

Auftreten der Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) als effizienter Vektor: Mittels sechs Gelbschalen wurde überprüft, inwieweit überwinterte Imagines abgefangen werden können. Vom 17.2. - 6.4.09 wurden zweimal pro Woche die Fallen erneuert und ausgewertet. *Myzus persicae* konnte in den Fallen nicht nachgewiesen werden. Das geringe Vorkommen wurde auch in den parallel in Kartoffeln durchgeführten Untersuchungen festgestellt. Als Beifänge fanden sich hauptsächlich Dipteren in der Flüssigkeit.

Untersuchung der Vektoren auf positive Beladung mit dem Scharka-Virus: Auf der Basis einer reversen Transcriptase-PCR-Reaktion wurden die verschiedenen Blattlausarten über die Vegetationszeit mehrmals auf positive Beladung mit dem *Plum Pox Potyvirus* untersucht. Trotz der häufigen Untersuchungen konnte in keiner Probe der Nachweis einer positiven Beladung der Tiere geführt werden.

Bis auf die Pfirsichblattlaus konnten alle relevanten Blattlausarten, welche als Scharka-Überträger in Frage kommen, nachgewiesen werden. Die Aufwanderung der Blattlausarten konnte wegen der geringen Individuendichte nicht näher bestimmt werden. Trotz der häufigen Untersuchungen auf positive Beladung der Tiere konnte in keiner Probe ein positiver Nachweis geführt werden.

104 - Darissa, O.; Willingmann, P.; Schäfer, W.; Adam, G.  
Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek

### **Ein neues Mykovirus aus *Fusarium graminearum*: seine Nukleinsäuresequenz, seine genomische Struktur und sein Effekt auf seinen Pilzwirt**

A novel double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*; nucleic acid sequence, genomic structure and effect on its fungal host

Ten *Fusarium graminearum* (F.g.) isolates from China were screened for the presence of dsRNA mycoviruses. One of the isolates, namely F.g. China 9 showed 5 dsRNA segments after agarose gel electrophoresis with sizes ranging from 2.4 to 3.5 Kbp. Isometric virus-like particles (VLPs) of about 40 nm were successfully purified from F.g. China 9 by means of CsCl ultracentrifugation and observed under the Transmission Electron Microscope. The five dsRNA segments were completely sequenced and a single ORF per segment was identified. Blast results showed that segment 1 possess RdRp conserved motifs, segment 5 has a C2H2 zinc finger domain, whereas segments 2 and 4 share no significant similarity to any published protein. Tandem Mass Spectrophotometry, VLPs surface protein labeling, SDS-PAGE and protein blast results support that 4 of the virus segments code for structural proteins of which segment 3 possibly codes for the outer capsid protein. Relative quantitative PCR studies of the 5 dsRNA segments isolated from purified VLPs suggested that the segments are encapsidated separately in unequal amounts. Genomic structure of F.g. China 9 virus and the phylogenetic study of the RdRp segment support that the virus would possibly candidate as a type species for a novel family of mycoviruses. Depending on the titer of the virus in the starting culture inoculums, the virus transmission through conidia ranges from 50-100 % as detected by RT-PCR. Accumulation of the virus in its fungal host dramatically reduces the mycelial growth rate, total conidia production, and alters its pigmentation.

105 - Thiele, K.<sup>1</sup>); Smalla, K.<sup>1</sup>); Braje, I.<sup>2</sup>); Rabenstein, F.<sup>1</sup>)

<sup>1</sup>) Julius Kühn-Institut; <sup>2</sup>) Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz

### **Nachweis und molekulare Charakterisierung von *Acidovorax valerianellae*, dem Erreger von bakteriellen Blattflecken an Feldsalat (*Valerianella locusta* (L.) Laterr.)**

Leaf spots on corn salad, *Valerianella locusta* (L.) Laterr., caused by the bacterium *Acidovorax valerianellae* – insights into biology and development of diagnostic tools

Seit 1999 treten in Deutschland vermehrt schwarze Blattflecken an Feldsalat (*Valerianella locusta* (L.) Laterr.) auf, die auf einen Befall durch das Bakterium *Acidovorax valerianellae* (Av) zurückzuführen sind (Moltmann, 2000) und im Erwerbsanbau hohe Verluste verursachen. Zur Lösung der offenen epidemiologischen Fragen werden innerhalb dieses Projektes serologische und molekularbiologische Diagnosemethoden entwickelt. Weiterhin sollte mit der molekular-biologischen Charakterisierung des Erregers begonnen werden.

Zunächst wurden monoklonale Antikörper gegen das Typisolat des Erregers (16619, DSMZ Braunschweig) erzeugt, selektiert und mit bereits verfügbaren polyklonalen Kaninchenseren hinsichtlich Spezifität und Sensitivität verglichen. Die ausgewählten Hybridom-Klone produzieren hochspezifische anti-Av-Antikörper in hoher Konzentration. Mittels TAS-ELISA (triple antibody sandwich) kann der Erreger in infiziertem Pflanzenmaterial sowie in Saatgut sicher nachgewiesen werden. Erstmals konnten mittels Immunogold-Labeling und Transmissions-

Elektronenmikroskopie Av-Zellen in symptomtragenden Feldsalatblättern dargestellt werden. Die Bakterienzellen wurden in sehr hoher Dichte im Interzellularraum in den Randregionen der Läsionen gefunden, jedoch nicht in symptomfreien Blattregionen.

Da alle bisher eingesetzten PCR-Primer sehr unspezifisch waren und für *A. valerianellae* nur wenig Sequenzinformationen vorliegen, wurden einige durch BOX-PCR (Martin, 1992) generierte Amplifikate kloniert und sequenziert. Die dabei gewonnenen Sequenzdaten ermöglichten die Etablierung einer für Av spezifischen PCR. Alle vorhandenen Isolate konnten damit nachgewiesen werden, die Übertragbarkeit der Methode auf Saatgut und Boden wird gegenwärtig getestet.

Hinweise auf Übertragbarkeit des Erregers durch Boden und Saatgut (Grondeau, 2009) konnten bestätigt werden. Auf Böden, in die im Herbst 2009 (in Schifferstadt) und März 2010 (in Quedlinburg) infiziertes Blattmaterial eingemischt wurde, konnte nach Lagerung in Containern im Freiland an Feldsalat-Fangpflanzen Befall nachgewiesen werden. Die Inkubation erfolgte unter dauerfeuchten Bedingungen in einer Klimakammer (Tag 20 °C, Nacht 15 °C, 16 Stunden Licht).

Über einen Zeitraum von drei Monaten traten Av-Symptome an den ausgesäten Fangpflanzen auf und konnten serologisch diagnostiziert werden. Bei dem leicht degenerierbaren Feldsalatgewebe entspricht dies etwa dem notwendigen Zeitraum für die natürliche Zersetzung des Pflanzenmaterials. Als weitere potentielle Infektionsquelle konnte das Saatgut bestätigt werden. Zur Klärung der Frage, ob aus kontaminiertem Saatgut eine Übertragung auf das daraus zu produzierende Saatgut zu erwarten ist, wurden 2007 und 2008 je zwei Saatgutpartien (natürlich kontaminiert mit *A. valerianellae* und nicht kontaminiert) gesät und die Pflanzen bis zur Saatgutbildung kultiviert. Das daraus produzierte Saatgut (Ernte 2008 und 2009) wurde mit unterschiedlichen Verfahren (Sweatbox-Test, Anzucht, TAS-ELISA) in einem Ringversuch durch verschiedene Diagnoselabore auf Kontamination geprüft. Eine Übertragung des Befalls vom Ausgangssaatgut auf das produzierte Saatgut konnte damit nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von herkömmlichen (Anzucht) und neu etablierten Methoden (TAS-ELISA) korrelieren miteinander.

Etwa 50 Isolate wurden auf Sequenzunterschiede der 16S-rRNA-Gene mittels Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) (Vanechoutte, 1992) und Unterschiede in der Genomorganisation mittels BOX-PCR [2] getestet. Die Isolate ließen sich mit Hilfe der Restriktionsmuster der 16S-rRNA-Gene in zwei etwa gleich große Gruppen einteilen, die sich in ihrem Bandenmuster durch eine Bande unterschieden. Durch Sequenzierung der 16S-rRNA-Gene wurde dieser Unterschied auf einen Basenaustausch zurückgeführt, der eine zusätzliche Schnittstelle für das eingesetzte Restriktionsenzym schafft.

Die durch BOX-PCR erzeugten Bandenmuster zeigen ebenfalls Unterschiede zwischen den Isolaten und lassen sich drei Gruppen zuordnen. Zwei dieser BOX-Gruppen korrelieren mit der einen ARDRA- bzw. 16S-Variante, die dritte BOX-Gruppe umfasst alle Isolate der anderen ARDRA-Variante.

Bei der Herstellung von neuen Isolaten aus belastetem Saatgut wurde festgestellt, dass Erreger beider 16S-Varianten parallel vorkommen. Gegenwärtig wird mit Inokulationsversuchen überprüft, ob sich diese Varianten in ihrer Pathogenität unterscheiden.

106 - Nabhan, S.<sup>1)</sup>; Felgentreu, D.<sup>2)</sup>; Wydra, K.<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Leibniz Universität Hannover; <sup>2)</sup> Julius Kühn-Institut; <sup>3)</sup> Georg-August-Universität Göttingen

### **Physiological fingerprinting and molecular characterization for identification and characterization of Soft Rot, pectolytic bacterial strains from Syria**

A collection of 30 pectolytic enterobacterial strains was sampled from potato fields in Syria between years 2002 to 2004. The strains were confirmed as soft rot pathogen by investing virulence assays on potato tubers, pepper slices, tomato plants and their ability to utilize pectin on CVP medium. Moreover, 33 reference strains of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (Pco), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, *Pectobacterium atrosepticum* (Pba), and *Dickeya* species (*Dickeya* spp.) included in the study for comparison. For the 63 strains, different method were used for identification, started with biochemical tests, fatty acid methyl ester analysis (FAME), metabolic fingerprinting using 95 carbon sources (GN Biolog assay), PCR using different primers targeting the Pel genes family, The16S-23SS intergenic transcribed spacer-PCR (ITS-PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism analyses (ITS-RFLP) (Toth et al. 2001). Additional RFLP approach still under investigation using some conserved housekeeping genes which present in both genera *Pectobacterium* and *Dickeya*.

The aim of our study was to determine the characteristics of pectolytic bacterial strains associated with the soft rot and blackleg disease of potato in Syria. The advantage of this study is that the genus *Pectobacterium* was representative with all of the known species and subspecies which could enable us to detect and to know more