



JKI



Mitteilungen

56. Deutsche Pflanzenschutztagung in Kiel

22.-25. September 2008

417
2008

wurde. Mit spezifischen Antisera bzw. mit einem monoklonalen Antikörper gegen *WSMV* ließen sich die beiden *WSMV*-Isolate aus Frankreich bzw. Italien serologisch im DAS-ELISA nicht von amerikanischen und anderen Herkünften aus Russland, der Ukraine, Ungarn bzw. der Türkei unterscheiden. Im Western blot zeigten die *WSMV*-Isolate Burgund und Toskana mit verschiedenen *WSMV*-Antisera jeweils ein scheinbares Molekulargewicht der Virushüllproteine von 45 bis 47 kDa, das, mit Ausnahme des *WSMV*-Russland (ca. 42 kDa), mit dem der übrigen Isolate übereinstimmte. Im Unterschied zum *WSMV*-Type Isolat waren das französische und italienische Isolat in der Lage die Mais-Inzuchtlinie SDp2 systemisch zu infizieren. Auch eine mechanische Übertragung auf *Triticum aestivum* (Alcedo), *Hordeum vulgare* (Erfa und Haisa) und *Secale cereale* (Nikita) war leicht möglich. Als Nichtwirte konnten folgenden Gräserarten identifiziert werden: *Alopecurus pratensis* (Alko), *Arrhenaterum elatius* (Arone), *F. rubra* (Condor, Roland 21), *Festuca pratensis* (Cosmonaut, Cosmopolit), *Lolium perenne* (Aberavon, Weigra), *Phleum pratensis* (Libretto), *Poa pratensis* (Lato) und *Trisetum flavescens* (Trisett 51). Elektronenmikroskopische Dekorationsstests mit den Isolaten Burgund und Toskana ergaben, neben den *WSMV*-Antisera, auch eine Dekoration mit Antisera gegen das *ONMV* und dem neuen *Tritimovirus* aus Dactylis. In Ultradünnschnitten des *WSMV*-Burgund konnten zytoplasmatische Veränderungen beobachtet werden, die sich, einschließlich der typischen Einschlusskörper (pinwheels), nicht von den aus der Literatur beschrieben unterscheiden. Sequenzdaten der coat proteins (CP) wurden neben den beiden zuvor genannten Isolaten für die *WSMV*-Isolate Russland, Iran, ATCC-57 (IEP) und Türkei 2 erhalten. Ein Vergleich der Aminosäure Sequenzen der CP zeigte, dass allen europäischen und dem Isolat Türkei 2 ein Glycinrest in Position 75 fehlt, der im CP der US-amerikanischen (einschließlich Type strain) und *WSMV*-Iran vorhanden ist. Phylogenetische Analysen anhand der CPs mit der „maximum likelihood“-Methode ergaben, dass alle „echten europäischen“ Isolate (Burgund, Czech, Hungary, Toskana, Türkei 2, Russland) ein gemeinsames Subcluster bilden. Bisher war das Vorkommen des *WSMV* für Frankreich nicht bekannt. Über eine Samenübertragbarkeit des *WSMV* wurde kürzlich in der Literatur berichtet. In Anbetracht der zunehmenden Aktivität globaler Waren- und Verkehrsströme und der damit verbundenen Möglichkeit der Verbreitung durch Ausbringung von ungetestetem Saatgut sowie des Einflusses eines sich abzeichnenden Klimawandel auf die Ausbreitung von Milben als Virusvektoren erfordern diese Ergebnisse eine Neubewertung der gegenwärtigen Ansichten zur Epidemiologie des *WSMV*.

29-4-Langer, J.; von Bargen, S.; Büttner, C.

Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Fachgebiet Phytomedizin

Sequenzanalyse ausgewählter *Cherry leaf roll virus* (CLRV) - Isolate unterschiedlicher Herkünfte

Sequence analysis of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) isolates from different origins

Das *Cherry leaf roll virus* ist ein weltweit verbreiteter Erreger an Laubgehölzen im Forst und öffentlichen Grün sowie an Obstgehölzen, Zier- und Gemüsepflanzen. Der ausgesprochen weite Wirtspflanzenkreis des *CLRV* - bislang einzigartig unter den Pflanzenviren - weist auf eine schnelle Anpassungsfähigkeit an verschiedene Wirtspflanzen und damit auf eine genetische Diversität zwischen *CLRV*-Isolaten verschiedener Herkünfte hin. Sequenzanalysen verschiedener kodierender und nicht kodierender Genomregionen von *CLRV*-Isolaten unterschiedlicher Wirtspflanzen und geographischer Herkünfte sowie deren serologische Reaktivität wiesen auf eine vorwiegend Wirtspflanzen-abhängige phylogenetische Verwandtschaftsstruktur hin [1]. Die Sequenzierung des Genoms von vier *CLRV*-Isolaten (Rhabarber, Holunder, Walnuss, Kirsche) zeigte bislang eine Genomorganisation, die grundsätzlich der von anderen bekannten Nepoviren entspricht. Für zwei *CLRV*-Isolate (Rhabarber, Walnuss) konnte die gesamte RNA1 sequenziert werden, die 7.923 und 7.925 nt lang sind. Von der etwa 6.600 nt langen RNA2 des Rhabarber-Isolats fehlen bislang noch ca. 1.300 nt des 5' Terminus, von drei weiteren Isolaten ist die Hälfte der RNA2 sequenziert. Auffällig erwies sich beim *CLRV* die besonders lange nicht kodierende Region am 3' Terminus der beiden RNAs, die für sechs *CLRV*-Isolate ermittelt wurde. Die RNA1-3' NCR von sechs *CLRV*-Isolaten ist 1.538 -1.587 nt lang, die RNA2-3' NCR ist mit 1554 -1602 nt länger. Die Nukleotidsequenzen des Hüllproteins und der 3' nicht kodierenden Region weisen insgesamt eine etwa gleich hohe Variabilität zwischen verschiedenen *CLRV*-Isolaten auf. Im Gegensatz zum Hüllprotein aber findet sich in der 3' NCR ein hochkonservierter Sequenzabschnitt mit max. 14 % Diversität im 3' proximalen Drittel und ein variabler Bereich mit bis zu 30 % im, dem kodierenden Genombereich angrenzenden, ersten Drittel der 3' NCR. Zudem sind die 3' NCRs der RNA1 und RNA2 der verschiedenen Isolate nicht identisch. Die Sequenzunterschiede, die bis zu 5 % betragen, sind ebenfalls am 5' Ende der 3' NCRs lokalisiert. Mittels inverser PCR gelang die Identifizierung des 5' Terminus der RNA1 von zwei *CLRV*-Isolaten. Die Sequenzanalyse des 250 bp langen Amplikons determiniert eine 11 nt lange 5' NCR und den N-Terminus des Protease-Cofaktors. Als Vertreter der Nepovirus-Subgruppe C besitzt das *CLRV* nicht nur die längste 3' NCR sondern auch die kürzeste 5' NCR.

Literatur

[1] Rebenstorf, K., Candresse, T., Dulucq, M. J., Büttner, C., Obermeier, C. 2006. Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, *Cherry leaf roll virus (CLR)*. *J. Virol.* 80, 2453-2462.

29-5-Richert-Pöggeler, K.¹⁾; Harper, G.²⁾; Hull, R.²⁾; Noreen, F.³⁾; Schwarzacher, T.⁴⁾; Hohn, T.³⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

²⁾ John Innes Centre

³⁾ University of Basel

⁴⁾ University of Leicester

New challenges for plant virus diagnostics: detection of DNA viruses in plants with *Homologous endogenous pararetrovirus* sequences

Sequences from two DNA virus families have been found integrated into plant genomes. Partial geminivirus sequences were detected in *Nicotiana* and there are a number of documented cases of members of the family *Caulimoviridae* which are referred to as *endogenous plant pararetroviruses (EPRVs)*. Some *EPRVs* are able to replicate and to initiate viral infection. Mobilization is possible from tandemly arranged units, mimicking the situation of true *retroviruses*. Such a mechanism was suggested for *endogenous Petunia vein clearing virus (ePVCV)*. The detection of viruses is a critical component of plant health and therefore, it is important to have diagnostic procedures that differentiate between the detection of encapsidated viral DNA and homologous sequences in the host genome. PCR-based detection methods targeted at *Petunia vein clearing virus (PVCV)* DNA have been tested and particular attention was paid to design controls that would indicate the existence of host DNA in the reaction. The early on detection of inducible *EPRVs* is essential for evaluating the risk of *EPRV* activation in plant genomes and for designing strategies to control such events during breeding programs.

29-6-Müller, I.; Jelkmann, W.; Geider, K.

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

Bakteriocine und Bakteriophagen zur biologischen Kontrolle des Feuerbrands?

Das Bakterium *Erwinia amylovora* ruft u. a. bei Äpfeln, Birnen und Quitten, aber auch bei einigen Ziergehölzen Feuerbrand hervor. Der Befall bei Kernobst kann zu großen Ertragseinbußen führen. Eine Bekämpfung des Erregers ist durch das Antibiotikum Streptomycin möglich, das zur Blütezeit angewendet wird. Um Resistenzbildungen, wie in den USA und anderen Ländern aufgetreten, vorzubeugen, ist in Europa einerseits die Streptomycinanwendung streng reglementiert und andererseits ist die Suche nach alternativen Mitteln wichtig. Eine Möglichkeit zur biologischen Bekämpfung von Feuerbrand kann der Einsatz von *Erwinia*-spezifischen Bakteriophagen und Bacteriocinen sein. Verschiedene *Erwinia*-spezifische Bakteriophagen, die in Nordamerika isoliert worden waren, wurden auf ihren Wirkungsbereich untersucht. Die Phagen tragen auf ihrer Hülle ein Enzym, die EPS-Depolymerase, welches die EPS-Kapsel, die die Bakterien umgibt, abbauen kann. Es konnte festgestellt werden, dass die Phagen einen unterschiedlich großen Wirkungsbereich haben. Bei *E. amylovora*-Stämmen, die eine hohe EPS-Produktion aufweisen, wurde eine effiziente Lyse beobachtet. Ein Bakteriophage ohne starke EPS-Abhängigkeit unterscheidet sich, wie mit Hilfe von PCR und Restriktionsenzymverdau sowie durch Sequenzanalysen (in Kooperation mit dem MPI für Molekulare Genetik, Berlin) gezeigt werden konnte, deutlich von den anderen Phagen. Auf Grundlage der Sequenz des Phagen phi-Ea1h wurden PCR-Primer synthetisiert, die im Depolymerase-Gen der Phagen binden. Weitere Primer binden im Lysozym- und im Holin-Gen, die an der Lyse der Bakterienzelle beteiligt sind. Drei zusätzliche Primerpaare wurden anhand der vorliegenden Sequenz des phi-Ea116-Phagen kreiert. Aufgrund der PCR-Signale und der vorhandenen Nukleotidsequenzen ließen sich die Phagen in mindestens zwei Gruppen einordnen. Um die Effizienz in einem dem Freiland entsprechenden System zu testen, wurden unterschiedliche Verdünnungen der Phagen in Apfelblüten von Bäumen aus dem Gewächshaus und auf unreife Birnen gebracht. Von *E. amylovora* wurde eine definierte Zellzahl aufgetragen und so die Effizienz der Phagen getestet. Beim Test mit den unreifen Birnen zeigten hohe Phagenkonzentration eine deutliche Reduktion der Symptome wie Bildung von Schleimtropfen und Verbräunung der Birnenscheiben. Ein Bakteriophage war hierbei in der Symptomreduktion besonders erfolgreich. Mit Hilfe der Blütentests konnte aufgrund starker Schwankungen in den Kontrollen nicht zu einer überzeugenden Aussage gelangt werden. Das von einem der Phagen produzierte Lysozym führte nach induzierter Expression in *E. coli* und *E. amylovora* zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. Da das Enzym Gram-negative Bakterien von außen kaum schädigt,