



Deutsche
Phytomedizinische
Gesellschaft e.V.

47. JAHRESTREFFEN DES ARBEITSKREISES “VIRUSKRANKHEITEN DER PFLANZEN“

16. und 17. März 2015

Humboldt-Universität zu Berlin
Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und
Gartenbauwissenschaften, Berlin Dahlem

Programm, Teilnehmerliste und Abstracts

Vorträge & Posterpräsentationen im, bzw. bei:



Vortragssaal A300 Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für
Kulturpflanzen, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin
(http://www.jki.bund.de/no_cache/de/startseite/ueber-uns/standort-anfahrtswege/berlin.html)

Sponsoren der Tagung

Herzlichen Dank für ihre Unterstützung!



GRundlagen + Innovation PflanzenSchutz GmbH

Montag, 16. März 2015	
12:00 – 12:45	Anreise und Registrierung zur Tagung
12:45 – 13:00	Begrüßung und organisatorische Bekanntmachungen <i>Tatjana Kleinow, Mark Varrelmann und Carmen Büttner & Team</i>
13:00 – 14:40	Sektion I: Moderation Carmen Büttner
13:00 – 13:40	Einführungsvortrag Viren im Obstbau: Wichtige Vertreter & aktuelle Entwicklungen <i>Wilhelm Jelkmann</i>
13:40 – 14:00	Construction of full-length cDNA clones of apple chlorotic leaf spot virus using In-Fusion <i>Lei Zhang & Wilhelm Jelkmann</i>
14:00 – 14:20	Studien zur Translationsinitiation der Polyproteine 1 und 2 des cherry leaf roll virus (CLRV) <i>Mathias Breuhahn; Susanne von Bargaen; Juliane Langer; Markus Rott & Carmen Büttner</i>
14:20 – 14:40	Tobacco rattle virus (TRV) in Kartoffel-Anbaugebieten in Deutschland: Genverluste in RNA2-Molekülen nach mechanischer Übertragung auf Tabak, eine neue TRV RNA2-Spezies und unterschiedliche RNA1/RNA2-Paarungen in verschiedenen Regionen <i>Kerstin Lindner; Inga Hilbrich & Renate Koenig</i>
14:40 – 15:20	KAFFEE-/TEEPAUSE mit Präsentation der Poster im Vestibül (40 min)
15:20 – 16:20	Sektion II: Moderation Christina Wege
15:20 – 15:40	Construction and fluorescence labeling of infectious full-length cDNA clones of beet soil-borne mosaic virus (BSBMV) and beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) <i>Marlene Dach; Hamza Mohammad; Mark Varrelmann & Edgar Maiß</i>
15:40 – 16:00	Applications of <i>Benyvirus</i> full-length clones - development of virus induced gene-silencing vectors and study of interactions in mixed infections <i>Hamza Mohammad; Marlene Dach; Edgar Maiß & Mark Varrelmann</i>
16:00 – 16:20	Strategies to achieve broad-spectrum resistance against cassava brown streak disease (CBSV/UCBSV) using siRNA <i>Beena Ravindran & Stephan Winter</i>
16:20 – 16:35	Kurze Pause (15 min.)
16:35 – 18:15	Sektion III Berichte & Besprechungspunkte aus der Praxis: Moderation Mark Varrelmann
16:35 – 16:45	B-Fast ELISA, ein neu entwickelter ELISA Test für Ergebnisse in nur 2 Stunden <i>Wulf Menzel; Mark Varrelmann & Stephan Winter</i>
16:45 – 16:55	Aktuelle Problemsituation: Viren in der Beratung des Pflanzenschutzamtes Berlin <i>Barbara Jäckel</i>
16:55 – 17:05	Das Auftreten von Viren 2014 im Gartenbau – Bayerische Ergebnisse, aktuelle Themen und Fragestellungen <i>Luitgardis Seigner</i>
17:05 – 17:15	Virologische Aufgaben am Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg (LTZ) Karlsruhe <i>Manfred Schröder</i>
17:15 – 17:25	Aus der österreichischen Praxis: Vorstellung der Abteilung "Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten" und Bericht zu aktuell diagnostizierten Viren & Viroiden <i>Sabine Grausgruber-Gröger</i>
17:25 – 17:35	Virologische Arbeiten für den Pflanzenschutzdienst in Sachsen <i>Wolfram Wiedemann</i>
17:35 – 17:45	Einige außergewöhnliche Virus Wirt Kombinationen im Zierpflanzenbau <i>Joachim Hamacher</i>
17:45 – 17:55	Verbreitung von Viren in Spargeljunganlagen <i>Hermann-Josef Krauthausen</i>
17:55 - 18:05	Das wheat streak mosaic virus (Weizenstrichelmosaik-Virus) breitet sich aus: erste Berichte zum Vorkommen in Deutschland und Österreich <i>Frank Rabenstein; Angelika Ziegler; Katja Richert-Pöggeler; Jörg Schubert; Michael Oberforster</i>

18:05 - 18:15	Aus der virologischen Praxis des Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück <i>Sabine Fabich</i>
ab 18:15	Pause & Möglichkeit für: Gespräche & Diskussionen im kleineren Kreis (Koordinierungstreffen) Besichtigung des Institutes in Kleingruppen (Organisation erfolgt vor Ort) Fahrt in die Hotels
ab 19:30	Gemütliches Beisammensein mit Buffet Verbinder Versuchsgewächshaus (Humboldt-Universität zu Berlin, Gewächshausanlage Dahlem, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin) Zwanglose Besichtigung des Gewächshauses möglich (Info: https://www.agrar.hu-berlin.de/de/institut/einrichtungen/gwh & http://www.agrosnet.de/gwh/greenhouse.html)

Dienstag, 17. März 2015	
08:20 – 10:20	Sektion IV: Moderation <i>Tatjana Kleinow</i>
08:20 – 09:00	Einführungsvortrag: Next generation sequencing <i>Bernhard Busch</i>
09:00 – 09:20	Next generation sequencing analysis of mixed infection with apple latent viruses reveals new strains of <i>Betaflexiviridae</i> <i>Vladimir Jakovljevic; Jonathon Blake; Vladimir Benes, & Wilhelm Jelkmann</i>
09:20 – 09:40	Neue Möglichkeiten und Herausforderungen moderner Sequenziertechnologien am Beispiel von Phytoplasmen und verwandten Bakterien <i>Michael Kube & Carmen Büttner</i>
09:40 – 10:00	Optimierung eines PCR basierten Nachweisverfahrens für <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> <i>Carolin Popp; Roland W.S. Weber; Volker Zahn & Edgar Maiß</i>
10:00 – 10:20	Vorstudie zum Einfluss von Silizium auf cucumber mosaic virus-infizierte Gurken-Gewebekulturen <i>Sabine Holz; Michael Kube; Grzegorz Bartoszewski; Bruno Huettel & Carmen Büttner</i>
10:20 – 11:00	KAFFEE-/TEEPAUSE und Präsentation der Poster im Vestibül (40 min)
11:00 – 13:00	Sektion V: Moderation <i>Edgar Maiß</i>
11:00 – 11:20	Modified TMV particles as advantageous scaffolds for the presentation of sensorically active enzymes <i>Claudia Koch; Katrin Wabbel; Fania Geiger; Sabine Eiben; Peter Krolla-Sidenstein; Hartmut Gliemann & Christina Wege</i>
11:20 – 11:40	Transmission Activation durch Vektoraktivität, ein generelles Phänomen? <i>Martin Drucker; Christiane Then; Marie Ducouso; Edwige Berthelot; Jean-Luc Macia & Stéphane Blanc</i>
11:40 – 12:00	Whiteflies Tiny insects with high impact <i>Monika Götz & Stephan Winter</i>
12:00 – 12:20	Frühe Funktion des Abutilon-Mosaik-Virus AC2 Gens als Replikationsbremse <i>Björn Krenz; Kathrin Deuschle; Tobias Deigner; Sigrid Unseld; Gabi Kepp; Christina Wege; Tatjana Kleinow & Holger Jeske</i>
12:20 – 12:40	Ku80 retards geminivirus multiplication <i>Kathrin Richter & Holger Jeske</i>
12:40 – 13:00	Analysing self- and intraviral protein-interaction of pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) proteins <i>Chiara Engelbrecht; Ingrid Schießl; Uwe Sonnewald & Björn Krenz</i>
Ab 13:00	Allgemeines und Abschlussdiskussion <i>Tatjana Kleinow & Mark Varrelmann</i>
anschließend	Tagungsende Möglichkeit zum Mittagessen in der Kantine vor Ort (Anmeldung vor Ort am Montag)

Übersicht Posterpräsentationen

1

Structural and Non-Structural Proteins of *Fusarium graminearum* Mycovirus-China 9 (FgV-ch9) and their Processing in the fungal host

Blum, Christine¹; Alder, Arne¹ & Heinze, Cornelia¹

¹Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Ohnhorststraße 18, 22609 Hamburg, Deutschland

2

'*Candidatus Phytoplasma ulmi*' affecting *Ulmus laevis* in Germany

Anne-Mareen Eisold¹; Kube, Michael¹; Holz, Sabine¹ & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

3

Emergence of birch-leafroll disease in Fennoscandia correlated with significant changes in cherry leaf roll virus population

Rumbou, Artemis¹; von Bargaen, Susanne¹; Jalkanen, Risto² & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²Natural Resources Institute Finland (Luke), Rovaniemi Unit, PO Box 16 96301 Rovaniemi Finland

4

Auftreten von EMARaV und CLRV in *Sorbus aucuparia* und *Betula* spp. im skandinavischen Raum und Finnisch-Lapland

Harhausen, Björn¹; von Bargaen, Susanne¹ & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

5

Studien zur Übertragung des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) auf putative neue Wirtspflanzen

Dieckmann, Heike Luise¹; Roßbach, Jenny¹; von Bargaen, Susanne¹; Mühlbach, Hans-Peter² & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg, Deutschland

6

Vollständige Genomsequenz eines carrot virus S Isolates aus Meerfenchel aus Spanien

Menzel, Wulf¹ & Winter, Stephan¹

¹Leibniz Institut DSMZ, Abteilung Pflanzenviren, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland

7

Charakterisierung einer neuen *Tobamovirus*-Spezies von Paprika aus Marokko

Menzel, Wulf¹ & Winter, Stephan¹

¹Leibniz Institut DSMZ, Abteilung Pflanzenviren, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland

8

Erste Untersuchungen zum Nachweis von Potyviren aus afrikanischen Nachtschattengewächsen (*Solanum* spp.)

*Rose, Hanna*¹; *Büttner, Carmen*²; *von Barga, Susanne*²; *Langer, Juliane*²; *Winter, Stefan*³ & *Maiß, Edgar*¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Deutschland

²Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

³Leibniz Institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Deutschland

9

A first survey on plant virus infections of African nightshade from small farms in Western Kenya

*Langer, Juliane*¹; *Aba Toumou, Lucie*²; *Mukoye, Benard*³; *von Barga, Susanne*¹; *Bandte, Martina*¹; *Kube, Michael*¹; *Ulrichs, Christian*⁴; *Wanjohi, Waceke*⁵ & *Carmen Büttner*¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²Crop production and protection, University of Bangui, Central African Republic

³Biological Sciences Department, Masinde Muliro University of Science and Technology (MMUST), P.O. Box 190 - 50100, Kakamega, Kenya

⁴Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Urbane Ökophysiologie, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin, Deutschland

⁵Kenyatta University, School of Agriculture and Enterprise Development, Kenyatta University, P.O.Box 43844 – 00100, Nairobi, Kenya

10

Nachweis des Kartoffel Virus S (PVS) in etiolierten Kartoffelpflanzen

*Maiß, Edgar*¹ & *Zahn, Volker*²

¹Leibniz Universität Hannover, Inst. für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Deutschland

²Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Wunstorfer Landstr. 9, 30453 Hannover, Deutschland

11

Erste komplette Genomsequenzanalyse vom Luffa aphid-borne yellows virus (LABYV) zeigt das Vorhandensein von mindestens zwei Konsensussequenzen in einem Isolat aus Thailand

*Knierim, Dennis*¹; *Maiß, Edgar*²; *Menzel, Wulf*¹; *Winter, Stephan*¹ & *Kenyon, Lawrence*³

¹Leibniz Institute DSMZ, Pflanzenviren, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland

²Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme - Abt. Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Deutschland

³AVRDC - The World Vegetable Center, Plant Virology, PO Box 42, Shanhua, Tainan 74199, Taiwan

12

Untersuchungen zur Identifikation und möglichen Expression eines sechsten offenen Leserahmens im lettuce virus X (LeVX)

*Schimmel, Jessica*¹; *Winter, Stephan*² & *Maiß Edgar*¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Deutschland

²Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Inhoffenstraße 7b, 38124 Braunschweig, Deutschland

13

Erstellung eines infektiösen Vollängenklons des cucumber vein yellowing virus

*Schieck, Kaja*¹ & *Maiß, Edgar*¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, Deutschland

14

Expression and localisation of the ACMV AC4 protein in fission yeast

*Hipp, Katharina*¹; *Rau, Peter*¹ & *Jeske, Holger*¹

¹Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

15

Identification of Rep interaction partners in fission yeast

*Dietz, Andrea*¹; *Hipp, Katharina*¹ & *Jeske, Holger*¹

¹Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

16

The induction of a stromule network by a plant DNA-virus in leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route

*Krenz, Björn*¹; *Jeske, Holger*² & *Kleinow, Tatjana*²

¹Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biochemie, Department Biologie, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen, Deutschland

²Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

17

Herstellung und Charakterisierung zweidimensionaler Virenkristalle

*Rink, Veronika*¹; *Müller-Reno, Christine*¹; *Boonrod, KaJohn*²; *Braun, Mario*²; *Ziegler, Christiane*¹ & *Krczal, Gabi*²

¹Fachbereich Physik und Forschungszentrum Optimas, TU Kaiserslautern, Erwin Schrödinger Str. 56, 67663 Kaiserslautern, Deutschland

²RLP AgroScience GmbH, AlPlanta - Institut für Pflanzenforschung, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Deutschland

Abstracts der Vorträge

Übersichtsvortrag (Montag 16.3.2015)

Viren im Obstbau: Wichtige Vertreter & aktuelle Entwicklungen

Jelkmann, Wilhelm¹

¹Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: Wilhelm.Jelkmann@jki.bund.de

Construction of full-length cDNA clones of apple chlorotic leaf spot virus using In-Fusion

Zhang, Lei¹ & Jelkmann, Wilhelm¹

¹Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: Lei.Zhang@jki.bund.de

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) is a member of genus *Trichovirus*, family *Betaflexiviridae*, infecting pome and stone fruit. The flexuous filamentous particle of ACLSV is approximatedly 680 to 780 nm in length and 12 nm in width, containing a genome of positive single-strand RNA in about 7.5 kb (excluding the polyadenylation tail at 3' end). Since in nature the ACLSV exist in different variants in a plant host, which cannot meet the requirement for 'pure virus' in experiment, we attempt to construct infectious cDNA clones to overcome. For constructing infectious cDNA clones of viruses, there are different methods based on combining of either restriction enzymes-created sticky ends or PCR-amplified complementary ends of inserts and vectors. In our study, a commercial product of In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) was employed, in which the offered Enzyme Premix works on and ligates the PCR-amplified complementary ends. ACLSV in a peach tree was chosen to rescue. Total RNA of leaf tissue from the infected peach tree was extracted using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). The cDNA was generated by RT-PCR with RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Thermal Scientific). Full-length fragments of ACLSV (inserts) and linear pV297 (a pBin vector, E. Maiß, Hannover) were produced from PCRs using Precisor High-Fidelity DNA Polymerase (BioCat). Assembly reactions were performed using In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) according to the manufacturer's instruction, followed by transforming NEB 10β competent cells. Finally, four successful full-length cDNA clones were identified, and two out of them were confirmed infectious on tobacco plants (*N. occidentalis* 37b) by *Agrobacterium*-mediated transformation.

Studien zur Translationsinitiation der Polyproteine 1 und 2 des cherry leaf roll virus (CLRV)

Breuhahn, Mathias¹; von Barga, Susanne¹; Langer, Juliane¹; Rott, Markus¹ & Büttner Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: mathias.breuhahn@gmx.de

Cherry-leaf roll virus (CLRV), ein *Nepovirus* der Subgruppe C aus der der Familie der *Secoviridae* (Sanfacon et al., 2009) besitzt ein bipartites Genom. Das aus einzelsträngiger positiv orientierter RNA bestehende Genom kodiert für zwei Polyproteine (P1 und P2). Das Virus weist aufgrund seiner weltweiten Verbreitung an Obst- und Laubgehölzen eine Vielzahl von genetischen Polymorphismen auf. Sequenzvariabilitäten zeigen sich unter anderen in der 5' terminalen Region der viralen RNA. Einige CLRV Isolate besitzen nur ein Start-Codon, wohingegen andere über ein zweites ATG *in frame* verfügen, welches ebenfalls zur Translationsinitiation dienen könnte. Ziel der Studie war die Überprüfung welches Start-Codon zur Translation der Polyproteine von CLRV genutzt wird.

Die 5' terminalen Regionen der RNA1 und RNA2 von verschiedenen CLRV Isolaten zweier separater phylogenetischer Gruppen wurde amplifiziert, in pJet1.2 kloniert und durch Sequenzierung überprüft, bevor sie hinter den T7-Promoter in den Expressionsvektor pET28a(+)überführt wurden. Die pJet-Konstrukte dienten als Template, um Punktmutationen mittels *overlap extension* PCR (Heckman and Pease 2007) einzufügen, um das erste, das zweite oder aber beide Start-Codons zu eliminieren. Mutierte 5' terminale Fragmente wurden ebenfalls in pET28a(+) kloniert und sequenziert. Die Expression der Polypeptide von den Wildtyp- bzw. mutierten Konstrukten erfolgte *in vitro* mit Hilfe eines gekoppelten Transkriptions- und Translationsystems in Verbindung mit einer Biotinylierung. Markierte Polypeptide wurden anschließend durch SDS PAGE nach Größe aufgetrennt und mittels eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugates im *Western blot* detektiert. Die Konstrukte für die vergleichende Analyse der Translationsinitiation der RNA1 und RNA2 der verschiedenen Isolate konnten erfolgreich hergestellt werden. Erste Ergebnisse zur Identifikation der Start-Codons, die zur Expression von P1 und P2 des CLRV dienen, werden vorgestellt.

Referenzen

Heckman KL, Pease LR, 2007. Nature Protocols 2, 924-932.

Tobacco rattle virus (TRV) in Kartoffel-Anbaugebieten in Deutschland: Genverluste in RNA2-Molekülen nach mechanischer Übertragung auf Tabak, eine neue TRV RNA2-Spezies und unterschiedliche RNA1/RNA2-Paarungen in verschiedenen Regionen

Lindner, Kerstin¹; Hilbrich, Inga¹ & Koenig, Renate²

¹Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11, 38104 Braunschweig, Deutschland

²c/o Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11, 38104 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: renate.koenig@jki.bund.de

Tobacco rattle virus (TRV) ist ein weit verbreitetes Pathogen für Kartoffeln in Deutschland. Um TRV-bedingte Schäden (Eisenfleckigkeit) zu vermeiden oder auf niedrigem Niveau zu halten, ist der Anbau resistenter Sorten erforderlich. In benachbarten Ländern wurden unterschiedliche TRV-Stämme nachgewiesen, unter anderem auch ein Resistenz-brechender. Mit Hilfe von PCR-Techniken wurden von uns TRV-Herkünfte aus verschiedenen Teilen Deutschlands in Kartoffelwurzeln oder frisch infizierten Knollen analysiert. In einem Gebiet nördlich von Braunschweig fanden wir einen Stamm (HaW), dessen RNA2 aus mehr als 4000 Nukleotiden (nts) besteht. Der 5'-Bereich der HaW RNA2 einschließlich des Hüllprotein-Gens ist fast 100% identisch mit den RNA2 5' Bereichen von früher in benachbarten Ländern erhaltenen TRV-Isolaten, die auf Tabakblättern vermehrt worden waren. Die RNAs 2 der früher beschriebenen Isolate bestehen jedoch nur aus c. 2000 nts. Sie enthalten als einziges Gen das Hüllprotein-Gen. Zwei weitere wahrscheinlich u.a. für die Nematoden-Übertragung notwendige Gene (2b und 2c), die sich in der HaW RNA2 finden, sind in den früheren Isolaten - wahrscheinlich aufgrund der Vermehrung in Tabakblättern - entweder ganz verloren gegangen oder es sind nur noch kurze Teilsequenzen von ihnen vorhanden. Ähnliche Deletionsmutanten traten in unserem HaW-Isolat nach mechanischer Übertragung auf Tabakblätter auf. Eine weitere RNA2-Spezies (ByK-2), die wir sowohl in Niedersachsen als auch in Bayern feststellten, enthält ein Hüllprotein-Gen, dessen Sequenz von Mitarbeitern der Uni Hamburg im Jahr 2000 bei der GenBank eingereicht wurde, ohne dass über weitere Bearbeitungsergebnisse berichtet wurde. Für dieses Isolat wurde das gesamte Genom analysiert. Interessanterweise ist diese TRV RNA2-Spezies in Niedersachsen mit einer anderen TRV RNA1 assoziiert als in Bayern. Einen ganz anderen RNA2-Typ, der zuerst unter dem Namen 'TpO1' aus England beschrieben wurde, stellten wir in Mecklenburg/Vorpommern sowie in Hessen fest. Auch hier waren es unterschiedliche RNA1-Moleküle, mit denen diese RNA2 assoziiert war.

Construction and fluorescence labeling of infectious full-length cDNA clones of beet soil-borne mosaic virus (BSBMV) and beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)

*Dach, Marlene*¹; *Mohammad, Hamza*²; *Varrelmann, Mark*¹ & *Maiß, Edgar*²

¹Institut für Zuckerrübenforschung (IfZ), Phytopathologie, Holtenser Landstr. 77, 37079 Göttingen, Deutschland

²Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abt. Phytomedizin, Pflanzenvirologie, Herrenhäuser Strasse 2, 30419 Hannover, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: varrelmann@ifz-goettingen.de

BSBMV and BNYVV both belong to the genus *Benyvirus* in the family *Benyviridae*. They are transmitted by the soil-borne plasmodiophoromycete *Polymyxa betae*, possess a similar genome organization with 4-5 ssRNA genome components, high sequence homology (60-77% on nucleotide level, depending on the genome component). More, they infect a similar host range (mainly members of the family *Amaranthaceae*). Both species cause diseases in *Beta vulgaris* with variable symptom expression and tissue affinity. BNYVV is mainly restricted to the root system and induces rhizomania, whereas BSBMV causes systemic leaf mosaic symptoms. In sugarbeet, BNYVV can be controlled with dominant resistance genes, like *Rz1*, which do not target BSBMV. In the US, both viruses occur in mixed infection and antagonism was suggested.

Here, the construction and fluorescence labeling of infectious cDNA clones of both viruses for *Agrobacterium*-mediated infection is reported. By replacing conventional cloning with isothermal *in vitro* recombination (Gibson et al., 2009), successful construction of cDNA clones under control of a 35S promoter in binary vectors of all four genome components was achieved for both species. The recombinant viruses displayed characteristic virus particles, replication of all components in local and systemic infection in *Nicotiana benthamiana*, *B. vulgaris* and *Beta macrocarpa* as well as transmission by *Polymyxa betae*. Subsequently both infectious clones were applied for fluorescence labeling (smRSGFP, mRFP) by means of different strategies. Replacement of the open reading frame (ORF) in the small RNA component 4 resulted in local fluorescence in *N. benthamiana* following agroinfection but no systemic spread was observed. Replacement of the RNA2 encoded coat protein-readthrough (RT) ORF in both viruses resulted in systemic movement and formation of wild-type symptoms in *N. benthamiana*. Strong fluorescence was detected in leaf as well as in root tissues. These results will allow identifying the molecular basis for virus species-specific properties, the tissue colonization strategy including interactions in mixed infections as well as formation of reassortants and recombinants.

References

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O. 2009. Nature Methods 6: 343–345.

Applications of *Benyvirus* full-length clones - development of virus induced gene-silencing vectors and study of interactions in mixed infections

*Mohammad, Hamza*¹; *Dach, Marlene*²; *Maiß, Edgar*¹ & *Varrelmann, Mark*²

¹Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abt. Phytomedizin, Pflanzenvirologie, Herrenhäuser Strasse 2, 30419 Hannover, Deutschland

²Institut für Zuckerrübenforschung (IfZ), Phytopathologie, Holtenser Landstr. 77, 37079 Göttingen, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: hamzamohammad@ipp.uni-hannover.de

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) and beet soil-borne mosaic virus (BSBMV) are members of the genus *Benyvirus* (family *Benyviridae*). They are vectored by *Polymyxa betae* and possess similar genome organisation, host range and morphology. BNYVV is the causal agent for Rhizomania disease in sugar beet (*Beta vulgaris*) (Koenig and Lesemann, 2005), BSBMV mainly causes a leaf mosaic. BNYVV has been reported in most regions of the world, while BSBMV distribution is limited to the US.

Full-length clones of BNYVV under control of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (Maiß et al., unpublished) and of BSBMV (Dach et al., unpublished) for *Agrobacterium*-mediated infection have been generated by the Gibson Assembly technique (Gibson et al., 2009). As replacement of RNA2 encoded coat-protein read-through open reading frame by a fluorescent marker gene (mRFP, smRSGFP) did not interfere with systemic movement and led to strong fluorescence development/marker gene expression, this insertion point was assayed for the suitability to convert both full-length clones into virus induced gene silencing (VIGS) vectors. Fragments (606 bp) of the phytoene desaturase (PDS) gene of *Nicotiana benthamiana* and *Beta macrocarpa* were cloned as sense or inverted-repeat constructs into RNA 2 of BNYVV or BSBMV, respectively. Agroinfection of *N. benthamiana* resulted in systemic infection and development of a photobleaching phenotype, indicative for PDS-VIGS.

To find evidence for the ability of both virus species to transreplicate and –encapsidate each other, the RNA 1 and 2 components were combined and used for *N. benthamiana* infection. Both in-vitro reassortants were viable but compared to wild-type virus symptoms occurred later and showed a different symptom severity compared to the wild-type combinations. To assay tissue affinity and colonization strategy in mixed infection, double infection experiments of both species equipped with fluorescent markers are in progress.

References

Gibson, D. G., L. Young, et al. (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." *Nature methods* 6(5): 343-345.

Koenig, R., Lesemann, D.E., 2005. Genus Benyvirus. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London.

Strategies to achieve broad-spectrum resistance against cassava brown streak disease (CBSV/UCBSV) using siRNA

Ravindran, Beena¹ & Winter, Stephan¹

¹Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Pflanzenvirologie, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: beena.ravindran@jki.bund.de

Cassava brown streak disease (CBSD) is a devastating disease caused by two *Ipomovirus* species, *Uganda cassava brown streak virus* and *cassava brown streak virus* causing serious losses of cassava due to root necrosis essentially destroying harvest of the tuberous roots. Cassava lacks innate resistance against CBSD viruses and hence alternative resistance strategies have to be pursued. Short hairpin RNA (shRNA), artificial micro RNA (amiRNA) and trans-acting small interfering RNA (ta-siRNA) - mediated post transcriptional gene silencing was tried to impart resistance in the model plant *Nicotiana benthamiana*, a susceptible host for both viruses and their isolates. Constructs were designed from sequences conserved in both viral genomes and were cloned in an inverted repeat (IR) orientation (hpRNA) into a binary transformation vector under the control of the 35S promoter of cassava vein mosaic virus. Virus sequences were screened for miRNA target sites (<http://wmd3.weigelworld.org>), the most promising sequences were chosen and cloned in a MIR319 precursor by replacing its 21nt stem sequence and resulting in a functional artificial miRNA. In plants many ta-siRNA regulatory pathways have been identified as significant components of the gene networks involved in plant development, metabolism, responses to abiotic and biotic stresses, and DNA methylation at TAS locus. One of these pathways was utilized to create multiple virus resistance targets to confer broad spectrum resistance against UCBSV and CBSV. Sequences were chosen from highly conserved regions to target immunity against strains and isolates of both viruses. Transgenic *N. benthamiana* were screened for resistance against diverse isolates of CBSV and UCBSV by mechanical inoculation of viruses and subsequent observation of disease development. Transgenic

plants expressing any of hpRNA, amiRNA or ta-siRNA were immune to UCBSV/ CBSV. However, resistance was only achieved against homologous virus strains. When inoculated with heterologous viruses, symptoms appeared much delayed but eventually developed similar to virus infections on wild type non-transgenic plants. Nonetheless, expression of synthetic genes or multiple amiRNA/ta-siRNA comprising sequences from both viruses resulted in broad-spectrum immunity. Successful constructs are now transferred to cassava as a part of an NSF/BMGF project "BREAD".

Übersichtsvortrag (Dienstag 17.3.2015)

Next generation sequencing

Busch, Bernhard¹

¹GATC Biotech AG, Jakob-Stadler-Platz 7, 78467 Konstanz, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: b.busch@gatc-biotech.com

Next generation sequencing analysis of mixed infection with apple latent viruses reveals new strains of *Betaflexiviridae*

Jakovljevic, Vladimir¹; Blake, Jonathon²; Benes, Vladimir² & Jelkmann, Wilhelm¹

¹Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Deutschland

²EMBL Genomics Core Facility, Meyerhofstr. 1, 69117 Heidelberg, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: vladimir.jakovljevic@jki.bund.de

Latent viruses cause no symptoms on their host and are therefore difficult to detect. However, mixed infection with latent viruses can cause symptoms and severe damages in pome- and stone fruits in commercial orchards. Here we analyzed apple trees with mixed infections of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple stem grooving virus (ASGV) and apple stem pitting virus (ASPV) using next generation sequencing of the viral double stranded RNA (dsRNA). In addition to the mixed viral infection, two out of three samples had also symptoms of apple rubbery wood (ARW) and flat limb (FL), diseases with unknown causal agent. Using sequence reads, we analyzed structure of the mixed viral population by de novo assembly. Assembled contigs revealed several complete genomes of new strains of latent viruses of apple.

Neue Möglichkeiten und Herausforderungen moderner Sequenziertechnologien am Beispiel von Phytoplasmen und verwandten Bakterien

Kube, Michael¹ & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: michael.kube@agrar.hu-berlin.de

Die erste Generation der modernen Sequenziertechnologien wie das *Pyro-Sequencing* (454 Life Technologies/ Roche), *Sequencing by Synthesis* (Solexa/illumina) und *Sequencing by Ligation* (Applied Biosystems/Life Technologies) ist charakterisiert durch *Amplicon-Libraries* zur Herstellung von Templaten, die massive Parallelisierung von Sequenzierreaktionen sowie die zeitgleiche Sequenzbestimmung. In der experimentellen Durchführung einfachere Systeme, wie die *Semiconductor Technology* (Ion Torrent), folgten. In den letzten Jahren gelang es bei den etablierten Technologien den Probendurchsatz zu erhöhen und längere *Reads* zu erreichen, unter anderem durch sogenannte *paired-end* Strategien. Lange *Reads* von hoher Qualität eröffnen neue Möglichkeiten in der Diagnose, Genomanalyse sowie Transkriptomforschung und lösten den aktuellen Sequenzier-Boom aus. Tiefensequenzierungen ermöglichen die Identifizierung und Analyse

von Pathogenen wie Phytoplasmen in Metagenom und –transkriptomstudien. Trotz aller Fortschritte stellen noch immer hohe Kosten und zu kurze *Read*längen die größten Probleme in der Sequenzanalyse dar. Neue Methoden wie das *Single Molecule Real Time* (SMRT) Sequencing (Pacific Biosciences) ermöglichen auf Grund der Leseweiten von mehreren Kilobasen hier die Analyse von nicht zellfrei-kultivierbaren Pathogenen. Probleme wie fehlerhafte Zuordnungen, Konflikte beim Assemblieren und die *deep-cluster* Bildung werden hierbei weitestgehend vermieden. Höherwertige Ergebnisse und eine deutlich vereinfachte Datenanalyse in der Diagnostik und der Analyse von Metagenomdaten werden ermöglicht. Bei der Rekonstruktion von Genomen der Acholeplasmen und der *Repeat*-reichen Phytoplasmen lassen sich diese offensichtlichen Vorteile stellvertretend für viele weitere Anwendungen zeigen.

Optimierung eines PCR basierten Nachweisverfahrens für *Candidatus Phytoplasma mali*

*Popp, Carolin*¹; *Weber, Roland W.S.*²; *Zahn, Volker*³ & *Maiß, Edgar*¹

¹Leibniz Universität Hannover, Inst. für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Deutschland

²Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Obstbauversuchsanstalt Jork, Moorende 53, 21635 Jork, Deutschland

³Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Pflanzenschutzamt, Wunstorfer Landstr. 9, 30453 Hannover, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: popp@ipp.uni-hannover.de

Die Apfeltriebsucht, verursacht durch den Erreger '*Candidatus Phytoplasma mali*', ist eine ökonomisch wichtige Obstbaum-Phytoplasmosenose. Der Routinenachweis erfolgt gegenwärtig durch PCR. Dieses Verfahren ist sensitiver als ELISA oder eine DAPI Färbung und günstiger als eine Real-Time-PCR. Allerdings können Extrakte von holzigen Pflanzen inhibierende Substanzen, wie zum Beispiel Polyphenole, enthalten, so dass der Nachweis mittels PCR nicht immer zweifelsfrei geführt werden kann.

In dieser Arbeit wurden deshalb modifizierte Oligonukleotid-Primer zur Detektion von Phytoplasmen der AP-Gruppe mit modifizierten Oligonukleotid-Primern, welche als interne Kontrolle für die Präsenz des *nad5*-Gens aus Mitochondrien des Apfels fungieren, kombiniert.

Beim Vergleich von drei Nukleinsäureextraktionsverfahren erwiesen sich eine Silicapartikel-basierte Methode nach Menzel et al. (2002) und das kommerziell verfügbare DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen als geeignet. Nach Anpassung der Konzentration der modifizierten Oligonukleotid-Primer, der Anlagerungstemperatur und der Anzahl von PCR Zyklen wurden PCR-Reaktionen an DNA-Proben von symptomatischen und asymptomatischen Bäumen aus dem Alten Land durchgeführt. Für alle Proben ist ein Fragment des internen Standards von 922 bp sichtbar. In Extrakten aus befallenen Bäumen ist ein zusätzliches Fragment mit einer Größe von 1070 bp festzustellen. Beide Fragmente lassen sich deutlich sichtbar in einem 1,5%igem Agarosegel auftrennen. Desweiteren kann eine Unterscheidung beider Fragmente durch eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* erfolgen.

Das optimierte PCR-Testverfahren erlaubt die parallele Detektion beider Fragmente in einem Schritt und erleichtert so die Interpretation von Ergebnissen.

Vorstudie zum Einfluss von Silizium auf cucumber mosaic virus-infizierte Gurken-Gewebekulturen

Holz, Sabine¹; Kube, Michael¹; Bartoszewski, Grzegorz²; Huettel, Bruno³ & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²Warsaw University of Life Sciences, Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology, 159 Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw/ Poland

³Max Planck Genome Centre Cologne, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: sabine.holz@agrar.hu-berlin.de

Silizium (Si) ist das zweithäufigste Element in der Erde und wird als vorteilhaftes Element für Pflanzen gesehen, gilt jedoch nicht als essentiell. Durch Silizium-Transporter in den Wurzeln können Pflanzen Si aktiv und passiv in der wasserlöslichen Form, Kieselsäure, aufnehmen und innerhalb der Pflanze transportieren. In den Zellwänden wird Si als Silica-Gel eingelagert. Neben höheren Erträgen, und verbesserter physikalischer Stabilität von Kultur- und Gewebekulturpflanzen ermöglicht Si eine höhere Toleranz gegenüber abiotischem und biotischem Stress. Viele Studien wurden zu biotrophen Pilzen durchgeführt, jedoch ist die Rolle von Si auf virale Infektionen nicht eindeutig geklärt.

In einem Gurken-Gewebekulturansatz der Linie B10 wurden genetisch identische Pflanzen generiert und auf Kulturmedien ohne/mit Natrium-Silikat kultiviert sowie bewurzelt. Blätter von Regeneranten, mit/ohne Si, wurden mechanisch mit dem cucumber mosaic virus (CMV) infiziert und die Virusinfektion durch RT-PCR in systemischem Gewebe nachgewiesen. Eine RNA-Sequenzierung von Kontroll- und Si-behandelten Pflanzen wurde durchgeführt, um mittels einer Transkriptomstudie differentiell exprimierte Kandidatengene durch Natrium-Silikat-Zugabe zu identifizieren. Ausgewählte Gene werden via qPCR untersucht werden.

Verschieden behandelte und ausdifferenzierte Gurkenklone wurden gewonnen und oberirdisches Pflanzenmaterial für RNA-Isolierungen verwendet. Die RNA-Sequenzierung von Kontroll- und Natrium-Silikat-behandelten Klonen sowie darauffolgender Transkriptomanalyse ermöglichte die Identifizierung von ungefähr 1.000 differentiell exprimierten Genen. Die funktionelle Klassifizierung zu biologischen Funktionen erfolgte bei 50% der identifizierten Transkripte, und zeigte einen Einfluss von Si auf den primären Metabolismus (Photosynthese, Lipidmetabolismus), und sekundären Metabolismus (Abwehr gegen abiotischen und biotischen Stress). Diese Ergebnisse stützen vorangegangene Studien zur vorteilhaften Rolle des Elements für diverse Kulturen. Ausgewählte Gene wurden zum Vergleich von unbehandelten, CMV-infizierten sowie Si-behandelten und CMV-infizierten Klonen untersucht, und zeigen einen gegenteiligen Effekt, basierend auf ersten qPCR-Ergebnissen, von Natrium-Silikat auf die CMV-Infektion in den Gurkenkulturen.

Modified TMV particles as advantageous scaffolds for the presentation of sensorically active enzymes

Koch, Claudia¹; Wabbel, Katrin¹; Geiger, Fania¹; Eiben, Sabine¹; Krolla-Sidenstein, Peter²; Gliemann, Hartmut² & Wege, Christina¹

¹Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

²Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG), Karlsruhe, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: claudia.koch@bio.uni-stuttgart.de

Tobacco mosaic virus (TMV) is a robust, rod shaped nucleoprotein scaffold increasingly employed for the attachment and presentation of functional molecules, including peptides, fluorescent dyes and antibodies. We report the use of TMV nanotubes as advantageous carriers for sensorically active enzymes. A TMV mutant with a reactive cysteine residue exposed on every coat protein (CP) subunit (TMV_{Cys}) enabled biotinylation of the capsid with bifunctional maleimide-PEG-biotin linkers (resulting

in TMV_{Cys}/Bio). To create a proof-of-principle for the efficient immobilization of bioactive proteins, the surface of TMV_{Cys}/Bio was equipped with a streptavidin [SA]-conjugated bienzyme system containing glucose oxidase ([SA]-GOx) and horseradish peroxidase ([SA]-HRP). Characterization of the enzyme-decorated particles demonstrated that (1) at least 50 % of the CPs were labeled with a linker molecule, of which almost all were carrying an enzyme; (2) the activity of the coupled enzymes was preserved; (3) utilizing TMV sticks for enzyme immobilization revealed up to 10-40-fold higher substrate turnover rates compared to control approaches employing the same input of enzymes; (4) enzymes exposed on TMV nanotube templates exhibited considerably increased shelf-life and reusability compared to enzymes immobilized in conventional 'high-binding' microtiter plates, indicating a stabilizing effect of the TMV stick environment.

Transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM) images of substrates covered with enzyme-labeled TMV showed a homogeneous distribution of the conjugated [SA]-enzymes and the structural integrity of TMV nanorods. Furthermore, they indicated that the high surface-increase and optimum sterical accessibility of the viral scaffolds are major determinants of the advantageous effects observed.

As a whole, the results of this study show that TMV can be used as a nanoscale sized, multivalent and highly ordered platform for the presentation of foreign protein functions. The possibility of utilizing TMV as versatile biotemplate for enzymes in biotechnology and nanotechnology, especial for biosensing systems, was proven by using it as adapter scaffolds for the immobilization of an enzyme-based glucose detection system in microtiter plate wells.

Transmission Activation durch Vektoraktivität, ein generelles Phänomen?

Drucker, Martin¹; Then, Christiane¹; Ducouso, Marie¹; Berthelot, Edwige¹; Macia, Jean-Luc¹ & Blanc, Stéphane¹

¹INRA, UMR BGPI, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, Frankreich

Kontakt-E-Mail-Adresse: drucker@supagro.inra.fr

Unsere Ergebnisse zeigen, dass cauliflower mosaic virus (CaMV) bei der Landung von Blattlausvektoren auf Pflanzen spezifische Transmissionsmorphe in infizierten Zellen bildet (Martinière et al. 2013, Bak et al. 2013). Künstliche Hemmung und Induktion der Bildung dieser Transmissionsmorphe erhöht bzw. erniedrigt Transmissionsraten. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass CaMV mittels der pflanzlichen Wahrnehmungssysteme die Anwesenheit des Vektors wahrnimmt und die gewonnene Information benützt, um seine Übertragung zu aktivieren.

Eine wichtige Frage ist, ob dieses Phänomen, dass wir "Transmission Activation" nennen, auch bei anderen Viren verbreitet ist. Um diese Frage zu beantworten, haben wir begonnen, die Übertragung von turnip mosaic virus (TuMV) näher zu untersuchen. Dieses Virus wird wie CaMV von Blattläusen übertragen, aber ist gänzlich unverwandt mit CaMV. Experimente mit infizierten Protoplasten zeigen, dass Inhibitoren von Calciumkanälen die Transmission von beiden Viren hemmen. Andererseits aktiviert Azid die Übertragung von CaMV und hemmt die von TuMV. ROS wiederum aktiviert die Transmission von TuMV, aber nicht die von CaMV.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass neben CaMV auch TuMV "Transmission Activation" als Übertragungsstrategie benutzt. Dies ist ein erster Schritt Richtung Verallgemeinerung des "Transmission Activation" Phänomens und deutet darauf hin, dass Wahrnehmung von Vektoren und eine gezielte Koordinierung des Übertragungsprozesses eine von vielen Viren benutzte Strategie sein könnte.

Referenzen

Martinière, A., Bak, A., Macia, J.-L., Lautredou, N., Gargani, D., Doumayrou, J., Garzo, E., Moreno, A., Fereres, A., Blanc, S., Drucker, M. (2013). A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *eLife* 2, e00183.

Bak, A., Gargani, D., Macia, J.-L., Malouvet, E., Vernerey, M.-S., Blanc, S., Drucker, M. (2013). Virus factories of cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. *J. Virol.* 87, 12207–12215.

Whiteflies Tiny insects with high impact

Götz, Monika¹ & Winter, Stephan¹

¹Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Pflanzenvirologie, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: monika.goetz@jki.bund.de

The whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius)(*Hemiptera*, *Aleurodidae*) is considered to be one of the most serious pests threatening agricultural and vegetable production as well as ornamental plants in tropical and subtropical regions. It is a polyphagous phloem-feeder surviving on more than 600 host plants. Most damage is caused by transmission of plant viruses, the most serious are members of the genus *Begomovirus* in the genus *Geminiviridae*. *B. tabaci* is a species complex composed of at least 34 cryptic species which are morphologically indistinguishable, however, with considerable differences in their biological traits. Of all species so far described, *B. tabaci* MEAM1 and Med are the most aggressive as their invasion into new areas is always linked to severe outbreaks of new virus diseases. In regions with warm climates, where whiteflies are established, the impact of whitefly transmitted diseases is particularly evident in horticultural crops, tomato and cucurbits. In many cases, open field production of these crops is not more possible or, is associated with a serious over/misuse of pesticides. An efficient crop management to reduce the impact of whitefly transmitted diseases is based on the knowledge of 1) the viruses present, 2) the occurrence and abundance of whitefly species and 3) the plant resistance responses to virus infections, in order to define crop management strategies. Research at the DSMZ Plant Virus Department in collaboration with the World Vegetable Centre, AVRDC, and partners, is to study the invasion of *B. tabaci* MEAM1 and Med in India, Thailand and Vietnam, to determine predominant virus populations in the region and to correlate virus outbreaks with the presence of these whiteflies. Natural resistance against viruses is the most sustainable strategy of plant defense. However, to find those resistance genotypes is difficult. This is because screening for virus resistance under field situations relies on presence of whiteflies and a given virus thus, is highly variable and uncertain. Resistance screening done at the Plant Virus Department is by agro-inoculation of infectious cloned begomoviruses and by whitefly transmission. Combined with tests to quantify virus load, a definite virus resistance status of a particular genotype can be determined and candidate breeding lines can be prescribed. An overview of the current project will be presented.

Frühe Funktion des Abutilon-Mosaik-Virus AC2 Gens als Replikationsbremse

Krenz, Björn¹; Deuschle, Kathrin¹; Deigner, Tobias¹; Unsel, Sigrid¹; Kepp, Gabi¹; Wege, Christina¹; Kleinow, Tatjana¹ & Jeske, Holger¹

¹Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: holger.jeske@bio.uni-stuttgart.de & kathrin.deuschle@googlemail.com

Das C2 oder AC2 Gen von Begomoviren und Curtoviren ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor. Je nach Analyseverfahren und Virus-Wirts-Kombination sind vielfältige Funktionen der Genprodukte beschrieben worden, von transkriptioneller Aktivierung späterer Gene (AV1, BV1), Suppression des

transkriptionellen und posttranskriptionellen Gensilencings bis zur Regelung von Methylzyklus und Zuckersignalen. Dementsprechend werden komplexe Veränderungen des Transkriptom bei ektopischer Expression von (A)C2 in Pflanzen beobachtet. Das exprimierte Protein hat alle Charakteristika eines Transkriptionsfaktors mit Zinkfingerdomäne und Transaktivierungsdomäne, unspezifische Binfähigkeit für einzel- und doppelsträngige DNA, zeigt allerdings keine spezifische Bindung an geminivirale Promotoren. Um die Komplexität der möglichen Wirkungen zu reduzieren, wurden nun die frühen Effekte nach Agroinfiltration von Plasmiden, die die einzelnen frühen Gene AC1, AC2 und AC3 exprimieren, untersucht. Transgene Pflanzen, die entweder dimere Kopien der DNA B enthielten oder ein Reporterkonstrukt zur Transreplikation eines GFP-exprimierenden Episoms wurden geprüft. Dabei stellte sich überraschenderweise eine weitere Funktion des Abutilon-Mosaik-Virus AC2 Gens heraus: AC2 bremst die Wirkung des Replikations-Initiator-Proteins Rep und reduziert damit die Replikation der Testkomponenten. Dieser Effekt wird durch die Koexpression mit AC3 wieder aufgehoben. Um darüber hinaus den Einfluss von AC2 auf eine mögliche Methylierung der viralen Minichromosomen-DNA zu prüfen, wurden chloroquinhaltige Gele genutzt, die den Kondensierungsgrad der Minichromosomen ermitteln lassen, und in der Kombination mit methylierungsabhängigen Restriktionsenzymen Rückschlüsse über die Topoisomer-spezifische Methylierung erlauben. Entgegen der weitverbreiteten Hypothese, dass AC2 die Methylierung der viralen DNA reduziert, konnte ein solcher Effekt in diesem Virus-Wirt-System und mit diesen Methoden nicht bestätigt werden. Dass der beobachtete Effekt von der Anwesenheit des AC2-Proteins abhängig ist, wurde durch Kontrollexperimente mit nicht-translatierbaren Konstrukten bestätigt. Zudem wurde erstmalig überhaupt das AC2 Protein immunologisch in der Pflanze nachgewiesen, und es zeigte sich, dass es nur zu sehr geringen Konzentrationen akkumuliert. Diese Untersuchungen zeigen die überlappende Genorganisation von AC1, AC2 und AC3 in einem völlig neuen Licht der Feinregulierung der geminiviralen DNA-Vermehrung. Die praktische Relevanz dieser Ergebnisse wird im Hinblick auf die resistenzbrechenden Cotton Leaf Curl Virus Varianten in Pakistan, die alle ein reduziertes AC2 aufweisen, mit neuer Perspektive zu diskutieren sein.

Literatur zum Thema:

Krenz, B., Deuschle, K., Deigner, T., Unseld, S., Kepp, G., Wege, C., Kleinow, T., and Jeske, H. (2015). Early functions of the Abutilon mosaic virus AC2 gene as a replication brake. *J. Virol.* in press.

Paprotka, T., Deuschle, K., Pilartz, M., and Jeske, H. (2015). Form follows function in geminiviral minichromosome architecture. *Virus Res.* 196, 44–55.

Paprotka, T., Deuschle, K., Metzler V., and Jeske, H. (2011). Conformation-selective methylation of geminiviral DNA. *J. Virol.* 85, 12001-12012.

Krenz, B., Wege, C., and Jeske, H. (2010). Cell-free construction of disarmed Abutilon mosaic virus-based gene silencing vectors. *J. Virol. Methods* 169, 129-137.

Pilartz, M., and Jeske, H. (2003). Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *J. Virol.* 77, 10808-10818.

Ku80 retards geminivirus multiplication

Richter, Kathrin¹ & Jeske, Holger¹

¹Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: kathrin.richter@bio.uni-stuttgart.de

Geminiviruses replicate their small circular single-stranded (ss) DNA genomes by three replication modes which are complementary strand replication (CSR), rolling circle replication (RCR) and recombination-dependent replication (RDR). In this process, host factors are strongly required and transcriptome profiling in *Arabidopsis thaliana* after geminivirus infection revealed an increase in expression levels of several DNA repair factors including Ku80. A key component of the non-homologous end joining pathway, Ku80 is involved in the repair of DNA double-strand breaks (DSBs).

On the other hand, Ku80 in mammals is also relevant in cytoplasmic sensing of viral DNA to activate innate immune responses. To elucidate the impact of Ku80 in geminivirus multiplication or, alternatively, in plant pathogen response, we monitored the infection process of Euphorbia yellow mosaic virus in *A. thaliana* wildtype and ku80 knock-out plants. We show that the early emergence of virus DNA was significantly increased in ku80 plants, revealing a retarding effect of Ku80 during geminivirus infection. The potential impact of Ku80 on geminivirus amplification by generating non-productive viral DNAs or its role as a pattern recognition receptor against DNA virus infections are outlined.

Analysing self- and intraviral protein-interaction of pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) proteins

Engelbrecht, Chiara¹; Schießl, Ingrid¹; Sonnewald, Uwe¹ & Krenz, Björn¹

¹Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biochemie, Department Biologie, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: bjoern.krenz@fau.de

Recently, a novel nanovirus, pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV), has been identified in commercially grown pea (*Pisum sativum* L.) in Germany. PNYDV is single-stranded DNA virus with a multipartite genome. It has eight circular DNAs, about 1 kb in size, each encoding for only one viral protein. Namely the master replication (M-Rep) initiator protein (DNA-R), the capsid protein (DNA-S), a cell-cycle link (clink) protein (DNA-C), a movement protein (DNA-M), a nuclear shuttle protein (DNA-N) and proteins of unknown function DNA-U1, -U2 and -U4.

To date, we have no information about self- and intraviral protein-interactions of nanoviruses and no host interaction partners of a nanovirus have been identified. We introduced all eight open reading frames of PNYDV into yeast-2-hybrid (Y2H)-vectors to get more insight into the molecular mechanisms in the nanovirus life cycle. Here we want to present our first Y2H results of self- and intraviral protein-interaction of PNYDV proteins.

Berichte & Besprechungspunkte aus der Praxis

B-Fast ELISA, ein neu entwickelter ELISA Test für Ergebnisse in nur 2 Stunden

Menzel, Wulf¹; Varrelmann, Mark² & Winter, Stephan¹

¹Leibniz Institut DSMZ, Abteilung Pflanzenviren, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland

²IfZ - Institut für Zuckerrübenforschung, Holtenser Landstraße 77, 37079 Göttingen, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: wulf.menzel@dsmz.de

Interkontinentaler Handel und Reisen haben in den letzten Jahrzehnten signifikant zugenommen und zu einer vermehrten Ausbreitung von Pflanzenkrankheiten geführt. Es wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von neuen Nachweisverfahren entwickelt, um mit diesen neuen Herausforderungen im Pflanzenschutz fertig zu werden, aber nur sehr wenige haben, bedingt durch unterschiedlichste Gründe, den Einzug in die Routinetestung geschafft. Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ist vermutlich immer noch das erfolgreichste etablierte Nachweisverfahren, auch wenn es im Vergleich zu molekularen Nachweisverfahren Einschränkungen in der Sensitivität gibt. Zudem sind viele einzelne Arbeitsschritte nötig und man erhält die Ergebnisse in der Regel erst am zweiten Arbeitstag. Bezüglich der beiden letztgenannten Nachteile herkömmlicher ELISA wurde jetzt eine verbesserte ELISA Methode entwickelt, die es ermöglicht mit nur sehr wenigen Arbeitsschritten Ergebnisse in nur 2 Stunden zu erhalten, und das bei einer mindestens vergleichbaren Sensitivität. Nach der gleichzeitigen Inkubation einer Mischung aus capture und detection Antikörper zusammen mit der Probe für 1 Stunde, wird nach einem Waschschrift ohne weitere Arbeitsschritte bereits das Substrat zugegeben. Dieser neue ELISA ist mit Standard-ELISA Puffern und Geräten kompatibel und eignet sich für die Routine-Massentestung.

Aktuelle Problemsituation: Viren in der Beratung des Pflanzenschutzamtes Berlin

Jäckel, Barbara¹

¹Pflanzenschutzamt Berlin, Mohriner Allee 137, 12347 Berlin, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: Barbara.Jaeckel@SenStadtUm.Berlin.de

Das Auftreten von Viren 2014 im Gartenbau – Bayerische Ergebnisse, aktuelle Themen und Fragestellungen

Seigner, Luitgardis¹

¹Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Lange Point 10, 85354 Freising, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: Luitgardis.Seigner@LfL.bayern.de

Virologische Aufgaben am Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg (LTZ) Karlsruhe

Schröder, Manfred¹

¹Landwirtschaftliches Technologiezentrum (LTZ) Augustenberg Baden-Württemberg, Neßlerstr. 25, 76227 Karlsruhe, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: manfred.schroeder@ltz.bwl.de

Aus der österreichischen Praxis: Vorstellung der Abteilung "Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten" und kurzer Bericht zu aktuell diagnostizierten Viren & Viroiden

Grausgruber-Gröger, Sabine¹

¹Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES), Institut für nachhaltige Pflanzenproduktion, Spargelfeldstrasse 191, 1220 Wien, Österreich

Kontakt-E-Mail-Adresse: sabine.grausgruber-groeger@ages.at

Virologische Arbeiten für den Pflanzenschutzdienst in Sachsen

Wiedemann, Wolfram¹

¹Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft FB 65 – Phytopathologie, Waldheimer Straße 219 Haus 4, 01683 Nossen, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: wolfram.wiedemann@smul.sachsen.de

Angemeldete Besprechungspunkte für Diskussion im Koordinierungstreffen:

Realtime Protokolle beim Nachweis von Viren in *Malus* und *Pyrus*?

Realtime Protokoll zu ‚*rubus stunt*‘?

Verbesserte PCR-Protokolle beim Nachweis von Viren in ‚small fruits‘, insb. bei *Ribes*, *Rubus* und *Fragaria*

Einige außergewöhnliche Virus Wirt Kombinationen im Zierpflanzenbau

Hamacher, Joachim¹

¹Agro- Horti- Testlabor, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourchenschutz (INRES), Nussallee 9, 53115 Bonn, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: hamacher@uni-bonn.de; info@planttest.de

Verbreitung von Viren in Spargeljunganlagen

Krauthausen, Hermann-Josef¹

¹Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstrasse, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: hermann-josef.krauthausen@dlr.rlp.de

Stichworte zum Bericht:

Ausbreitung von AV1, AV2, CMV und ArMV aus unserer Spargelversuchsanlage (dreijährig, 2 Sorten à 2 Anzuchtssysteme); Nachweis dieser Viren an kommerziell vertriebenem Pflanzmaterial (einjährig)

Das wheat streak mosaic virus (Weizenstrichelmosaik-Virus) breitet sich aus: erste Berichte zum Vorkommen in Deutschland und Österreich

Rabenstein, Frank¹; Ziegler, Angelika¹; Richert-Pöggeler, Katja²; Schubert, Jörg³ & Oberforster Michael⁴

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Erwin-Baur-Straße 27, 06484 Quedlinburg, Deutschland

²Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Deutschland

³Julius Kühn-Institute, Institut für die Sicherheit biotechnologischer Verfahren, Erwin-Baur-Straße 27, 06484 Quedlinburg, Deutschland

⁴Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Nachhaltige Pflanzenproduktion, Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien, Österreich

Kontakt-E-Mail-Adresse: frank.rabenstein@jki.bund.de

Das *wheat streak mosaic virus* (WSMV), Type Species des Genus *Tritimovirus* in der Familie *Potyviridae*, kommt weltweit in verschiedenen Weizenanbaugebieten vor. Vor allem in den USA ist es von wirtschaftlicher Bedeutung und verursachte z.B. im Bundesstaat Kansas Ertragsverluste von durchschnittlich 13%, für andere Regionen wurden in Jahren mit starkem Befall sogar über Ausfälle von 32 bis zu 97 % berichtet. Frühere Angaben zum Vorkommen des WSMV in Europa stammen vorwiegend aus einzelnen südeuropäischen Ländern. Über ökonomisch signifikante Einbußen wurde besonders aus Weizenanbaugebieten der Ukraine und Südrusslands berichtet.

In Deutschland konnte das Virus erstmalig 2013 am Feldrand in Ausfallgetreide und 2014 auch im angrenzenden Weizenfeld in Hoym (Sachsen-Anhalt) gefunden werden. Auf den Blättern befallener Getreidepflanzen waren Gallmilben vorhanden, die durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Art *Aceria tosichella*, Vektor des WSMV, zugeordnet werden konnten. In Niederösterreich ist ein Befall mit WSMV für das Jahr 2013 in der lokalen Winterweizensorte Lupus belegt.

Das Vorkommen des WSMV in D und A wurde durch Gewinnung von Virusisolaten und deren Charakterisierung mit elektronenmikroskopischen (Negativkontrastierung, Immun-ELMI, Ultradünnschnitte), serologischen (DAS- und TAS-ELISA, Western blotting) und molekularen Methoden (PCR und Sequenzierung) bestätigt.

Die kompletten Sequenzen der Isolate WSMV-D (Hoym) und WSMV-A wurden erhalten und mit bekannten kompletten Sequenzen verglichen. Phylogenetische Analysen ergaben, dass die europäischen Isolate einschließlich eines neuen französischen Isolates (WSMV-Marmagne) mit WSMV iranischer Herkunft gruppieren und ein separates Cluster bilden.

Weitere Studien sind erforderlich, um Aussagen zur Verbreitung und wirtschaftlichen Bedeutung des WSMV in Deutschland und Österreich treffen zu können. Darüber hinaus sind hierfür Untersuchungen zur Virusübertragung über das Saatgut bzw. durch Vektoren notwendig. Neueste Berichte über das Auftreten von WSMV in Nachbarländern wie Polen, der Tschechischen Republik, der Slowakei und Frankreich, deuten darauf hin, dass das Virus sich weiter ausbreitet und zukünftig eine Bedrohung für die Getreideproduktion auch in Zentraleuropa werden könnte.

Aus der virologischen Praxis des Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück

Fabich, Sabine¹

¹Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinhessen-Nahe-Hunsrück, Rüdesheimer Str. 60-61

55545 Bad Kreuznach, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: Sabine.Fabich@dlr.rlp.de

Abstracts der Posterpräsentationen

Structural and Non-Structural Proteins of *Fusarium graminearum* Mycovirus-China 9 (FgV-ch9) and their Processing in the fungal host

*Blum, Christine*¹; *Alder, Arne*¹ & *Heinze, Cornelia*¹

¹Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Ohnhorststraße 18, 22609 Hamburg, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: christine.blum@uni-hamburg.de

Fusarium graminearum mycovirus-China 9 (FgV-ch9) is a putative Chrysovirus, which consists of five dsRNA segments and causes hypovirulence in its host *Fusarium graminearum*. Its sequence shows the highest homology with the *Fusarium graminearum* Mycovirus-2 and is, among others, distantly related to *Magnaporthe oryzae* chrysovirus-1. The dsRNA content of infected mycelium is extremely high.

In purified virion preparations we found four protein bands ranging from about 130 to 65 kDa in size. No differences were observed, when purified from fresh (3 days) or older (20 days) cultures. Testing with antisera against purified particles in western blots, two bands were detected. We detected the same bands with a peptide derived antiserum against the ORF of RNA 3 (=P3). The third band was detected using an antiserum against a peptide derived antiserum against the N-terminus of the protein encoded on RNA 2 (=P2). The two bands of P3 and the band of P2 are shorter in size, as they were calculated from the sequence.

When P2 and P3 were expressed in bacteria we found the unprocessed protein with the expected MW of 93 and 94 kDa, respectively. Testing total protein in fresh and old cultures, we found a gradual degradation of the structural proteins P2 and P3. In old cultures (20 days) we exclusively detected the size, which we found in particle preparations.

The two ORFs of RNA 4 and 5 express proteins that could not be detected in virus particle preparations. In total protein preparations P4 and P5 are present in young to moderate aged cultures. While P4 showed the calculated MW, P5 showed several bands with higher MWs as the calculated size of 96 kDa. The function of both proteins is unknown.

The ORF of RNA 5 has a duplication at the 5'-end.

'*Candidatus Phytoplasma ulmi*' affecting *Ulmus laevis* in Germany

*Anne-Mareen Eisold*¹; *Kube, Michael*¹; *Holz, Sabine*¹ & *Büttner, Carmen*¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: anne-mareen.eisold@hu-berlin.de

Phytoplasmas are wall-less obligate parasites of the plant phloem causing diseases in many important crops and trees worldwide. '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' is a quarantine pest of several *Ulmus* spp. and is associated with phloem necrosis, leaf yellowing, stunting, witches' broom and decline. Initially reported in Northern America, infections were also detected in European countries such as Italy, France, Czech Republic and Serbia. Here, we provide information on the European white elm (*Ulmus laevis*) infected with '*Ca. P. ulmi*' in Berlin and Brandenburg (Germany).

Leaf samples were randomly picked from *U. laevis* trees with and without chlorotic symptoms in the riparian forest Spreewald (N12), the palace garden Caputh (N4) and the experimental garden at the Humboldt-Universität zu Berlin (N42). DNA was extracted by the CTAB approach and applied as template for diagnostic direct and nested PCR targeting the *rRNA* operon of phytoplasmas. The partial sequence of the 16S-*rRNA* gene was determined.

Positive PCR-products were obtained for 30 out of 58 samples and assigned to '*Ca. P. ulmi*' by sequence analysis (99.7-99.9% identity). This is the first report of *U. laevis* infected with '*Ca. P. ulmi*' in Germany.

Emergence of birch-leafroll disease in Fennoscandia correlated with significant changes in cherry leaf roll virus population

Rumbou, Artemis¹; von Barga, Susanne¹; Jalkanen, Risto² & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²Natural Resources Institute Finland (Luke), Rovaniemi Unit, PO Box 16 96301 Rovaniemi Finland

Kontakt-E-Mail-Adresse: artemis.rumbou@agrار.hu-berlin.de

A viral epidemic associated with the cherry leaf roll virus has emerged in *Betula* species in Fennoscandia exhibiting quick and effective dispersal. A population genetics approach is chosen in order to characterize the virus's diversity and the sources of genetic variation aiming to investigate factors that may affect this disease's emergence. Two CLRV populations are analyzed, one natural population originating from urban trees in Rovaniemi, Finland and one population that occurred after infecting young *Betula* seedlings with scions from the original trees based on RT-PCR data in the coat protein (CP), the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and the 3'- untranslated region (UTR). Both populations are characterized by remarkably high genetic diversity. The CLRV variants detected in each genomic region are clustered into five-six different haplotypes, one of which is predominant in each population. Single trees are mixed-infected by highly variable CLRV haplotypes that cluster into different phylogenetic groups. As an additional source of genetic variation, recombination events in the CP region are evidenced. Clustering of CLRV variants from birch to phylogenetic groups from other hosts implies potential virus's spillover from diverse hosts to *Betula* sp. We suggest that increased genetic diversity and the coexistence of a complex of highly variable strains in the same host constitute signs of a significant change in the pathogen population presumably leading to the disease's emergence.

Auftreten von EMARaV und CLRV in *Sorbus aucuparia* und *Betula* spp. im skandinavischen Raum und Finnisch-Lapland

Harhausen, Björn¹; von Barga, Susanne¹ & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: phytomedizin@agrار.hu-berlin.de

CLR (cherry leaf roll virus) ist ein bipartites, einzelsträngiges(+)RNA Virus (Gattung *Nepovirus* (Subgruppe C); Familie *Secoviridae*). Das Virus ist weltweit verbreitet mit einem großen Wirtspflanzenkreis aus 26, meist holzigen Pflanzengattungen. Symptome sind Blattrollen, Nekrosen und chlorotische Flecken an den Blättern. Diese können im späteren Verlauf mit Absterbeerscheinungen einhergehen.

Das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) ist ein einzelsträngiges(-) RNA-Virus, das aus 4 Genomsegmenten besteht. Das Virus tritt vor allem in Ebereschen (*Sorbus aucuparia*) in Europa auf und induziert Blattscheckungen sowie chlorotische Ringflecken.

In 2012 und 2014 wurden Studien zum Auftreten Virus-verdächtiger Symptome an Ebereschen und Birken des Forsts sowie des Stadtgrüns in verschiedenen skandinavischen Ländern und Finnisch-Lapland durchgeführt. Zudem wurden insgesamt 75 Blattproben mit Chlorosen, Scheckungen, Adernbänderungen und Blattrollen sowohl von Birken (*B. pendula* und *B. pubescens*) als auch von Ebereschen auf eine Infektion mit CLRV bzw. EMARaV mittels PCR-basierter Verfahren getestet. Erste Ergebnisse dieser Studie werden vorgestellt und interpretiert.

Studien zur Übertragung des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) auf putative neue Wirtspflanzen

Dieckmann, Heike Luise¹; Roßbach, Jenny¹; von Bargaen, Susanne¹; Mühlbach, Hans-Peter² & Büttner, Carmen¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: dieckmann.luisa@yahoo.de

Das *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) infiziert Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.) und induziert Scheckungen und chlorotischen Ringflecken der Blätter. Es handelt sich um ein (-)ssRNA Virus mit 4 RNAs aus der Gattung *Emaravirus* (Mühlbach und Mielke-Ehret, 2011). Im Jahr 2013 konnte das Virus erstmals in der Schwedischen Mehlbeere (*Sorbus intermedia*) und in der Echten Mehlbeere (*Sorbus aria*) nachgewiesen werden (Robel et al. 2013). Weitere Wirtspflanzen sind bisher nicht bekannt. Die Übertragung des Pathogens ist bisher nur durch Pfropfung zwischen Ebereschen beschrieben worden. Die bisher bekannten Wirtspflanzen des Pathogens gehören zur Familie *Rosaceae*. In dieser Studie wurde versucht, EMARaV mechanisch auf krautige *Rosaceae* und *Nicotiana*-Arten zu übertragen. Erdbeerpflanzen (*Fragaria* sp.), Erdbeerblättriges Fingerkraut (*Potentilla megalantha*), Frauenmantel (*Alchemilla vulgaris*), *N. rustica* und *N. benthamiana* wurden mechanisch mit EMARaV inokuliert. Dazu wurden symptomatische Blätter von infizierten Ebereschen am Standort entnommen und mit Celite und Norit Puffer, 2 % Nicotininlösung (McGavin et al. 2011) oder Phosphatpuffer mit 2 % Nicotin homogenisiert und auf die Blätter der putativen Wirtspflanzen abgerieben. Alternativ wurden Blätter mit dem infizierten Pflanzenmaterial, welches nicht homogenisiert war, trocken unter Verwendung von Celite inokuliert. Nach sieben Tagen wurde das Pathogen von den inokulierten Pflanzen auf neue Pflanzen passagiert. Für den Nachweis wurde Gesamt RNA aus den Blättern der inokulierten Pflanzen mit dem *Invitrap* Spin Plant RNA kit isoliert. Die reverse Transkription wurde mit random Hexameren und eine PCR wurde mit spezifischen Primern nach Mielke et al. (2008) durchgeführt. Der Großteil der Pflanzen zeigte nach der Inokulation keine spezifischen oder unspezifischen Symptome. Eine Infektion der Pflanzen mit EMARaV konnte in keinem Fall molekularbiologisch bestätigt werden. Dies kann auf den kleinen Wirtspflanzenkreis des Erregers und dessen Instabilität außerhalb des Wirts zurückgeführt werden.

Referenzen

McGavin WJ, Mitchell C, Cock PJA, Wright KM, MacFarlane SA. 2011. In: *Journal of General Virology*, 93, 430–437

Mielke N, Weber M, Khan S, Muehlbach HP. 2008. In: *Forest Pathology*, 38, 371–380

Mühlbach HP, Mielke-Ehret N. 2011. In: King A, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. *Virus Taxonomy: IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: 767–770.*

Robel J, Büttner T, Mühlbach H-P, von Bargaen S, Büttner C 2013. *International Advances in Plant Virology 25.-27.9.2013 in Norwich, Großbritannien Conference proceedings*

Vollständige Genomsequenz eines carrot virus S Isolates aus Meerfenchel aus Spanien

Menzel, Wulf¹ & Winter, Stephan¹

¹Leibniz Institut DSMZ, Abteilung Pflanzenviren, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: wulf.menzel@dsmz.de

Aus dem dsRNA Extrakt einer Möhrenprobe aus Bingenheim wurde die Teilsequenz (2,2 kb) eines bisher unbekanntes Carlavirus ermittelt und 2008 publiziert. Alle Versuche, diese Virus in den folgenden Jahren bei der Untersuchung von hunderten Möhrenprobe und Proben anderer *Apiaceen* aus verschiedenen Regionen Deutschlands wiederzufinden, waren nicht erfolgreich. Von einer zufällig an der Felsküste im Norden von Mallorca gesammelten, stark chlorotischen

Meerfenchelprobe (*Crithmum maritimum*, Fam. *Apiaceae*) konnte ein Virus mechanisch auf *Nicotiana hesperis* übertragen werden. Das vollständige Genom dieses Virus (8,6 kb) wurde ermittelt und Sequenzvergleiche zeigten, daß es die höchsten Sequenzidentitäten zum carrot virus S hat. Auch wenn die Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzidentitäten für das Hüllproteingen an oder minimal unter der Demarkationsgrenze liegen (74% nt/79% aa Identität; Demarkationsgrenzen bei 72%/80%), sollte es als ein abweichendes Isolat des carrot virus S angesehen werden. Das Virusisolat aus Spanien konnte auf verschiedene *Apiaceen*, u.a. Möhre, Fenchel und Sellerie, übertragen werden. Dies ist der zweite dokumentierte Fund dieses Virus überhaupt und der erste Fund außerhalb Deutschlands. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich um ein recht variables Virus handelt, welches eine weite Verbreitung in Europa zu haben scheint, auch wenn es nicht häufig zu finden ist. Es ist in der Virussammlung der DSMZ unter der Nummer PV-1090 verfügbar.

Charakterisierung einer neuen *Tobamovirus*-Spezies von Paprika aus Marokko

Menzel, Wulf¹ & Winter, Stephan¹

¹Leibniz Institut DSMZ, Abteilung Pflanzenviren¹, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: wulf.menzel@dsmz.de

In 2010 wurde eine Paprikapflanze (*Capsicum annum*) mit Mosaik Symptomen von A. Remah (IAVCHA, Agadir) aus Marokko zur Verfügung gestellt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten stäbchenförmige Viruspartikel die denen von Tobamoviren ähnelten. Das Virus konnte nach mechanischer Inokulation verschiedene Tabakarten sowie Paprika und Tomate systemisch infizieren. Die Arten *N. benthamiana*, *N. tabacum* 'Samsun nn', *N. tabacum* 'Xanthi nc', *N. glutinosa* '24A', Paprika und Tomate zeigten Blattscheckung oder Mosaik Symptome, wohingegen *N. glutinosa* '24A' mit Blattkräuselung und Nekrose der Sproßspitze reagierte. Pflanzen von *Nicotiana rustica* 'NRT 63' und *Chenopodium quinoa* zeigten nur schwache Chlorosen auf den inokulierten Blättern und das Virus zeigte keine systemische Ausbreitung. Ausgehend von dsRNA, die von *N. benthamiana* isoliert wurde, konnte das vollständige Genom sequenziert werden (6.412 nt), welches eine für Tobamoviren typische Genomorganisation zeigt. Das Virus hat die höchsten Sequenzidentitäten mit 75% zu einem Obuda pepper virus Isolat, gefolgt von paprika mild mottle virus (73%) und yellow tailflower mild mottle virus (69%) Isolaten. Basierend auf den molekularen ICTV Spezies-Demarkationskriterien (weniger als 90% Nukleotid-Sequenzidentität) und der vorhergesagten Genomorganisation kann das Virus als ein Isolat einer neuen Spezies der Gattung Tobamovirus angesehen werden. Für das Virus wird der Name Capsicum mild mottle virus (CapMMV) vorgeschlagen und es ist in der DSMZ Pflanzenvirussammlung unter PV-1013 verfügbar.

Erste Untersuchungen zum Nachweis von Potyviren aus afrikanischen Nachtschattengewächsen (*Solanum* spp.)

Rose, Hanna¹; Büttner, Carmen²; von Barga, Susanne²; Langer, Juliane²; Winter, Stefan³ & Maiß, Edgar¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Deutschland

²Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

³Leibniz Institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: rose@ipp.uni-hannover.de

Im Rahmen des HORTINLEA Projektes liegt ein Schwerpunkt unter anderem in der Charakterisierung der vorherrschenden Virose in afrikanischen Nachtschattengewächsen (*Solanum* spp.), die von hoher wirtschaftlicher Bedeutung in Afrika sind. Im Hinblick auf die Entwicklung eines erfolgreichen

Pflanzenschutz zur Reduktion von Ernteaussfällen und Produktion schaderregerfreier Pflanzen wurden verschiedene Proben auf das Auftreten von Pflanzenviren untersucht. Die Proben stammen von verschiedenen kenianischen Farmen aus symptom- oder nicht-symptomatischen *Solanum* spp. und wurden zum Teil mechanisch auf *Nicotiana benthamiana* oder *Nicotiana rustica* übertragen. Vorangegangene ELISA Tests geben erste Hinweise darauf, welche Spezies oder Genera in dem Material vorliegen können, zum Beispiel cucumber mosaic virus (CMV) oder tomato spotted wilt virus (TSWV). In der Vergangenheit sind wiederholt Befälle durch pepino mosaic virus (PepMV), tomato yellow leaf curl disease (TYLCV), tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), potato mop-top virus (PMTV) und potato leafroll virus (PLRV) aufgetreten. Aus verschiedenen Proben konnten durch random RT-PCRs Fragmente generiert und sequenziert werden. Sequenzvergleiche weisen auf weitere Viren, auch in Mischinfektionen vorliegend, hin. Es handelt sich vorwiegend um Mitglieder des Genus *Potyvirus* in der Familie der *Potyviridae*: pepper vein mottle virus (PVMV), chilli vein mottle virus (ChiVMV) und wahrscheinlich um ein bisher unbekanntes Potyvirus. Neben weiteren Screenings soll durch die vollständige Sequenzierung der Hüllproteingene eine taxonomische Einordnung der bislang gefundenen Potyviren in die *Potyviridae* erfolgen sowie eine Befallsübersicht erstellt werden.

Dieses Arbeiten werden im Rahmen des HORTINLEA-Projektes gefördert (<http://www.hortinlea.org/home.html>).

A first survey on plant virus infections of African nightshade from small farms in Western Kenya

*Langer, Juliane*¹; *Aba Toumou, Lucie*²; *Mukoye, Benard*³; *von Barga, Susanne*¹; *Bandte, Martina*¹; *Kube, Michael*¹; *Ulrichs, Christian*⁴; *Wanjohi, Waceke*⁵ & *Carmen Büttner*¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²Crop production and protection, University of Bangui, Central African Republic

³Biological Sciences Department, Masinde Muliro University of Science and Technology (MMUST), P.O. Box 190 - 50100, Kakamega, Kenya

⁴Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Urbane Ökophysiologie, Lentzeallee 55-57, 14195 Berlin, Deutschland

⁵Kenyatta University, School of Agriculture and Enterprise Development, Kenyatta University, P.O.Box 43844 – 00100, Nairobi, Kenya

Kontakt-E-Mail-Adresse: langenj@agrar.hu-berlin.de

A first survey on plant viruses in African nightshade was carried out in small farms of Western Kenya. Food security and income generation of subsistence and semi-commercial farmers in African countries is one of the world's key challenges. In this context, diverse abiotic and biotic stresses affect the productivity of protein-, fat- or vitamin-packed vegetables. Among biotic factors, viral diseases of vegetables gain considerable negative economic impact by compromising plant health, thereby affecting both yield and quality. In developing countries farming practices are usually smaller in scale and of lower input cost. Traditional growing of self-produced seeds, often due to inaccessibility of certified seed, and also growing of traditional, unimproved varieties increases the risk of infection.

Virus disease management measures available are often poorly adapted to technological and educational standards of local agriculture. Concerted efforts to develop a sustainable integrated pest and disease management are therefore of high priority, furthering the sustainable production of healthy vegetables. Detection of viral pathogens at initial stages of infection is a critical element in local disease management. Furthermore, routine diagnostics are important tools in large scale virus testing and also in the production of virus-free planting and propagation material.

The objective of this study is to get an overview on the potential incidence of virus infections in African nightshade. In this regard different farms in Kenya were surveyed for visual inspection of their Nightshade crops in Uasin Gishu, Bungoma and Kakamega counties which are the major African nightshade producing areas in Kenya. Fresh material of indigenous/traditional African nightshade varieties (*Solanum scabrum*, *Solanum villosum*, *Solanum nigrum*, and *Solanum americanum*) as well as self-produced seeds were taken and investigated. Laboratory analyses to identify viral pathogens in African nightshade comprise mechanical transmission to different indicator plant species and ELISA techniques to test for putative infections with cucumber mosaic virus (CMV), tobacco mosaic virus, tomato mosaic virus, tomato spotted wilt virus, tomato yellow leaf curl virus, and potyviruses, known to be economically important pathogens of a wide range of crops in Africa. Nightshade was sampled and tested from a total of 23 different farms. Plant material of 10 farms was mixed infected with CMV and potyviruses. In sampled material of six farms only potyvirus infection was detected, and of one farm only CMV. Singly in plant material originated from six farms no virus infection was detected. Six seed charges of different farms were tested for germination rate, plant development and potential virus infection. Seeds showed diverse germination rates, ranging from 4-58% 14 days after sowing in the green house and up to 72-92% after 26 days. Plant development was observed for 20 seedlings per seed provenance for a total of seven weeks. Two charges had a weaker performance. Virus typical symptoms were not observed on seedlings, even though CMV was detected in two charges by DAS-ELISA.

Nachweis des Kartoffel Virus S (PVS) in etiolierten Kartoffelpflanzen

Maiß, Edqar¹ & Zahn, Volker²

¹Leibniz Universität Hannover, Inst. für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Deutschland

²Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Wunstorfer Landstr. 9, 30453 Hannover, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: maiss@ipp.uni-hannover.de

In den vergangenen Jahren wurden in Pflanzkartoffelvermehrungsbeständen immer wieder etiolierte Pflanzen beobachtet. Tests mittels ELISA auf die gängigen Kartoffelviren, inklusive Kartoffelvirus S (Potato virus S), verliefen negativ. Um zu untersuchen, ob in den getesteten Pflanzen andere Viren vorlagen, wurde aus den etiolierten Kartoffelpflanzen dsRNA isoliert und mittels random RT-PCRs Fragmente generiert. Initiale Sequenzierungen ergaben Ähnlichkeiten zu PVS Sequenzen. Mit PVS spezifischen Oligonukleotiden wurden anschließend PCR Fragmente erzeugt, die das komplette Genom zweier PVS Isolate repräsentieren. Beide PVS Sequenzen umfassen 8485 bp ohne poly-A-Tail und zeigen die typische Genomorganisation von Carlaviren. Die Sequenzvergleiche ergaben für das eine Isolat eine hohe Sequenzverwandtschaft zu europäischen PVS Isolaten, die Sequenz des zweiten Isolates zeigte eine hohe Sequenzhomologie zu südamerikanischen Isolaten. Für beide PVS Isolate wurden infektiöse Vollängenklone erstellt. In weiteren Versuchen kann nun mit den Vollängenklonen gezielt geprüft werden, ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Etiolierung der Pflanzen und der Infektion mit einem oder beiden PVS Isolaten existiert.

Erste komplette Genomsequenzanalyse vom Luffa aphid-borne yellows virus (LABYV) zeigt das Vorhandensein von mindestens zwei Konsensussequenzen in einem Isolat aus Thailand

Knierim, Dennis¹; Maiß, Edgar²; Menzel, Wulf¹; Winter, Stephan¹ & Kenyon, Lawrence³

¹Leibniz Institute DSMZ, Pflanzenviren, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland

²Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme - Abt. Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Deutschland

³AVRDC - The World Vegetable Center, Plant Virology, PO Box 42, Shanhua, Tainan 74199, Taiwan

Kontakt-E-Mail-Adresse: dennis.knierim@dsmz.de

Für Kürbisgewächse sind sechs verschiedene Poleroviren beschrieben worden, die diese Pflanzen infizieren können. Die kompletten Genomsequenzen sind von cucurbit, melon und Sauropus aphid-borne yellows virus bekannt, wohingegen von den neu vorgeschlagenen Spezies Luffa, pepo und cucumber aphid-borne yellows virus jeweils nur Teilsequenzen vorhanden sind. Von dem zuvor nur mit einer Teilsequenz beschriebenen LABYV Isolat TH24 wurde nun das gesamte Genom aus einem gesamt-RNA Extrakt bestimmt. Für das Isolate konnten zwei komplette Genom-Konsensussequenzen erstellt werden, die sich hauptsächlich im 5'-Bereich unterscheiden, wohingegen für das 3'-Ende eine partielle Konsensussequenz gefunden wurde, der sich kein überlappendes 5'-Ende zuordnen läßt.

Untersuchungen zur Identifikation und möglichen Expression eines sechsten offenen Leserahmens im lettuce virus X (LeVX)

Schimmel, Jessica¹; Winter, Stephan² & Maiß Edgar¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419, Hannover, Deutschland

²Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Inhoffenstraße 7b, 38124 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: schimmel@ipp.uni-hannover.de

Das lettuce virus X wurde 2008 von Dizadji et al. erstmals beschrieben. Es handelt sich um ein flexibles, stäbchenförmiges Virus des Genus *Potexvirus*. Das LeVX Genom besteht aus fünf offenen Leserahmen (ORF), wobei zusätzlich ein sechster ORF mit einer Länge von 1098 bp existiert. Dieser ORF liegt innerhalb der kodierenden Region des Triple Gene Blocks 3 (TGB3) und des Hüllproteins (CP). Bereits Jelkmann et al. (1992) zeigten beim strawberry mild yellow edge-associated potexvirus (SMYEAV) und Yang et al. (1997) beim bamboo mosaic virus (BaMV), dass ein sechster ORF bei einigen Vertretern der Potexviren vorkommt. Der ORF 6 liegt beim SMYEAV ebenfalls innerhalb der kodierenden Region für das Hüllprotein.

Eine Funktion konnte dem ORF 6 bisher nicht zugeordnet werden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob dem ORF 6 beziehungsweise dem unknown reading frame (URF) im LeVX eine funktionelle Bedeutung zuzuordnen ist. Ausgehend vom Wildtyp Virus wurden Knock-Out Mutationen innerhalb des URFs erstellt. Diese Mutationen erfolgten ohne die Aminosäureabfolge des CPs zu beeinflussen. Es zeigte sich, dass die URF Knock-Out-Mutanten keinen Unterschied in ihrer Infektiosität in *Nicotiana benthamiana* im Vergleich zum LeVX-Wildtyp aufwiesen.

In einem weiteren Versuch wurde ein His-Tag bestehend aus sieben Histidinmolekülen an das Ende des URFs beziehungsweise CPs über eine Mutagenese-PCR eingefügt und die Viren als Vollängenklone mittels Agroinfektion (*Rhizobacter rhizogenes* (*Agrobacterium tumefaciens*)) in *N. benthamiana* inokuliert. Über eine Gesamtnukleinsäureextraktion, cDNA-Synthese, PCR und Sequenzierung wurde der His-Tag am URF aus systemisch infizierten Pflanzen in der RNA nachgewiesen. Der serologische Nachweis des markierten putativen URF-Proteins steht noch aus.

Erstellung eines infektiösen Vollängenklons des cucumber vein yellowing virus

Schieck, Kaja¹ & Maiß, Edgar¹

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: kaja.schieck@gmx.de

Unter natürlichen Bedingungen können verschiedene Pflanzenviren wie z.B. das cucumber mosaic virus (CMV), das cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) und das cucumber vein yellowing virus (CVYV) Gurkenpflanzen (*Cucumis sativus*) infizieren. Das CVYV gehört zum Genus *Ipomovirus* innerhalb der Familie der *Potyviridae*. Übertragen werden kann es mechanisch oder semipersistente über den Vektor *Bemisia tabaci*, nicht jedoch über Samen. Es ist systemisch und in allen Pflanzenteilen nachweisbar. Das Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines infektiösen Vollängenklons des cucumber vein yellowing virus sowie die erfolgreiche Infektion von *C. sativus* mittels *Rhizobium rhizobacter* (ehem. *Agrobacterium tumefaciens*). Aus extrahierter dsRNA von *Cucumis sativus* 'Vorgebirgstraube' wurden zwei PCR-Fragmente für die Synthese des Vollängenklons produziert. Diese konnten mit der isothermalen Rekombinationsmethode 'Gibson Assembly' zu einem infektiösen Klon zusammengefügt werden. In weiteren Untersuchungen werden gegenwärtig durch Koinfiltration Mischinfektionen vom CVYV (DSMZ PV 0776) und CGMMV (DSMZ PV 0159) auf die Virusverteilung und Symptomausprägung untersucht. Dabei konnten die Symptome beider Viren identifiziert werden.

Expression and localisation of the ACMV AC4 protein in fission yeast

Hipp, Katharina¹; Rau, Peter¹ & Jeske, Holger¹

¹Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: katharina.hipp@bio.uni-stuttgart.de

The AC4 protein of geminiviruses is encoded within the open reading frame of the replication-initiator protein but in a different reading frame, and is considered to be a determinant for pathogenicity of old world begomoviruses. AC4 proteins of several bipartite geminiviruses act as suppressors of post-transcriptional gene silencing. For African cassava mosaic virus (ACMV), the function of the AC4 protein is unclear as well as which of the two potential start codons is used for translation. We employed fission yeast as a model organism to study the expression and localisation of the two potential start codon variants. Both proteins have been expressed successfully in fusion with either GFP or GST at the C-terminus that is common to both variants. Laser scanning microscopy confirmed expression of the GFP fusion proteins. Whereas the first start codon variant revealed a small, punctate pattern in the cytoplasm, the protein translated from the second start codon localised mainly to the plasma membrane. Using freeze fracture immunogold labelling of cells expressing the GST fusion proteins, the membrane localisation of the second start codon variant has been reinforced. Both start codon variants will be further analysed by mass spectrometry to reveal post-translational modifications.

Identification of Rep interaction partners in fission yeast

Dietz, Andrea¹; Hipp, Katharina¹ & Jeske, Holger¹

¹Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: andrea.dietz@bio.uni-stuttgart.de

Replication of geminiviruses, single-stranded DNA viruses of higher plants, depends on the replication-initiator protein (Rep). Since geminiviruses lack an own polymerase, Rep induces re-

entering of plant cells into the cell cycle by interacting with the plant homologues of retinoblastoma proteins (pRBR) in order to activate the host DNA synthesis machinery. The Rep protein of African cassava mosaic virus (ACMV) is interfering with the cell cycle when ectopically expressed in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) as a model organism. Even though fission yeast does not encode a RB protein, Rep induces a cell division cycle phenotype accompanied with enlarged cell nuclei and re-replication of DNA. In order to identify Rep interaction partners in fission yeast, Rep will be expressed in fusion with a biotin ligase. This in vivo labelling system will be used to biotinylate interaction partners or proteins in close distance of Rep to allow their purification using streptavidin beads followed by the identification via mass spectrometry. As a control, the biotin ligase is going to be fused to mGFP and a nuclear localisation signal to facilitate the differentiation between background and Rep-dependent biotinylation.

The induction of a stromule network by a plant DNA-virus in leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route

Krenz, Björn ¹; Jeske, Holger ² & Kleinow, Tatjana ²

¹Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl für Biochemie, Department Biologie, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen, Deutschland

²Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: tatjana.kleinow@bio.uni-stuttgart.de

Stromules are dynamic thin protrusions of membrane envelope from plant cell plastids. Despite considerable progress in understanding the importance of certain cytoskeleton elements and motor proteins for stromule maintenance, their function within the cell has yet to be unravelled. Several viruses cause a re-modulation of plastid structures and stromule biogenesis within their host plants. For RNA-viruses these interactions were demonstrated to be relevant to the infection process. Moreover, some plastid proteins seem to be involved in the regulation of plasmodesmata and viral intercellular transport. An involvement of plastids and stromules is assumed in the DNA-virus life cycle as well, but their functional role needs to be determined. Recent findings support a participation of heat shock cognate 70 kDa protein (cpHSC70-1)-containing stromules induced by a DNA-virus infection (Abutilon mosaic virus, AbMV, *Geminiviridae*) in intra- and intercellular molecule exchange [1, 2]. The chaperone cpHSC70-1 was shown to interact with the AbMV movement protein (MP). Bimolecular fluorescence complementation confirmed the interaction of cpHSC70-1 and MP, and showed a homo-oligomerization of either protein *in planta*. The complexes were detected at the cellular margin and co-localized with plastids. In healthy plant tissues cpHSC70-1-oligomers occurred in distinct spots at chloroplasts and in small filaments extending from plastids to the cell periphery, most likely to plasmodesmata. AbMV-infection induced a cpHSC70-1-containing stromule network that exhibits elliptical dilations and transverses whole cells. Silencing of the cpHSC70-gene revealed an impact of cpHSC70 on chloroplast stability and restricted AbMV movement, but not viral DNA accumulation. Based on these data, a model is suggested in which these stromules function in molecule exchange between plastids and other organelles and perhaps other cells. AbMV may utilize cpHSC70-1 for trafficking along plastids and stromules into a neighbouring cell or from plastids into the nucleus.

References:

[1] B. Krenz, V. Windeisen, C. Wege, H. Jeske, T. Kleinow (2010). *Virology*, 401, 6

[2] B. Krenz, H. Jeske, T. Kleinow (2012). *Front Plant Sci*, 3, 291

Herstellung und Charakterisierung zweidimensionaler Virenkristalle

Rink, Veronika¹; Müller-Reno, Christine¹; Boonrod, KaJohn²; Braun, Mario²; Ziegler, Christiane¹ & Krczal, Gabi²

¹Fachbereich Physik und Forschungszentrum Optimas, TU Kaiserslautern, Erwin Schrödinger Str. 56, 67663 Kaiserslautern, Deutschland

²RLP AgroScience GmbH, AlPlanta - Institut für Pflanzenforschung, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: gabi.krczal@agrosience.rlp.de

Bisher werden für die Produktentwicklung von Bauteilen für die Nanotechnologie vor allem Top-Down Ansätze verwendet. Dieser Methode sind physikalische Grenzen gesetzt und so werden heute die Fähigkeit von Teilchen zur Selbstorganisation in Bottom-up Ansätzen genutzt. Pflanzenviren besitzen ein hohes Potential zur Selbstassemblierung, sind robust und können durch genetische Manipulation unterschiedliche Oberflächenfunktionen erhalten.

Wir verwenden tomato Bushy Stunt (TBSV) Viruspartikel, um mittels eines Bottom-up Ansatzes zweidimensionale Virenkristalle herzustellen, die als Template für darauf aufbauende Nanostrukturen dienen können. Ziel war es, TBSV Partikel auf einer Glimmerfläche reproduzierbar großflächig und monolagig anzulagern. Eine möglichst große Oberflächenbedeckung mit möglichst wenig Defekten wurde unter folgenden Bedingungen erreicht: Zur Probenherstellung erwies sich das Spincoating im Vergleich zur Drop-and-Dry Methode und dem Trocknen des Virentropfens mit Stickstoff als beste Methode um eine monolagige Virenassemblierung zu erhalten. In Abhängigkeit von den Ladungsverhältnissen der Kapseloberfläche, die durch Modifikation von Aminosäureseitenketten entstanden, variierte die optimale Konzentration für die größte monolagige Oberflächenbedeckung. Darüber hinaus konnte für jeden Kapseltyp ein optimaler pH-Wert der Virenlösung für das Coating der Glimmeroberfläche bestimmt werden. Insgesamt konnten die Bedingungen für eine monolagige defektfreie Oberflächenbedeckung gut ermittelt und verstanden werden.

In weiteren Schritten soll die Selbstassemblierung von TBSV Partikeln auf glatten Oberflächen wie Gold oder Silizium und die Herstellung von drei-dimensionalen Virenkristallen versucht werden.