

Um das Risikopotential von PVY<sup>NW</sup> für Deutschland bewerten zu können, wurde versucht, den PVY<sup>NW</sup>-Anteil an den PVY-Infektionen in den Hauptkartoffelanbaugebieten zu ermitteln sowie die Symptome an PVY<sup>NW</sup>-infizierten Augenstecklingspflanzen zu bestimmen. Die PVY-Isolate sind vorerst serologisch und biologisch typisiert worden, d.h. insgesamt 384 Feldisolate, die dem PVY<sup>O</sup>-Serotyp zuzuordnen waren, wurden auf ihr Vermögen geprüft, Stängelnekrosen an Tabak zu verursachen.

Im Ergebnis dieser Untersuchungen waren 70 % aller Isolate mit einem "PVY<sup>N</sup>-Phänotyp" dem PVY<sup>NW</sup>-Stamm zuzuordnen. Zur Bestätigung dieses Resultats sind 36 bereits im Bioassay geprüfte Feldisolate mit Hilfe einer nach Glais et al. (2005) modifizierten IC-RT-PCR und nach Teilsequenzierung des HC-Pro-Gens auf ihre Stammzugehörigkeit hin analysiert worden. Überraschenderweise konnten 35 der 36 Isolate dem PVY<sup>NW</sup>-Stamm und nur ein Isolat der PVY<sup>O</sup>-Stammgruppe zugeordnet werden. Trotz der ermittelten Differenzen wird deutlich, dass sich PVY<sup>NW</sup> zu einem der vorherrschenden Stämme des PVY entwickelt. Die in Verbindung mit PVY<sup>NW</sup> vermutete Symptomlosigkeit der Virose an Augenstecklingspflanzen und Kraut von Freilandkartoffeln konnte nicht bestätigt werden. Alle in die Untersuchung einbezogenen 8 Kartoffelsorten wiesen auffallend rauhe Blätter (Kräuselungen) und mehr oder weniger starkes Mosaik auf. Damit ist PVY<sup>NW</sup> auch hinsichtlich seiner Symptomatologie der N-Stammgruppe zuzuordnen. Visuelle Bonituren erscheinen möglich.

Literatur

Glais, L., Tribodet, M., Kerlan, C., 2005: Specific detection of the PVY<sup>NW</sup> variant of Potato virus Y. Journal of Virological Methods, 125, 131–136.

### **105 – Fomitcheva, V.<sup>1)</sup>; Schubert, J.<sup>1)</sup>; Sztangret-Wisnewska, I.<sup>2)</sup>; Lindner, K.<sup>3)</sup>**

<sup>1)</sup> Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ),  
Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik (IRP)

<sup>2)</sup> Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików

<sup>3)</sup> Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,  
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit

### **Entwicklung eines Verfahrens für die molekulare Analyse des Stammspektrums des Potato virus Y**

Development of a method for the molecular differentiation of strains in Potato virus Y population

Das Potato virus Y (PVY), Typenvertreter der Potyviridae, gehört nach wie vor zu den wichtigsten Schadviren im mitteleuropäischen Kartoffelbau. Anfang der 1990er traten neue Stämme des Virus auf, die auf Rekombinationen unter den zuvor existierenden Stämmen, PVY<sup>N</sup> und PVY<sup>O</sup>, beruhen. Die bisher angewendete biologisch/serologische Differenzierung der Stämme basierte auf der Bestimmung von Krankheitssymptomen auf Tabak und Kartoffel-Differentialwirten sowie der Reaktion mit stammspezifischen monoklonalen Antikörpern. Dieses Verfahren versagt jedoch bei Mischinfektionen und kann bestimmte Stämme nicht sicher identifizieren. Die bisher publizierten Primerpaare für eine RT-PCR-basierte Differenzierung führten in vielen Fällen zu falschen Ergebnissen. Dies kann besonders bei der Diagnose des PVY<sup>NTN</sup> hinsichtlich der weiteren Verwendung des Materials als Pflanzgut erhebliche Konsequenzen haben. Basierend auf der Identifizierung der kompletten Sequenzen verschiedener Stämme des PVY und unter Nutzung publizierter Sequenzen wurden neue differenzierende Primer für die RT-PCR abgeleitet. Ihre Eignung wurde an definierten Isolaten erprobt und die Testsicherheit über mehrfache Klonierung und Sequenzierung der resultierenden PCR-Produkten verifiziert.

Das praktizierte Verfahren besteht aus mehreren Schritten. Zunächst wird der Virusbefall über polyklonale Antikörper bestätigt. Daran schließt sich ein serologischer Test unter Verwendung von für N- bzw. O-Stämme spezifischen monoklonalen Antikörpern an. Nach dieser Vordifferenzierung, die der Kostenreduzierung dient, erfolgt die Feindifferenzierung und Bestimmung möglicher Mischinfektionen über IC-RT-PCR. Es können die Stämme PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup> (recombinant), PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>O</sup> und PVY<sup>NW</sup> sicher differenziert werden. Nur beim Nordamerikanischen Typ des PVY<sup>N</sup> ist es nicht möglich, zwischen normalen und Nekrosen-induzierenden Isolaten zu differenzieren, da das für die Induktion der Nekrosen verantwortliche Sequenzmotiv noch nicht bekannt ist.

Es gab eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen allen genutzten Methoden. Vorteil des PCR-Verfahrens ist neben seiner hohen Spezifität auch seine hohe Sensitivität.

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde u.a. das aktuelle Stammspektrum des PVY in Deutschland, Neuseeland und Polen analysiert.

**106 – Rabenstein, F.<sup>1)</sup>; Schubert, J.<sup>1)</sup>; Ehrig, F.<sup>1)</sup>; Habekuß, A.<sup>1)</sup>; Krauthausen, H.-J.<sup>2)</sup>; Müller, J.<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup> Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik (IRP)

<sup>2)</sup> Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinland, Abteilung Phytomedizin – Gartenbau

**Identifizierung und Differenzierung von Viren an Spargel**

Identification and differentiation of viruses in asparagus

Eine erste Analyse des Auftretens von Viren an Spargelpflanzen aus Rheinland-Pfalz (Rheinessen und Pfalz) und aus Sachsen-Anhalt (Raum Aschersleben) ergab einen z. T. sehr hohen Befall der untersuchten Spargelbestände. Für die Untersuchungen zur Verbreitung kam ein polyklonales Antiserum im Standard-DAS-ELISA zum Einsatz, das gegen ein Isolat des Asparagus virus 1 (AV-1) aus der Virusbank des IER Aschersleben hergestellt worden war. Da der Test nicht mit gesunden Spargelpflanzen (z.B. Sorte 'Ravel') reagierte, andererseits in einzelnen Spargelanlagen alle geprüften Pflanzen positiv getestet wurden, kann von einer vollständig Durchseuchung dieser Anlagen ausgegangen werden. Von verschiedenen Standorten wurden mehrere Isolate gewonnen. Untersuchungen zum Wirkkreis ergaben, dass mindestens zwei Linien isoliert werden konnten, die sich hinsichtlich ihrer Reaktion auf *Nicotiana benthamiana* (systemische Infektion) und *Chenopodium quinoa* (Bildung von Lokalläsionen) unterscheiden. Untersuchungen mit elektronenmikroskopischen, serologischen und molekularen Methoden ergaben, dass sich zwei ähnliche Viren mit fadenförmiger, flexibler Morphologie identifizieren lassen, die beide mit Potyvirus-gruppenspezifischen Antikörpern und PCR-Primern reagieren und auch vom polyklonalen AV-1 Antiserum im Western blot erfasst werden. Erste Sequenzierungsdaten zeigten für beide Isolate Unterschiede, die besonders am N-Terminus des Hüllproteins ausgeprägt sind. Darüber hinaus konnte ein weiteres, bisher nicht identifiziertes, flexibles Virus isoliert werden, das eine systemische Infektion in *Ch. murale* verursacht, jedoch nicht mit Antiserum gegen AV-1 aus der Kollektion des IRP reagierte. In mehreren Proben waren isometrische Viren vorhanden, die als Stämme des Cucumber mosaic virus (CMV) identifiziert wurden. Mit spezifischen monoklonalen Antikörpern und anhand von Wirkkreisuntersuchungen ließen sich diese Isolate weiter differenzieren. Untersuchungen zum Vorkommen des Asparagus virus 2 (Genus Ilarvirus), ein Virus mit ebenfalls isometrischer Morphologie, ergaben in den geprüften deutschen Spargelbeständen bisher keinen Nachweis. Die unerwartet starke Verbreitung von Viren in den untersuchten Spargelbeständen erfordert die Entwicklung spezifischer Diagnosemethoden, um eine differenzierte Überwachung (Monitoring) der verschiedenen Viren zu ermöglichen und darauf aufbauend für ausgewählte Spargelsorten zukünftig möglichst virusfreies bzw. virusgetestetes Pflanzenmaterial zur Verfügung stellen zu können. Darüber hinaus ist für die gezielte Entwicklung von Resistenzprüfmethoden unter Einbeziehung von Sorten und Genbankmaterial eine genaue Charakterisierung der Viren eine wesentliche Vorbedingung. Hierfür ist es erforderlich, neben den biologischen, morphologischen und serologischen Eigenschaften der in Deutschland vorkommenden Spargelviren, deren Genomstruktur zu ermitteln.

**107 – Knierim, D.; Blawid, R.; Maiss, E.**

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

**Optimierung der artifiziellen Inokulation von *Nicotiana benthamiana* mit Vollängenklonen des Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-AIT)**

Optimisation of artificial inoculation of *Nicotiana benthamiana* with a full-length clone of TYLCTHV-AIT

Die artifizielle Inokulation von Pflanzen mit Vollängenklonen von Geminiviren stellt einen wichtigen Schritt zur Überprüfung der Infektiosität und damit der Erfüllung der Kochschen Postulate dar. Vollängenklone von Geminiviren sind für die Erforschung der molekularen und biologischen Eigenschaften dieser Pathogene nahezu unverzichtbar. Für die Inokulation von Pflanzen mit Vollängen-