

**PROGRAMM DES 43. JAHRESTREFFENS DES DPG-ARBEITSKREISES
"VIRUSKRANKHEITEN DER PFLANZEN"
AM 31. MÄRZ + 1 APRIL 2011**

Großer Sitzungssaal des Julius Kühn Instituts (JKI), Messeweg 11-12

Donnerstag, 31. März 2011	
13:00 – 13:20	Anreise und Tagungsanmeldung im Vorraum des Großen Sitzungssaals des Julius Kühn Instituts (JKI), Messeweg 11-12
13:20 – 13:30	Stephan Winter & Heinrich-Josef Vetten: Begrüßung & Organisatorische Bekanntmachungen
13:30 – 15:00	Sektion I: Moderation Edgar Maiss
13:30 – 14:10	Gastvortrag Genetic recombination in plant RNA viruses: the example of brome mosaic virus Jozsef Bujarski, USA
14:10 – 14:30	Tobacco rattle virus (TRV)-Infektionen in Alstroemeria und Tulpen: Deletionen und Rekombinationen mit den 3'-Enden unterschiedlicher tobaviraler RNA 1-Spezies haben zu einer Vielzahl von TRV-TCM-verwandten RNA 2-Spezies geführt <i>Koenig, R., Lesemann, D.-E., Pfeilstetter, E., Winter, S.</i>
14:30 – 14:50	Gewebe-spezifischer Einfluss von Geminiviren auf die somatische homologe Rekombination der Wirtspflanze <i>Richter, K., Kleinow, T., Jeske, H.</i>
14:50 – 15:40	KAFFEE-/TEEPAUSE (Poster Session)
15:40 – 18:00	Sektion II: Moderation Stephan Winter
15:40 – 16:00	Untersuchungsmethoden der Elektronenmikroskopie für die Pathogendiagnose <i>Richert-Pöggeler, K., Maaß, C., Schuhmann, S., Zimmermann, E.</i>
16:00 – 16:20	European nanoviruses: Identification of three new species and new DNA components <i>Grigoras, I., Timchenko, T., Gronenborn, B., Vetten, H.-J.</i>
16:20 – 16:40	Ein für Deutschland neues bodenbürtiges Furovirus an Wintergerste <i>Rabenstein, F., Fomitcheva, V., Kühne, T.</i>
16:40 – 17:00	Sind serologisch eng mit dem Cowpea mild mottle virus verwandte Carlaviren abweichende Isolate oder verschiedene Spezies? <i>Menzel, W., Hamed, K., Winter, S., Vetten, H.-J.</i>
17:00 – 17:10	PAUSE
17:10 – 17:30	Real-Time-PCR in der Kartoffelforschung - vielfältige Einsatzmöglichkeiten am Beispiel des quantitativen Nachweises von Potato virus Y in Kartoffelpflanzen und Aphiden <i>Hühnlein, A., Schubert, J., Thieme, T., Schliephake, E.</i>
17:30 – 17:50	Herstellung eines infektiösen Klons des Hop latent virus <i>Ziegler, A., Schubert, J.</i>
17:50 – 18:10	Herstellung infektiöser Volllängklone durch Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) <i>Maiss, E.</i>
18:10 – 18:20	Vorschlag für ein bundesweites Pflanzenvirologie-Projekt <i>Adam, G.</i>
18:20 – 19:00	Allgemeines
ab 19:00	Abendessen und Gemütliches Beisammensein im Gewächshaus

Freitag, 1. April 2011

09:00 – 10:30	Sektion III: Moderation Bruno Gronenborn
09:00 – 09:30	Einführungsvortrag Circomics of geminiviruses <i>Jeske, H., Krenz, B., Horn, J., Wyant, P., Paprotka, T.</i>
09:30 – 09:50	Inter-species complementation of Old and New World begomoviruses in spread: "Artificial" two-component infections dissect virus-plant-interactions <i>Deuschle, K., Saalfank, H., Kober, S., Krenz, B., Wege, C.</i>
09:50 – 10:10	Changes in the architecture of nuclei and nuclear membranes evoke a novel intracellular traffic route of plant DNA viruses <i>Kleinow, T., Krenz, B., Kepp, G., Neugert, F., Wege, C., Jeske, H.</i>
10:10 – 11:00	KAFFEE-/TEEPAUSE (Poster Session)
11:00 – 12:40	Sektion IV: Moderation Christina Wege
11:00 – 11:20	Methylierung geminiviraler DNA <i>Deuschle, K., Paprotka, T., Metzler, V., Jeske, H.</i>
11:20 – 11:40	Wie verhalten sich Begomoviren unterschiedlicher Pathogenität bei inaktivierter RNA-abhängiger RNA-Polymerase 6 (RDR6)? <i>Schnepf, V., Vo, D., Wege, C.</i>
11:40 – 12:00	Ein RNase III Enzym des Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV) als ein Suppressor von RNA Silencing <i>Weinheimer, I., Rajamäk, M.-L., Cuellar, W., Kreuze, J.-F., Valkonen, J.-P.T.</i>
12:00 – 12:20	Modifizierung der Wirt-Vektor-Beziehung durch das Cucumber mosaic virus 2b-Protein <i>Ziebell, H., Murphy, A., Lewsey, M., Westwood, J., Du, Z., Tungadi, T., Moulin, M., Smith, A., Stevens, M., Carr, J.</i>
12:20 – 12:40	HSP70 implication in the transmission of mono- and bipartite begomoviruses by the whitefly Bemisia tabaci B biotype <i>Kollenberg, M., Götz, M., Popovski, S², Czosnek, H., Winter, S., Ghanim, M.</i>
anschließend	Tagungsende

Poster

1 A new badnavirus infecting enset (*Ensete ventricosum*, Musaceae) in Ethiopia

Abraham, A., Menzel, W., Winter, S.

2 Functionalization on a nanoscale: Tobacco mosaic virus exposing antibodies

Bartels, M., Mangold, S., Brodbeck, D., Eiben, S., Eber, F., Kadri, A., Kontermann, R., Jeske, H., Wege, C.

3 Gewebespezifische und temperaturabhängige Rizomania-Resistenz in Rz1 Zuckerrübenhybriden

Bornemann, K., Varrelmann, M.

4 Distribution of symptom determinants on the Arabis Mosaic Nepovirus genomic RNA2

Dupuis, L., Hember, C., Dunoyer, P., Bassler, A., Keller, M., Wetzel, T.

5 RNA-directed in vitro assembly of mixed Tobacco mosaic virus coat proteins derived from *E. coli* and plants

Eiben, S., Eber, F., Jeske, H., Wege, C.

6 Virussympptome an Zierpflanzenarten

Hamacher, J.

7 Untersuchungen der Interaktion zwischen dem Beet necrotic yellow vein virus Pathogenitätsfaktor P25 und einem putativen Auxin-induzierbaren Transkriptionsfaktor aus *Beta vulgaris* und der subzellulären Ko-Lokalisation

Thiel, H., Varrelmann, M.

8 HSP70 implication in the transmission of mono- and bipartite begomoviruses by the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype

Kollenberg, M., Götz, M., Popovski, S., Czosnek, H., Winter, S., Ghanim, M.

9 Molekulare Analyse des Genus Betacryptovirus der Familie Partitiviridae

Lesker, T., Maiß, E.

10 DsRNA-Screening an *Asparagus officinalis*

Lesker, T., Blockus, S., Maiß, E.

11 Binding of small double-stranded RNAs by a plant viral suppressor is enhanced by a member of the plant cupin superfamily

Füllgrabe, M., Boonrod, K., Rana, J.

12 Expression des African cassava mosaic virus AC4-Proteins in *S.pombe* und seine Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Rau, P., Hipp, K., Kleinow, T., Jeske, H.

13 Vergleich der Nucleocapsidsequenz des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) aus schwedischen Ebereschen mit anderen Standorten

Robel, J., Arndt, N., von Barga, S., Jalkanen, R., Büttner, C.

14 Monitoring von Hopfen auf Hop Stunt Viroid

Seigner, L., Anton, L., Seigner, E.

15 Ektopische Expression des ACMV Hüllproteins und Entwicklung von in vitro Bindungsstudien

Stachorski, L., Hipp, K., Kleinow, T., Kadri, A., Jeske, H.

16 Die Reaktionen von Abutilon mosaic virus und Tomato yellow leaf curl Sardinia virus auf Inaktivierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase 6 in Nicotiana benthamiana

Vo, D., Schnepf, V., Wege, C.

17 Die Helferkomponente-Protease (HC-Pro) des Plum pox virus interagiert in einem bimolekularen Fluoreszenzkomplementations (BiFC)-Assay in Nicotiana benthamiana nicht mit sich selbst.

Zilian, E., Maiß, E.

Circomics of geminiviruses

Jeske, Holger¹, Krenz, Björn¹, Horn, Judith¹, Wyant, Patricia¹, Paprotka, Tobias¹

¹Universität Stuttgart

Contact: holger.jeske@bio.uni-stuttgart.de

“Circomics” is coined to describe the combination of RCA-based diagnosis of viruses with small circular DNA, deep sequencing, and cell-free construction of recombinant molecules in order to learn more about functional genomics and population genetics of geminiviruses. During a three years European project and two international summer schools on this topic, we have collected valuable experience that will be presented. Batch sequencing of 50 isolates revealed 79 geminiviral DNA components and satellite DNAs from all over the world within two weeks. Population structures of three geminiviruses have been analysed in further detail. A rational bioinformatic comparison of RFLP patterns and batch sequencing data will be explained and the consequences of the accumulating information on a meaningful naming of geminiviruses will be discussed.

A new badnavirus infecting enset (*Ensete ventricosum*, Musaceae) in Ethiopia

Abraham, Adane¹, Menzel, Wulf², Winter, Stephan²

¹Ethiopian Institute of Agricultural Research, Holetta Agricultural Research Center, P.O.Box 2003, Addis Ababa, Ethiopia

²DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig

Contact: adaneabraham@yahoo.com

Enset [*Ensete ventricosum* Cheesman, (Syn. *Musa ensete* Gmel)] and banana (*Musa* spp.) are two taxonomically and morphologically related horticultural crops widely cultivated in Ethiopia. Enset is a staple food crop for over 15 million people in southern Ethiopia while banana is an important fruit crop. Although virus-like diseases are commonly observed on these crops, little information is available on the identity of the associated viruses. Badnaviruses represent the main group of viruses infecting banana and related crops. To identify badnaviruses infecting enset, we used a rolling circle amplification (RCA) strategy on DNA extracted from suspected samples followed by using its product as template in a PCR with degenerated badnavirus primers. Based on the sequence of the fragment obtained, an outward directed virus-specific primer pair was designed and used in an inverse PCR which gave a

product of ca. 6 kbp. After sequencing, the complete genome of a putatively new badnavirus species (7163 bp) was obtained. The virus has genome properties typical of the genus Badnavirus with three ORFs predicted to encode proteins of the following sizes: ORF1, 21.5 kDa; ORF2, 14.5 kDa and ORF3, 202.5 kDa. Electron microscopy of leaf dip preparations of the studied sample showed the presence of bacilliform particles. BLAST search and comparison with other badnaviruses using the complete nucleotide sequences showed that the new virus is most closely related to a badnavirus from sugarcane (73.6%), which has been recently entered to the database (virus species not clearly named) followed by Banana streak Mysore virus (60.8%). Based on the current species demarcation criteria of the genus Badnavirus, the new virus is sufficiently distinct from all known viruses and hence should be considered as a distinct species for which the name Enset streak virus (ESV) is suggested. The badnavirus was detected from several enset samples using virus specific primers based on the sequence obtained. In addition, Banana streak OL virus (BSOLV), which could not be detected in enset samples, was identified in some banana samples originating from Ethiopia. These results suggest that distinct badnavirus species infect enset and banana crops in Ethiopia.

Gewebespezifische und temperaturabhängige Rizomania-Resistenz in Rz1 Zuckerrübenhybriden

Bornemann, Kathrin¹, Varrelmann, Mark¹

¹Institut für Zuckerrübenforschung, Holtenser Landstr. 77, 37079 Göttingen

Contact: varrelmann@ifz-goettingen.de

Die Rizomania in Zuckerrüben wird durch das Benyvirus *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) erzeugt und führt zu erheblichen Ertragseinbußen. Die Krankheit wird nahezu ausschließlich durch den Anbau toleranter Sorten kontrolliert, die das *Rz1*-Majorresistenzgen besitzen. Seit einigen Jahren treten in den USA und Spanien in klimatisch wärmeren Regionen mit künstlicher Bewässerung BNYVV-Isolate mit bestimmten Mutationen auf, die in der Lage sind, diese Resistenz zu überwinden und sich vermehrt in Seitenwurzeln und im Rübenkörper zu replizieren. Unklar ist, ob die Replikation und damit die Variabilität von BNYVV durch erhöhte Temperaturen und Feuchtigkeit gefördert werden und ob eine Abhängigkeit der Resistenz von Umweltfaktoren besteht. Eine mechanische Blattinfektion zeigte, dass eine offensichtliche *Rz1*-unabhängige Ausbildung von Lokalläsionen das Virus an seiner Ausbreitung hindert. Zusätzlich zu Gewächshausversuchen mit natürlicher Infektion über den Boden mittels *Polymyxa betae* wurde geprüft, inwieweit eine Temperaturabhängigkeit beider gewebespezifischer Resistenzphänotypen besteht.

Die BNYVV-Blattinfektion von Zuckerrüben genotypen unterschiedlicher Anfälligkeit bei Temperaturen von 18°, 24° und 30°C zeigte eine starke Temperaturabhängigkeit der Ausbildung von Lokalläsionen. Bei einer Temperaturerhöhung von 18°C auf 24°C wiesen die Läsionen nach vier Wochen einen vergrößerten Durchmesser und einen erhöhten Virusgehalt auf. Durch Temperaturen von 30°C wurde die Läsionsbildung stark unterdrückt und eine teilsystemische Ausbreitung des Virus nachgewiesen. Die Virusgehalte waren jedoch stark reduziert. Diese Veränderungen des Virusgehaltes waren insgesamt *Rz1*-unabhängig.

Darüber hinaus wurde die temperaturabhängige *Rz1*-Resistenz nach natürlicher Bodeninfektion und mechanischer Wurzelinfektion untersucht. Dabei konnte sechs Wochen nach Infektion in Pflanzen des anfälligen Genotyps bei zunehmenden Temperaturen (18°, 24° und 30°C) unabhängig von der Art der Infektion ein sinkender Virusgehalt nachgewiesen werden. Im resistenten Genotyp war bei natürlicher Infektion eine Temperaturstabilität der Resistenz zu beobachten. Bei mechanischer Infektion war jedoch bei 24°C ein erhöhter Virusgehalt nachzuweisen. Aus den erhobenen Daten lässt sich eine gewebespezifische Expression der *Rz1*-Resistenz ableiten und eine temperaturabhängige hypersensitive Resistenzreaktion im Blatt vermuten. Die *Rz1*-Resistenz erscheint jedoch unter natürlichen Infektionsbedingungen temperaturstabil. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob „RNA-silencing“ Ursache für die beobachtete Temperaturabhängigkeit sowohl in Blatt als auch Wurzelgewebe ist.

Inter-species complementation of Old and New World begomoviruses in spread: "Artificial" two-component infections dissect virus-plant-interactions

Deuschle, Kathrin¹, Saalfank, Heike¹, Kober, Sigrid¹, Krenz, Björn¹, Wege, Christina¹

¹University of Stuttgart, Institute of Biology, Dpt. of Molecular Biology and Plant Virology, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Germany

Contact: christina.wege@bio.uni-stuttgart.de

Tomato-infecting begomoviruses have realized distinct concepts of genome organization and utilization. Whereas the Old World *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) harbours a single ssDNA circle fulfilling all functions, New World viruses such as *Abutilon mosaic virus* (AbMV) express two movement-associated proteins from a separate DNA B. Their mode of action differs from the transport system of TYLCSV. Unexpectedly, we have discovered that TYLCSV may not only fully replace the AbMV DNA B for long-distance spread in *N. benthamiana*, but can even perpetuate and intensify systemic establishment of AbMV DNA A.

This was shown by Southern analyses, and by extensive tracing of a GFP-expressing AbMV- Δ CP-DNA A longitudinally along stems, which prove that AbMV CP was not essential in the interaction. Cross-slicing of whole stems revealed that TYLCSV sustained continuous infiltration of many cells in the inner and outer phloem by AbMV A, ongoing throughout the host's lifespan. This dramatically differed from its behaviour with cognate DNA B, when - after a peak - AbMV A accumulation soon ceased and remained limited to only few productive cells in newly grown tissues. *In situ* hybridisation on systemic organs and on isolated nuclei revealed that both types of viral DNAs did not share same, but segregated into distinct nuclei. This was strikingly different from co-infections with closely related begomoviruses, which co-invaded numerous cells. This hints at an indirect support of AbMV by TYLCSV, e.g. *via* its silencing suppression system, rather than at a direct gating or even a physical co-transport through plasmodesmata.

DISTRIBUTION OF SYMPTOM DETERMINANTS ON THE ARABIS MOSAIC NEPOVIRUS GENOMIC RNA2

Dupuis, Laurence¹, Himber, Christophe², Dunoyer, Patrice², Bassler, Alexandra¹, Keller, Mario², Wetzel, Thierry¹

¹RLP Agrosience, AlPlanta, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Germany

²IBMP-CNRS, 12 rue du General Zimmer, 67084 STRASBOURG Cedex, France

Contact: thierry.wetzel@agrosience.rlp.de

Arabis mosaic virus (ArMV) belongs to the plant virus genus *Nepovirus* of the family *Comoviridae*. In the wine producing areas southwest of Germany, including Neustadt an der Weinstrasse (NW), ArMV is, along with the Grapevine fanleaf virus (GFLV) and the Raspberry ringspot virus (RpRSV), two other nepoviruses, a causative agent of the grapevine fanleaf disease, one of the most widespread and damaging virus diseases affecting grapevine. Nepoviruses have two single-stranded positive sense genomic RNAs, which are linked to a VPg at their 5' ends, and polyadenylated at their 3' ends. While ArMV-NW produces no symptoms on *Chenopodium quinoa*, ArMV-lilac and -Lv, isolated from lilac and privet respectively, produce chlorotic symptoms and extremely severe symptoms eventually leading to the death of the plant. The availability of full-length infectious clones of ArMV-NW (under the control of a double 35S promoter) allowed the generation of chimeric constructs between ArMV-NW and ArMV-lilac or -Lv. These clones were assessed in mechanical inoculation assays on *Chenopodium quinoa* for their infectivity and their symptomatology. The results with chimeric constructs between RNAs 2 seem to indicate that the N-terminal region of the 2A gene, but also regions in the movement and coat proteins are involved in the development of symptoms on *Chenopodium quinoa*.

RNA-directed in vitro assembly of mixed Tobacco mosaic virus coat proteins derived from *E. coli* and plants

Eiben, Sabine¹, Eber, Fabian¹, Jeske, Holger¹, Wege, Christina¹

¹Universität Stuttgart, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Deutschland

Contact: sabine.eiben@bio.uni-stuttgart.de

Tobacco mosaic virus (TMV) is one of the most interesting viruses for the application as a structural scaffold in nanotechnology. This is due to its outer dimensions, a hollow rod of 300 nm length and 18 nm in diameter, but also due to its chemical and temperature stability. Different researchers have shown that it is possible to generate particles of altered length, change their outer surface or inner channel properties both genetically and chemically, and to immobilize virus-like particles (VLPs) to several substrates. These modifications have been used for example to mineralise or metallise VLPs. One of the remaining challenges is that some TMV coat protein (CP) mutants interfere with self assembly and therefore, concomitantly, with their propagation in plants. However, numerous intended applications do not depend on particles of which each CP subunit is modified; therefore mixed assembly could constitute an alternative route to functionalised VLPs. It has already been shown that it is possible to express TMV CP in *E. coli*, but up to now, *in vitro* assembly with *E. coli*-derived CP species in combination with specific RNA has failed in different laboratories. We therefore have combined an *E. coli*-expressed mutant CP species elongated by a C-terminal His₆-tag with wildtype CP from plants, upon *in vitro* assembly with RNAs of different length. VLPs of the predicted defined length were efficiently generated and the incorporation of the *E. coli*-derived CP mutant proven by several tests, amongst others employing His₆-specific antibodies. Hence, the "protein-blend-technology" is a versatile procedure facilitating the exposure of bacterially expressed functionalities on TMV backbones.

Virussyptome an Zierpflanzenarten

Hamacher, Joachim¹

¹INRES Uni Bonn, Pflanzenkrankheiten, Nussallee 9, 53115 Bonn, NRW

Contact: hamacher@uni-bonn.de

Virussyptome an Zierpflanzenarten

Es werden typische Symptome von Zierpflanzenvirosen, die am Agro-Horti-Testlabor diagnostiziert wurden dargestellt. Als Beispiele werden Virose an Impatiens (BaCV, CMV, CVB, IFBV, INSV, TMGMV, TVCV) Petunien/Calibrachoa (AMV, BaCV, CbMV, INSV, Panaschüren, PVY, TMV, TVCV) und Pelargonien (PFBV, PLPV, PLCV, PCRPV, TSWV) Diascia und Nemesis (ScrMV, NeRNV, TSWV), Verbenen (BaCV, AMV, BBWV1, CMV, INSV/TSWV), Phalaenopsis (CaCV, INSV, CymMV) und Zantedeschia/Philodendron selloum (ZaMV) gebracht. Virussympptome geben gute Hinweise auf die Ätiologie der Krankheit und können zu bestimmten Jahreszeiten gute Hinweise auf die Virusgattung oder -art geben.

Untersuchungen der Interaktion zwischen dem Beet necrotic yellow vein virus Pathogenitätsfaktor P25 und einem putativen Auxin-induzierbaren Transkriptionsfaktor aus *Beta vulgaris* und deren subzellulären Ko-Lokalisation

Heike Thiel¹, Mark Varrelmann¹

¹Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin, Holtenser Landstr. 77, 37079 Göttingen

Contact: thiel@ifz-goettingen.de

Ein cDNA-Klon (*Bv-iaa*) mit Sequenzhomologie zu einem "Auxin responsiven Gen" aus *Nicotiana tabacum* konnte auf Proteinebene mittels "Yeast-two hybrid" (YTH) erfolgreich auf Interaktion mit dem Pathogenitätsfaktor P25 des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) getestet werden. Da BNYVV anfällige Zuckerrüben auf eine Infektion mit erhöhten Auxingehalten reagieren, wurde dieser Kandidat für weitere funktionelle Untersuchungen ausgewählt. Die genauen Funktionen des P25 sind bisher unbekannt. Es ist aber sicher, dass dieses für Ertragseinbußen, Translokalisierung des Virus im Wurzelsystem und Symptomausprägung in anfälligen Zuckerrüben verantwortlich ist. *Bv-IAA* konnte erfolgreich aus resistenten und anfälligen Genotypen mittels RT-PCR als Voll-Längen Sequenz gewonnen und die Interaktion mit P25 im YTH bestätigt werden. Im Rahmen von Agrobakterium vermittelter Expression, basierend auf N- bzw. C-terminal fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen, wurden der *Bv-IAA* Kandidat alleine und in Ko-Expression mit P25 auf subzelluläre Lokalisation in *N. benthamiana* Epidermiszellen überprüft. Bei alleiniger Agroexpression lokalisierte *Bv-IAA* erwartungsgemäß ausschließlich im Zellkern. P25 wurde sowohl im Cytoplasma, wie auch im Zellkern detektiert. Bei Ko-Expression beider Gene fand eine Re-Lokalisierung des *Bv-IAA* aus dem Nukleus ins Cytoplasma statt. Da kein Polymorphismus zwischen Allelen in BNYVV resistenten und anfälligen Genotypen identifiziert wurde, wird vermutet, dass es sich bei der Wechselwirkung nicht um eine Resistenzinteraktion handelt. Die exakten Funktionen von

"Auxin responsiven" Genen, neben ihrer allgemeinen Beteiligung an Wachstum und Zelldifferenzierung in Pflanzen, sind bisher ungeklärt. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, warum P25 das Bv-IAA aus dem Zellkern re-lokalisiert und es wahrscheinlich an der Durchführung seiner Funktion(en) hindert. Es wird postuliert, dass die Interaktion des P25 mit Bv-IAA Teil der viralen Aggressivität ist und über diese die vermehrte Seitenwurzelbildung induziert wird. Weitere Studien müssen die Auxin-Induzierbarkeit und die Expression in Abhängigkeit der BNYVV Infektion zeigen.

Ein RNase III Enzym des Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV) als ein Suppressor von RNA Silencing

Isabel Weinheimer¹, Minna-Liisa Rajamäki², Wilmer Cuellar³, Jan F. Kreuze³, Jari P.T. Valkonen²

¹Department of Agricultural Sciences, PO Box 27, FIN-00014 University of Helsinki, Finland, RLP AgroScience GmbH, AIPlanta-Institute for Plant Research, Breitenweg 71, D-67435 Neustadt, Germany

²Department of Agricultural Sciences, PO Box 27, FIN-00014 University of Helsinki, Finland

³International Potato Center, Germplasm Enhancement and Crop Improvement Division, Apartado 1558, Lima 12, Peru

Contact: isabel.weinheimer@agrosience.rlp.de

Süßkartoffel (*Ipomoea batatas* L.) ist die siebtwichtigste Nahrungspflanze der Welt, das drittwichtigste Knollen- und Wurzelgemüse nach Kartoffel und Maniok, und eine sehr wichtige Grundlage und der Lebensmittelsicherheit dienende Kulturpflanze für die ländliche Bevölkerung in vielen tropischen Regionen der Welt. Die Viruserkrankung der Süßkartoffel (SPVD) ist die einzige schwere Erkrankung von Süßkartoffeln in Afrika südlich der Sahara. Sie entwickelt sich in einer Ko-Infektion der Pflanze mit dem auf das Phloem beschränkten Sweetpotato chlorotic stunt virus (SPCSV, Familie *Closteroviridae*) und dem heterologen, nicht Phloem beschränkten Sweetpotato feathery mottle virus (SPFMV, Familie *Potyviridae*). Dieser Synergismus ermöglicht die Erhöhung des Titers von SPFMV um das 600-1000 fache, während der Titer des SPCSV unverändert bleibt. SPCSV kodiert für zwei Proteine, p22 und RNase3, die in einem frühen Infektionsstadium exprimiert werden. RNase3 ist eine doppelsträngige RNA (dsRNA)-spezifische Endoribonuklease III der Klasse 1. Diese ermöglicht die Unterdrückung des RNA-Silencing (RNAi), dem grundlegenden antiviralen Abwehrsystem der Pflanzen, wenn sie zusammen mit p22, einem starken Silencing Suppressoren exprimiert wird. Das Ziel dieser Studie war es, die Rolle von p22 und RNase3 im viralen Synergismus, dem Auslöser des schwerwiegenden SPVD, zu ergründen. Eine SPFMV resistente

Süßkartoffelsorte "Huachano" wurde transformiert um die RNase3 oder das p22 transgen zu exprimieren. Transgene Linien wurden mittels SPFMV Infektion überprüft. Die Expression von RNase3 alleine reichte aus, um Huachano anfällig für SPFMV zu machen. Die transgenen Pflanzen akkumulierten hohe Titer an SPFMV und entwickelten die typischen Symptome der SPVD. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von p22 alleine die Resistenz gegen SPFMV nicht durchbrechen. Dies geht mit der Tatsache einher, dass SPCSV Isolate, denen das p22-Gen fehlt, auch in einer Ko-Infektion mit SPFMV in der Süßkartoffel Symptome des SPVD verursachen. Kürzlich wurde entdeckt, dass die RNase3 synthetische doppelsträngige small interfering RNAs (siRNAs) spalten kann sowie in einem *in vitro* Experiment die gesamten isolierte siRNAs aus infiziertem Pflanzengewebe reduzierte. Diese Ergebnisse implizieren einen neuen Mechanismus, mit dem Viren RNA-Silencing unterdrücken können. In diesem Zusammenhang sind wir daran interessiert, die Substratspezifität der RNase 3 aufzuklären.

Untersuchungsmethoden der Elektronenmikroskopie für die Pathogendiagnose

Katja R. Richert-Pöggeler¹, Christina Maaß¹, Sabine Schuhmann¹, Elke Zimmermann²

¹JKI/EP, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Germany

²JKI/EP, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany

Contact: katja.richert-poeggeler@jki.bund.de

Die Mikroskopie im Allgemeinen und die Elektronenmikroskopie im Besonderen erlebt seit den letzten Jahren eine Renaissance. Während früher hauptsächlich morphologische Aspekte im Vordergrund standen, sind heutzutage neben deskriptiven auch funktionelle Analysen durch die zur Verfügung stehende Vielfalt an Untersuchungsmethoden möglich. Die neueren Geräte zeichnen sich durch Bedienungsfreundlichkeit und digitale Bilderstellung aus.

Die Entwicklung neuer Vakuumsysteme und Detektoren in der Rasterelektronenmikroskopie erlaubt eine direkte und damit schnelle Untersuchung von biologischen Proben. Somit ist eine aufwendige Aufarbeitung zur Trocknung und Herstellung der Leitfähigkeit nicht mehr erforderlich.

Beispiele für den Einsatz verschiedener Optionen des Transmissions- und Rasterelektronenmikroskops für die Diagnose von Viren bzw. deren Vektoren werden dargestellt.

Changes in the architecture of nuclei and nuclear membranes

evoke a novel intracellular traffic route of plant DNA viruses

Kleinow, Tatjana¹, Krenz, Björn¹, Kepp, Gabi¹, Neugert, Felix², Wege, Christina¹, Jeske, Holger¹

¹Universität Stuttgart/Biologisches Institut/Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Deutschland

²Universität Stuttgart/Institute für Zellbiologie, Allmandring 30, 70550 Stuttgart, Deutschland

Contact: tatjana.kleinow@bio.uni-stuttgart.de

Geminiviruses constitute a large and economically important group of ssDNA plant viruses with circular genomes. The DNA A component of bipartite geminiviruses encodes proteins necessary for viral replication, transcription and encapsidation, among which the replication-associated protein (Rep) is essential for replication within nuclei. The two DNA B-encoded gene products, nuclear shuttle protein (NSP) and movement protein (MP), enable systemic spread within the host and affect pathogenicity. Although previous studies indicated that NSP mediates trafficking of viral DNA into and out of the nucleus, and MP serves as a membrane adaptor and facilitates cell-to-cell transfer as well as long distance spread, the functional details of how both proteins coordinate viral DNA transport remain to be determined. Here, we show that geminiviral infections and over-expression of viral proteins induce characteristic changes in the nuclear architecture. Over-expression of Rep alone led to intense budding and even division of nuclei. Upon co-expression of Rep, MP and NSP, nuclear envelope-derived vesicles invaginated into the nucleus and budded into the cytoplasm. These vesicles are likely to contain nucleoplasm as indicated by a nucleoli/cajal body (No/CB) marker. Subsequent accumulation of the No/CB marker at the cell periphery denotes that the vesicles may traffic from the nucleus to the plasma membrane. These data suggest that a concerted action of plant viral replication and shuttling/movement proteins re-organizes nuclear and membrane domains, paving a novel intracellular trafficking route for DNA geminiviruses.

Tobacco rattle virus (TRV)-Infektionen in Alströmeria und Tulpen: Deletionen und Rekombinationen mit den 3'-Enden unterschiedlicher tobroviraler RNA 1-Spezies haben zu einer Vielzahl von TRV-TCM-verwandten RNA 2-Spezies geführt

Koenig, R.¹, Lesemann, D.-E.¹, Pfeilstetter, E.², Winter, S.³

¹c/o JKI, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11, D38104 Braunschweig

²JKI, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der

Pflanzengesundheit, Messeweg 11, D38104 Braunschweig
³DSMZ Plant Virus Department, Messeweg 11, D38104 Braunschweig

Contact: reate.koenig@JKI.bund.de

Tobraviren (z.B. Tobacco rattle virus – TRV; Pea early browning virus - PEBV) werden als gestreckte Viren mit bipartitem Genom beschrieben. Ihre RNA 1 enthält die Gene für Replikationsenzyme, Transport-Protein und silencing suppressor. Ihre RNAs 2 bestehen aus einem RNA 2-spezifischen 5'-Bereich mit Hüllprotein-Gen und u.U. weiteren Genen und einem unterschiedlich langem 3'-Ende, das weitgehend identisch mit dem 3'-Ende einer tobaviralen RNA 1 ist. In einer Tobravirus-infizierten Alströmeria identifizierten wir eine RNA 1 (TRV-AL RNA 1) und sieben verschiedene RNAs 2. Letztere zeigten in ihrem RNA 2-spezifischen 5'-Bereich eine fast 100 %ige Sequenzidentität mit der TRV-TCM RNA 2 aus Tulpen. Allerdings war der RNA 2-spezifische Bereich in einigen TRV-AL RNA 2-Molekülen länger, in anderen wesentlich kürzer als in der TRV-TCM RNA 2. Die Größe und darüber hinaus auch die Basenzusammensetzung der RNA 1-verwandten 3'-Enden variierten ebenfalls in den verschiedenen TRV-AL RNA 2-Molekülen. In Molekülen mit langem RNA 2-spezifischem Anteil war der RNA 1-verwandte Teil mit ca. 250 Basen relativ kurz, während er bei Molekülen mit verkürztem RNA 2-spezifischem Anteil wesentlich länger war. Erstaunlicherweise war der RNA 1-ähnliche Teil in den Molekülen mit langem RNA 2-spezifischem Anteil (TC3'PE-Moleküle) fast 100 % identisch mit dem 3'-Ende der PEBV RNA 1. In RNA 2-Molekülen mit verkürztem RNA 2-spezifischem Anteil war er hingegen 100% identisch mit dem 3'-Ende der TRV-AL RNA 1 (TC3'AL-Moleküle). Offenbar handelt es sich bei den TC3'-PE-Molekülen um phylogenetisch ältere Formen, aus denen die TC3'-AL-Moleküle durch Deletionen und Rekombinationen mit dem 3'-Ende der als einziger vorhandenen TRV-AL RNA 1 hervorgegangen sind. Möglicherweise repräsentieren die in Alströmeria, Tulpen und einigen anderen Wirten beschriebenen RNA 2-Varianten mit unterschiedlich hohem Anteil an PEBV-Genomanteilen Schritte eines Adaptationsprozesses, in dem in PEBV RNA 2-Molekülen PEBV-Genomelemente durch entsprechende TRV-Genomteile ausgetauscht werden. Da das TRV im Gegensatz zum PEBV eine große Anzahl unterschiedlicher Wirte infiziert, könnten derartige Austauschere Teil eines Adaptations-Prozesses sein, der den weiten Wirtspflanzenkreis des TRV auch für ursprünglich vom PEBV stammende RNAs 2 öffnet (JGV im Druck).

HSP70 implication in the transmission of mono- and bipartite begomoviruses by the whitefly Bemisia tabaci B biotype

Kollenberg, Mario¹, Götz, Monika¹, Popovski, S.², Czosnek, Henryk³, Winter, Stephan¹, Ghanim, Murad⁴

¹DSMZ, Pflanzenviren, Inhoffenstrasse 7b, 38124 Braunschweig, Deutschland

²Israel

³Institute of Plant Sciences and Genetics, Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

⁴Department of Entomology, Volcani Center, Bet Dagan, Israel

Contact: mario.kollenberg@dsmz.de

HSP70 implication in the transmission of mono- and bipartite begomoviruses by the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype

Kollenberg, M., Götz, M., Popovski, S., Czosnek, H., Winter, S., Ghanim, M.

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) are two begomoviruses (*Geminiviridae*), exclusively vectored by the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.) in a persistent circulative manner. The circulative passage of virions from the midgut to the hemolymph and from the hemolymph to the primary salivary glands requires specific recognition between virions and whitefly proteins and/or receptors located in the midgut, hemolymph and salivary gland barriers, where specificity is thought to reside.

1D and 2D virus overlay protein binding assays with purified WmCSV and TYLCV virions revealed specific binding of virus particles to a couple of whitefly proteins amongst which HSP70 showed a pronounced binding. Interaction between HSP70 and TYLCV was confirmed using an immunocapture PCR approach with a HSP70-specific antibody and TYLCV-specific PCR primers. In addition, over-expression of the HSP70 proteins was observed in a western blot assay, and over-expression of the *hsp70* gene was observed in whole whiteflies and dissected midguts of viruliferous whiteflies compared to non viruliferous insects in a microarray approach and confirmed using a real-time PCR assay.

A combined fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunolocalization approach revealed co-localization and association of HSP70 with TYLCV virions in midgut epithelial cells. Immunolocalization of HSP70 and WmCSV also showed areas in which the virions were associated with HSP70. Transmission tests of TYLCV revealed enhanced transmission of the virus after *B. tabaci* had fed on an artificial diet containing a HSP70-specific antibody.

These results suggest that the viruses act as a stress factor for *B. tabaci* leading to an up-regulation and expression of HSP70 which reduces the virus transmission.

Molekulare Analyse des Genus Betacryptovirus der Familie Partitiviridae

Lesker, Till¹, Maiß, Edgar¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenschutz und Pflanzenkrankheiten, Herrenhäuser Strasse 2, 30419 Hannover

Contact: lesker@ipp.uni-hannover.de

Kryptische Viren (Familie *Partitiviridae*) nehmen aufgrund ihrer Apathogenität und der limitierten Übertragbarkeit eine Sonderstellung ein. Diese Viren werden nur über den Samen übertragen und ausschließlich durch Zellteilung in Pflanzen verteilt. Trotzdem sind kryptische Viren in verschiedenen Kulturpflanzen weit verbreitet.

Die Literatur lieferte bislang nur wenige Daten über kryptische Viren in Pflanzen; Ergebnisse zur Systematik stammen zumeist aus den 80er Jahren. Derzeit werden kryptische Viren in die Genera *Partivirus*, *Alphacryptovirus* und *Betacryptovirus* gegliedert. Während Viren der ersten Gattung in Pilzen zu finden sind, finden sich Viren aus den anderen beiden Gattungen in Pflanzen.

Für das Genus *Betacryptovirus*, für das bisher keine Sequenzen zur Verfügung standen, konnten mehrere Viren aus verschiedenen Kulturpflanzen isoliert und bestimmt werden. Weiterführende phylogenetische Betrachtungen der Sequenzen ergaben ein Cluster, welches eine starke Sequenz-Diversität zu den Pflanzenviren des Genus *Alphacryptovirus* aufzeigt, jedoch eine nahe Verwandtschaft zum Genus *Partivirus* besitzt.

Die Mykoviren weisen sehr ähnliche Eigenschaften auf und wurden in vielen pflanzenpathogenen Pilzen gefunden. Die gewonnenen Informationen können zum einen zur Verbesserung der Systematik der Virusfamilie *Partitiviridae* genutzt werden, zum anderen liefern sie Hinweise auf die evolutionäre Beziehung von kryptischen Viren aus Pflanzen zu Partitiviren aus Pilzen.

DsRNA-Screening an *Asparagus officinalis*

Lesker, Till¹, Blockus, Sebastian¹, Maiß, Edgar¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenschutz und Pflanzenkrankheiten, Herrenhäuser Strasse 2, 30419 Hannover

Contact: lesker@ipp.uni-hannover.de

Die Untersuchung von doppelsträngiger RNA (dsRNA Screening) aus Pflanzen ist ein unspezifischer Test für mögliche Virusinfektionen, ohne weitere Information von Symptomen oder Sequenzen zu benötigen. Dabei ist es möglich Viren mit dsRNA als Genom oder ssRNA-Viren aufgrund ihrer replikativen Übergangsformen zu erkennen. Charakteristische dsRNA Bandenmuster (Anzahl, Größe und Konzentration) geben dabei erste Hinweise auf mögliche Virusinfektionen.

Die eingesetzte modifizierte Isolationsmethode nach Dodds (1979) beruht auf einer spezifischen Bindung von dsRNA an Cellulose in Ethanol (15 %) und der Stabilität gegenüber DNasen und RNasen in Hochsalz-Puffern. Für die Reinigung wurden rund 10 g Blattmaterial, ein Phenol/Chloroform Extraktionspuffer und zwei mit Cellulose beladene Säulen verwendet. Die Doppelstrangnatur der RNA Präparation wurde durch einen RNase/DNase-Verdau und Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Einzelne dsRNA Banden wurden aus dem Gel eluiert und durch Random-RT-PCR, Klonierung und anschließende Sequenzierung weiter charakterisiert.

Asparagus officinalis L. (Gemüsespargel) ist eine Langzeitkultur mit Standzeiten von rund 9 Jahren. Bisher wurden nur wenige Viren bei Spargelkulturen entdeckt. Weit verbreitet sind Asparagus Virus 1 (AV-1), Asparagus Virus 2 (AV-2) und Gurkenmosaikvirus (CMV), welche zu Ertragseinbußen von bis zu 70% führen können. Es ist sowohl eine mechanische Übertragung, beim Stechen des Spargels, als auch eine Übertragung durch Blattläuse, Samen und Pollen möglich.

In Rahmen eines Qualitätssicherungsprojektes wurden Proben von 5 kommerziellen Anbau Feldern in Niedersachsen mit unterschiedlichen Pflanzzeiten und eine Versuchsfeldprobe mit Hilfe des dsRNA Screenings untersucht. Nach Klonierung und Sequenzanalysen konnten einige bekannte Viren und Satelliten aber auch bislang unbekannte Viren in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Herstellung infektiöser Vollängenklone durch Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC)

Maiss, Edgar¹

¹Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

Contact: maiss@ipp.uni-hannover.de

Infektiöse Vollängenklone von Pflanzenviren sind wichtige Werkzeuge zur Untersuchung viraler Funktionen im Infektionsverlauf. Für die Herstellung infektiöser Klone von Viren deren Genom aus RNA besteht, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Prozeduren entwickelt, u.A. wurden Vollängenklone aus einzelnen DNA-Fragmenten über z.B. gemeinsame Restriktionsendonuklease-Schnittstellen zusammengefügt. Sehr häufig wurde die cDNA dabei auch unter die Kontrolle eines Phagenpromoters gebracht, so dass die Produktion von viralen Transkripten *in vitro* ermöglicht wurde. Eine Alternative dazu ist die Klonierung der cDNA Teilkclone unter die Kontrolle eines in Pflanzen aktiven Promoters. Hierfür wurde sehr häufig der 35S Promoter des Cauliflower mosaic virus (CaMV) verwendet. Nach Übertragung des Vollängenklones durch mechanische Inokulation oder Partikelbombardment entstehen virale Transkripte *in planta*, die zur Infektion führen.

Mit Hilfe von Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) ließen sich infektiöse Vollängenklone des Tobacco mosaic virus (TMV) und des Plum pox virus (PPV) ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligase herstellen. Hierzu wurde zunächst ein binärer Vektor mit dem 35S Promoter des CaMV sowie Terminationssequenzen ausgestattet. Mittels RT-PCR wurden 4 Fragmente des TMV, bzw. 6 Fragmente des PPV erzeugt. Diese Fragmente wurden anschließend gleichzeitig (TMV) oder sukzessive (TMV, PPV) in den binären Vektor durch CEPC eingebracht. Die erhaltenen Vollängenklone wurden nach Elektroporation in Agrobakterien auf *Nicotiana benthamiana* Pflanzen agroinokuliert. Nach etwa 12-18 Tagen konnte die erfolgreiche Infektion der Pflanzen durch Symptombonitur bzw. RT-PCR Nachweis der Viren bestätigt werden. Damit steht ein Verfahren zur Verfügung, welches neben Oligonukleotiden lediglich den Einsatz einer Reversen Transkriptase sowie einer hitzestabilen Polymerase erfordert und in relativ kurzen Zeiträumen die Herstellung von infektiösen Vollängenklonen im Bereich bis etwa 10 kb ermöglicht.

Binding of small double-stranded RNAs by a plant viral suppressor is enhanced by a member of the plant cupin superfamily

Marc Füllgrabe¹, KaJohn Boonrod¹, Rana Jamous¹, RLP AgroScience GmbH, AlPlanta-Institute for Plant Research, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Germany², RLP AgroScience GmbH, AlPlanta-Institute for Plant Research, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Germany³

¹RLP AgroScience GmbH, AlPlanta-Institute for Plant Research, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Germany

²Gabi Krczal

³Michael Wassenegger

Contact: gabi.krczal@agrosience.rlp.de

The Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of potyviruses is a suppressor of gene-silencing and has been shown to elicit plant developmental defect-like symptoms. Both functions are related to the small double-stranded RNA (dsRNA) binding activity of HC-Pro. Up to now little is known about the role of host plant proteins in viral suppression of gene silencing. We report that a plant factor enhances the silencing suppression capacity of HC-Pro. Addition of plant extracts from *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* but not from *N. tabacum* and *Curcubita pepo* to bacterially expressed HC-Pro^{FRNK} enhanced its binding capacity for small double-stranded RNAs. Via MALDI-TOF analysis and protein sequencing a peptide belonging to the cupin superfamily of proteins was indentified as the enhancing factor. The type of interaction between this peptide and HC-Pro proteins will be discussed.

Ein für Deutschland neues bodenbürtiges Furovirus an Wintergerste

Rabenstein, Frank¹, Fomitcheva, Viktoria¹, Kühne, Thomas¹

¹Julius Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Quedlinburg

Contact: frank.rabenstein@jki.bund.de

Am Versuchsstandort Bornum in Niedersachsen werden in Kooperation mit dem Bundesortenamt im Rahmen hoheitlicher Aufgaben durch das JKI jährlich Prüfungen von Sortenkandidaten und Akzessionen auf Virusresistenz gegen die beiden bodenbürtigen Viren Barley yellow mosaic virus (BaYMV) und Barley mild mosaic virus (BaMMV) durchgeführt. Unerwartet traten im Frühjahr 2010 an Pflanzen des Kontrollsortiments, die das Resistenzgen *rym5* tragen, wie z.B. den beiden Gerstensorten 'Jorinde' und 'Nerz' Mosaiksymptome und Blattvergilbungen auf, die denen der Gelbmosaikvirose stark ähnelten. Deshalb wurde zunächst ein Resistenzdurchbruch durch einen neuen Pathotyp von Viren des Gelbmosaikvirus-Komplexes vermutet. In diesen Pflanzen waren jedoch keine Bymoviren nachweisbar. Es waren jedoch stäbchenförmige Viruspartikeln mit ca. 180 und 300 nm Länge und einem Durchmesser von ca. 20 nm vorhanden, die sich mit goldmarkierten Furovirus-spezifischen Antikörpern dekorieren ließen. Serologische Tests mit Antiseren bzw. monoklonalen Antikörpern und erste molekulare Analysen zeigten eine enge Verwandtschaft mit Isolaten des Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) bzw. dem Soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV), die aber bisher in Deutschland nicht an Wintergerste sondern nur in Roggen, Triticale und Winterweizen gefunden wurden. Das Isolat Jorinde-1 konnte durch mechanische Inokulation auf verschiedene Gerstensorten übertragen werden, darunter auch solche mit Resistenzen gegen die beiden Bymoviren BaYMV/BaMMV. Die Inokulation mehrerer Weizensorten ergab starke Unterschiede in deren Anfälligkeit, während zwei Roggensorten nicht infiziert wurden. Auf *Nicotiana tabacum* 'Samsun-NN' sowie 'Samsun-nn' zeigten sich bereits 4 d p.i. auf den inokulierten Blättern zahlreiche nekrotische Lokalläsionen. Dagegen konnten die Tabakpflanzen mit SBWMV bzw. SBCMV nicht infiziert werden. Mit Hilfe sequenzspezifischer Primer für die RNA1 des SBCMV bzw. des SBWMV wurde nach RT-PCR nur für die homologen Viren, nicht jedoch für den neuen Erreger ein Amplifikationsprodukt erhalten. Dies weist auf Sequenzunterschiede hin. Die Sequenzanalyse der RNA 2 belegte für das neue Gerstenvirus eine weitgehende Identität mit dem Isolat Marne (F), das erstmals 2007 in Frankreich unter der Bezeichnung Soil-borne barley mosaic virus beschrieben wurde und nahezu identisch mit einem als

SBWMV-JT bezeichneten Virus ist, welches in Japan bereits 1986 aus Gerste isoliert worden war. Das Isolat Jorinde-1 besitzt im Hüllprotein (CP), in der Position 63 im Vergleich zu diesen beiden Isolaten anstelle von Phenylalanin ein Leucin. Der Vergleich der CP-Sequenzen von 14 Furoviren deutet auf gemeinsame Muster für die Isolate Jorinde-1 (D), Marne (F) und JT (Japan) hin. Weitere Untersuchungen sind erforderlich zum Schädpotential des neuen Erregers hinsichtlich Ertrag, Winterhärte u.a. Parametern sowie zur biologischen und genetischen Diversität, wie sie z.B. von dem verwandten, Roggen und Weizen infizierenden SBCMV bekannt ist. Nach den bisherigen Erfahrungen mit bodenbürtigen Viren ist zu erwarten, dass sich das neue, erstmals an Wintergerste in Deutschland nachgewiesene Furovirus in Zukunft weiter ausbreiten wird. Daher muss perspektivisch auch die Frage nach der Möglichkeit und den Konsequenzen von Mischinfektionen in Gerstenpflanzen mit anderen Viren, wie Bymo- bzw. insektenübertragbaren Viren gestellt werden. Sollte sich das neue Virus als ökonomisch bedeutsam erweisen, werden neue resistenzzüchterische Arbeiten erforderlich, die wahrscheinlich mit der Suche nach Resistenzquellen im Genpool der Gerste beginnen müssen.

Vergleich der Nucleocapsidsequenz des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) aus schwedischen Ebereschen mit anderen Standorten

Robel, Jenny¹, Arndt, Nick¹, von Bargen, Susanne¹, Jalkanen, Risto², Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, FG Phytomedizin, Königin-Luise-Str. 19, 14195 Berlin

²The Finnish Forest Research Institute METLA, Northern Research Unit, PL 16, FI-96301 Rovaniemi, Finnland

Contact: phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Charakteristische Krankheitssymptome, wie chlorotische Ringflecken und Scheckungen an Blättern der Eberesche (*Sorbus aucuparia*) wurden erstmals 1960 beschrieben. Eine Assoziation dieser Symptome mit dem *European mountain ash ringspot-associated virus* erfolgte erst 2005 (Benthack et al., 2005; Mielke und Mühlbach 2007). Aufgrund der Genomorganisation dieses phytopathogenen Virus ist vom International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) das neue Genus *Emaravirus* mit dem Virus als Typspezies etabliert worden. EMARaV besitzt ein viergeteiltes Genom, bei dem die einzelsträngigen, negativ orientierten RNAs jeweils einen ORF aufweisen.

Die RNA 3 kodiert für das virale Nucleocapsidprotein (120-1064 nt) mit einer Größe von 35 kDa.

Im Jahr 2010 wurde Blattmaterial von Ebereschen mit charakteristischen EMARaV-Symptomen in Schweden und Nordfinnland (Rovaniemi) gesammelt. Die Nucleocapsid-kodierende Genomregion des Virus wurde

mittels RT-PCR aus isolierter Gesamt-RNA, unter Verwendung der von Kallinen et al. (2009) publizierten Primer amplifiziert. Die generierten Produkte wurden im Anschluss direkt bzw. nach Klonierung sequenziert. Ein Vergleich der Nucleotidsequenzen (7 schwedische-, 2 nordfinnische-, 1 Berliner EMARaV-Variante) mit bis dahin veröffentlichten Sequenzen (16 finnische, 4 russische, 1 Hamburger EMARaV-Isolat) bestätigte die hohe Konservierung des Nucleocapsids (97-99 %), wie sie von Kallinen et al. (2009), sowie von Valkonen und Rännäli (2010) beschrieben wurde. Eine der beiden Proben aus Nordfinnland (Rovaniemi) weist eine geringere Nucleotidsequenz-Identität des Nucleocapsid-kodierenden Genombereiches von 96 % auf. Dieses bedingt zudem eine geringere Identität auf Aminosäureebene von 97-98 %, im Vergleich zu den anderen EMARaV-Isolaten, die eine Sequenzähnlichkeit von (99-100 %) aufweisen. Phylogenetisch gruppiert diese EMARaV-Variante aus Rovaniemi mit einer schwedischen EMARaV-Variante (Skellefteå) in ein separates Cluster. Neben den beiden von Valkonen und Rännäli beschriebenen zwei separaten EMARaV-Populationen repräsentieren diese beiden Sequenz-Varianten eine dritte Population. Insgesamt korreliert die genetische Distanz der EMARaV-Varianten aus Schweden und Nordfinnland (Rovaniemi) nicht mit ihrer geographischen Distanz, wie es ebenfalls für die bislang untersuchten Isolate beschrieben wurde (Kallinen et al. 2009, Valkonen und Rännäli 2010).

Benthack, W., Mielke, N., Büttner, C. & Mühlbach, H.-P. (2005) Archives of Virology 150: 37-52.

Mielke, N. & Mühlbach, H.-P. (2007) Journal of general Virology 88: 1337-1346.

Kallinen, A. K., Lindberg, I. L., Tugume, A. K. & Valkonen, J. P. T. (2009) Phytopathology 99: 344-352.

Valkonen, J. P. T. & Rännäli, M. (2010) Disease Notes 94, Nr. 7, S. 921.

Monitoring von Hopfen auf Hop Stunt Viroid

Seigner, Luitgardis¹, Anton, Lutz², Seigner, Elisabeth³

¹85354 Freising, Deutschland, Bayerische Landesanstalt fuer Landwirtschaft, Institut fuer Pflanzenschutz, Lange Point 10

²85283 Wolnzach, Deutschland, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Hüll 5 1/3

³85354 Freising, Deutschland, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 2

Contact: luitgardis.seigner@lfl.bayern.de

Problematik

Hopfen wird von Pilzen, tierischen Schädlingen sowie Viren und Viroiden befallen. Letztere sind besonders problematisch, da sie durch Pflanzenschutzmittel nicht zu bekämpfen sind. Vor allem die sehr leicht mechanisch übertragbaren Viroide werden bei Kulturarbeiten großflächig innerhalb eines Bestandes und von Bestand zu Bestand verschleppt. Viroid-infizierte Pflanzen bleiben oft lange Zeit symptomlos, so dass es zunächst zu einer unbemerkten großflächigen Verbreitung der Infektion kommen könnte. Die Gefahr der Einschleppung neuer Pathogene ist infolge des intensiven weltweiten Austausches von Hopfenpflanzgut sehr groß. Wegen fehlender Bekämpfungsmöglichkeiten sind gerade im Hinblick auf Viroide wirksame Vorbeugemaßnahmen unerlässlich. Im Falle des gefährlichen, in Japan seit den 1940er Jahren, in den USA seit 2004 und in China seit 2007 vorkommenden *Hop stunt viroids* (HSVd) wird seit 2008 an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) ein Monitoring in den Hopfenanbaugebieten Deutschlands durchgeführt. Primäre Befallsherde würden damit frühzeitig aufgedeckt und einer großflächigen HSVd-Verschleppung könnte durch unverzüglich veranlasste phytosanitäre Maßnahmen entgegengewirkt werden. Präventiv wird die Einfuhr von Hopfen insbesondere aus HSVd-Befallsgebieten streng kontrolliert. Die wirtschaftlichen Verluste einer HSVd-Infektion wären für die deutschen Hopfenpflanzer wie auch für die Brauwirtschaft dramatisch.

HSVd-Monitoring

2008 wurde mit einem HSVd-Monitoring in der Hallertau, dem größten deutschen Hopfenanbaugebiet, und den anderen bedeutenden Hopfenanbauregionen Deutschlands begonnen, das 2009, 2010 weitergeführt wurde und auch künftig fortgesetzt wird. Beprobte wurden/werden Hopfensorten aus Praxisbeständen in der Hallertau (Bayern), im Gebiet um Tettang (Baden-Württemberg), in der Elbe-Saale-Region (Thüringen, Sachsen, Sachsen-Anhalt), Pflanzen auf Versuchsflächen, Mutterpflanzen der Vermehrungsbetriebe der Gesellschaft für Hopfenforschung, männliches und weibliches Zuchtmaterial des LfL-Hopfenforschungszentrums Hüll, Hüller Zuchtsorten und Sorten aus dem Ausland im Sortenregister und Sortengarten des Hopfenforschungszentrums, Wildhopfen aus der Wildhopfensammlung des Hopfenforschungszentrums, in Quarantäne gehaltene Gewächshaus-Bestände.

Bei der Beprobung werden nach Möglichkeit junge, frische Blätter von Hopfenpflanzen mit „verdächtigem“ Erscheinungsbild (Chlorosen, gelbliche Sprenkelung, eingerollte Blätter, auffällig kleine Dolden, Stauchung) ausgewählt. Die Blätter werden schnellst möglich ins Labor transportiert und bis zur Untersuchung bei minus 80 °C gelagert. Die RNA wird mit dem QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit extrahiert. Der HSVd-Nachweis erfolgt über RT-PCR mit HSVd-spezifischen Primern (Eastwell und Nelson 2007). Zusätzlich wird eine auf Hopfen mRNA-basierende interne RT-PCR-Kontrolle mitgeführt (Seigner et al. 2008).

Ergebnisse aus dem Monitoring der Jahre 2008-2010 werden auf dem Poster präsentiert.

Erster Nachweis von CLRV und EMARAV in Laubgehölzen in Schweden

von Bargaen, Susanne¹, Arndt, Nick¹, Dierker, Luise¹, Jalkanen, Risto², Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, FG Phytomedizin, c/o JKI, Königin-Luise-Str. 19, 14195 Berlin, Deutschland

²The Finnish Forest Research Institute METLA, Northern Research Unit, PL 16, FI-96301 Rovaniemi, Finnland

Contact: susanne.von.bargaen@agrar.hu-berlin.de

In Schweden zählen Birken (*Betula* spp.) und Ebereschen (*Sorbus aucuparia*) zu den nativen Laubhölzern, die aufgrund ihrer Frosthärte in Europa auch bis zur nördlichsten Baumgrenze verbreitet sind. Die Vertreter beider Taxa sind wichtige Pioniergehölze, deren Vorhandensein wesentlich zur Diversität von Fauna und Flora z.B. im Zuge der natürlichen Sukzession von Lichtungen in den Koniferen-dominierten Wäldern der borealen Zone Skandinaviens beiträgt. Symptome einer Infektion, wie sie durch das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) verursacht werden, konnten bereits an Birken in Nordschweden beschrieben werden (Jalkanen et al. 2007). Ebenso wurden Ringfleckensymptome, die mit dem *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV) assoziiert sind, an Ebereschen in der Region Norrbotten festgestellt (Valkonen und Rännäli 2010). Bisher konnte keines der beiden Viren in Schweden nachgewiesen werden. Im Sommer 2010 wurden Blattproben mehrerer *Betula*-Arten (*B. pendula* und *B. pubescens*) sowie Ebereschen mit charakteristischen Virus-Symptomen von verschiedenen schwedischen Standorten entnommen und mittels RT-PCR untersucht. CLRV-spezifische Genombereiche der 3' nicht-kodierenden Region sowie des Hüllproteins ließen sich in einer von 11 untersuchten Birken mit Blattrollen bzw. Chlorosen nachweisen. In keiner der 14 untersuchten Ebereschen mit Ringfleckensymptomen ließ sich CLRV detektieren. Dagegen waren alle Ebereschen mit EMARAV infiziert, wie durch die Amplifikation spezifischer Fragmente der viralen RNA1 bis RNA4 gezeigt werden konnte. Die Sequenzierung gereinigter PCR-Produkte bestätigte die Infektion der Birke mit CLRV und den EMARAV-Nachweis in Ebereschen an verschiedenen Standorten in Nord- und Südschweden.

R. Jalkanen, C. Büttner, S. von Bargaen (2007) *Silva Fennica* 41, 755 -762.
J.P.T. Valkonen, M. Rännäli (2010) *Plant Disease* 94, 921.

Modifizierung der Wirt-Vektor-Beziehung durch das Cucumber

mosaic virus 2b-Protein

Ziebell, Heiko¹, Murphy, Alex², Lewsey, Mathew³, Westwood, Jack², Du, Zhiyou², Tungadi, Trisna², Moulin, Michael⁴, Smith, Alison², Stevens, Mark⁵, Carr, John²

¹Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig

²Cambridge University, Dept. of Plant Sciences, Downing St, Cambridge CB2 3EA, Großbritannien

³Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA

⁴University of Geneva, Dept. of Botany and Plant Biology, Science III, Room 1059, Quai E. Ansermet 30, 1211 Geneva 4, Schweiz

⁵Brooms Barn Sugar Beet Research Station, Higham, Bury St. Edmunds, Suffolk, IP28 6NP, Großbritannien

Contact: heiko.ziebell@jki.bund.de

Das 2b-Protein vom Gurkenmosaikvirus (CMV) unterdrückt antivirales RNA silencing und Salicylsäure-vermittelte Resistenz. Desweiteren kann das 2b-Protein Jasmonsäure-regulierte Genexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibieren. Mittels DNA-Microarrays wurde der Effekt der Infektion mit CMV und der 2b-Deletionsmutante CMV Δ 2b auf das Transkriptom von Tabakpflanzen untersucht. Infektionen mit CMV oder CMV Δ 2b führten zu weitreichenden, aber unterschiedlichen Änderungen in der Genexpression, unter anderem Salicylsäure-regulierter Gene. Infektion mit CMV, aber nicht Infektion mit der CMV Δ 2b-Deletionsmutante führte außerdem zu einer erhöhten Biosynthese von Salicylsäure.

Die Behandlung infizierter Pflanzen mit Jasmonsäure führte zu einer komplexen Änderung der Jasmonsäure-regulierten Genexpression. So wurde z. B. die Expression von mRNAs, die JAZ-Faktoren kodieren, in CMV-infizierten Pflanzen stark inhibiert. Desweiteren induzierte die Infektion mit CMV Δ 2b eine Resistenz gegen die Blattlaus *Myzus persicae* an Tabakpflanzen. Dieses deutet daraufhin, dass CMV-kodierte Faktoren eine Blattlausresistenz induzieren, die aber durch das 2b-Protein unterdrückt werden kann. Außerdem führte CMV-Infektion zu einer erhöhten Reproduktion von Blattläusen und ermöglichte eine höhere Überlebensrate von Nymphen. Da CMV von Blattläusen übertragen wird, könnte das 2b-Protein ein neuer Faktor sein, der die Blattlausübertragbarkeit beeinflusst.

Herstellung eines infektiösen Klons des Hop latent virus

Ziegler, Angelika¹, Schubert, Jörg¹

¹JKI Quedlinburg, SG, 06484 QLB, Erwin-Baur-Str. 27

Contact: angelika.ziegler@jki.bund.de

Im Rahmen eines DFG-Projektes zum Pathogenese-mechanismus von Viroiden soll ein VIGS-Vektor für Hopfen entwickelt werden. Das Hop latent virus, ein Hopfen symptomlos infizierendes Carlavirus, wurde ausgewählt, da es weit verbreitet und kein Quarantänevirus ist. Die Konstruktion des Volle-Länge-Klons wird dargestellt. Experimente zur Untersuchung der Infektiosität des genomischen Klons in Testpflanzen werden diskutiert.

Die Helferkomponente-Protease (HC-Pro) des Plum pox virus interagiert in einem bimolekularen Fluoreszenzkomplementations (BiFC)-Assay in *Nicotiana benthamiana* nicht mit sich selbst.

Zilian, Eva¹, Maiß, Edgar¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover

Contact: maiss@ipp.uni-hannover.de

Das Genom von Vertretern des Genus Potyvirus, wie z.B. des *Plum pox virus* (PPV), innerhalb der Familie der *Potyviridae*, kodiert u.a. für ein Polyprotein, das von drei viruseigenen Proteasen in 10 funktionelle Proteine prozessiert wird. Interaktionen zwischen diesen Proteinen spielen eine wichtige Rolle während des viralen Infektionszyklusses. Generell können zur Detektion von Protein-Interaktionen eine Reihe unterschiedlicher Methoden genutzt werden. Das „Yeast two-hybrid“-System stellt dabei eines der bekanntesten dar. Mittlerweile erlangt zudem die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) einen immer höheren Stellenwert, da dieses System im Gegensatz zu anderen Systemen eine direkte Visualisierung von Protein-Interaktionen in lebenden Zellen ermöglicht.

Eines der potyviralen Proteine ist die Helferkomponente-Protease (HC-Pro), ein multifunktionelles Protein, das u.a. als Protease bei der Prozessierung des Polyproteins fungiert, eine wichtige Rolle bei der Aphiden-Übertragung spielt und zudem die Funktion des Gene-Silencing Suppressors erfüllt. HC-Pro stand bereits im Mittelpunkt vieler Studien. Mittels „Yeast two-hybrid“-System wurde in der Vergangenheit für eine Vielzahl an Potyviren eine Selbstinteraktion des HC-Pros gezeigt.

Mittels eines optimierten BiFC-Systems, basierend auf einem monomeren rot fluoreszierenden Protein (mRFP), sollten in einer Studie die Protein-Protein Interaktionen eines PPV-NAT Isolates untersucht werden. Dabei konnte in *N. benthamiana* Epidermiszellen keine Selbstinteraktion des HC-Pros nachgewiesen werden. Auch für ein weiteres PPV Isolat (PPV-AT) und

ein PVY-Isolat konnten keine Interaktionen der HC-Pros festgestellt werden. Vergleichsuntersuchungen mit dem vollständigen TuMV HC-Pro hingegen, für das vor kurzem erst mittels eines YFP-basierten BiFC eine Selbstinteraktion in *N. benthamiana* gezeigt werden konnte, resultierten auch mit dem mRFP-basierten BiFC eindeutig in einer Interaktion. Zudem wurden sowohl für TuMV als auch für PPV die Interaktionen zweier HC-Pro Fragmente (Aminosäurebereich 1-99 bzw. 100-458) detektiert. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die fehlende Interaktion des kompletten HC-Pros beider PPV-Isolate und des PVY-Isolats nicht auf einem unzureichenden BiFC-System beruht. Die gewonnenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Selbstinteraktion des HC-Pros *in planta* speziesabhängig sein könnte.