
Sektion 9 – Virologie / Bakteriologie / Mykologie I

09-1 - Rose, H.¹⁾; Heinze, C.²⁾; Maiss, E.¹⁾

¹⁾ Leibniz Universität Hannover

²⁾ Universität Hamburg

Markierung des Tabakmosaikvirus mit dem Gen für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP)

Labelling of Tobacco mosaic virus with gfp (green fluorescent protein)

Das Tabakmosaikvirus (TMV) ist dem Genus *Tobamovirus* zugeordnet und besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einer Größe von 6392 Nukleotiden. Um die Bedeutung einzelner Sequenzbereiche für den Kurz- und Langstreckentransport zu bestimmen, wird das Ausbreitungsverhalten unterschiedlicher TMV-Mutanten untersucht. Hierfür wurde das TMV mit dem Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) markiert, wobei die Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung in *Nicotiana benthamiana* erhalten bleiben sollte.

Die Expression der TMV Proteine erfolgt über die Bildung und anschließende Translation subgenomischer RNAs. Für die Markierung mit GFP wurde ein Mechanismus genutzt, bei dem das Reporterprotein während der Translation der subgenomischen RNAs des TMV "abgespalten" wird, wodurch es anschließend getrennt vom viralen Protein vorliegt. Dazu erfolgte der Einbau einer 19 Aminosäuren langen Variante des p2A-Peptids des Maul- und Klauenseuche Virus vor das Hüllprotein. Durch den nachfolgenden Einsatz kompatibler Restriktionsschnittstellen und anschließender gerichteter Klonierung wurde die GFP-Sequenz vor die p2A-Sequenz eingesetzt. Die Translation wird innerhalb des p2A-Peptids zwischen Aminosäure 16 (Glycin) und 17 (Prolin) unterbrochen, wodurch eine Art "Selbstspaltung" stattfindet. Die zuvor durch das p2A-Peptid verbundenen Proteine, GFP und Hüllprotein, liegen nach der Spaltung getrennt voneinander vor.

Sechs bis acht Tage nach der Inokulation von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen waren typische systemische Symptome einer TMV-Infektion sichtbar, wie mosaikartige Aufhellung der jüngeren Blätter sowie deren Einrollen. Gleichzeitig konnte die Expression des GFP in den Blättern durch UV-Detektion festgestellt werden. Zusätzlich wurde das GFP auf Zellebene im Epifluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde jedoch gezeigt, dass das GFP nicht vollständig vom Hüllprotein getrennt wurde. Es steht somit ein effizientes System zur Verfügung, mit dem die Ausbreitung und Verteilung des TMV in Wirtspflanzen untersucht werden kann. Hierzu wurden eine spontan aufgetretene Mutation im Movement Protein (MP) sowie künstlich erzeugte Deletionen in diesem Protein untersucht. Das MP enthält verschiedene Domänen, die zum Beispiel an einer Proteinfaltung, der RNA-Bindung, der Erweiterung des Plasmodesmenlumens, der Proteinestabilität sowie der Membranverankerung mitwirken. Der natürlich aufgetretenen Deletionsmutante fehlt die Proteinfaltungsdomäne, eine der RNA-Bindedomänen und etwa die Hälfte der Domäne für die Erweiterung des Plasmodesmenlumens. Bei den künstlich erzeugten MP-Mutationen wurden verschiedene dieser Domänen selektiv entfernt. Das Ausbreitungsverhalten der TMV Mutanten wurde unter zur Hilfenahme des GFP-markierten TMV untersucht.

Die Ergebnisse werden im Einzelnen vorgestellt und diskutiert.

09-2 - Menzel, W.¹⁾; Hamed, K.²⁾; Winter, S.¹⁾

¹⁾ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

²⁾ Agricultural Research Corporation, Eddamer, Sudan

Neu auftretende und neue Viren in Zwiebeln und Knoblauch im Sudan

Emerging and new viruses in onion and garlic in Sudan

Speisezwiebeln gehören zu den bedeutendsten Gemüsekulturen im Sudan. Entsprechend der FAO Statistik wurden im Jahr 2009 im Sudan Zwiebeln auf 7.338 Hektar angebaut, mit einem Ertrag von 86.000 Tonnen. Beim Zwiebelanbau können Viruserkrankungen einen erheblichen Einfluss auf den Ertrag und die Qualität haben. In einem Survey im Anbaugebiet in Nord-Kharthoum (Sudan) im Jahr 2010 konnten neben den bereits im Sudan bekannten Viren auch erstmals das *Shallot virus X* (ShVX, Gattung *Allexivirus*) und das *Garlic common latent virus* (GarCLV, Gattung *Carlavirus*) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden über die Extraktion viraler dsRNA aus erkrankten Zwiebeln und Knoblauch 3 neue, bisher unbeschriebene Virusspezies entdeckt. Die voll-

ständigen RNA Genome wurden ermittelt. Vergleiche mit Sequenzen der Genbank ergaben, dass es sich um ein Virus der Familie Partitiviridae, eines mit Ähnlichkeiten zum *Southern tomato virus* (STV), welches bisher keiner höheren taxonomischen Ordnung zugeordnet wird, und eines mit Ähnlichkeiten zu Viren der Familie Tombusviridae handelt. Dies weist jedoch eine für Tombusviren bisher unbekannte Genomorganisation auf. Die Sequenzähnlichkeiten liegen für die neuen Viren unterhalb den bekannten Spezies-Demarkationsgrenzen. Untersuchungen von Sämlingen haben eine Samenübertragbarkeit des Virus der Familie Partitiviridae und des Virus mit den Ähnlichkeiten zum STV ergeben. Das Vorkommen der beiden durch Samen übertragbaren Viren in in Deutschland gehandelten Zwiebeln und Knoblauch konnte gezeigt werden.

09-3 - Rabenstein, F.¹⁾; Maiss, E.²⁾; Marthe, F.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Leibniz Universität Hannover

Identifizierung, Charakterisierung und Nachweis von Viren an Zitronenmelisse (*Melissa officinalis* L.) in Deutschland

Identification, characterization and detection of viruses on lemon balm (Melissa officinalis L.) in Germany

Über Viruskrankheiten an Melisse (*Melissa officinalis* L.) in Deutschland ist bisher wenig bekannt. Lediglich das "Ringmosaik der Zitronenmelisse" wurde bisher von SCHMIDT und SCHMELZER (1976) beschrieben, das durch eine Mischinfektion mit dem *Tobacco rattle virus* (TRV) und dem „potato bouquet“ Serotyp des *Tomato black ring virus* (TBRV) verursacht wird. Dalchow (1998) bestätigte das Auftreten des TRV an *M. officinalis*.

Im Rahmen eines im Julius Kühn-Institut in Quedlinburg laufenden Projektes zur züchterischen Bearbeitung von Zitronenmelisse wurden an zahlreichen verklonten Genotypen virusverdächtige Symptome beobachtet. Aus zwei näher untersuchten Klonen konnte ein bisher unbekanntes Virus isoliert werden. Mittels elektronenmikroskopischer, serologischer und molekularer Methoden wurde dieses Isolat als ein neue Virusspezies innerhalb der Familie Potyviridae (Genus *Potyvirus*) identifiziert, für das der Name "*Melissa virus Y*" (MeVY) vorgeschlagen wird. Für den Routinenachweis konnte ein DAS-ELISA entwickelt werden, der jedoch nicht alle Symptomtragenden Klone erfasste und somit das Vorhandensein weitere Viren vermuten lässt.

Neben dem MeVY konnte bisher ein nicht näher charakterisiertes stäbchenförmiges Virus in einzelnen Klonen gefunden werden, das vermutlich dem Genus *Tobamovirus* angehört. Tieferegehende Untersuchungen sind erforderlich, um das Vorkommen weiterer Viren zu analysieren und deren Epidemiologie und wirtschaftliche Bedeutung für den Anbau von Melisse aufzuklären. Die Entwicklung und Verfügbarkeit empfindlicher Nachweismethoden ist hierfür eine grundlegende Voraussetzung.

09-4 - Richert-Pöggeler, K.¹⁾; Maaß, C.¹⁾; Schuhmann, S.¹⁾; Blockus, S.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Leibniz Universität Hannover

Elektronenmikroskopischer Nachweis von Carlaviren in Deutschland, 2007 bis 2012

Carlavirus detection using electron microscopy

Wie der Name des „type member“ Carnation latent virus andeutet, ist eine visuelle Diagnose aufgrund fehlender Symptome in manchen Wirtspflanzen nicht möglich, bzw. Mischinfektionen mit anderen Viren lassen keine eindeutige Zuordnung von Symptomen zu. Hier bietet der elektronenmikroskopische Nachweis mehrere Vorteile: Carlaviren lassen sich im Adsorptionspräparat gut nachweisen und Mischinfektionen mit Viren, die eine andere Partikelmorphologie besitzen, können sofort erkannt werden. Für eine weitere Charakterisierung stehen serologische (ISEM, Dekoration) und zytologische (Ultradünnschnitte) Methoden zur Verfügung. Als Beispiel wird die Identifikation des *Helleborus net necrosis virus* in Christrosen beschrieben, das wir 2008 erstmals nachweisen konnten.

09-5 - Arntjen, A.¹⁾; Maiss, E.²⁾; Jelkmann, W.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Leibniz Universität Hannover

Generation of in vitro RNA transcripts and infectious full-length cDNA clones of ASPV and ASGV

Generation of in vitro RNA transcripts and infectious full-length cDNA clones of ASPV and ASGV

Apple stem pitting virus (ASPV), *Apple stem grooving virus* (ASGV), and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) are the three most common latent viruses in apple worldwide. These viruses are highly variable and infect several woody host plants with different symptoms. Infectious cDNA clones provide the opportunity to study pathogenicity and symptomatology of a determined variant of a virus. Two strategies for the generation of an infectious full-length cDNA clone of ASPV were attempted. Initially a ligation strategy was attempted by subdividing the genome of ASPV isolate PB 66 into three fragments. These were ligated into the plasmid p1657 containing the 35S promoter. Due to an incomplete 5'-end of the sequence the resulting cDNA clones showed no infectivity on different host plants. The second strategy was based on PCR of the full length of ASPV and ASGV. Comparison of the 5'- and 3'-end of different ASPV isolates showed highly conserved domains which were used as primers for PCR. Generation of infectious in vitro RNA transcripts of ASPV and ASGV were obtained by the addition of the T7 promoter sequence to the forward primers of full-length PCR fragments. *In vitro* RNA transcripts of ASGV infected 5 out of 6 mechanically inoculated *Nicotiana occidentalis* 37B plants, whereas transcripts of ASPV infected only 4 out of 42 tobacco plants. The Circular Polymerase Extension Cloning method (CPEC) was used to generate an infectious full-length cDNA clone of ASPV and ASGV in pBin V297. *N. occidentalis* 37B plants were infected by inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* containing the pBin vector with the full-length cDNA clone for both viruses. The infection rates were 3% for ASPV and 22% for ASGV.

09-6 - Eltlbany, N.¹⁾; Prokscha, Z.-Z.¹⁾; Castaneda-Ojeda, M. P. ²⁾; Heuer, H. ¹⁾; Wohanka, W. ³⁾; Ramos, C. ²⁾; Smalla, K. ¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Universidad de Malaga, Spanien

³⁾ Forschungsanstalt Geisenheim

Rolle von Plasmiden für die Diversifizierung und Anpassung des Phytopathogens *Pseudomonas savastanoi*

Mandevilla sanderii erfreut sich seit einigen Jahren großer Beliebtheit als üppig blühende Balkon- und Gartenpflanze. Seit 2008 haben jedoch Blattflecken und tumorartige Veränderungen des Stamms, verursacht durch *Pseudomonas savastanoi*, Züchtern erhebliche wirtschaftliche Schäden verursacht. Basierend auf BOX-Fingerprints konnte gezeigt werden, dass Isolate von *Mandevilla sanderii* eine große Ähnlichkeit mit Isolaten von Oliven, Oleander, Jasmin und Liguster haben. Alle untersuchten *Pseudomonas savastanoi* Isolate enthalten Plasmide, deren Diversität in dieser Studie durch Restriktionsverdau, Hybridisierungen charakterisiert wurden. Die Sequenzierung verschiedener Plasmid-lokalisierter Gene (*iaaM*, *iaaL*, *repA*, *hopAO1*) des Isolats Ph4 von *Mandevilla sanderii* gab Hinweise auf einen gemeinsamen Ursprung der für die Interaktion mit Wirtspflanzen wichtigen Plasmide. Ein spezifisches und sensitives Verfahren zum Nachweis des Erregers in Pflanzenmaterial wurde basierend auf PCR- und Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde etabliert.

09-7 - Dircks, C.¹⁾; Franke, L.²⁾; Bürcky, K.³⁾; Zellner, M.⁴⁾; Varrelmann, M. ¹⁾

¹⁾ Institut für Zuckerrübenforschung

²⁾ Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

³⁾ Kuratorium für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau

⁴⁾ Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Usage of bait plants as indicators for the *Rhizoctonia solani* infection inoculum in a crop rotation field trial

Einsatz von Fangpflanzen als Indikatoren für das Rhizoctonia solani Infektionspotential in einem Fruchtfolgeversuch

Rhizoctonia solani AG2-2IIIB is an endemic soilborne fungus and known as the causal agent of crown and root rot of sugar beet. Cultivation of *R. solani* resistant sugar beet cultivars and an appropriate crop rotation are the actual measures against *R. solani*. However, the *R. solani* resistant cultivars display about 10 % lower yield under

non-*R. solani* conditions. The infection potential of *R. solani* in the soil is the basis for the occurrence of crown and root rot. Therefore, for sugar beet growers it would be desirable getting a prediction about the *R. solani* infection potential before sowing.

Growth of bait-plants was performed in the third year of a four-year crop rotation trial with sugar beet-maize/winter wheat-maize/winter wheat-sugar beet. The bait plants *Vicia faba* and 4-week old sugar beet plants were sown/planted in 4 week period into maize (host plant) and wheat (non host plant) plots. After 4 or 8 weeks the bait plants were harvested and disease symptoms evaluated. Additionally in July and September soil samples were taken, verifying the results of the bait plants in the field under controlled greenhouse conditions. *V. faba* and the sugar beets both showed higher disease severity in maize than in wheat plots in the field as well as in the greenhouse assay. The severe symptoms of the bait plant roots in the maize plots indicate a higher *R. solani* infection potential. The usage of these bait plants for estimation and prediction of the *R. solani* infection potential is discussed.

09-8 - Wensing, A.; Müller, I.; Geider, K.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Bakteriozin Bildung im Feuerbrand-Antagonisten *Erwinia tasmaniensis*

Bacteriocin production of the fire blight antagonist Erwinia tasmaniensis

Unter Stressbedingungen produzieren viele Bakterien Toxine mit einem engen Wirkungsspektrum, das vorrangig gegen eng verwandte Arten oder sogar Stämme der eigenen Art gerichtet ist. Die Klasse der Bakteriozine zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus. Der Feuerbrand-Antagonist *Erwinia tasmaniensis* unterscheidet sich von anderen Epiphyten durch eine hohe Anpassung an das Blütenhabitat. In Freilandversuchen zur Feuerbrandbekämpfung zeigt er eine gute Wirkung gegen den eng verwandten Erreger *Erwinia amylovora*. In der Sequenzanalyse des australischen Typstamms Et1/99 wurde ein Operon mit hoher Ähnlichkeit zu zwei Bakteriozin-Clustern aus *Klebsiella oxytoca* identifiziert. Die entsprechenden Bereiche zu Klebicin C, D und Tasmancin zeigen einen ähnlichen Aufbau und enthalten neben Genen für ein Aktivitäts- und ein Immunprotein noch einen zusätzlichen open-reading-frame mit Ähnlichkeiten zu Phagen-bezogenen Genen unbekannter Funktion.

Das Wirkungsspektrum sowie die Verbreitung der Tasmancin Biosynthese wurden untersucht. Über Mutagenese und Plasmidtransfer wurde die Funktion des Tasmancin-Clusters genauer analysiert.