

**PROGRAMM UND TEILNEHMERLISTE DES 46. JAHRESTREFFENS DES DPG-ARBEITSKREISES
"VIRUSKRANKHEITEN DER PFLANZEN"
AM 31. MÄRZ + 01. APRIL 2014**

Vortragssaal des Julius Kühn-Instituts (JKI) Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen

Montag, 31. März 2014	
12:40 – 13:00	Anreise und Tagungsanmeldung Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen
13:00 – 13:20	Frank Rabenstein, Tatjana Kleinow & Wilhelm Jelkmann: Begrüßung und organisatorische Bekanntmachungen Kurzvorstellung der Liegenschaft Siebeldingen/Geilweilerhof des JKI und der dort forschenden Institute für Rebenzüchtung und für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau <i>Wilhelm Jelkmann</i>
13:20 – 15:20	Sektion I: Moderation Wilhelm Jelkmann
13:20 – 14:00	Einführungsvortrag Phytoplasmosen im Weinbau <i>Michael Maixner</i>
14:00 – 14:20	Recent advances in the study of grapevine leafroll disease in north-eastern France <i>Etienne Herrbach, Antoine Alliaume, Monique Beuve, Gérard Hommay, Jean Le Maguet, Catherine Reinbold, Marilyne Uzest, Louis Wiss, Olivier Lemaire</i>
14:20 – 14:40	Grapevine red blotch-associated virus is widespread in the United States <i>Björn Krenz, Jeremy R. Thompson, Heather L. McLane, Marc Fuchs, Keith Perry</i>
14:40 – 15:00	Defekte geminivirale DNA in Beet curly top virus-infizierten, langzeitüberlebenden Zuckerrüben <i>Judith Bach und Holger Jeske</i>
15:00 – 15:20	DNA methylation status of geminiviral minichromosomes <i>Kathrin Deuschle, Holger Jeske</i>
15:20 – 16:00	KAFFEE-/TEEPAUSE mit Präsentation der Poster im Vestibül
16:00 – 17:30	Sektion II: Moderation Christina Wege
16:00 – 16:20	The RXL motif of the African cassava mosaic virus Rep protein is necessary for rereplication of yeast DNA and viral infection in plants <i>Katharina Hipp, Peter Rau, Benjamin Schäfer, Bruno Gronenborn, Holger Jeske</i>
16:20 – 16:40	Next generation sequencing of the Apple Rubbery Wood Disease <i>Vladimir Jakovljevic, Patricia Otten, Wilhelm Jelkmann</i>
16:40 – 17:00	Celery latent virus: Ein potentielles Mitglied der <i>Potyviridae</i> mit einem N-terminal lokalisierten Signalpeptid <i>Hanna Rose, Ines Eikenberg, Wulf Menzel, Heinrich-Josef Vetten, Edgar Maiss</i>
17:00– 17:30	Allgemeines und ggf. kurze Berichte aus der Praxis (Mitarbeiter aus den Pflanzenschutzämtern u. a.)
ab 17:45	Möglichkeit für Exkursionen in Kleingruppen (allg. Besichtigung des Geilweilerhofes; phytopathologische Forschungsarbeiten mit Laborgewächshausbesichtigung; Züchtungsforschung und genetische Ressourcen). Organisation und Verteilung auf die Gruppen erfolgt vor Ort am Montagnachmittag.
ab 19:00	Weinprobe und Gemütliches Beisammensein mit Buffet in der Vegetationshalle

Dienstag, 1. April 2014	
09:00 – 10:20	Sektion III: Moderation Thomas Kühne
09:00 – 09:40	Einführungsvortrag: Molekulare Resistenzforschung an der Weinrebe <i>Eva Zyprian</i>
09:40 – 10:00	Der Einsatz von Deep Sequencing zur Entdeckung bisher unbekannter Viren in Taro <i>Marion Liebrecht, Pirasteh Pahlavan, Stephan Winter</i>
10:00 – 10:20	Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) am Beispiel des Yam bean mosaic virus <i>Nicole André, Thomas Kühne, Segundo Fuentes, Bettina Heider, Jan Kreuze, Heiko Ziebel</i>
10:20 – 11:00	KAFFEE-/TEEPAUSE und Präsentation der Poster im Vestibül
11:00 – 12:20	Sektion IV: Moderation Hans-Peter Mühlbach
11:00 – 11:20	Charakterisierung der viralen Proteinase des Cherry leaf roll virus (CLRV) <i>Markus Rott, Carmen Büttner, Susanne von Bargaen</i>
11:20 – 11:40	Identification of the protein interaction domain of the putative movement protein of Cherry leaf roll virus (CLRV) <i>Luise Dierker, Susanne Von Bargaen, Carmen Büttner</i>
11:40 – 12:00	Does the high genetic variation found in Cherry leaf roll virus variants explain the epidemics of the 'birch leaf-roll disease' in Finland? <i>Artemis Rumbou, Susanne von Bargaen, Markus Rott, Risto Jalkanen, Carmen Büttner</i>
12:00 – 12:20	Besteht ein Zusammenhang zwischen der genetischen Variabilität der RNA3 des European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) und dem Standort bzw. der Wirtspflanzenart? <i>Jenny Robel, Theresa Büttner, Hans-Peter Mühlbach, Susanne von Bargaen, Carmen Büttner</i>
12:20 – 13:00	Allgemeines und Abschlussdiskussion Frank Rabenstein & Tatjana Kleinow
anschließend	Tagungsende

Posterpräsentationen

1

Studien zur Detektion eines unbekanntes Agens an Flatterulme (*Ulmus laevis* Pall.)

Anne-Mareen Eisold, Markus Rott, Martina Bandte, Carmen Büttner
Humboldt Universität zu Berlin, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin

2

Construction of Apple chlorotic leafspot virus full length cDNA clones by Gibson Assembly

Constanze Berwarth, Lei Zhang, Vladimir Jakovljevic, Wilhelm Jelkmann
Julius Kühn Institute, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim

3

Virus elimination and reinfection of *Fusarium graminearum* strains and mutants

Stefanie Götsch, Britta Magsig, Arne Alder, Christine Blum, Cornelia Heinze
Universität Hamburg, MPPG, Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg

4

Impact of silica supplementation on virus infected cucumber cultures

Sabine Holz¹, Grzegorz Bartoszewski², Rivka Elbaum³, Franziska Emmerling⁴, Janina Kneipp⁵, Michael Kube¹, Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Division Phytomedicine, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin

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

³Hebrew University, The Faculty of Agriculture, The Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, 76100 Rehovot, Israel

⁴Federal Institute for Materials and Testing (BAM), Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin

⁵Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Chemistry, Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin

5

Geminivirus/host plant interaction: regulation of movement protein functions by plant-derived posttranslational modification

Tatjana Kleinow¹, Gabi Kepp¹, Sigrid Kober¹, Marc Nischang¹, Werner Preiss¹, Monika Stein¹, Alexander Beck², Fariha Tanwir¹, Holger Jeske¹, Christina Wege¹

¹Molecular Biology and Plant Virology, Institute of Biomaterials and biomolecular Systems, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Germany

²PANATecs GmbH, Vor dem Kreuzberg 17, 72070 Tübingen, Germany

6

Genombestimmung einer noch unbeschriebenen Poleroviruspezies die *Sauropus androgynus* Pflanzen befällt

Dennis Knierim¹, Edgar Maiss², Wulf Menzel¹, Stephan Winter¹, Lawrence Kenyon³

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

²Leibniz Universität Hannover, Abteilung Pflanzenviren, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Deutschland

³AVRDC - The World Vegetable Center, Abteilung Pflanzenviren, PO Box 42, Shanhua, Tainan 74199, Taiwan

7

Etablierung von Gewebekulturen Cherry leaf roll virus-infizierter *Betula* spp. aus Nordfinland

Juliane Langer¹, Susanne von Barga¹, Tuija Aronen², Risto Jalkanen³, Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²The Finnish Forest Research Institute, Finlandiantie 18, 58450 Punkaharju, Finland

³The Finnish Forest Research Institute, Eteläranta 55, 96301 Rovaniemi, Finland

8

Capsicum yellowing virus - ein neues Tobamovirus isoliert aus Tabasco

Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Inst. Gartenbaul. Produktionssysteme, Abt. Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover

9

Primerdesign für den Luminex xTAG-Nachweis von verschiedenen Tospoviren

Niklas Bald, Edgar Maiss

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

10

Dispensable and exchangeable domains of the RNA 2-encoded 2A^{HP} protein of Arabis mosaic nepovirus

Shaheen Nourinejad Zarghani¹, Laurence Dupuis-Maguiraga², Alexandra Bassler³, Thierry Wetze³

¹Department of Plant Entomology and Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

²CEA, Division of Immuno-Virologie, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies, Fontenay-aux-Roses, France

³RLP Agrosience, AIPlanta, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Germany

11

Unravelling the role of repair and recombination pathway components for geminivirus replication in *Arabidopsis thaliana*

Kathrin Richter, Holger Jeske

Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Abteilung Molekularbiologie u. Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart

12

Erstellung eines infektiösen Volllängenkons des Cucumber green mottle mosaic virus

Kaja Schieck, Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Inst. Gartenbaul. Produktionssysteme, Abt. Phytomedizin, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover

13

Pea yellow stunt virus: Auf dem Wege zur Rekonstitution eines infektiösen Virus mit Hilfe klonierter Genomkomponenten

Lisa Schlesener¹, Petra Lüddecke¹, Ioana Grigoras², Heinrich Josef Vetten¹, Heiko Ziebell¹, Bruno Gronenborn³

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathodiagnostik, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Deutschland

²University of Évry-Val-d'Essonne, Institut of Systems and Synthetic Biology, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry Cedex, France

³Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex, France

14

The analysis of the complete genome content of members belonging to the *Acholeplasmataceae* supporting an early split of the genera *Acholeplasma* and *Candidatus Phytoplasma*

Christin Siewert¹, Michael Kube¹, Alexander M. Migdoll², Sabine Holz¹, Bojan Duduk³, Ralf Rabus⁴, Erich Seemüller⁵, Jelena Mitrovic³, Richard Reinhardt⁶, Carmen Büttner¹

¹*Humboldt-Universität zu Berlin, Phytomedicine, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Germany*

²*National Center for Tumor Diseases (NCT) Heidelberg, INF 460, 69120 Heidelberg, Germany*

³*Institute of Pesticides and Environmental Protection, Banatska 31b, 11080 Belgrade, Serbia*

⁴*Institute for Chemistry and Biology of the Marine Environment (ICBM), University of Oldenburg, Carl-von-Ossietzky Str. 9-11, 26111 Oldenburg, Germany*

⁵*Julius Kühn Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Germany*

⁶*Max Planck Genome Centre Cologne, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, Germany*

15

Production of monoclonal antibodies to little cherry virus 2 (LChV-2)

Justine Brodard, Jean-Sébastien Reynard

Agroscope, Route de Duillier 50, 1260 Nyon, Switzerland

16

Biodiversität persistenter Pflanzenviren

Till Lesker, Edgar Maiss

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

Abstracts Vorträge

Einführungsvortrag (Montag 31.03.2014): **Phytoplasmosen im Weinbau**

Michael Maixner

Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: michael.maixner@jki.bund.de

Phytoplasmen sind als Erreger der Vergilbungskrankheiten der Rebe (Grapevine Yellow, GY) im europäischen Weinbau von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Die Vitalität kranker Reben wird vermindert und sowohl die Erntemenge als auch die Qualität des Ernteguts werden erheblich verringert. Die wichtigsten GY in Europa sind die Flavescence dorée (FD), die von Erregern der 16SrV-C und -D-Gruppe verursacht werden, und die Schwarzholzkrankheit (Bois noir, BN), die mit 'Candidatus Phytoplasma solani' (16SrXII-A Gruppe, = Stolbur-Gruppe) assoziiert ist. Phytoplasmosen sind pfropfübertragbar und werden durch infiziertes Vermehrungsmaterial verbreitet. Im Feld werden sie durch Zikaden in einem persistent-propagativen Modus übertragen. Sowohl FD als auch BN weisen eine hohe Vektorspezifität auf und unterscheiden sich erheblich in Bezug auf die Epidemiologie. Die FD breitet sich epidemisch aus, da sie durch einen ampelophagen Vektor, die Cicadellide *Scaphoideus titanus*, sehr effektiv von Rebe zu Rebe übertragen wird. Dem gegenüber sind die Erreger der 16SrXII-A Gruppe in krautigen Wildpflanzen verbreitet und werden von Cixiiden mit dem Hauptvektor *Hyalesthes obsoletus* übertragen. Reben sind für die Erreger eine Sackgasse, da sie keine Wirtspflanze für die Larven des Vektors darstellen.

Deutschland ist bislang frei von der Quarantänekrankheit FD als auch von ihrem Vektor, die jedoch beide eine starke Ausbreitungstendenz nach Norden zeigen. Die FD-Erreger weisen eine enge phylogenetische Verwandtschaft mit in Erlen weit verbreiteten Phytoplasmen auf. Daher wird derzeit untersucht, inwieweit diese Pathogene durch den Vektor der FD übertragbar sind.

Die in jüngerer Zeit beobachtete starke Zunahme der Schwarzholzkrankheit war auf einen bislang unbekanntem, mit der Brennnessel als Wirtspflanze assoziierten Typ des BN-Phytoplasmas zurückzuführen, dessen Ausbreitung durch die Erweiterung des Wirtsspektrums des Vektors ermöglicht wurde. Durch die Entwicklung einer neuen Wirtsrasse des Vektors und die Wirtsspezifität verschiedener BN-Typen existieren nun spezifische, an Ackerwinde und Brennnessel gebundene epidemiologische Systeme der Stolbur-Phytoplasmen, wobei von beiden eine Infektionsgefahr auf Reben ausgeht.

Recent advances in the study of grapevine leafroll disease in north-eastern France

Etienne Herrbach¹, Antoine Alliaume¹, Monique Beuve¹, Gérard Hommay¹, Jean Le Maguet², Catherine Reinbold¹, Marilynne Uzes³, Louis Wiss & Olivier Lemaire¹

¹Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR SVQV, BP 20507, 68000 Colmar, France; and Université de Strasbourg, UMR 1131, 67000 Strasbourg, France

²Institut Français des Productions Cidricoles, La Rangée Chesnel, 61500 Sées, France

³INRA, UMR BGPI, CIRAD TA A54/K, Campus International de Baillarguet, 34000 Montpellier, France

Kontakt-E-Mail-Adresse: etienne.herrbach@colmar.inra.fr

Grapevine leafroll disease is one of the most damaging viral diseases of grapevine worldwide. It is caused by a series of closterovirid species, *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV)-1,-2, etc. In French vineyards, GLRaV-1 and -3 (genus *Ampelovirus*) are highly prevalent and are spread along with trade of infected material, as well as by natural vectors, the scale insects (Hemiptera, *Pseudococcidae* and *Coccidae*). Deeper knowledge on leafroll transmission and epidemiology (Herrbach et al., APS book, in press) is required to improve the grapevine protection against leafroll and forecast the virus spread in a changing context.

This communication will review recent advances achieved in the study of leafroll viruses and vectors in north-eastern France (Alsace, Burgundy, Champagne). Spatio-temporal analyses of leafroll spread in Burgundy revealed a rapid dissemination of both the vector and the virus within plots, as well as between plots, highlighting the risk posed by neighbouring infected vineyards (Le Maguet et al. 2013, Eur. J. Plant Pathol. 135, 415). Further field experiments aimed at estimating the possible wind transport of *Parthenolecanium corni* larvae showed that L1 larvae ('crawlers') were commonly trapped.

Virus-vector specificity studies revealed that Holarctic species *Phenacoccus aceris* is an efficient vector of several ampeloviruses and associated vitiviruses (Le Maguet et al., 2012, Phytopathology 102, 717). Also, the retention over two weeks of viral RNA in viruliferous vectors was assessed by RT-PCR. Further experiments are underway to better characterise the virus-vector interactions.

We are most grateful to three French regional viticulture committees ('Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne' CIVC, 'Comité Interprofessionnel des Vins d'Alsace' CIVA, 'Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne' BIVB), to SPE Department of INRA and to the FranceAgriMer agency for financial support. Thanks are also due to greenhouse technicians, several winegrowers and viticultural advisors.

Grapevine red blotch-associated virus is widespread in the United States

Biörn Krenz, Jeremy R. Thompson, Heather L. McLane, Marc Fuchs & Keith Perry

¹Lehrstuhl Biochemie Department Biologie - Universität Erlangen-Nürnberg Staudtstr. 5 91058 Erlangen Germany

²Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology, 334 Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY, 14853 USA

³Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva NY, 14456 USA

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

Grapevine red blotch disease has been recognized since 2008 as affecting North American grape production. The presence of the newly described grapevine red blotch-associated virus (GRBaV) is highly correlated with the disease. To more effectively detect and monitor the presence of the virus, a sample processing strategy and multiplex polymerase chain reaction assay were developed. Forty-two of 113vine samples collected in or received from seven of the United States (CA, FL, MD, NJ, NY, OR, PA, VA) were shown to harbor the virus, demonstrating the virus is widely distributed across North America. Phylogenetic analyses of a viral replication-associated protein (Rep) gene fragment from the 42 isolates of GRBaV demonstrated there were two distinct clades of the virus, with clade 1 showing the greatest variability. The full-length genomes of six virus isolates were sequenced and phylogenetic analyses of 14 whole genomes recapitulated results seen for the Rep gene. Using a suite of statistical models, a comparison of GRBaV genomes indicated recombinational mechanisms underlay some of the variation seen among GRBaV genomes within clade 1. A phylogenetic analysis of coat and replicase-associated protein sequences among single-stranded DNA viruses revealed GRBaV to group within the family *Geminiviridae*, but distinct from other genera of plant viruses.

Defekte geminivirale DNA in Beet curly top virus-infizierten, langzeitüberlebenden Zuckerrüben

Judith Bach & Holger Jeske

Institut für Biomaterialien und biomolekulare System, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70569 Stuttgart, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: holger.jeske@bio.uni-stuttgart.de

Das *Beet curly top virus* (BCTV; Genus Curtovirus) stammt ursprünglich aus Vorderasien, wurde aber schon Ende des 19. Jahrhunderts wahrscheinlich mit infiziertem Pflanzenmaterial nach Nordamerika eingeschleppt, von wo es den gesamten amerikanischen Kontinent eroberte. In wellenförmigen Epidemien, zuletzt seit den 1990er Jahren hat es in den USA die Zuckerrüben-Produktion erheblich reduziert. Curtovirus-Genome gelten als evolutionär entstandene Rekombinanten, deren Eltern einerseits Begomoviren für Gene der Replikations- und Transkriptionskontrolle waren, andererseits Mastreviren für das Hüllprotein und damit die Übertragung durch Zikaden. Vielleicht wegen dieses rekombinanten Ursprungs neigen die Curtoviren mehr als andere Geminiviren zur Produktion von defekten (D-) DNA Molekülen. Diese D-DNAs brauchen die Elternviren zur Vermehrung, können aber auch die BCTV-Vermehrung bremsen, warum sie häufig als *defective interfering* (DI) DNAs bezeichnet werden (3). Verschiedene D-DNAs wirken in der Modelnpflanze *Nicotiana benthamiana* sehr unterschiedlich und zunächst wurde angenommen, dass der Interferenz-Effekt von der Größe der D-DNA abhängt (2). Bestimmte Molekülklassen lieferten als dimeres Transgen in *N. benthamiana* einen passablen Schutz gegen BCTV Infektion, der auf der Erholung der Pflanzen (*recovery*) basiert (2). Um die Praxistauglichkeit zu prüfen, wurden das beste Konstrukte, das in *N. benthamiana* selektiert worden waren, in das Zuckerrüben-genom transferiert, eine Zusammenarbeit mit der Planta GmbH, Einbeck (4). Viele transgene Linien wurden auf Virusresistenz geprüft, mit dem enttäuschenden Ergebnis, dass die gewählte D-DNA die Symptome eher verschlechterte (4). Andererseits zeigten die Analysen, dass sich während der Infektion in Zuckerrüben neue D-DNAs herausbildeten (D_n -DNAs), die in ihrer Größenvielfalt ohne Vorbild waren. Während die meisten infizierten Pflanzen sehr bald starben, überlebten einige davon sehr lange (*long-term survivor*; LTS). Die D_n -DNAs aus LTS-Pflanzen wurden mittels *Rolling circle amplification* vermehrt, bakteriell kloniert und sequenziert (1). Dabei stellten sich folgende Besonderheiten heraus: (a) die Größen können variieren, aber in diskreten Stufen, die mit Nukleosomengrößen der geminiviralen Minichromosomen korrelieren, (b) der für die Pathogenität der Viren wichtige ORF C4 bleibt erhalten, (c) obwohl große Teile des viralen Genoms vorzugsweise auf der rechten Seite verloren gehen, bleiben die Promotoren und Terminatoren (z. T. als invertierte Wiederholungen) erhalten, ein Umstand der im Zusammenhang mit RNA-Interferenz bedeutsam sein kann. Diese Ergebnisse führen zu einem Modell der Entstehung von D-DNAs durch Rekombination, wobei die minichromosomale DNA bestimmte Matrizenwechsel offensichtlich bevorzugt. Die Zuckerrüben-adaptierten D_n -DNAs aus LTS Pflanzen könnten eine nächste Generation von Konstrukten liefern, die in ihren ursprünglichen Wirtspflanzen *Recovery*-Resistenz hervorrufen.

References:

- (1) Bach, J. & H. Jeske (2014): Defective DNAs of beet curly top virus from long-term survivor sugar beet plants. *Virus Res.* **183**: 89-94.
- (2) Frischmuth, T., M. Engel & H. Jeske (1997): Beet curly top virus DI DNA-mediated resistance is linked to its size. *Mol. Breed.* **3**: 213-217.
- (3) Frischmuth, T. & J. Stanley (1994): Beet curly top virus symptom amelioration in *Nicotiana benthamiana* transformed with a naturally occurring viral subgenomic DNA. *Virology* **200**: 826-830.
- (4) Horn, J., S. Lauster, B. Krenz, J. Kraus, T. Frischmuth & H. Jeske (2011): Ambivalent effects of defective DNA in beet curly top virus-infected transgenic sugarbeet plants. *Virus Res.* **158**: 169-178.

DNA methylation status of geminiviral minichromosomes

Kathrin Deuschle & Holger Jeske

Institut für Biomaterialien und biomolekulare System, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70569 Stuttgart, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: Kathrin.Deuschle@bio.uni-stuttgart.de

Geminiviruses are important plant pathogens with a circular single-stranded DNA (ssDNA) genome of about 2500 to 3000 bases which is copied to double-stranded (ds) covalently closed circular DNA (cccDNA) during replication. This cccDNA is packaged into host histones to form nucleosomes. Viral minichromosomes serve as templates for transcription and replication. In order to investigate if the methylation status of geminiviral DNA is dependent on the condensation level of cccDNA over the time course of infection, viral minichromosomes were purified from *Nicotiana benthamiana* plants by differential and sucrose gradient centrifugation between 14 and 42 days post inoculation. Gradient fractions were analyzed after digestion with a methylation-dependent restriction enzyme (McrBC) by gel electrophoresis and Southern blot hybridization. Differences for the condensation stages of chromatin as well as for the different points in time were observed.

The RXL motif of the African cassava mosaic virus Rep protein is necessary for rereplication of yeast DNA and viral infection in plants

*Katharina Hipp*¹, *Peter Rau*¹, *Benjamin Schäfer*¹, *Bruno Gronenborn*² & *Holger Jeske*¹

¹Institut für Biomaterialien und biomolekulare System, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70569 Stuttgart, Deutschland

²Institut des Sciences du Végétal, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, Frankreich

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

Geminiviruses, single-stranded DNA plant viruses, encode a replication-initiator protein (Rep) that is indispensable for virus replication. This protein interacts with plant homologues of retinoblastoma protein (pRBR) to induce DNA synthesis in differentiated plant cells in order to provide the polymerases required for efficient virus replication. In *Schizosaccharomyces pombe*, the ectopic expression of Rep promotes host DNA rereplication leading to a cell elongation phenotype, although the fission yeast does not possess an RB homologue. Consequently, alternative links of Rep to cell cycle control are possible. A potential cyclin interaction motif (RXL) in the sequence of African cassava mosaic virus Rep is highly conserved among geminiviruses and an alternative for such a link. Mutation of this motif abrogated rereplication and cell elongation in the yeast suggesting that the interaction of Rep via its RXL motif with one or several yeast proteins may be responsible for interference with cell cycle control. The RXL motif is essential for viral infection of *Nicotiana benthamiana* plants, since mutation of this motif in infectious clones prevented completely any symptomatic infection. For comparison, a nanovirus (faba bean necrotic yellows virus) was investigated that encodes a specialized cell-cycle link (Clink) protein in addition to Rep that activates the cell cycle by binding via its LXCXE motif to pRBR. Expression of wildtype Clink as well as of a Clink mutant deficient in pRBR-binding did not trigger rereplication in fission yeast. These results suggest that single-stranded DNA viruses may have evolved multiple routes to exploit host DNA synthesis in plants.

Next generation sequencing of the Apple Rubbery Wood Disease

*Vladimir Jakovljevic*¹, *Patricia Otten*² & *Wilhelm Jelkmann*¹

¹Julius Kühn Institute, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Deutschland

²FASTERIS SA Ch. du Pont-du-Centenaire 109 Case postale 28 CH-1228 Plan-les-Ouates, Switzerland

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

Apple Rubbery Wood (ARW) disease has been known in orchards for decades but the etiology of the disease is still unclear. Here we used Illumina Next Generation Sequencing (NGS) to search for a possible pathogen. Analysis of total RNA (RNA-seq) as well as of small RNAs (siRNA) from ARW samples revealed several possible viral pathogens. Among small RNAs we found highly abundant micro RNAs (miRNA) which had different copy numbers between healthy control and the ARW sample. Several of these miRNA have been reported to be involved in wood lignification, therefore possibly explaining disease symptoms.

Celery latent virus: Ein potentielles Mitglied der *Potyviridae* mit einem N-terminal lokalisierten Signalpeptid

*Hanna Rose*¹, *Ines Eikenberg*², *Wulf Menzel*³, *Heinrich-Josef Vetten*⁴ & *Edgar Maiss*¹

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

²Georg-August-Universität Göttingen, Dept. für Nutzpflanzenwissenschaften, Abt. Allgemeine Pflanzenpathologie & -schutz, Grisebachstrasse 6, 37077 Göttingen, Deutschland

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

⁴Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Deutschland

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

Das Celery latent virus (CeLV) wurde 1966 erstmals durch Brandes & Lousioni (1) beschrieben. Infizierte Selleriespezies wie beispielsweise *Apium graveolens* var. *rapaceum* und *Apium graveolens* var. *dulce* zeigen keine sichtbaren Symptome. Weiterführenden Untersuchungen von Bos et al., 1987 (2) offenbarten eine flexible filamentöse Partikelstruktur. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Virus schwache systemische Symptome in *Chenopodium quinoa* auslöst und in etwa 70 % der Fälle eine Übertragung durch Samen erfolgt. Eine vektorielle Übertragbarkeit durch Insekten, zum Beispiel verschiedene Blattlausarten wie *Aphis fabae* und *Myzus persicae*, konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Das virale Genom besteht aus 11.220 Nukleotiden inklusive des PolyA-Schwanzes und kodiert für ein 3.640 Aminosäuren langes Polyprotein sowie ein theoretisch vorhandenes PIPO. Phylogenetische Analysen legen nahe, dass es sich um ein neues Genus innerhalb der *Potyviridae* handeln könnte. Verschiedene konservierte Proteindomänen und -motive weisen auf die Existenz eines CI, NIa-Pro und NIb hin. Im N-terminalen Bereich ist bis auf das Vorhandensein eines mutmaßlichen Signalpeptids (SMART & Phobius) von 23 Aminosäuren Länge keine Aussage über eventuelle Proteine möglich. Durch Fusion des mutmaßlichen Signalpeptids mit GFP und den Einsatz eines mRFP-ER-Markers konnte in ersten mikroskopischen Untersuchungen eine mögliche Lokalisation an und/oder im endoplasmatischen Retikulum festgestellt werden.

References:

(1) Brandes J. & Lousioni E. (1966): Untersuchungen über einige Eigenschaften von zwei gestreckten Sellerieviren. *Phytopath. Z.* **57**:277-288.

(2) Bos L., Diaz-Ruiz J.R. & Maat D.Z. (1978): Further characterization of celery latent virus. *Neth. J. Pl. Path.* **84**:61-79.

Einführungsvortrag (Dienstag 01.04.2014):

Molekulare Resistenzforschung an der Weinrebe

Eva Zyprian

Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Molekulare Genetik, D 76833 Siebeldingen, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: eva.zyprian@jki.bund.de, eva.zyprian@kit.edu

Der europäische Weinbau verbraucht seit der Einschleppung von Pathogenen wie dem Echten und dem Falschen Mehltau im 19. Jahrhundert aus Amerika enorme Mengen an Fungiziden. Im Zuge der Entwicklung nachhaltiger und

umweltfreundlicher Verfahren für die moderne Landwirtschaft ist die Züchtung pathogen-resistenter Qualitätsrebsorten eine wichtige Aufgabe, die schon seit langem am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof verfolgt wird. Dazu müssen Resistenzeigenschaften aus amerikanischen und -neuerdings verstärkt- auch asiatischen Wildarten der Rebe in die europäische Kulturform eingekreuzt werden. Hierbei ist die Kombination möglichst vielfältiger Resistenzmechanismen zum Aufbau einer dauerhaften Widerstandsfähigkeit anzustreben.

Moderne genetische Methoden unter Verwendung von molekularen Markertechniken ermöglichen seit wenigen Jahren die „Markierung“ von Resistenz-vermittelnden Genombereichen, so dass deren Introgression und erfolgreiche Kombination jetzt in der Kreuzungszüchtung „frühdiagnostisch“ verfolgt werden kann. Darüber hinaus ist es unumgänglich, die beteiligten Resistenzmechanismen zu studieren, um sie mit bester Effizienz kombinieren zu können. Laufende Forschungsarbeiten am Geilweilerhof sind Untersuchungen der Resistenz-vermittelnden Genombereiche auf molekularer Ebene, um die beteiligten Gene zu erarbeiten. Ebenso zeigen Studien zur differentiellen Genexpression in anfälligen und resistenten Reben Unterschiede in der Regulation der pflanzlichen Abwehr auf. Untersuchungen zur Sequenzvariabilität in den erhaltenen Kandidatengenomen und Assoziationsstudien können ermitteln, welche Genvarianten mit der Ausprägung der Resistenz korrelieren. Auf diesem Weg werden auch neuartige Marker aus den beteiligten Genen für eine Verbesserung der Marker-gestützten Züchtung verfügbar.

Der Einsatz von Deep Sequencing zur Entdeckung bisher unbekannter Viren in Taro

Marion Liebrecht¹, Pirasteh Pahlavan² & Stephan Winter¹

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

²DSMZ, Pflanzenviren, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: marion.liebrecht@dsmz.de; stephan.winter@jki.bund.de

Im International Network of Edible Aroids (INEA) Projekt „Adapting Clonally Propagated Crops to Climatic and Commercial Change“ sind Forschungs- und Entwicklungsinstitute zusammengeschlossen, um durch Züchtung die genetische Diversität von Taro (*Colocasia esculenta*) auszuweiten, global zu nutzen und vor allem um Kultivare zu finden, die gegen *Phytophthora colocasiae* (Taro leaf blight) resistent sind. Tarozüchtung findet vor allem im Südpazifik, Fidschi, Papua Neu Guinea statt und von dort werden Zuchtlinien an Partner in Südamerika und Afrika zu Züchtungszwecken gesandt. Der Austausch von Zuchtmaterial zwischen den Kontinenten muss Pathogenfreiheit gewährleisten und unser Beitrag zu diesem Projekt ist es, alle viralen Erreger in Taro zu erfassen und entsprechende diagnostische Tests zu entwickeln. Mittels Deep Sequencing von RNA aus Taro wurden zwei neuartige Viren der Gattungen *Rhabdovirus* und *Tenuivirus* aufgedeckt und die nahezu vollständigen Genomsequenzen der Minus-strang RNA Viren rekonstruiert. Durch RT-PCR und Sangersequenzierung wurden die vollständigen Genome rekonstruiert und verifiziert, die Nukleo- bzw. Hüllproteingene kloniert und in Bakterien exprimiert, um Antisera herzustellen, die als Grundlage für den Virusnachweis herangezogen werden können. Das neuartige Rhabdovirus wurde in verschiedenen symptomatischen Pflanzen aus den Solomoninseln und Papua Guinea gefunden und kommt als potentieller Erreger der „Bobone“ Krankheit in Taro in Frage. Diese Krankheit kommt nur auf diesen Inseln vor und führt zu schweren Deformationen der Pflanze. Sie hat eine, der „Alomae“-Krankheit ähnliche Symptomatologie, jedoch führt „Alomae“ zum Tod der infizierten Pflanzen. Das neuartige Rhabdovirus kommt auch als Erreger von „Alomae“ in Frage, jedoch sind noch weitere virale Erreger involviert, deren Beitrag zur Ätiologie der Krankheit diskutiert wird.

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) am Beispiel des Yam bean mosaic virus

Nicole Andree¹, Thomas Kühne¹, Segundo Fuentes², Bettina Heider², Jan Kreuze² & Heiko Ziebell¹

¹JKI Braunschweig, Messeweg 11, 38104 Braunschweig, Deutschland

²International Potato Center, Apartado 1558, Lima 12, Perú

Kontakt-E-Mail-Adresse: n.andree@tu-bs.de

Die Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ist eine schnelle und einfache Methode zur Detektion von Nukleinsäuren. Im Vergleich zu einer normalen PCR findet die LAMP Reaktion durch spezielle Primer unter isothermalen Bedingungen innerhalb einer Reaktionszeit von ca. 30 bis 60 Minuten statt.

Die Methode wurde im Jahr 2000 eingeführt und seitdem immer weiter modifiziert und verbessert. Mittlerweile sind vier verschiedene LAMP Methoden zum Nachweis von Pflanzenpathogenen beschrieben. Bei der Standard-LAMP Reaktion ist eine Trübung des Reaktionsgemisches bei positiven Proben mit dem bloßen Auge sichtbar während durch die Blue LAMP Methode ein Farbumschlag von violett zu blau bei positiven Proben beobachtet werden kann. Zudem können die amplifizierten Produkte mittels Gelelektrophorese überprüft werden. Bei der Real-Time LAMP Methode wird ein Anstieg des Fluoreszenzsignals durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes in das LAMP Produkt detektiert. Somit ist während der Amplifikation bereits eine Aussage über positive und negative Proben möglich. Eine weitere Methode ist die Detektion von positiven Proben durch Zugabe von SYBR green I (oder ähnlichen Farbstoffen) nach der LAMP Reaktion, bei der ein Farbumschlag des SYBR green I von orange zu gelb sichtbar ist. Ziel des Projekts ist es, die LAMP Methoden für diverse Pflanzenviren zu etablieren. Diese werden anhand des *Yam bean mosaic virus*, einem Potyvirus, vorgestellt. Alle Primer wurden mit der Primer Explorer V4 Software der Firma Ecken [<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>] entwickelt. Durch Variation der verwendeten Puffer, Konzentration der eingesetzten Enzyme, Reaktionszeiten und einer Gradienten LAMP konnten die verschiedenen LAMP Methoden optimiert werden. Darüber hinaus wurde durch Einsatz von reiner Virus RNA das Detektionslimit der verschiedenen LAMP-Methoden bestimmt und mit dem der herkömmlichen PCR verglichen. Ebenso konnte ein Unterschied des Detektionslimits zwischen den verschiedenen LAMP Methoden gezeigt werden. Die Methode stellt somit durchaus eine gute Nachweismethode dar, die großes Potential für praktische Anwendungen hat.

Charakterisierung der viralen Proteinase des Cherry leaf roll virus (CLRV)

Markus Rott, Carmen Büttner & Susanne von Bargaen

Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

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

Nepoviren (Familie *Secoviridae*, Sanfacon *et al.*, 2009) besitzen zwei RNAs, die zu zwei Polyproteinen translatiert werden. Aus diesen Polyproteinen können intermediäre, durch eine virale Proteinase teilweise prozessierte, sowie final maturierte Proteine hervorgehen, die verschiedene Aktivitäten haben (Chisholm *et al.*, 2001). Der regulierten Maturation der Polyproteine kann also im Rahmen der Verbreitungs- und Vermehrungsstrategie des Virus eine essentielle Funktion zukommen. Die Voraussetzung für die funktionale Charakterisierung viraler Genprodukte ist daher die Aufklärung der Prozessierung in ihre Untereinheiten.

Das bipartite Genom von *Cherry leaf roll virus* (CLRV, *Nepovirus* der Subgruppe C) kodiert die zwei Polyproteine P1 und P2. P1 beinhaltet charakteristische Domänen für einen Proteinase-Cofaktor (PCo), eine Helikase (Hel), ein *genome-linked* Protein (VPg), eine Proteinase (Pro) und eine RNA-abhängige Polymerase (Pol). P2 beinhaltet das *movement Protein* (MP) und das *coat Protein* (CP) (von Bargaen *et al.*, 2012). Die Polyproteine werden durch die Proteinase zu funktionellen Einheiten maturiert. Die Analyse der Vollängensequenz zeigt potentielle Prozessierungsstellen, die analog zu experimentell bestätigten Schnittstellen verwandter Proteinasen aus Nepoviren liegen (Wang & Sanfacon 2000; Wetzel *et al.*, 2008).

Zur funktionalen Charakterisierung der Proteinase von CLRV werden diese, sowie die Bereiche der beiden Polyproteine, die putative Erkennungsstellen kodieren, *in vitro* exprimiert. Anschließend werden die proteolytische Aktivität der Proteinase, sowie die putativen Prozessierungsstellen der Polyproteine *in vitro* experimentell verifiziert.

References:

- von Bargaen S., Langer J., Robel J., Rumbou A., Büttner C. (2012): Complete nucleotide sequence of Cherry leaf roll virus (CLRV), a subgroup C nepovirus. *Virus Res.* **163**, 678-683.
- Chisholm J., Wieczorek A., Sanfacon H. (2001): Expression and partial purification of recombinant tomato ringspot nepovirus 3C-like proteinase: comparison of the activity of the mature proteinase and the VPg-proteinase precursor. *Virus Res.* **79**:153-164.
- Sanfacon H., Wellink J., Le Gall O., Karasev A., van der Vlugt R., Wetzel T. (2009): *Secoviridae*: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Arch. Virol.* **154**: 899-907.
- Wang A. & Sanfacon H. (2000): Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **81**: 2771-2781.
- Wetzel T., Chisholm J., Bassler A., Sanfacon H. (2008): Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from *Arabidopsis mosaic virus* (subgroup A nepovirus). *Virology* **375**: 159-169.

Identification of the protein interaction domain of the putative movement protein of Cherry leaf roll virus (CLRV)

Luise Dierker, Susanne von Bargaen & Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: luise.dierker@hu-berlin.de

The putative movement protein (MP) of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) is encoded by RNA2 upstream of the coat protein (CP) coding region. Yeast-two hybrid (YTH) studies revealed dimerization of the viral MP and CP, as well as the specific interaction of both proteins. Additionally, specific binding of the CLRV-MP to a plant protein (At-4/1) which localizes to plasmodesmata was demonstrated. These protein-protein interactions may play a substantial role in tubule-guided cell-to-cell transport of the virus within its host plant.

Therefore, we aimed to identify the peptide sequence of the CLRV-MP responsible for dimerization, binding to CLRV-CP as well as to the host factor At-4/1 and constructed 5 different N- and C-terminal deletions of the MP of the rhubarb strain CLRV-E395 (385 aa, 42 kDa). Investigating MP-deletion constructs in YTH revealed that the region between aa 46 and 80 of the putative MP of CLRV is most important to facilitate dimerization of CLRV-MP-E395 as well as binding to CLRV-CP and At-4/1. The 45 first aa of the N terminus (construct ΔN1) could be deleted without a negative effect on homo- or heterodimerization of the CLRV-MP. On the contrary when the first N terminal 80 aa of the putative MP of CLRV were deleted (construct ΔN2) protein binding was completely abolished. Also, when the last 142 aa of the C-terminal region of the CLRV-MP are missing (constructs ΔN1-C1 and ΔC1) dimerization and interaction with other proteins is hampered. However, the first 80 aa of the N terminus (construct ΔC2) showed enhanced binding to other interaction partners when compared with the full length constructs. These findings support our hypothesis that the coiled-coil structure predicted for aa 54-71 of the CLRV-MP is a functional domain essential for protein binding.

Does the high genetic variation found in Cherry leaf roll virus variants explain the epidemics of the 'birch leaf-roll disease' in Finland?

Artemis Rumbou¹, Susanne von Bargaen¹, Markus Rott¹, Risto Jalkanen² & Carmen Büttner¹

¹HU-Phytomedicine, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²METLA, PL 16, FI 96301, Rovaniemi, Finland

Kontakt-E-Mail-Adresse: rumbouar@cms.hu-berlin.de

The 'birch leaf-roll disease' is currently causing extensive epidemics in Fennoscandia strongly reducing the birch forest vigor. *Cherry leaf roll virus* has been often detected in diseased birch trees. First results on CLRV characterization from Finland showed that the virus variants from Finnish birches differ genetically from the ones described until now in birches from other regions. To further characterize Finnish CLRV strains we assessed samples from 14 birch trees from Rovaniemi, northern Finland reported to be heavily infected (leaf discoloration and deformation as well as tree decline). PCR fragments from three genomic regions, the coat protein region (CP), the untranslated region (UTR) and the RNA-dependent-RNA polymerase region (RdRp) were amplified, cloned and sequenced. The data obtained from the genomic analysis revealed high CLRV variability within each tree and among trees. In the samples from the 14 trees examined, 5 to 6 different virus

variants were found in each genomic region. Interestingly, almost all of the trees were infected with two or more CLRV variants. One genotype in each genomic region appeared predominantly (present in 9 to 11 out of the 14 samples, depending on the genomic region). Maximal diversity at the nucleotide level between variants was 23.5%. The diversity at the amino acid level was 16% and 11.2% in the CP and the RdRp region, respectively. The high genotypic and genetic diversity found in limited number of samples all originating from the city of Rovaniemi and covering a restricted geographic area suggests that the CLRV population related to the 'birch leaf-roll disease' contains high levels of genetic variation. It is however questionable if this variability is the main reason of the wide disease occurrence or if more pathogenic factors contribute to the disease.

Besteht ein Zusammenhang zwischen der genetischen Variabilität der RNA3 des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) und dem Standort bzw. der Wirtspflanzenart?

Jenny Robel¹, Theresa Büttner¹, Hans-Peter Mühlbach², Susanne von Bargaen¹ & Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin, Deutschland

²Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: jenny.robels@hu-berlin.de

European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) ist europaweit in Ebereschen (*Sorbus aucuparia*) verbreitet (Büttner *et al.*, 2013). Die RNA3 des segmentierten (-)ssRNA Virus kodiert das virale Nucleocapsidprotein mit einer Größe von 35 kDa. Bisher wurde eine starke Konservierung der RNA3 (97-99 %) für EMARaV-Varianten aus Schweden, Finnland und Russland beschrieben (Kallinen *et al.*, 2009; Valkonen & Rännäli 2010; von Bargaen *et al.*, 2013) und mit dem sehr engen Wirtspflanzenkreis bzw. einer ausschließlichen Übertragung durch eine einzige Vektorspezies, die Gallmilbe *Phytoptus pyri*, erklärt.

In dieser Studie wurde EMARaV in erkrankten Ebereschen *Sorbus aucuparia* aus Norwegen detektiert. Zudem war das Virus in zwei weiteren *Sorbus*-Arten nachweisbar, einer Schwedischen Mehlbeere (*Sorbus intermedia*) mit chlorotischen Ringflecken sowie einer Echten Mehlbeere (*Sorbus aria*) mit chlorotischen Linienmustern aus Västerås (Schweden). Die Nucleocapsid-kodierende Genomregion des Virus wurde mittels RT-PCR amplifiziert (Kallinen *et al.*, 2009) und direkt sequenziert. Ein Vergleich der Nucleotidsequenzen der gesamten RNA3 (Nucleotid 26-1481) mit Referenzsequenzen aus Deutschland, Schweden, Finnland und Russland zeigt eine hohe Konservierung der RNA3 der EMARaV-Varianten aus Mehlbeere und schwedischer Mehlbeere (95-98 %). Die Aminosäuresequenzen des kodierenden Bereichs der RNA3 weisen Identitäten von 97-99 % auf. Im Gegensatz dazu weicht die Sequenz der RNA3 des EMARaV in sechs von neun untersuchten Bäumen aus Norwegen deutlich ab. Beim Vergleich mit publizierten Sequenzen treten bis zu 30% Variabilität innerhalb der 3' nicht-kodierenden Region auf, die Aminosäuresequenz des p3-Proteins zeigt Unterschiede bis zu 8%. Die Variabilität der RNA3 von EMARaV ist somit nicht von der Wirtspflanzenart abhängig. Welchen Einfluss geographischer Standort bzw. Vektor-Übertragung auf das Auftreten von EMARaV-Varianten haben und ob es sich um neue Stämme des Virus handelt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

References:

Büttner C., von Bargaen S., Bandte M., Mühlbach H.-P. (2013): Forest diseases caused by viruses. In: Gonthier P. & Nicolotti G. (Eds.) *Infectious forest diseases*. CABl, pp. 50-75.

Kallinen A.K., Lindberg I.L., Tugume A.K., Valkonen J.P. (2009): Detection, distribution, and genetic variability of European mountain ash ringspot-associated virus. *Phytopathology* **99**: 344-352.

Valkonen J.P.T. & Rännäli M., 2010. First report of *European mountain ash ringspot-associated virus* in *Sorbus aucuparia* from Eastern Karelia, Russia. *Plant Disease* **94**: 921-921.

von Bargaen S., Arndt N., Robel J., Jalkanen R., Büttner C. (2013): Detection and genetic variability of *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) in Sweden. *Forest Pathology* **43**. 429-432.

Abstracts Posterpräsentationen

1

Studien zur Detektion eines unbekanntes Agens an Flatterulme (*Ulmus laevis* Pall.)

Anne-Mareen Eisold, Markus Rott, Martina Bandte & Carmen Büttner

Humboldt Universität zu Berlin, Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

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

Ulmus laevis gehört heute in Deutschland als Reliktbaumart zu den gefährdeten heimischen Gehölzarten. Melioration und Rückgang der natürlichen Standorte bedingen einen starken Rückgang dieser bedeutenden Baumart. Als Ursache für das sog. Ulmensterben wird die Dutch-Elm-Disease als Hauptverursacher für Degenerationen diskutiert. Aus eigenen langjährigen Beobachtungen an vielen Ulmen verschiedener Standorte sind virusverdächtige Symptome sehr offensichtlich und sollten als mitwirkender Verursacher von Degenerationserscheinungen in Betracht gezogen werden. Dass Virusinfektionen die Prädisposition der Bäume verändern können, ist bekannt, und das kann auch für bisher unbekanntes Viren in Ulmen gelten. Virologische Untersuchungen an solchen Baumarten liegen nur spärlich vor, denn sie sind ausgesprochen schwierig durchzuführen und bedürfen einer langjährigen schrittweisen Herangehensweise. Dies gilt vor allem für bisher nicht beschriebene Viren. Zu den vermutlich virusbedingten chlorotischen Ringflecken in Ulme gibt es bisher nur die eigenen Untersuchungen, die hier an einem Fallbeispiel vorgestellt werden. Seit dem Jahr 2000 wird ein Altbaumbestand mit 30 Flatterulmen (*Ulmus laevis*) im Schloßpark Caputh regelmäßig bonitiert. Die Hälfte der Bäume weist die für Viren typischen Symptome wie chlorotische Ringspots, Nekrosen, Astverkahlung und Absterbeerscheinungen auf. In vorangegangenen Untersuchungen konnte das verursachende Agens mechanisch übertragen werden. Zur näheren

Charakterisierung des Pathogens wurden aus *Chenopodium quinoa*, welche mit homogenisierten Knospen von Flatterulmen aus Caputh mit Symptomen inokuliert worden waren, virale Partikel aufgereinigt und anschließend mittels SDS-PAGE das putative virale Hüllprotein analysiert. Aus der Virusaufreinigung wurde RNA isoliert und eine *random* PCR (rPCR) durchgeführt. Parallel erfolgte sowohl aus inokulierten *C. quinoa* als auch aus Blattmaterial symptomtragender *U. laevis* die Isolation virusspezifischer dsRNA, die ebenfalls zur rPCR eingesetzt wurde. Die rPCR Fragmente wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

Im Vergleich zur nichtinokulierten Kontrolle wies die Probe der inokulierten *C. quinoa* in der SDS-PAGE eine zusätzliche Proteinbande mit einer Größe von ca. 25 kDA auf. In Verbindung mit flexiblen Partikeln, die in vorangegangenen Untersuchungen (Bandte et al., 2004) im TEM gezeigt werden konnten, deutet dies darauf hin, dass bei den Flatterulmen eine Infektion mit einem viralen Pathogen vorliegt. Die ausstehenden Daten aus der Sequenzierung sowie die Analyse der dsRNA werden zur weiteren Aufklärung beitragen.

Reference:

Bandte M., Essing M., Obermeier C., Büttner C. (2004): Investigations on virus-diseased elm trees (*Ulmus laevis* Pall.) in eastern Germany. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales* **13**: 65-69.

2

Construction of the full length clones of the Apple Chlorotic Leaf Spot Virus by Gibson Assembly

Constanze Berwarth, Lei Zhang, Vladimir Jakovljevic & Wilhelm Jelkmann

Julius Kühn Institute, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: constanze.berwarth@jki.bund.de

Cloning of the full length viral clones of RNA viruses is often hampered by their genome sizes. Here we cloned several full length clones of the Apple Chlorotic Leafspot Virus (ACLSV), a latent virus of the apple using Gibson Assembly cloning, a promising novel method which enables cloning of large DNA fragments without use of restriction enzymes. ACLSV full length clones showed strong infections symptoms when inoculated on tobacco plants.

3

Virus elimination and reinfection of *Fusarium graminearum* strains and mutants

Stefanie Götsch, Britta Magsig, Arne Alder, Christine Blum & Cornelia Heinze

Universität Hamburg, MPPG, Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg, Deutschland

Kontakt-E-Mail-Adresse: cornelia.heinze@gmx.de

FgVCh9 is a dsRNA virus infecting *Fusarium graminearum* (*Fg*). Infected mycelium shows different biological properties according to the virus concentration. High titer infected mycelium (*FgCh9*[HT]) shows a reduced radial growth on solid medium and reduced infectivity of the fungus on wheat and maize. To investigate the biology of the virus a virus free isolate as well as an infection of *F. graminearum* strains and mutants are necessary tools. To eliminate the *FgVCh9* from its host *FgVCh9*[HT] was treated with the guanosin analogon Ribavirin. After 7 days a strong reduction of the virus titer was observed, as it was shown in a stronger radial growth on CM agar and a reduction of viral segments in total RNA preparations. However, the virus was still present as proven by (nested) RT-PCR. When subcultured mycelium from single conidia was tested all subcultures showed a normal growth compared to non-infected strain *FgPH1*. However, only one out of the 10 tested cultures showed no amplicon when tested by nested RT-PCR and, therefore, was defined as virus-free and named *FgVCh9*[VF].

Mycoviruses are transmitted vertically by spores. When testing single conidia subcultures generated from two infected strains a different percentage of high titer cultures was obtained. The virus was transferred to different strains and mutants of *F. graminearum* by anastomoses. While the infection of *FgVCh9*[VF] did not result in *FgCh9*[HT] strain, a *Dicer2* knock-out mutant showed a high virus titer [HT] after infection. When testing the *F. graminearum* strains *FgPH1* and *Fg8/1* the GFP expressing strain *FgPH1* showed a high virus titer after infection, while the GFP expressing *Fg8/1* did not. With the infection of the different strains we are now able to investigate biological properties of infected and virus free strains and mutants.

4

Impact of silica supplementation on virus infected cucumber cultures

Sabine Holz¹, Grzegorz Bartoszewski², Rivka Elbaum³, Franziska Emmerling⁴, Janina Kneipp⁵, Michael Kube¹ & Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Division Phytomedicine, 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

³Hebrew University, The Faculty of Agriculture, The Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture, 76100 Rehovot, Israel

⁴Federal Institute for Materials and Testing (BAM), Richard-Willstätter-Straße 11, 12489 Berlin, Deutschland

⁵Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Chemistry, Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin, Deutschland

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

Silicic acid is present in the soil and can be taken up by plants. Beneficial effects are described such as higher yield or mitigation of abiotic and biotic stresses. Here, we present the transcriptome analysis of control and silicic acid pretreated cucumber *in vitro* cultures for revealing the role of silicic acid on the genetic level. Subsequent studies will focus on the effect on virus infected plants.

5

Geminivirus/host plant interaction: regulation of movement protein functions by plant-derived posttranslational modification

Tatjana Kleinow¹, Gabi Kepp¹, Sigrid Kober¹, Marc Nischang¹, Werner Preiss¹, Monika Stein¹, Alexander Beck², Fariha Tanwir¹, Holger Jeske¹ & Christina Wege¹

¹Institut für Biomaterialien und biomolekulare System, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Deutschland

²PANATECS GmbH, Vor dem Kreuzberg 17, 72070 Tübingen, Deutschland

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

In plants, transport of endogenous macromolecules such as proteins and nucleic acids over cellular boundaries occurs in a highly selective and regulated manner. Viruses for systemic spread within their hosts exploit these intra- and intercellular pathways; viruses can thus be used as tools to study basic endogenous transport processes and their regulation in plants. The geminiviruses constitute a large and economically important group of plant-infecting viruses. They possess small circular single-stranded DNA genomes, which can encode only for a few viral proteins. This results in a pronounced dependency on host factors to complete their life cycle and favors viral proteins capable to mediate multiple functions. To investigate virus/host interactions and their regulation during inter- and intracellular movement we focused on the geminivirus Abutilon mosaic virus (AbMV), which possess a genome consisting of two DNA molecules (DNA-A and -B). The DNA-B encodes for a nuclear shuttle protein (NSP) and movement proteins (MP), which both enable viral transport within host plants and affect pathogenicity. Although previous studies indicated that NSP mediates trafficking of viral DNA into and out of the nucleus, and MP serves as a membrane adaptor and facilitates cell-to-cell transfer as well as long distance spread, the functional details of how both proteins coordinate viral DNA transport remain to be determined. MP mediates multiple functions during intra- and intercellular trafficking, such as selective binding of viral nucleoprotein complexes, targeting to and modification of plasmodesmata and release of the cargo after cell-to-cell transfer is completed. Consequently, it has to interact with a variety of plant proteins, and is most likely integrated into a regulatory network of other viral proteins and plant factors controlling the diverse MP functions. A phosphorylation of AbMV MP was shown for bacteria-, yeast- and *Nicotiana benthamiana*-derived protein. Mass spectrometry analyses of yeast-expressed MP identified three phosphorylation sites (Thr-221, Ser-223 and Ser-250) located in the C-terminal oligomerization domain. To assess their functional relevance for the viral life cycle within plants, several point mutations were introduced into the MP gene of AbMV DNA-B, which lead to an exchange of Thr-221, Ser-223, and Ser-250, either singly or in various combinations, with either an uncharged alanine or a phosphorylation-mimicking aspartate residue. When co-inoculated with a wild-type DNA-A, all mutated DNA-B variants give rise to a systemic infection in *N. benthamiana*. However, some mutations in MP abolished an AbMV-infection in other plant species of the families *Solanaceae* and *Malvaceae*. In systemically infected plants, symptoms and/or viral DNA accumulation were significantly altered for several of the tested DNA-Bs encoding MP mutants. The identification of three phosphorylation sites in AbMV MP, which have an impact on host range, symptom development, and/or viral DNA accumulation, indicates a regulation of the diverse MP functions by plant-derived posttranslational modification and underscores their importance for geminivirus/host plant interaction.

6

Genombestimmung einer noch unbeschriebenen Poloroviruspezies die *Sauropus androgynus* Pflanzen befällt

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

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

²Leibniz Universität Hannover, Abteilung Pflanzenviren, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Deutschland

³AVRDC - The World Vegetable Center, Abteilung Pflanzenviren, PO Box 42, Shanhua, Tainan 74199, Taiwan

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

Blattproben aus Thailand von *Sauropus androgynus* (L.) Merr., welches eine indigene Gemüsepflanze aus Südostasien ist, zeigten Vergilbungssymptome und wurden mittels RT-PCR auf eine mögliche Polorovirusinfektion getestet. Fünf von acht Proben reagierten positiv mit einem universellen Polorovirus Primerpaar. In einer vorherigen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass von den fünf Polorovirus positiv Proben vier eine zusätzliche Begomovirusinfektion aufweisen. Von der Polorovirus positiv Probe die nicht mischinfiziert war, wurde das komplette Genom aus einer gesamt-RNA Extraktion bestimmt. Das Genom weist die typische Genomeorganisation von Poloroviren auf. Die höchste Identität über die komplette Nukleotidsequenz zu allen beschriebenen Poloroviruspezies ist die zu *Pepper yellow leaf curl virus* (PYLCV) mit 49%. Die höchste Identität aller abgeleiteten Proteine auf Aminosäure-Ebene wurde mit 70% vom CP ebenfalls zu PYLCV gefunden. Für die neu beschriebene Poloroviruspezies schlagen wir den Namen *Sauropus yellowing virus* (SaYV) vor.

7

Etablierung von Gewebekulturen *Cherry leaf roll virus*-infizierter *Betula* spp. aus Nordfinland

*Juliane Langer*¹, *Susanne von Barga*¹, *Tuija Aronen*², *Risto Jalkanen*³ & *Carmen Büttner*¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland

²The Finnish Forest Research Institute, Finlandiantie 18, 58450 Punkaharju, Finland

³The Finnish Forest Research Institute, Eteläranta 55, 96301 Rovaniemi, Finland

Kontakt-E-Mail-Adresse: langeri@rz.hu-berlin.de

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) ist durch seinen großen gattungsübergreifenden Wirtskreis innerhalb der Laub-, Obst- und Ziergehölze und seiner weltweiten Verbreitung von ökonomischer und ökologischer Bedeutung. Im Hinblick auf die genetische Variabilität und Übertragungsmechanismen ist das Auftreten des CLRV in den forstwirtschaftlich bedeutenden Birkenbeständen Finnlands mit außergewöhnlich starker Symptomausprägung in Verbindung mit der Identifikation atypischer CLRV-Varianten besonders interessant. Mit dem Aufbau und der Vermehrung von Gewebekulturen ausgewählter CLRV-infizierter Birken (*Betula pendula* und *B. pubescens*) soll ein Modellsystem beispielsweise für Übertragungsversuche mit potentiellen Vektorspezies, Viruslokalisationsstudien und Transkriptomanalysen etabliert werden. Die Regenerationsraten aus ruhenden vegetativen Knospen CLRV-infizierter und CLRV-negativ getesteter Birken werden verglichen. Abhängig von der individuellen Virusverteilung in den CLRV-infizierten Birken wird eine unterschiedliche Anzahl von CLRV-infizierten Regeneranten erwartet.

8

Capsicum yellowing virus - ein neues Tobamovirus isoliert aus Tabasco

Edgar Maiss

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

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

Viren aus dem Genus Tobamovirus weisen als Partikel eine hohe Stabilität auf und können z.B. in Tabakwaren als infektiöse Einheiten lange Zeit überdauern. Auch in einer Gewürzsauce wurde das *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) als infektiöses Tobamovirus nachgewiesen. Es sollte überprüft werden, ob in drei verschiedenen Tabasco-Saucen das PMMoV enthalten ist. Untersucht wurden Tabasco - Chilisauce, Tabasco - Green Jalapeno Chili Sauce und Tabasco - Chipotle Chili Sauce, wobei jeweils ca. 1 ml Sauce mit 7 ml 1 M Tris-Puffer (pH 7) versetzt wurde und die Suspension anschließend auf *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi-nc*. inokuliert wurde. Nach ca. 4-6 Tagen wurden einige wenige Lokalläsionen bei der Probe aus Tabasco - Green Jalapeno Chili Sauce beobachtet. Aus einer einzelnen Lokalläsion wurde ein Homogenat hergestellt und dieses auf *N. benthamiana* inokuliert. Nach ca. 5-7 Tagen wurden systemische Symptome, zunächst als Einrollen der jüngeren Blätter später als komplette Vergilbung, beobachtet. Aus den systemisch infizierten *N.benthamiana* Pflanzen wurden Gesamtnukleinsäuren extrahiert und in RT-PCRs mit Tobamovirus-spezifischen Oligonukleotiden Fragmente erzeugt. Erste Sequenzanalysen zeigten Ähnlichkeiten zum *Bell pepper mottle virus* (BPMV). Anhand der BPMV Sequenz wurden Oligonukleotide hergestellt, die letztlich eine komplette Amplifikation des Genoms und die Erzeugung eines Volllängenkons ermöglichten. Inokulationen mit einem Volllängenkons führten zur systemischen Infektion von *N.benthamiana* mit den bereits oben beschriebenen Symptomen. Das Genom des Virus umfasst 6404 Basen und hat die typische Organisation eines Tobamovirus. Sequenzvergleiche zeigten, dass zu den bislang taxonomisch eingeordneten Tobamoviren mit ca. 84% die größte Übereinstimmung auf Nukleotidebene zum BPMV besteht. Aufgrund der Kriterien zur Beschreibung von Tobamoviren handelt es sich bei dem aus Tabasco isolierten Virus aber um eine neue Tobamospezies. Die mechanische Inokulation des aus dem Volllängenkons hervorgegangenen Virus auf *Capsicum annuum* ('Jalapeno NuMex Pinata') führte zur Ausbildung von Vergilbungen, so dass als vorläufiger Virusname *Capsicum yellowing virus* vorgeschlagen wird. Für die endgültige Namensgebung müssen allerdings noch die Symptome auf weiteren Paprikasorten verifiziert werden.

9

Primerdesign für den Luminex xTAG-Nachweis von verschiedenen Tospoviren

Niklas Bald & Edgar Maiss

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

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

Ein Detektionsverfahren für verschiedene Tospoviren wird entwickelt, das die Luminex xTAG® Technologie nutzt. Ein Vorteil dieser Technologie ist die Möglichkeit zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Pathogene. In zwei Amplifikationsschritten wird virale RNA in DNA umgeschrieben und vervielfältigt. Der erste Schritt (*preamplification*) nutzt unspezifische Primer und dient der Anreicherung von Ziel-DNA. Beim zweiten Schritt (*target specific primer extension*, TSPE) wird biotinyliertes dCTP in die DNA eingebaut und es werden spezielle Primer benutzt, die an ihrem 5'-Ende einen Tag aus 24 Nukleotiden tragen. Über diesen Tag kann die DNA an MagPlex-TAG™ Mikrokugeln gebunden werden, die einen komplementären Anti-Tag auf ihrer Oberfläche besitzen. Es gibt eine Auswahl von Mikrokugeln, die jeweils eine bestimmte Färbung und einen festgelegten Anti-Tag vorweisen. Zu den Reaktionsansätzen wird das Reporter-Protein Streptavidin-R-Phycoerythrin dazugegeben, welches an integriertes Biotin bindet. Die Analyse läuft ähnlich einer Durchflusszytometrie ab: Die Mikrokugeln werden einzeln durch eine enge Kapillare gepumpt, in der ein roter Laser den Farbstoff in den Kugeln und ein grüner das Reporter-Protein anregt, woraufhin beide Stoffe fluoreszieren. Fallen die beiden Fluoreszenzen zusammen, wurde ein Virus erfolgreich nachgewiesen.

Für die Präamplifikation wurde ein Primerpaar erstellt, das die Transkription und Vervielfältigung von RNA möglichst vieler Tospoviren ermöglicht. Für die anschließende TSPE-Reaktion wurde ebenfalls ein Primerpaar erzeugt, das den Nachweis möglichst vieler Tospoviren erlaubt. Des Weiteren wurden fünf spezifische Primerpaare designt, die eine Detektion und Unterscheidung der fünf Tospoviren TSWV, INSV, WSMoV, CaCV und IYSV zulassen. Nach einem ersten erfolgreichen Test werden den Primern Tags für den Luminex xTAG-Nachweis zugeordnet.

Diese Arbeit ist Teil eines Projekts zur Entwicklung von Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Pflanzenpathogene und wird vom EU Interreg Programm Gezonde Kas finanziert.

10

Dispensable and exchangeable domains of the RNA 2-encoded 2A^{HP} protein of Arabis mosaic nepovirus

*Shaheen Nourinejad Zarghani*¹, *Laurence Dupuis-Maguiraga*², *Alexandra Bassler*³ & *Thierry Wetzel*³

¹Department of Plant Entomology and Pathology, College of Aburayhan, University of Tehran, Tehran, Iran

²CEA, Division of Immuno-Virologie, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies, Fontenay-aux-Roses, France

³RLP Agrosience, AlPlanta, Breitenweg 71, 67435 Neustadt, Germany

Kontakt-E-Mail-Adresse: thierry.wetzel@agrosience.rlp.de

The N-terminal domains of the RNA 2-encoded 2A^{HP} proteins of the arabis mosaic (ArMV) and grapevine fanleaf (GFLV) nepoviruses were shown to be highly variable, and a hotspot for intra- and inter-species recombination events. Phylogenetic analyses based on the N-terminal domain of 2A^{HP} showed that ArMV isolates clustered within the different GFLV isolates clusters. In contrast, clustering was species-specific when the core and C-terminal domains of 2A^{HP}, or the 2A^{HP} protein were considered. Chimeric ArMV-NW clones, in which the N-terminal domain of 2A^{HP} or the 2A^{HP} of GFLV isolates replaced the corresponding domains of ArMV, retained their infectivity, showing that the 2A^{HP} proteins of ArMV-NW or GFLV were exchangeable in the ArMV-NW clones. Furthermore, the N-terminal domain of the ArMV-NW 2A^{HP}

protein was dispensable for the infectivity of the ArMV-NW clones in *Chenopodium quinoa*, showing that the functional domains of the protein were located in the core and/or C-terminal domains.

11

Unravelling the role of repair and recombination pathway components for geminivirus replication in *Arabidopsis thaliana*

Kathrin Richter & Holger Jeske

Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Abteilung Molekularbiologie u. Virologie der Pflanzen, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart; Deutschland

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

Geminiviruses consist of one or two circular single-stranded (ss) DNA genome components (DNA A and DNA B) of about 2.5-3 kb infecting important crop plants worldwide. Their multiplication relies on host DNA polymerases and DNA-modifying enzymes. The first step of viral amplification is complementary strand replication (CSR) to convert circular ssDNA to double-stranded (ds) DNA. The resulting circular dsDNA is organized into nucleosomal minichromosomes with covalently closed circular (ccc) DNA molecules which are templates for transcription and further DNA replication via rolling circle replication (RCR) and recombination-dependent replication (RDR). We suggest that geminiviruses utilize the host's DNA damage tolerance, repair and recombination pathways for their replication. Especially somatic homologous recombination pathway enzymes and translesion synthesis (TLS) polymerases, part of the error-prone DNA damage tolerance pathway, are promising candidates for RDR or CSR, respectively. We tested several T-DNA insertion knock-out lines of *Arabidopsis thaliana* lacking single or several components of those pathways and compared the infection process of *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) or *Cleome leaf crumple virus* (CLCrV) with wildtype plants. Using 1D and 2D gel systems, virus replicative intermediates were detected unravelling the role of those host pathways during virus amplification.

12

Erstellung eines infektiösen Vollängenklons des Cucumber green mottle mosaic virus

Kaja Schieck & Edgar Maiss

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

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

Gurkenpflanzen (*Cucumis sativus*) können unter natürlichen Bedingungen mit verschiedenen Viren, z.B. dem *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) und dem *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) infiziert werden. Für spätere Untersuchungen des CMV, CVYV und CGMMV in Mischinfektionen sollte zunächst überprüft werden, ob mit einem Vollängenklon des CGMMV in Verbindung mit einer Agroinokulation eine erfolgreiche Infektion von *C. sativus* möglich ist. Es wurde ein Stamm des CGMMV (DSMZ, PV0375) verwendet, um mit Hilfe der isothermalen *In vitro* Rekombinationstechnik „Gibson Assembly“ einen infektiösen Vollängenklon herzustellen. CGMMV (Genus *Tobamovirus*, Familie *Virgaviridae*) formt 300 bis 310 nm lange starre Stäbchen, die eine einzelsträngige (+)RNA von ca. 6,4 kbp enthalten. Eine Infektion mit dem CGMMV verursacht kleine unregelmäßig geformte Blätter mit blasig aufgetriebenen Bereichen, sowie leichte Scheckungen an älteren Blättern und Früchten. CGMMV wird mechanisch oder durch Käfer, Boden, Samen und Pfropfung übertragen. Das Virus ist in seinem Wirtsspektrum auf *Cucurbitaceae* begrenzt. Gesamt-RNA aus virusinfizierten Gurkenpflanzen diente als Ausgangsmaterial für RT-PCRs. Es wurden zwei PCR Fragmente von ca. 3,2 kbp erzeugt und mittels „Gibson Assembly“ in einem binären Vektor unter der Kontrolle des 35S-Promoters des *Cauliflower mosaic virus* in einem Schritt zusammengefügt. Mittels *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 erfolgte eine Transformation von 14 Tage alten Gurkenpflanzen (‘Delikateß’) durch Inokulation der Bakteriensuspension in die Unterseite beider Keimblätter. 21 Tage nach der Inokulation zeigten sechs von sieben inokulierten Pflanzen typische CGMMV-Symptome. Damit konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Agroinfektion von *C. sativus* mit CGMMV möglich und dieses System auch für die Erstellung von infektiösen Klonen des CMV und CVYV geeignet ist.

13

Pea yellow stunt virus: Auf dem Wege zur Rekonstitution eines infektiösen Virus mit Hilfe klonierter Genomkomponenten

Lisa Schlesener¹, Petra Lüddecke¹, Ioana Grigoras², Heinrich Josef Vetten¹, Heiko Ziebell¹ & Bruno Gronenborn³

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Deutschland

²University of Évry-Val-d'Essonne, Institut of Systems and Synthetic Biology, 5 rue Henri Desbrières, 91030 Evry Cedex, France

³Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex, France

Kontakt-E-Mail-Adresse: lschlesener@tu-bs.de

Das *Pea yellow stunt virus* (PYSV) gehört zu den Nanoviren und besitzt ein multipartites ssDNA-Genom mit 8 Komponenten. Dieses Virus wurde erstmals 2010 in einer aus Österreich stammenden Erbsen-Probe gefunden. Es wird durch Blattläuse übertragen und ruft auf infizierten Erbsen Chlorosen der Blätter und Wachstumsdepression bis zum Absterben hervor.

Ziel des Projekts ist die Herstellung infektiöser Klone des PYSV. Die Herstellung von infektiösen Klonen ist besonders bei den nicht-mechanisch übertragbaren Nanoviren hilfreich, um einen Stamm jederzeit reaktivieren zu können. Desweiteren können Informationen über die Funktion einzelner DNA-Fragmente über reverse Genetik erhalten werden. Dabei wird für die Agroinokulation nur ein Teil der DNAs verwendet. Auftretende Unterschiede zur Infektion mit allen Komponenten werden analysiert und so können Rückschlüsse auf die Funktion der fehlenden Komponente gezogen werden. Bisher konnten alle Nanovirus-DNAs konnten als vollständige Fragmente in Plasmide kloniert und in *E. coli* vermehrt werden. Interessanterweise wurden dabei durch Sequenzierung verschiedene Varianten der DNA-U2 gefunden, deren Bedeutung noch unklar ist. Für die Überführung in Agrobakterien ist eine Dimerisierung der Fragmente notwendig, die zurzeit bearbeitet wird.

14

The analysis of the complete genome content of members belonging to the *Acholeplasmataceae* supporting an early split of the genera *Acholeplasma* and *Candidatus Phytoplasma*

*Christin Siewert*¹, *Michael Kube*¹, *Alexander M. Migdoll*², *Sabine Holz*¹, *Bojan Duduk*³, *Ralf Rabus*⁴, *Erich Seemüller*⁵, *Jelena Mitrovic*³, *Richard Reinhardt*⁶ & *Carmen Büttner*¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Phytomedicine, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Germany

²National Center for Tumor Diseases (NCT) Heidelberg, INF 460, 69120 Heidelberg, Germany

³Institute of Pesticides and Environmental Protection, Banatska 31b, 11080 Belgrade, Serbia

⁴Institute for Chemistry and Biology of the Marine Environment (ICBM), University of Oldenburg, Carl-von-Ossietzky Str. 9-11, 26111 Oldenburg, Germany

⁵Julius Kühn Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Germany

⁶Max Planck Genome Centre Cologne, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, Germany

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

The family *Acholeplasmataceae* comprises the genera *Acholeplasma* and '*Candidatus Phytoplasma*'. *Acholeplasmas* are characterized as saprophytes. Contrary, phytoplasmas are pathogens associated to several hundreds of plant diseases. They depend on their spread on insect vectors and are obligate parasites of the sieve cells of the plant phloem.

Fully sequencing of the plant-derived *Acholeplasma brassicae* strain O502 and *A. palmae* strain J233 resulted in determination of circular chromosomes with 1,9 Mb and 1,6 Mb in size, a number of coding sequences number with 1,690 and 1,439, and a G + C content of 36% and 29%, respectively.

The functional analysis of these both species and the recently published genomes of *A. laidlawii*, '*Ca. P. asteris*' strains, '*Ca. P. australiense*' and '*Ca. P. mali*' highlights a limited shared basic genetic repertoire of *acholeplasmas* and *phytoplasmas*. *Acholeplasma* genomes exhibit a low number of re-arrangements, duplication and integration events. Rare exceptions are for instance the unusual duplication of *rRNA*-operons in *A. brassicae*. In comparison to phytoplasmas, *acholeplasmas* encode the cell division protein FtsZ, a wide variety of ABC transporters, the F₀F₁ ATP synthase, the *Rnf*-complex, SecG of the Sec-dependent secretion system, a rich equipment for carbohydrate, fatty acid, isoprenoid and partial amino acid metabolism. Important metabolic proteins of phytoplasmas such as the malate dehydrogenase SfcA, several transporters, proteins involved in host-interaction and virulence-associated effectors were not identified in *acholeplasmas* indicating an early evolutionary split of both genera.

15

Production of monoclonal antibodies to little cherry virus 2 (LChV-2)

Justine Brodard & *Jean-Sébastien Reynard*

Agroscope, Route de Duillier 50, 1260 Nyon, Switzerland

Kontakt-E-Mail-Adresse: jean-sebastien.reynard@agroscope.admin.ch

Little cherry disease is a complex viral disease of cherry. It has been established that this disease is associated with two different viruses in the family *Closteroviridae* LChV-1 and LChV-2. Infected cherry trees produce small, bitter cherries, that are unmarketable. Here we described the development of four monoclonal antibodies against LChV-2 and their evaluation in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western immunoblot analysis. We used *E. coli* expressed recombinant capsid protein of LChV-2 to produce monoclonal antibodies (Mabs). To detect LChV-2 in infected cherry leaves, we developed a DAS-ELISA procedure combining the different Mabs with a rabbit antiserum raised against viral particles of LChV-2. The high signal to noise ratio obtained in DAS-ELISA underline the potential of the new developed monoclonal antibodies for diagnostic purpose. On-going comparative studies with different LChV-2 strains and field surveys should further characterize their specificity and performance. ELISA, as an economical and reliable method to process numerous samples, may be useful for large-scale surveys and certification schemes. Thus, the developed Mabs complete the diagnostic reagents for fast, cost-effective and specific detection of little cherry virus 2.

16

Biodiversität persistenter Pflanzenviren

Till Lesker & *Edgar Maiss*

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

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

Pflanzenviren sind in der Regel als krankheitsauslösende Faktoren in vielen Wild- und Kulturpflanzen bekannt. Dennoch gibt es eine Vielzahl an Viren die mit ihrem Wirt über Generationen hinweg in einer Art Koexistenz zusammen leben und offenbar keine Symptome und Erkrankungen hervorrufen. Zu diesen persistierenden Viren gehören Vertreter aus den Familien *Partitiviridae*, *Endornaviridae* und aus der neu vorgeschlagenen Familie *Amalgaviridae*.

Diese Viren treten insbesondere als "Beifang" beim Deep-Sequencing Screening auf. Eine durchgeführte dsRNA Sequenzierung an Klee und Dill deckte ein breites Spektrum an persistierenden Viren auf. Weitere aufkommende Analysen dieser Art stellen die Taxonomie vor die Herausforderung diese Informationen zu nutzen und gleichzeitig einer Inflation an neuen Viren vorzubeugen. Insbesondere für die durch Zellteilung und Keimzellen übertragbaren persistierenden Viren müssen neue Konzepte erarbeitet werden.