern über 100 Präparate und Strategien geprüft (Kunz & Donat). Freilandversuche mit diesem Quarantäneerreger sind teuer und aufwändig. Deshalb wurde bei der Firma Bio-Protect in Zusammenarbeit mit der Universität Konstanz ein Blütentestsystem etabliert, welches eine schnelle Wirksamkeitsprüfung gegen Feuerbrand ermöglicht. In verschiedenen Entwicklungsprojekten wurde dieses System zum Screening von Wirkorganismen und zur Produktentwicklung unter anderem von Blossom Protect verwendet (Kunz, 2004, Kunz et al., 2011, Chen et al., 2009). Das Testsystem wurde so optimiert, dass die Ergebnisse mit denen aus den Freilandversuchen vergleichbar sind. Die Daten für 29 Präparate aus den letzten 15 Jahren, die sowohl im Blütensystem als auch im Freiland geprüft wurden ergaben eine gute Korrelation zwischen den Testsystemen. Mit dem Blütensystem steht eine Methode zur Verfügung, mit der der Probenumfang bei der Mittelprüfung gegen Feuerbrand deutlich erhöht werden kann. Nur im Blütensystem wirksame Präparate sollten im Freiland weiter geprüft werden.

Literatur

Chen XH, Scholz R, Borriess M, et al., 2009. Difficidin, bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology* **140**, 38-44.

Hinze M, Köhl L, Kunz S, et al. Real Time PCR Detection of *E. amylovora* on Blossoms Correlates with Subsequent Fire Blight Incidence. *Phytopathology* **submitted**.

Kunz S, 2004. Development of "Blossom-Protect" - a yeast preparation for the reduction of blossom infections by fire blight. In: Fökoe.V., ed. *11th International Conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture*. Weinsberg: FÖKO e.V., 108-14.

Kunz S, Donat C. Field results for the efficacy of fire blight control agents in the last 15 years in Germany. *Acta Hort. (ISHS)* **in press**.

Kunz S, Mendgen K, Haug P, Schmitt A, 2011. Entwicklung von Strategien zur Feuerbrandbekämpfung im ökologischen Obstbau. In.: *Organic E-Prints*.

29-6 - Tn5 Mutagenese zur Identifikation von relevanten Eigenschaften bakterieller Feuerbrand-Antagonisten im Pflanzensystem

Tn5 mutagenesis as a method for identification of essential features of Fire Blight antagonists in plant systems

Christine Hübert, Helmut Junge², Kristin Dietel², Annette Wensing, Wilhelm Jelkmann

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

²ABITEP GmbH, 2489 Berlin, Deutschland

In der Entwicklung von mikrobiellen Antagonisten für den Pflanzenschutz zeigt sich oft eine hohe Diskrepanz zwischen guten Hemmwirkungen im Laborversuch und nur mäßigen Wirkungsgraden unter Praxisbedingungen. Oft stehen für die entscheidenden Praxisversuche z.B. in der Feuer-

brandbekämpfung nur begrenzt Versuchsflächen zur Verfügung. Zusätzlich unterliegen die Freilandversuche im Vergleich zu Laborbedingungen höheren Schwankungen bedingt durch Witterungs- und wechselnde Standorteinflüssen. Eine bessere Vorauswahl der möglichen Behandlungsvarianten unter Laborbedingungen wäre daher wünschenswert, um die knappen Freilandkapazitäten besser und effektiver nutzen zu können. Die beschriebenen Mechanismen zur antagonistischen Aktivität reichen von Konkurrenz um Nahrungs- und Besiedelungsangebot bis hin zur Bildung von Komponenten mit toxischer Wirkung auf das Pathogen. Die direkte Hemmwirkung eines Antagonisten auf den Feuerbanderreger *Erwinia amylovora* durch die Bildung von Toxinen ist im Labor mit verschiedenen Methoden leicht zu quantifizieren. Auf der behandelten Blüte ist die Wirkung des Antagonisten jedoch nicht immer ausschließlich auf ein solches Toxin zurückzuführen, sondern beruht wahrscheinlich auf einem komplexen Interaktionsmechanismus. Durch den Einsatz eines modifizierten Tn5 Konstrukts (pRL27; Larson et al., 2002) lassen sich Zufallsmutationen erzeugen und auf diese Weise Genregionen unterbrechen, die einen bisher unbekanntem Einfluss auf die Hemmwirkung der Antagonisten haben können. Problematisch gestaltet sich das Screening nach Mutanten mit einer verlorenen oder verminderten Hemmaktivität, da zum einen ein hoher Durchsatz erreicht und zum anderen ein pflanzliches System eingesetzt werden soll, das mehr den Bedingungen in der Praxis entspricht. Unter Abwandlung eines von Vogel et al. (2012) an *Arabidopsis* entwickelten Testsystems wurden Tn5-Mutanten verschiedener Antagonisten auf ihre Effizienz gegenüber *E. amylovora* auf Birnenscheiben und Apfelblüten getestet. Der Einsatz eines lumineszierenden Reporterstammes von *E. amylovora* erlaubte dabei einen Durchsatz im 96-well Format für das Primärscreening. Das individuelle Wachstumsverhalten der selektierten Klone in verschiedenen Nährmedien und auf der Pflanzenoberfläche wurde ebenfalls verglichen. Das verwendete Plasmid pRL27 erlaubt zudem eine vereinfachte Identifikation der Transposon-Insertionsstelle in den selektierten Klonen, wodurch relevante Eigenschaften für antagonistische Fähigkeiten bestimmt werden können. Diese Informationen und die Entwicklung von Screening-Verfahren auf der Pflanze ermöglicht eine bessere Vorauswahl von geeigneten Antagonisten gegen den Feuerbanderreger.

Literatur

- Larsen, R. A., M. M. Wilson, A. M. Guss, W. W. Metcalf, 2002: Genetic analysis of pigment biosynthesis in using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. *Arch Microbiol* **178** (3), 193-201.
- Vogel, C., G. Innerebner J., Zingg, and J. A. Vorholt, 2012: Forward Genetic *In Planta* Screen for Identification of Plant-Protective Traits of *Sphingomonas* sp. Strain Fr1 against *Pseudomonas syringae* DC 3000. *Appl Environ Microbiol* **28** (16), 5529-5535.

29-7 - Charakterisierung bakterieller Blattfleckererger an Radies

Characterization of leaf spot causing bacteria on red radish

Inka S. Scholze, Ralf T. Vögele², Hermann-Josef Krauthausen

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz

²Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin

In den vergangenen Jahren kam es zu einem vermehrten Auftreten schwarzer und brauner Blattflecken an Radies (Krauthausen et al., 2009), einer der wichtigsten Gemüsekulturen in Rheinland-Pfalz. Da dem Blattmaterial als Frischemerkmal eine hohe Bedeutung beigemessen wird, führten auftretende Symptome zu hohen wirtschaftlichen Einbußen, obwohl die Knolle selbst nicht betroffen ist. Bei ersten Untersuchungen wurden verschiedene Bakterien, vor allem *Pseudomonaden* und *Xanthomonas campestris*, von befallenen Pflanzen isoliert. Der genaue Erregerkreis war bislang ungeklärt.

Im Rahmen eines dreijährigen BLE-Innovationsprojektes erfolgten Untersuchungen zur Identifikation des Erregerkreises und zur Klärung der biotischen und abiotischen Einflussfaktoren auf den Infektionsverlauf sowie die Entwicklung einer Screeningmethode zum Nachweis resistenter Pflan-

zen. Die Projektkoordination wurde von der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) übernommen.

Die Charakterisierung phytopathogener Pseudomonaden erfolgte zunächst anhand physiologischer Methoden (LOPAT-Charakter, BIOLOG™-System). Hierüber konnten pathogene Pseudomonaden als *P. viridiflava* und *P. syringae* klassifiziert werden. Wie ein Vergleich der Ergebnisse mit dem molekularen Fingerprint der rep-PCR zeigte, war eine zuverlässige Bestimmung der *P. syringae*-Pathovare über physiologische Methoden jedoch nicht möglich. Da sich diese Pathovare hinsichtlich ihres Wirtspflanzenspektrums unterscheiden, erfolgte darüber hinaus eine molekularbiologische Charakterisierung mittels 16s rDNA Sequenzanalyse und dem MultiLocus Sequence Typing (MLST). Dieses erfolgte mit *P. syringae*-Stämmen aus Radies, einzelnen *P. viridiflava*- und *P. fluorescens*-Stämmen aus Radies sowie *P. syringae*-Referenzstämmen aus anderen Wirtspflanzen. Sequenzdaten anderer *P. syringae*-Pathovare aus der von Almeida et al. (2010) entwickelten Plant-Associated Microbes Database (PAMDB) dienten als Referenzen. Für die Konstruktion eines phylogenetischen Baumes wurden die Sequenzen der vier housekeeping genes *gyrB*, *rpoD*, *gapA* und *gltA* verwendet. Virulenztests an Radies verdeutlichten die Bedeutung einzelner Pathovare.

Pathogene Xanthomonaden wurden über das spezifische *hrpF*-Fragment (Berg et al., 2005) detektiert und mittels semiselektiver Medien selektiert. Über Virulenztests an Radies wurde deutlich, dass sich die pathogenen Xanthomonaden anhand ihres Symptombildes in Adernschwärze- und Blattflecken-induzierende Typen unterscheiden ließen, deren phylogenetische Divergenz auch durch eine *gyrB*-Sequenzanalyse bestätigt wurde.

Über die Kombination physiologischer und molekularbiologischer Verfahren war es somit möglich, die pathogenen Erreger an Radies eindeutig als *P. viridiflava*, *P. syringae* pv. *maculicola*, *P. cannabina* pv. *alisalensis* oder *X. campestris* zu charakterisieren, wobei die beiden ersteren während der letzten Jahre am häufigsten in Rheinland-Pfalz auftraten.

Literatur

- ALMEIDA, N.F., S. YAN, R. CAI, C.R. CLARKE, C.E. MORRIS, N.W. SCHAAD, E.L. SCHUENZEL, G.H. LACY, X. SUN, J.B. JONES, J.A. CASTILLO, C.T. BULL, S. LEMAN, D.S. GUTTMAN, J.C. SETUBAL, B.A. VINATZER (2010): PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes, *Phytopathology*, **100** (3), 208-215.
- BERG, T., L. TESORIERO, D.L. HAILSTONES (2005): PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed, *Plant Pathol.*, **54** (3), 416-427.
- KRAUTHAUSEN, H.-J., G. HOERNER, N. LAUN, (2009): Bakterielle Blattflecken-Erreger an Radies, *Gemüse*, **45**, 12-13.