



**42. Jahrestreffens des DPG-Arbeitskreises
"Viruskrankheiten der Pflanzen"
am 11. + 12. März 2010
Göttingen**

**PROGRAMM DES 42. JAHRESTREFFENS DES DPG-ARBEITSKREISES
"VIRUSKRANKHEITEN DER PFLANZEN"
AM 11. + 12. MÄRZ 2010**

Zentrales Hörsaalgebäude der Universität Göttingen (ZHG), Raum 001, Platz der Göttinger Sieben

Donnerstag, 11. März 2010	
13:00 – 13:20	Anreise und Tagungsanmeldung im Zentralen Hörsaalgebäude der Universität Göttingen (ZHG), Platz der Göttinger Sieben
13:20 – 13:30	Stephan Winter & Mark Varrelmann: Begrüßung & Organisatorische Bekanntmachungen
13:30 – 15:00	Sektion I: Moderation Stephan Winter
13:30 – 14:00	Einführungsvortrag Bruno Gronenborn, CNRS Variabilität und Evolutionsgeschwindigkeit von Pflanzenviren mit Einzelstrang-DNS Genom <i>Grigoras, Ioana; Timchenko, Tatiana; Grande-Pérez, Ana; Katul, Lina; Vetten, Heinrich-Josef; Gronenborn, Bruno</i>
14:00 – 14:20	Begomoviruses infecting bolivian weeds <i>Wyant, Patrícia; Gotthardt, Diether; Schäfer, Benjamin; Krenz, Björn; Jeske, Holger</i>
14:20 – 14:40	Erster Nachweis eines Nanovirus für Deutschland und Zentraleuropa <i>Vetten, Heinrich Josef; Grigoras, Ioana; Gronenborn, Bruno</i>
14:40 – 15:00	Neuere Isolate des Carnation Italian ringspot virus ähneln typischen Tombusviren und besitzen nicht die abweichenden molekularen und zytopathologischen Eigenschaften des Original-Isolates, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Rekombinante handelt <i>Koenig, Renate; Lesemann, Dietrich-Eckhardt; Pfeilstetter, Ernst; Rabenstein, Frank; Vetten, Heinrich-Joseph</i>
15:00 – 15:30	KAFFEE-/TEEPAUSE (Poster Session)
15:30 – 18:00	Sektion II: Moderation Wulf Menzel
15:30 – 15:40	In memoriam Prof. Dr. Dr. hc. mult. Dieter Spaar <i>Rabenstein, Frank</i>
15:40 – 16:00	Cassava brown streak viruses causing brown streak disease of cassava in East Africa <i>Winter, Stephan; Koerbler, Marianne; Stein, Beate; Pietruszka, Agnes; Butgereitt, Anja</i>
16:00 – 16:20	Sequenzstabilität der 3´ nicht-kodierenden Regionen verschiedener Cherry leaf roll virus-Isolate <i>Langer, Juliane; Robel, Jenny; von Bargen, Susanne; Büttner, Carmen</i>
16:20 – 16:40	Quantitativer Nachweis der Getreideviren BYDV-PAV und WDV mit Realtime-PCR <i>Drechsler, Nadine; Habekuß, Antje; Thieme, Thomas; Schubert, Jörg</i>
16:40 – 17:00	Quantitative detection of Potato virus Y with IC-RT-qPCR <i>Hühnlein, Anja; Schubert, Jörg; Thieme, Thomas</i>
17:00 – 17:20	Optimized approaches for the sequence determination of novel dsRNA templates <i>Darissa, Omar; Willingmann, Peter; Adam, Günter</i>
17:20 – 18:00	Praxis-Sitzung - Diskussion von Praxisproblemen
	<ul style="list-style-type: none"> • Samenübertragbarkeit von PSTVd und Wirksamkeit von Saatgutbehandlungen <i>Menzel, Wulf; Winter, Stephan</i> • Viren in Dahlien <i>Adam, Günter</i> • Identifizierung und Charakterisierung eines unbekanntes Potyvirus in Melisse (Melissa officinalis) – erste Ergebnisse <i>Rabenstein, F.; Marthe, F.; Menzel, W., Vetten, H.J., Winter, S.</i>
ab 19:00	Gemütliches Beisammensein im Schwarzen Bären

Freitag, 12. März 2010	
09:00 – 10:30	Sektion III: Moderation Edgar Maiss
09:00 – 09:30	Einführungsvortrag NN
09:30 – 09:50	Quantification and localization of Watermelon chlorotic stunt virus and Tomato yellow leaf curl virus in differently transmitting populations of the whitefly vector Bemisia tabaci <i>Kollenberg, Mario; Götz, Monika; Winter, Stephan</i>
09:50 – 10:10	Expression dynamics and ultrastructural localization of epitope-tagged Abutilon mosaic virus nuclear shuttle and movement proteins in Nicotiana benthamiana cells <i>Kleinow, Tatjana; Tanwir, Fariha; Kocher, Cornelia; Krenz, Björn; Wege, Christina; Jeske, Holger</i>
10:10 – 10:30	Optimierung und Anwendung eines Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation-Systems zur Detektion von Plum pox potyviralen Protein-Interaktionen in Nicotiana benthamiana <i>Scholz, Eva; Maiss, Edgar</i>
10:30 – 11:00	KAFFEE-/TEEPAUSE (Poster Session)
11:00 – 12:40	Sektion IV: Moderation Mark Varrelmann
11:00 – 11:20	Physikalische Interaktion zwischen dem Pathogenitätsfaktor P5 des Beet necrotic yellow vein virus und einem F-box Protein aus Zuckerrübe, welches an der Auslösung einer hypersensitiven Reaktion beteiligt ist <i>Thiel, Heike; Varrelmann, Mark</i>
11:20 – 11:40	Beladung von Polymyxa betae mit verschiedenen Isolaten des Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) und Analyse der resistenzüberwindenden Eigenschaften <i>Bornemann, Kathrin; Varrelmann, Mark</i>
11:40 – 12:00	Analyse der autoproteolytischen Aktivität des Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) Silencing Suppressors P <i>Weinheimer, Isabel; Boonrod, KaJohn; Moser, Mirko; Zwiebel, Michele; Füllgrabe, Marc; Krczal, Gabi; Wassenegger, Michael</i>
12:00 – 12:20	Symptom Determinants on the Arabis mosaic nepovirus genomic RNA <i>Dupuis, Laurence; Himber, Christophe; Dunoyer, Patrice; Bassler, Alexandra; Keller, Mario; Wetzler, Thierry</i>
12:20 – 12:40	Tobacco mosaic virus derivatives: on the route to biosensing applications <i>Eber, Fabian; Geiger, Fania; Müller, Anna; Azucena, Carlos; Petershans, André; Gliemann, Hartmut; Eiben, Sabine; Jeske, Holger; Wege, Christina</i>
anschließend	Tagungsende

Poster

1 Nachweis von Cherry leaf roll virus (CLRV) in Einzelinsekten verschiedener Gruppen

Schuster, A., Bandte, M., von Barga, S., Büttner, C.

2 Genomorganisation der RNA des Cherry leaf roll virus (CLRV)

von Barga, S., Langer, J., Rumbou, A., Gentkow, J., Büttner, C.

3 Wiederherstellung der Infektiosität von 3'-Endmutanten des Carrot mottle mimic virus durch in vivo Reparatur

Buhse, Frederike; Menzel, Wulf; Maiss, Edgar

4 Charakterisierung eines neuen Virus aus Erbse

Menzel, W., Winter, S., Vetten, H.-J.

5 Faba bean necrotic stunt virus: Reconstitution and variability of a nanovirus

Grigoras, I., Timchenko, T., Grande-Pérez, A., Katul, L., Vetten, H.-J., Gronenborn, B.

Variabilität und Evolutionsgeschwindigkeit von Pflanzenviren mit Einzelstrang-DNS Genom

Gronenborn, B.¹, Grigoras, I.¹, Timchenko, T.¹, Grande-Pérez, A.², Katul, L.³, Vetten, H.-J.³

¹Institut des Sciences du Végétal, CNRS, 91198 Gif sur Yvette, France

²Universidad de Málaga, Area de Genética, 29071 Málaga, España

³Julius Kühn Institute (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogen-diagnostik, 38104 Braunschweig, Deutschland

Pflanzenviren mit Einzelstrang-DNS-Genom sind in zwei Familien unterteilt: Geminiviridae mit den Gattungen Mastrevirus, Curtovirus, Topocuvirus und Begomovirus, sowie Nanoviridae mit den Gattungen Babuvirus und Nanovirus. In den letzten Jahren sind die Genomsequenzen zahlreicher Geminiviren bekannt geworden, die es erlaubten, die genetische Variabilität ausgewählter Virusspezies oder -gruppen zu analysieren und deren Evolutionsgeschwindigkeit zu bestimmen. Vergleichbar umfassende Variabilitätsstudien an Nanoviren waren bislang nicht oder nur begrenzt möglich. Im Rahmen der molekulargenetischen Analyse des Genoms des Faba bean necrotic stunt virus (FBNSV), eines noch wenig bekannten, Leguminosen infizierenden Nanovirus aus Äthiopien, haben wir mehr als 414.000 Nukleotide Sequenzinformation erhalten. Diese Daten dienen als Grundlage zur Bestimmung der genetischen Variabilität des FBNSV sowie der Geschwindigkeit seiner Evolution für die Dauer von 29 Monaten unter experimentellen Bedingungen. Wir haben eine sehr hohe Evolutionsrate von 1.78×10^{-3} Änderungen per Nukleotidposition pro Jahr gemessen, vergleichbar mit den höchsten bekannten Evolutionsraten aller Viren. Desweiteren haben wir die genetische Entwicklung des Mastrevirus *Digitaria streak virus* (DSV) über einen Zeitraum von 21 Jahren in derselben, immer wieder durch Ausläufer vermehrten Fingergraspflanze *Digitaria setigera* verfolgt. In diesem Fall betrug die Evolutionsrate $2,11 \times 10^{-4}$ Änderungen per Nukleotidposition pro Jahr, und war somit etwa eine Größenordnung geringer als die des FBNSV. Die Evolutionsraten beider Viren werden mit denen anderer Einzelstrang-DNS-Viren verglichen und im Zusammenhang mit Daten zur Evolution von Pflanzenviren im Allgemeinen diskutiert.

Begomoviruses infecting bolivian weeds

Wyant, P.¹, Gotthardt, D.¹, Schäfer, B.¹, Krenz, B.¹, Jeske, H.¹

¹Institute of Biology, Department of Molecular Biology and Plant Virology, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Germany.

Begomovirus is the largest genus within the family Geminiviridae, which combines economically important plant DNA viruses infecting a broad range of plant species and causing devastating crop diseases mainly in subtropical and tropical countries. Besides cultivated plants, many weeds act as virus reservoirs. In this work, eight begomovirus isolates from Bolivian weeds were examined using rolling circle amplification (RCA), restriction fragment-length polymorphism (RFLP) and sequencing of the complete genomes. The viruses were classified by phylogenetic analysis as typical bipartite New World begomoviruses including three new virus species, Sida Bolivia-1 begomovirus, Sida Bolivia-2 begomovirus, Abutilon Brazil begomovirus (SiBo1BV, SiBo2BV; AbBrBV), four new strains of Sida micrantha mosaic virus (SimMV), and the complete sequence of a new strain of the formerly only partially sequenced Soybean blistering mosaic virus (SbBMV).

Erster Nachweis eines Nanovirus für Deutschland und Zentraleuropa

Vetten, H.- J.¹, Grigoras, I.², Gronenborn, B.²

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

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

Nanoviren wie das Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) und faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) haben ein zirkuläres ssDNA-Genom, werden durch bestimmte Blattlausarten zirkulativ-persistent auf Leguminosen übertragen und sind in Nordafrika und im Nahen Osten z.B. an Fababohne, Kichererbse und Linse weit verbreitet. Über ihr Auftreten (FBNYV) in Europa liegen nur sporadische Befunde von Mallorca und Murcia in Spanien vor. Aus zwei von 23 Blattproben von Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*), die im Juli 2009 in einem Feld in der Nähe von Aschersleben (Sachsen-Anhalt) wegen virusähnlicher Symptome auffielen, konnte durch Blattlausübertragung (*Acyrtosiphon pisum*) ein Krankheitserreger isoliert werden, der auffällige Vergilbungs- und Stauche-symptome an Erbsen- und Fababohnensämlingen verursachte. Nachdem eine Vielzahl von Versuchen zum Nachweis eines Luteovirus oder anderer RNA-Viren gescheitert war, begannen wir das Vorliegen eines Nanovirus in Betracht zu ziehen. Bei Verwendung eines Antiserums gegen FBNYV im DAS-ELISA beobachteten wir schwache, aber eindeutig positive Reaktionen mit den beiden Erbsenisolaten. Letztere reagierten auch schwach bis stark im TAS-ELISA mit 6 der 26 monoklonalen Antikörper (MAKs), die wir früher gegen FBNYV und FBNSV hergestellt hatten. Der Einsatz von „Rolling Circle Amplification“ (RCA) an einem Gesamt-DNA-Extrakt aus symptomtragenden Blättern ergab eine starke, hochmolekulare DNA-Bande, die sich nach Behandlung mit der Endonuclease AatII fast vollständig in ein Produkt von ca. 1 kb umwandeln ließ. Klonierung und Sequenzierung dieser DNA lieferten eindeutige Hinweise für das Vorliegen einer zirkulären DNA von 1002 Nukleotiden, die als vollständige DNA-R-Komponente eines neuen Mitglieds der Gattung Nanovirus identifiziert wurde. Sie weist Nukleotidsequenzidentitäten von lediglich 73-79% mit den bisher bekannten Nanoviren auf. Dieser Befund und unsere serologischen Resultate belegen das natürliche Vorkommen eines neuen Nanovirus an Erbse.

Neuere Isolate des Carnation Italian ringspot virus ähneln typischen Tombusviren und besitzen nicht die abweichenden molekularen und zytopathologischen Eigenschaften des Original-Isolates, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Rekombinante handelt

Koenig, R.¹, Lesemann, D.-E.¹, Pfeilstetter, E.², Rabenstein, F.³, Vetten, H.-J.⁴

¹c/o JKI, EP, Messeweg 11, 38104 Braunschweig, ²JKI, AG, Messeweg 11, 38104 Braunschweig,

³JKI, EP, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, ⁴JKI, EP, Messeweg 11, 38104 Braunschweig

Neuere Isolate des Carnation Italian ringspot virus ähneln typischen Tombusviren und besitzen nicht die abweichenden molekularen und zytopathologischen Eigenschaften des Original-Isolates, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Rekombinante handelt R.

Koenig(1), D.-E. Lesemann(1), E. Pfeilstetter(1), F. Rabenstein(2) und H.-J. Vetten(1) (1) JKI Braunschweig, (2) JKI Quedlinburg Carnation Italian ringspot virus (CIRV) wurde 1970 von Hollings et al. als ein seltenes Pathogen in Nelken beschrieben, das auf Grund seiner morphologischen und serologischen Eigenschaften den Tombusviren zugeordnet wurde. Spätere Sequenzanalysen bestätigten diese Zuordnung, allerdings fiel auf, dass sich das 5' Ende seines ORF 1 sowohl in seiner Größe als auch in seiner Basenzusammensetzung stark von der entsprechenden Genomregion anderer Tombusviren unterschied und dass diese Eigenheit mit einem zytopathologischen Merkmal korrelierte. Tombusviren induzieren die Bildung von sog. multivesicular bodies (MVBs), in denen wahrscheinlich die Virusreplikation stattfindet und die sich normalerweise aus Peroxisomen entwickeln. Beim Original-Isolat des CIRV (CIRVcar) entstehen sie jedoch aus Mitochondrien. Weitere CIRV Isolate sind später aus einer Reihe sehr unterschiedlicher Wirtspflanzen sowie aus Wasserproben erhalten worden. Sequenzanalysen, die wir mit drei Herkünften des CIRV aus Süßkirschen, die das Symptombild des detrimental canker zeigten, sowie mit je einer Herkunft aus Schleierkraut, Spinat und einer Wasserprobe durchgeführt haben, ergaben in allen sechs Fällen ein ORF1-5' Ende, das große Ähnlichkeit mit der entsprechenden Genomregion anderer Tombusviren aufwies. Alle diese Isolate induzierten die Bildung von MVBs nicht aus Mitochondrien, sondern - wie typische Tombusviren - aus Peroxisomen. Ein ähnliches ORF1-5' Ende wie das CIRVcar und die Fähigkeit, MVBs aus Mitochondrien zu bilden, besitzt nur das ansonsten stark abweichende Pelargonium necrotic spot virus (PelNSV) (Heinze et al., 2004). CIRVcar ist möglicherweise eine natürliche Rekombinante, deren ORF1-5' Ende aus dem Genom eines PelNSV-ähnlichen Virus stammt. Das rekombinante CIRVcar ist anscheinend ökologisch wenig erfolgreich, da es nie wieder aus Nelken oder anderen Wirten isoliert wurde und nur mit Schwierigkeiten in Nelken zurück übertragen werden konnte, in denen es einige Zeit nach der Infektion oft nicht mehr nachweisbar war.

In memoriam Prof. Dr. Dr. hc. mult. Dieter Spaar

Rabenstein, Frank¹

¹Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Erwin-Baur-Str. 27 06484 Quedlinburg

Mit großer Trauer haben wir zur Kenntnis nehmen müssen, dass am 30. Januar 2010 im Alter von 77 Jahren nach langer, schwerer Krankheit unser geschätzter Kollege Prof. Dieter Spaar verstarb. Dieter Spaar, letzter Präsident der ehemaligen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, war als Agrarwissenschaftler und Buchautor weit über die Grenzen Deutschlands hinaus bekannt.

Cassava brown streak viruses causing brown streak disease of cassava in East Africa

Winter, S¹., Koerbler, M¹., Stein, B¹., Piertruszka, A¹., Butgereitt, A.¹

¹DSMZ AG Pflanzenviren, Braunschweig

Cassava brown streak virus (CBSV) isolates were analysed from cassava in the major cultivation regions of East Africa. The analysis of complete RNA genomes of seven isolates from Kenya, Tanzania, Mozambique, Uganda and Malawi revealed a common genome structure but clearly clustered in two distinct clades. The first, comprised isolates from Kenya, Uganda, Malawi, northwestern Tanzania and the CBSV previously described, shared between 87-95% identical nucleotide (nt) sequences, and the second included isolates from coastal regions of Mozambique and Tanzania, which shared only 70% nt sequence identities to isolates of the first clade. When the amino acid sequences of viral proteins were compared, identities as low as 47% (Ham1) and 59% (P1) between the two clades were determined. An antiserum obtained against the capsid protein (CP) of a clade-1 isolate identified a 43 kDa protein in clade-1 isolates and a 45 kDa protein in those of clade 2. Several cassava cultivars were susceptible to isolates of clade 2 but resistant to those of clade 1. The differences observed in both biological behaviour and in genomic and protein sequences indicate that the cassava brown streak disease in East Africa is caused by at least two distinct virus species.

Sequenzstabilität der 3' nicht-kodierenden Regionen verschiedener Cherry leaf roll virus-Isolate

Langer, J.¹, Robel, J.¹, von Barga, S.¹, Büttner, C.¹

¹HU-Berlin/Fachgebiet Phytomedizin/Königin-Luise-Str.19/14195 Berlin/Deutschland

Das Nepovirus Cherry leaf roll virus (CLRV) der Familie Comoviridae weist ein bipartites, einzelsträngiges (+)RNA-Genom auf. RNA1 und RNA2 eines CLRV-Isolats (E395, Rhabarber) konnten vollständig sequenziert werden und sind 7922 nt bzw. 6365 nt lang. Aufgrund der sehr langen RNA2, die beim CLRV mehr als $\frac{3}{4}$ der Länge der RNA1 aufweist und die besonders langen 3' NCRs beider RNAs (1538-1602 nt), die etwa 20% des Gesamtgenoms ausmachen, wird das CLRV der Nepovirus Subgruppe C zugeordnet. Bei Nepoviren weisen die 3' NTRs einen besonders hohen Grad der Sequenzkonservierung innerhalb eines Isolates auf. Beim CLRV liegt die Sequenzidentität der RNA1 und RNA2-3' NCRs innerhalb eines Isolates fast ausschließlich bei 94.1-99.8 %. Die 3' Identität ist offenbar einem Selektionsdruck unterlegen, um funktionelle Elemente, die zum Erhalt der Replikationsfähigkeit der RNA-Populationen essentiell sind, durch Rekombinationsmechanismen zwischen RNA1 und RNA2 zu konservieren. Möglicherweise ist dieser Prozess aber nicht so zwingend wie allgemein angenommen wurde. Ein Himbeer-Isolat weist im Gegensatz zu allen anderen bislang untersuchten CLRV-Isolaten Sequenzidentitäten in den 3' NCRs von nur 73,4 % auf. Solche Variabilität ist sonst zwischen verschiedenen CLRV-Isolaten vorhanden. Sequenzanalysen sollen Hinweise darauf geben, ob das Himbeer-Isolat innerhalb verschiedener RNA-Populationen die gleiche Sequenzstabilität der nicht-identischen 3' NCRs zeigt wie CLRV-Isolate mit identischen 3' NCRs.

Quantitativer Nachweis der Getreideviren BYDV-PAV und WDV mit Realtime-PCR

Drechsler, N.¹, Habekuß, A.², Thieme, T.¹, Schubert, J.³

¹BTL Bio-Test Labor Sagerheide GmbH, Birkenallee 19, 18184 Sagerheide

²JKI, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Erwin-Baur-Str. 27, 06448 Quedlinburg

³JKI, Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06448 Quedlinburg

Zu den bedeutendsten Getreideviren Deutschlands gehören das Barley yellow dwarf virus (BYDV, Luteoviridae) und das Wheat dwarf virus (WDV, Geminiviridae). Beide Viren rufen bei befallenem Getreide u.a. Zwergwuchs und Vergilbungen hervor und führen zu Ertragsminderung oder Absterben der Pflanze. BYDV wird von Blattlausarten übertragen, der in Deutschland vorherrschende Stamm PAV vor allem durch *Rhopalosiphum padi*. Das WDV wird durch die Zwergzikade *Psammotettix alienus* übertragen.

Mit quantitativer Realtime-PCR ist es möglich, die Viren sensitiv nachzuweisen und zu quantifizieren. Es wurden Assays entwickelt, die den Nachweis beider Viren auch in geringen Kopienzahlen erlauben und zur Quantifizierung in Pflanze und Vektor angewendet.

Quantitative detection of Potato virus Y with IC-RT-qPCR

Hühnlein, A.¹, Schubert, J.¹, Thieme, T.²

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

²BTL Biotest Labor Sagerheide, Birkenallee 19, 18184 Sagerheide

Potato virus Y (PVY) is for the potato growing industry worldwide one of the most important viruses causing high yield losses every year. *Myzus persicae* is among other aphid species the main vector for the distribution of PVY. In addition to the three main strains (PVYN, PVYO and PVYC) some recombinant forms can be found; amongst those, PVYNTN and PVYWilga are of special importance. In recent years PCR and qPCR assays have been developed to discriminate PVY isolates. In isolate-discriminating PCR assays often huge amplicons have to be generated. The particular enzymes needed to accomplish this task are often not affordable. qPCR assays on the other hand are as yet not able to distinguish PVY NTN and PVYWilga isolates, although these recombinant forms of PVY are of increasing importance in Europe and can often be found as mixed infections. For practical applications, a high throughput is also necessary. However, with conventional sample preparation methods like RNA-Extraction or immunocapture (IC) with microcentrifuge tubes only a limited number of samples can be handled. We have developed a new high-throughput IC-RT-qPCR assay that can discriminate PVYNTN and PVYWilga isolates with high specificity and that is low in cost.

Optimized approaches for the sequence determination of novel dsRNA templates

Darissa, O.¹, Willingmann, P.¹, Adam, G.¹

¹Fachbereich Biologie, Biozentrum Klein FLottbeck, Universität Hamburg

Double-stranded RNA (dsRNA) is in many cases the only available template for molecular studies of plant viruses. Examples include the Replicative Intermediate (RI) of RNA viruses and viruses with dsRNA genomes. We have optimized several PCR-based methods for the amplification and cloning of novel dsRNA templates. These methods are in most of the cases prerequisites for the sequence determination of unknown genomes. A novel mycovirus isolated from China with 5 unequally abundant genomic segments, served as a template for the molecular approaches investigated in this study. Clones obtained by the classical method random amplification (rPCR) with a single universal primer cover only parts of 3 of the 5 segments. We think that the failure of getting clones for the other two segments is due to their very low amounts in the extract. In a second approach, we have cloned purified dsRNA segments directly into a blunt end cut dsDNA plasmid using relatively high amounts of T4 DNA and T4 RNA ligases. In our hands, we did not get full length clones using this approach, however several sequences up to 800bp in length were obtained and constitute a basic material for other methods like primer walking or as probes for diagnosis. We have also obtained relatively long but not complete sequences by ligating a linker called PC3 to the 3' ends of the dsRNA segments followed by RT-PCR using a single primer complementary to part of the linker. When the linker ligation method was modified, full length clones representing the five genomic segments were obtained. The modifications of this method included: a new linker called PC3-T7loop, first described by Potgieter A.C. et al., 2009**, optimization of the linker ligation, and use of a new commercial reverse transcriptase called RevertAid Premium. RevertAid Premium is thermo stable up to 60°C and has no RNase H domain. The PC3-T7loop linker folds in a way that serves as a primer for the reverse transcriptase. This increases the chances for obtaining full length products since there is no floating primer in the RT reaction, which may anneal unspecifically and produce truncated products. We have employed the RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) method for the determination of the terminal sequences of one of the dsRNA segments and compared the results to those sequences obtained by the PC3-T7loop linker method. Since several of the terminal sequences obtained by the RACE method were truncated, we had to sequence more than 5 clones to obtain the complete terminal sequence of each segment, whereas the PC3-T7loop method delivered the exact sequence at once. **Journal of General Virology (2009), 90, 1423-1432.

Quantification and localization of Watermelon chlorotic stunt virus and Tomato yellow leaf curl virus in differently transmitting populations of the whitefly vector *Bemisia tabaci*

Kollenberg, M.¹, Götz, M.¹, Winter, S.¹

¹DSMZ Plant Virus Department, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, Germany

The whitefly *Bemisia tabaci* is a major pest of agriculture. It transmits begomoviruses in a persistent-circulative manner. Although a lot of efforts were made on the evaluation of the virus-whitefly-interactions the crucial determinants for virus translocation and transmission are still unknown.

In this study two populations of *Bemisia tabaci* biotype B were compared regarding their virus concentration and localization: *B. tabaci* 63 transmits Watermelon chlorotic stunt virus and Tomato yellow leaf curl virus with high rates (90%) and *B. tabaci* 95 transmits both viruses with very low rates (10%). In both populations the secondary endosymbionts were characterized to exclude the possibility that the presence or absence of one symbiont is the reason for the low transmission rates of *B. tabaci* 95.

Assumed barriers for the translocation of both viruses are the midgut and the primary salivary glands. Moreover virions can be degraded within the haemocoel. To identify factors responsible for the weak transmission rates of *B. tabaci* 95 virus loads of whole insects and of dissected midguts and primary salivary glands were quantified by real-time PCR. For the highly transmitting population *B. tabaci* 63 significantly higher concentrations of both viruses were observed than for the weakly transmitting population *B. tabaci* 95. Analysis of dissected midguts and primary salivary glands confirmed these results. Fluorescence in situ hybridization analysis revealed higher fluorescence signals in the midguts and primary salivary glands of *B. tabaci* 63.

The results indicate for the midgut of *B. tabaci* as a first barrier to virus translocation.

Expression dynamics and ultrastructural localization of epitope-tagged Abutilon mosaic virus nuclear shuttle and movement proteins in *Nicotiana benthamiana* cells

Kleinow, T.¹, Tanwir, F.², Kocher, C.¹, Krenz, B.¹, Wege, C.¹, Jeske, H.¹

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

²Universität Hohenheim/Institut für Genetik/ Allgemeine Virologie, Emil-Wolf-Str. 14

The geminivirus Abutilon mosaic virus (AbMV) encodes two proteins which are essential for viral spread within plants. The nuclear shuttle protein (NSP) transfers viral DNA between the nucleus and cytoplasm, whereas the movement protein (MP) facilitates transport between cells through plasmodesmata and long-distance via phloem. An inducible overexpression system for epitope-tagged NSP and MP in plants yielded unprecedented amounts of both proteins. Western blots revealed extensive posttranslational modification and truncation for MP, but not for NSP. Ultrastructural examination of *Nicotiana benthamiana* tissues showed characteristic nucleopathic alterations, including fibrillar rings, when epitope-tagged NSP and MP were simultaneously expressed in leaves locally infected with an AbMV DNA A in which the coat protein gene was replaced by a green fluorescent protein encoding gene. Immunogold labelling localized NSP in the nucleoplasm and in the fibrillar rings. MP appeared at the cell periphery, probably the plasma membrane, and plasmodesmata.

Optimierung und Anwendung eines Bimolekularen Fluoreszenzkomplementations-Systems zur Detektion von Plum pox potyviralen Protein-Interaktionen in *Nicotiana benthamiana*

Scholz, E.¹, Maiss, E.¹

¹Leibniz Universität Hannover, Inst. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover

Das Genom des Plum pox virus (PPV), einem Mitglied des Genus Potyvirus innerhalb der Familie der Potyviridae, besteht aus einer (+)ssRNA mit ca. 10 kb, auf der ein offenes Leseraster (ORF) lokalisiert ist. Dieses wird in ein ca. 360 kDa großes Polyprotein translatiert, welches anschließend von drei viruseigenen Proteasen in zehn funktionelle Proteine prozessiert wird. Interaktionen zwischen diesen Proteinen spielen eine wichtige Rolle während des viralen Infektionszyklusses. Zur Detektion von Protein-Interaktionen sind verschiedene Methoden, wie z.B. das "Yeast-2-Hybrid"-System, bekannt. Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) ermöglicht, im Gegensatz zu anderen Systemen, eine direkte Visualisierung von Protein-Interaktionen in lebenden Zellen. Diese Methode basiert auf der Beobachtung, dass N- und C-terminale nicht-fluoreszierende Teilfragmente eines Fluorophors zu einem funktionellen Fluorophor rekonstituieren, wenn sie in direkte räumliche Nähe gebracht werden, z.B. durch die Interaktion fusionierter Proteine.

Mit dem Yeast-2-Hybrid-System wurden in der Vergangenheit bereits Protein-Interaktionskarten für verschiedene Potyviren erstellt, die jedoch eine große Diversität untereinander zeigen. Mittels BiFC soll für PPV eine Protein-Interaktionskarte erstellt werden. Ein auf einem monomeren rot fluoreszierenden Protein, mRFP1-Q66T [1] basierendes System wurde für die Interaktionsstudien optimiert. Zu diesem Zweck wurden der N-terminale (AS 1-168) und der C-terminale (AS 169-225) Bereich des mRFP mit Proteinen des PPV fusioniert. Zur Entwicklung geeigneter Kontrollen wurden zudem Proteine des Tobacco mosaic virus, Capsicum chlorosis virus und des Tomato yellow leaf curl Thailand virus herangezogen, von denen bekannt ist, dass sie miteinander interagieren bzw. nicht interagieren. Im Gegensatz zum Originalsystem werden die Fusionspartner durch eine 7 Aminosäuren umfassende Linkersequenz voneinander getrennt, die für maximale Flexibilität der fusionierten Proteine sorgen soll. Die für diese Fusionsproteine kodierenden Kassetten wurden für Agro-Inokulation von *Nicotiana benthamiana* in einen binären Vektor integriert. Fusionsproteine (z.B. CP-mRFPN plus CP-mRFPC) wurden in Blättern von *N. benthamiana* transient co-exprimiert und mittels Konfokaler Laserscan Mikroskopie auf ihre Interaktion hin untersucht.

So konnte eine vorläufige Interaktionskarte für die Proteine des PPV erstellt werden, die sich nochmals von bisher erstellten Karten für andere Potyviren unterscheidet. Es konnten zunächst für alle untersuchten Potyviren beobachtete Interaktionen, wie z.B. die Selbst-Interaktion des Hüllproteins (CP) und des Kerneinschlußkörpers α (NIa), auch im BiFC für PPV bestätigt werden. Zudem konnten aber auch Interaktionen beobachtet werden, die nur für einen Teil der mittels Yeast-2-Hybrid untersuchten potyviralen Proteine oder sogar bisher noch gar nicht detektiert werden konnten, wie z.B. für die beiden 6 kDa großen Proteine (6K1 und 6K2).

References [1] Jach, G., Pesch, M., Richter, K., Frings, S., Uhrig, J.F., 2006. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nature Methods*, 3, 597-600.

Physikalische Interaktion zwischen dem Pathogenitätsfaktor P25 des Beet necrotic yellow vein virus und einem F-box Protein aus Zuckerrübe, welches an der Auslösung einer hypersensitiven Reaktion beteiligt ist

Thiel, H.¹, Varrelmann, M.¹

¹Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin, 37079 Göttingen

Die viröse Wurzelbärtigkeit, die bei Zuckerrübe durch BNYVV verursacht und durch P. betae übertragen wird, ist durch Anbau teilresistenter Genotypen kontrollierbar. Das Virus, welches sich von infizierten Haarwurzeln in die Hauptwurzel ausbreitet, wird durch diese Genotypen in Replikation und Transport gehindert. BNYVV besteht aus vier bzw. fünf RNA Segmenten und kodiert auf RNA3 das Genprodukt P25, welches für Ertragsminderung, Translokation des Virus im Wurzelsystem und Symptomausprägung verantwortlich ist. Um die weitgehend unbekannt Funktionen von P25 charakterisieren zu können, wurde erstmals mittels "yeast-two hybrid" eine BNYVV infizierte Rz2 resistente Zuckerrüben cDNA Bibliothek auf Proteininteraktion mit P25 getestet. Die verbliebenen 36 cDNA Kandidaten wurden mittels Datenbankanalysen überprüft. Interessant zeigte sich ein F-box Protein, welches an der Induktion einer Zelltodreaktion nach transienter Agroexpression in N. benthamiana beteiligt ist. F-box Proteine sind an der Proteindegradation als Komplexproteine der E3 Ligase identifiziert worden und binden durch bestimmte Proteindomänen Zielproteine, die am 26S Proteasom abgebaut werden. Nach Herstellung von Vollängen-Klonen aus resistenten und anfälligen Zuckerrübenlinien konnte die Interaktion mit P25 in vitro, wie auch die Zelltodinduktion in Tabak durch Expressionsnachweis von PR-Proteinen bestätigt werden. Final soll die F-box Expression im infizierten und gesunden Blatt- und Wurzelgewebe mittels Northern Blot überprüft und eine Beteiligung des F-box Proteins am BNYVV Resistenzmechanismus gezeigt werden.

Beladung von *Polymyxa betae* mit verschiedenen Isolaten des Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) und Analyse der resistenzüberwindenden Eigenschaften

Bornemann, K.¹, Varrelmann, M.¹

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

Die viröse Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe wird durch BNYVV ausgelöst, welches durch *Polymyxa betae* übertragen wird. Die Virustypen A und B besitzen vier RNAs, wobei die Typen P und J eine zusätzliche fünfte RNA besitzen, welche im P-Typ für eine höhere Aggressivität verantwortlich gemacht wird. Trotz der Verwendung von Genotypen mit dem Resistenzgen *Rz1* kommt es an mehreren Standorten in den USA und Spanien seit einigen Jahren zu Resistenzüberwindungen. Als Ursache hierfür wird der steigende Selektionsdruck auf den Pathogenitätsfaktor P25 angesehen. Durch den Anbau von *Rz1*-toleranten Sorten kommt es möglicherweise zu einer erhöhten Mutationshäufigkeit auf einem bestimmten Abschnitt auf dem P25-Gen. Es ist unklar, ob *P. betae* an der Resistenzüberwindung beteiligt ist. In Gewächshausversuchen sollte gezeigt werden, ob die Pathogenität von unterschiedlichen BNYVV-Isolaten von der Vektorpopulation beeinflusst wird. Dazu wurde erstmals eine BNYVV-Beladung eines *P. betae*-haltigen Bodens mit verschiedenen resistenzüberwindenden BNYVV-Isolaten durchgeführt. Als Inokulum diente hierzu ein *C. quinoa* Presssaft. Anschließend wurden die Bodenproben mit gleicher Vektorpopulation, jedoch unterschiedlichen BNYVV-Isolaten, für einen Resistenztest mit anfälligen, *Rz1*- sowie *Rz1+Rz2*-Hybriden eingesetzt. Eine Beladung von *P. betae* konnte nachgewiesen werden. Die im Feld und in Gewächshausversuchen beobachteten *Rz1*-resistenzüberwindenden Eigenschaften eines französischen P-Typ Isolates und eines A-Typ Isolates aus Imperial Valley (USA) konnten mit dieser Methode reproduziert werden.

Analyse der autoproteolytischen Aktivität des Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) Silencing Suppressors P1

Weinheimer, I.¹, Boonrod, K.¹, Moser, M.¹, Zwiebel, M.¹, Füllgrabe, M.¹, Krczal, G.¹, Wassenegger, M.¹

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

Das Genom des RYMV besteht aus einer Einzelstrang RNA mit positiver Polarität und umfasst vier putative offene Leseraster (Open Reading Frame, ORF). Das P1 Protein wird durch den ORF1 kodiert, der separat translatiert wird. Der ORF2 kodiert für ein Polyprotein, das durch eine viruskodierte Protease prozessiert wird. Wir konnten feststellen, dass in *Nicotiana benthamiana* und *Escherichia coli* exprimierte P1 Fusionsproteine autokatalytisch prozessiert werden. Wir untersuchten die Spaltungsaktivität mittels Mutagenese und Western Blot Analysen.

Die N-terminale Sequenzierung eines C-terminalen Spaltungsprodukts eines transient in *N. benthamiana* exprimierten P1/GFP (Green Fluorescence Protein) Fusionsproteins zeigte eine Schnittstelle zwischen den beiden ersten Aminosäuren „downstream“ der P1 Sequenz. Eine Substitution von Phenylalanin durch Valin in Position 157 der P1 Aminosäuresequenz beeinträchtigte die autoproteolytische Aktivität, während eine Substitution durch Tyrosin kaum Einfluss zeigte. Eine Deletion von Methionin in Position 159 (erste Aminosäure des GFP) zeigte ebenfalls keinen Effekt. N-terminale Fusionen von P1 mit GFP beeinträchtigten die autoproteolytische Aktivität von P1, wogegen der (relativ kleiner) His-Tag wenig Effekt zeigte.

Ein modifiziertes P1/GFP Fusionsprotein mit einer N-terminalen Deletion von 81 Aminosäuren zeigte keine Spaltungsaktivität mehr. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der N-Terminus von P1 eine wichtige Rolle in der Proteolyse spielt und dass große N-terminale Fusionspartner die für eine Autokatalyse notwendige Faltung stören könnten. Die C-terminale autoproteolytische Aktivität von P1 ist unerwartet und die biologische Funktion im Kontext des viralen Genoms noch unklar.

SYMPTOM DETERMINANTS ON THE ARABIS MOSAIC NEPOVIRUS GENOMIC RNA2

Dupuis, L.¹, Himber, C.², Dunoyer, P.², Bassler, A.¹, Keller, M.², Wetzell, T.¹

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

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

Arabis mosaic virus (ArMV) belongs to the plant virus genus Nepovirus of the family Comoviridae. In the wine producing areas southwest of Germany, including Neustadt an der Weinstrasse (NW), ArMV is, along with the Grapevine fanleaf virus (GFLV) and the Raspberry ringspot virus (RpRSV), two other nepoviruses, a causative agent of the grapevine fanleaf disease, one of the most widespread and damaging virus diseases affecting grapevine. Nepoviruses have two single-stranded positive sense genomic RNAs, which are linked to a VPg at their 5' ends, and polyadenylated at their 3' ends.

While ArMV-NW produces no symptoms on *Chenopodium quinoa*, ArMV-lilac and -Lv, isolated from lilac and privet respectively, produce chlorotic symptoms and extremely severe symptoms eventually leading to the death of the plant. The availability of full-length infectious clones of ArMV-NW (under the control of a double 35S promoter) allowed the generation of chimeric constructs between ArMV-NW and ArMV-lilac or -Lv. These clones were assessed in mechanical inoculation assays on *Chenopodium quinoa* for their infectivity and their symptomatology. The first results with chimeric constructs between RNAs 2 seem to indicate that the N-terminal 2A gene is involved in the development of symptoms on *Chenopodium quinoa*.

Tobacco mosaic virus derivatives: on the route to biosensing applications

Eber, F.¹, Geiger, F.¹, Müller, A.¹, Azucena, C.², Petershans, A.², Gliemann, H.², Eiben, S.¹, Jeske, H.¹, Wege, C.¹

¹Universität Stuttgart, Biologisches Institut, Abt. Molekularbiologie und Pflanzenvirologie, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart

²Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Funktionelle Grenzflächen, Abt. Nanomineralogie, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen

In the past decade, biomolecule-containing devices have become increasingly important for the detection of various substances such as indicators for pathogens in personalized medicine, blood glucose level of diabetes patients or toxic substances. An improved biosensor based on stiff TMV-derived scaffolds guarantees optimal distance between carrier substrate and detection unit, and allows the orientation of the biomolecule and provides multivalent attachment sites. To attain this goal, nanoparticles derived from TMV are assembled in vitro from isolated coat protein around RNA scaffolds, which may be immobilized on beads or flat surfaces. Bottom-up assembly has been used for creating nanoscale arrays directly on sites of interest on patterned solid substrates and is currently optimized to obtain more complex carrier structures. Furthermore genetically modified variants of the coat protein are suitable to couple both fluorescent dyes and proteins to the viral particle. Here orthogonal strategies are established for coupling, which allow the selective binding of different functions to the particles. Strategies for individually addressing pre-defined particles have been developed and successfully tested in proof-of-concept experiments. Besides the respective results and their potential for technical applications, also the biological relevance of the findings is discussed.

Nachweis von Cherry leaf roll virus (CLRV) in Einzelinsekten verschiedener Gruppen

Schuster, A.¹, Bandte, M.¹, von Barga, S.¹, Büttner, C.¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Fachgebiet Phytomedizin, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin, Deutschland

Die Übertragung durch tierische Vektoren konnte bisher für CLRV (Cherry leaf roll virus) nicht belegt werden, Untersuchungen deuten allerdings auf deren Vorhandensein hin. Die vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der quantitativen und qualitativen Analyse des Artenspektrums potentieller Vektorinsekten auf *Betula pendula*. Insgesamt wurden 26 Hemipterenarten anhand morphologischer Merkmale identifiziert. Hiervon sind 5 Wanzenarten, 7 Zikadenarten und 4 Pflanzenlausarten als Birken-sauger bekannt und kommen somit als Überträger von CLRV in Betracht. Individuen aller gefundenen Arten wurden mittels IC-RT-PCR auf CLRV-Kontamination getestet, wobei das Virus in mehreren Insekten nachgewiesen werden konnte. Der Beitrag gibt einen Überblick über das Artenspektrum möglicher Insektenvektoren von CLRV.

Genomorganisation der RNA2 des Cherry leaf roll virus (CLRV)

von Barga, S.¹, Langer, J.¹, Rumbou, A.², Gentkow, J.³, Büttner, C.¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, FG Phytomedizin, Königin-Luise Str. 19, 14195 Berlin

²NAGREF, Volos, Griechenland

³Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Weinberg 3, 06120 Halle/Saale

Bisher ist die Genomorganisation des Cherry leaf roll virus (CLRV), welches viele Obst- und Laubgehölze infiziert, bis auf wenige Sequenzinformationen der 3´ proximalen Bereiche der RNA1 und RNA2 nicht veröffentlicht. CLRV wurde aufgrund der langen 3´ nicht-kodierenden Region in die Subgruppe C der Nepoviren eingeordnet. Nach vollständiger Sequenzierung der RNA1 eines CLRV-Isolates aus Rhabarber (E395, unveröffentlichte Daten) liegt erstmals auch die vollständige RNA2-Sequenz dieses Virus vor. Die genetische Organisation der RNA2 wurde mit anderen Nepoviren verglichen. Die Genomorganisation der RNA2 des CLRV-Isolates E395 aus Rhabarber zeigt höchste Übereinstimmungen zur RNA2 des Tomato ringspot virus (ToRSV) Subgruppe C.

Charakterisierung eines neuen Virus aus Erbse

Menzel, W.¹, Winter, S.¹, Vetten, H.-J.²

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

²JKI, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Deutschland

Aus einer Erbsenpflanze (*Pisum sativum*) mit Stängel- und Hülsenverbräunung aus Drohndorf (Sachsen-Anhalt) konnte ein Virus mechanisch auf *Vicia faba* und Erbse übertragen werden. Der Wirtskreis des Virus (ED-12) erschien recht eng: neben Erbse und Fababohne wurden nur Kichererbse (*Cicer arietinum*) (mit Welke) und *Nicotiana occidentalis* (P1 und 37B) systemisch infiziert, während an *Chenopodium quinoa* und *N. hesperis* nur lokale Infektionen beobachtet wurden. Elektronen-mikro-skopisch wurden in den infizierten Pflanzen filamentöse Partikel von ca. 650 nm nachgewiesen. In immunoelektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Antiseren gegen Leguminosen-Potex- und Carlaviren wurden starke Dekorationsreaktionen nur mit einem Antiserum gegen Red clover vein mosaic virus (RCVMV; Gattung Carlavirus; Familie Betaflexiviridae) erhalten. Nach Isolierung von dsRNA aus infizierten Erbsen wurde im Agarosegel ein für Flexiviren (Carlaviren) charakteristisches Bandenmuster erhalten. Dieses dsRNA-Präparat diente als Ausgangsmaterial für die komplette Sequenzierung des Isolats ED-12. Das Genom des ED-12 besteht aus 8.488 Nukleotiden (ohne die Polyadenylierung am 3'-Ende) und ist strukturiert wie das der Carlaviren. Die Aminosäuresequenzen der Replikase (ORF1), der "triple-gene-block"-Proteine 1-3 (ORF2-4) und des ORF6 zeigten Sequenzidentitäten von nur 48% - 56% zu anderen Viren der Gattung Carlavirus. Nur das Hüllprotein (ORF5, CP) des ED-12 wies mit 90% eine deutlich höhere Identität zu einem RCVMV-Isolat aus den USA und den zweithöchsten Wert (59%) zum Pea streak virus (PeSV) auf, zu dessen CP das RCVMV-USA eine Identität von 55% besitzt. Diese auffällige Sequenzähnlichkeit zum CP des RCVMV-USA könnte Hinweis dafür sein, dass es sich bei ED-12 oder dem in den USA sequenzierten RCVMV-Isolat um eine Rekombinante handelt, bei der allerdings der zweite Elter noch unbekannt ist. Die Partikel des Isolats ED-12 ließen sich leicht reinigen, so dass die Herstellung eines hochtitrigen und spezifischen Antiserums gelang. Dies ermöglicht nicht nur Untersuchungen zur Verbreitung des ED-12 in Deutschland, sondern auch die Gewinnung von weiteren Isolaten, an denen sich die rekombinante Natur dieses Carlavirus in deutschen Erbsenbeständen bestätigen lassen sollte. Falls letzteres gelingt, wird der Name pea virus S für ED-12 vorgeschlagen.

Faba bean necrotic stunt virus: Reconstitution and variability of a nanovirus

Grigoras, I.¹, Timchenko, T.¹, Grande-Pérez, A.², Katul, L.³, Vetten, H.-J.³, Gronenborn, B.¹

¹Institut des Sciences du Végétal, CNRS, 91198 Gif sur Yvette, France

²Universidad de Málaga, Area de Genética, 29071 Málaga, Spain

³Julius Kühn Institute (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, 38104 Braunschweig, Germany

Nanoviruses are single-stranded multi-component (ss)DNA plant viruses comprising members that cause important diseases of crop and pasture legumes, and banana. Little is known about variability or molecular evolution of these viruses.

We applied rolling circle amplification to extensively copy individual circular genomic DNAs from two faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) populations sampled about two years apart: a field isolate from Holetta, Ethiopia, collected in 1997, and a population derived thereof after >30 successive cycles of aphid vector transmission. By comprehensive sequence analyses of more than 419 individually cloned genome components we derived with a representative sample of eight polymorphic swarms of circular DNAs, each about 1 kb in size, the characteristic set of DNAs forming the genome of a legume-infecting nanovirus. We established that FBNSV has a heterogeneous and complex genetic structure similar to that described for animal and plant RNA viruses with mutation frequencies of 7.74×10^{-4} alterations /site in the field population and 5.33×10^{-4} substitutions /site in the laboratory-maintained one. Comparison of the consensus sequences of the two different populations revealed a substitution rate of 1.78×10^{-3} /site /year. This elevated molecular evolution rate places FBNSV, as a representative of the nanovirus family, among the fastest evolving ssDNA viruses infecting plants or vertebrates.

By selecting consensus clones of the eight DNAs for transfer by T-DNA plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* into *Vicia faba* plants we elicited the development of the typical FBNSV disease symptoms and showed that the thus produced virus was readily transmitted by two different aphid vector species, *Aphis craccivora* and *Acyrtosiphon pisum*. This represents the first reconstitution of a fully infectious and sustainably insect transmissible nanovirus from its cloned eight genomic DNAs.

Teilnehmerliste

Name	Institut	E-mail Adresse
Abraham, Adane	DSMZ Plant Virus Department	adaneabraham@yahoo.com
Adam, Günter	Universität Hamburg, Inst.f.angew. Botanik	guenter.adam@iangbot.uni-hamburg.de
Arndt, Nick	HU Berlin, Fachgebiet Phytomedizin	arndtnick@gmx.de
Bald, Niklas	Leibniz Universität Hannover, IPP	niklas_bald@yahoo.com
Bandte, Martina	HU Berlin	martina.bandte@agrار.hu-berlin.de
Bicknäse, Vera	DSMZ Plant Virus Department	vera.bicknaese@jki.bund.de
Bornemann, Kathrin	Institut für Zuckerrübenforschung	bornemann@ifz-goettingen.de
Brinkmann, Philipp	Leibniz Universität Hannover, IPP	nexugh@web.de
Butgereitt, Anja	DSMZ Plant Virus Department	plantvirus@dsmz.de
Cernusko, Robert	LALLF-M-V	robert.cernusko@lallf.mvnet.de
Darissa, Omar	Universität Hamburg, Inst.f.angew. Botanik	omarissa30@hotmail.com
Degenhard, Sven	Universität Stuttgart, Abt. Molekularbiologie	sven.degenhard@bio.uni-stuttgart.de
Dr. Freye, Caroline	Loewe Biochemica GmbH	service@loewe-info.com
Drechsler, Nadine	BTL Bio-Test Labor GmbH Sagerheide	nadine.drechsler@jki.bund.de
Eber, Fabian	Universität Stuttgart, Biol. Institut	fabian.eber@bio.uni-stuttgart.de
Eisold, Anne-Mareen	HU Berlin, Fachgebiet Phytomedizin	a-m.eisold@web.de
Fricke, Heiko	Leibniz Universität Hannover, IPP	Fricke.Heiko@gmx.de
Götz, Monika	DSMZ Plant Virus Department	monika.goetz@jki.bund.de
Grigoras, Ioana	Institut des Sciences du Végétal, CNRS	Ioana.grigoras@isv.cnrs-gif.fr
Gronenborn, Bruno	Institut des Sciences du Végétal, CNRS	gronenborn@isv.cnrs-gif.fr
Held, Katja	Leibniz Universität Hannover, IPP	katja.held@gmx.net
Horn, Judith	Universität Stuttgart	judith.horn@bio.uni-stuttgart.de
Hühnlein, Anja	Julius Kühn Institut	anja.huehnlein@jki.bund.de
Jelkmann, Wilhelm	JKI, Inst.f.Pflanzenschutz in Obst- u.Weinbau	Wilhelm.Jelkmann@jki.bund.de
Jeske, Holger	Universität Stuttgart	holger.jeske@bio.uni-stuttgart.de
Kleinow, Tatjana	Universität Stuttgart, Biol. Institut	tatjana.kleinow@bio.uni-stuttgart.de
Klinkenbuß, Dominik	Leibniz Universität Hannover, IPP	dom_klinkenbuss@web.de
Koenig, Renate	Julius Kühn Institut, EP	renate.koenig@jki.bund.de
Koerbler, Marianne	DSMZ Plant Virus Department	marianne.koerbler@jki.bund.de
Kollenberg, Mario	DSMZ Plant Virus Department	kollenberg-my@gmx.de
Korte, Joschka	Leibniz Universität Hannover	Sitzplatzultra@gmx.de
Krczal, Gabi	RLG Agrosience GmbH, AIPlanta	gabi.krczal@agrosience.rlp.de
Kühne, Thomas	Julius Kühn Institut, EP	thomas.kuehne@jki.bund.de
Langer, Juliane	HU Berlin, Fachgebiet Phytomedizin	langerrj@rz.hu-berlin.de
Lesker, Till	Leibniz Universität Hannover	lesker@ipp.uni-hannover.de
Liedl, Peter	Klemm + Sohn GmbH & Co. KG	p.liedl@selectaklemm.de
Lintl, Lara	DSMZ Plant Virus Department	lli05@dsmz.de
Loewe, Renate	Loewe Biochemica GmbH	Dr.Loewe@loewe-info.com
Maiss, Edgar	Leibniz Universität Hannover, IPP	maiss@ipp.uni-hannover.de
Menzel, Wulf	DSMZ Plant Virus Department	wulf.menzel@dsmz.de
Müller, Jakob	HU Berlin	phytomedizin@agrار.hu-berlin.de
Neuhaus, Christof		chrneuhaus@t-online.de
Ohlendorff, Meike	DSMZ Plant Virus Department	M.Ohlendorff@t-online.de
Pietruszka, Agnes	DSMZ Plant Virus Department	agnes.pietruszka@jki.bund.de
Rabenstein, Frank	Julius Kühn Institut	frank.rabenstein@jki.bund.de

Robel, Jenny	HU Berlin, Fachgebiet Phytomedizin	jenny.robel@gmx.de
Scholz, Eva	Leibniz Universität Hannover	scholz@ipp.uni-hannover.de
Schubert, Jörg	Julius Kühn Institut, Inst. SG	joerg.schubert@jki.bund.de
Schuster, Anna	HU Berlin, Fachgebiet Phytomedizin	phytomedizin@agrar.hu-berlin.de
Stein, Beate	DSMZ Plant Virus Department	
Thiel, Heike	Institut für Zuckerrübenforschung	thiel@ifz-goettingen.de
Varrelmann, Mark	Institut für Zuckerrübenforschung	varrelmann@ifz-goettingen.de
Vetten, H. Josef	Julius Kühn Institut	heinrich-josef.vetten@jki.bund.de
Vincent Janina	HU Berlin	
von Barga, Susanne	HU Berlin, Fachgebiet Phytomedizin	susanne.von.barga@agrar.hu-berlin.de
Wege, Christina	Universität Stuttgart, Biol. Institut	christina.wege@bio.uni-stuttgart.de
Wetzel, Thierry	RLP Agrosience	thierry.wetzel@agrosience.rlp.de
Winter, Stephan	DSMZ Plant Virus Department	stephan.winter@jki.bund.de
Wyant, Patricia	Universität Stuttgart	patricia.wyant@bio.uni-stuttgart.de
Ziegler, Angelika	Julius Kühn Institut, Quedlinburg	Angelika.Ziegler@jki.bund.de