46–4 – Ghazala, W.; Varrelmann, M.
Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Pflanzenvirologie

Subcellular localisation and molecular characterisation of the 16K suppressor of gene silencing protein of Tobacco rattle virus

Plant viral suppressors of gene silencing do not possess obvious sequence homology and in addition have different subcellular localization. 16K protein encoded by RNA1 of Tobacco rattle virus (TRV) – recently identified as pathogenicity factor in tobacco plants and a suppressor of RNA silencing in Drosophila cells – was found to be mainly associated with nuclei, but also present in the cytoplasm of tobacco tissue fractions. To date, suppression of RNA silencing in plant, as well as, nuclear localization signal (NLS) of 16K protein was not addressed. Thus, this study aimed to assign these functions in relation to specific domains or motifs. Patch agroinfiltration assay proved the proteins ability to suppress transgene induced silencing in GFP–transgenic Nicotiana benthamiana plants. Testing 30 independent 16K–mutants obtained by pentapeptide scanning insertion mutagenesis showed that only two short regions of the protein tolerated the insertions. Two bipartite amino acids stretches rich in K and R located in the C–terminus, NLS1 (^{75} RKRVETRNREIWKQIRR ^{91}) and NLS2 (^{112} KKFKEDREFGTPKRFLR ^{128}) were predicted using computational prediction. CLSM examination of N. benthamiana leaf sections agro–infiltrated with several synthesized peptides fused to the C–terminus of DsRed–1, revealed that both predicted NLSs were able to target the DsRed into the nucleus. DsRed–16K–C–terminus fusion was localized in the nucleus, while N–terminus was found undiffused in the cytoplasm. Moreover, the wild–type 16K protein fused to either DsRed–1 or mRFP was found to be located in the cytoplasm, concluding that this protein may also possess a nuclear export signal (NES). Co–localization of mRFP–16K fusion with several GFP constructs, containing targeting signals to different cell compartments, showed that this protein is somehow associated with the endoplasmic reticulum (ER). At present, several 16K deletion mutants fused to mRFP are examined to prove the transport of 16K protein into and out of the nucleus, function as a shuttle protein.

46–5 – Stephan, D.; Maiss, E.
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

Charakterisierung von Beet mild yellowing virus Amplicon–transgenen *N. benthamiana*

Characterization of Beet mild yellowing virus amplicon–transgenic *N. benthamiana*

Ein infektiöser Beet mild yellowing virus full–length cDNA Klon (BMYV $_{fl}$) wurde als Amplicon durch A. tumfefaciens vermittelte Blattscheibentransformation in das Genom von N. benthamiana integriert.

Durch Tissue print immuno assay (TPIA) von BMYV Amplicon–transgenen Pflanzen wurde nachgewiesen, dass in einem Großteil des nicht vaskulärem Gewebes kein BMYV nachweisbar war, obwohl jede Zelle die Möglichkeit besitzt, den BMYVfl als Transgen zu exprimieren. Nach Ko–Infektion von BMYV Amplicon–transgenen Pflanzen mit Potato virus Y (PVY), Beet yellows virus (BYV) oder Pea enation mosaic virus–1/–2 (PEMV–1/–2) konnte eine Erhöhung des BMYV–Virustiters in der Blattlamina festgestellt werden. Obwohl in Ko–infizierten transgenen Pflanzen auch eine erhöhte Anzahl von BMYV–infizierten Mesophyllzellen nachweisbar war, konnte im Großteil der Zellen weiterhin keine BMYV–Infektion nachgewiesen werden. Dies gibt erste Hinweise, dass ein durch das Amplicon induzierter starker RNA–Silencing Mechanismus die Akkumulation von BMYV in Mesophyllzellen unterbindet.

46–6 – Engelmann, J.; Lesemann, D.-E.
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit

Überblick über die aktuellen Virusvorkommen – speziell neu auftretender Viren – in Beet– und Balkonpflanzen in Deutschland

Overview over virus occurence – especially new emerging viruses– in bed and balcony plants in Germany

Verschiedene Beet– und Balkonpflanzen und bestimmte Stauden mit virusverdächtigen Symptomen wurden von unterschiedlichen Pflanzenschutzämtern und -diensten, Beratungsinstitutionen, Jung-

pflanzenproduzenten und dem Bundessortenamt mit dem Ziel des Nachweises und der Charakterisierung bzw. Identifizierung der darin vorkommenden Viren an die BBA gesandt. Die primäre Diagnose erfolgte in der Regel elektronenmikroskopisch bzw. immunelektronenmikroskopisch und durch Übertragung auf differenzierte Spektren von Testpflanzen. Dabei wurden zum einen bekannte Viren in lange etablierten Kulturen nachgewiesen. Zum anderen wurden in neu nach Deutschland eingeführten vegetativ vermehrten Zierpflanzen und Stauden sowohl bekannte als auch unbekannte Viren detektiert.

Neben einem kurzen Überblick über die 2005/2006 detektierten Viren, wird in dem Vortrag im Wesentlichen über Hosta infizierende Viren berichtet. Nachdem 2005 zum ersten Mal das Hosta Virus X in Hostapflanzen in Deutschland nachgewiesen wurde, wurden Hostapflanzen aus ganz Deutschland auf Virusinfektionen untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen, sowie die durch die unterschiedlichen nachgewiesenen Viren hervorgerufenen Symptome werden in dem Vortrag vorgestellt.

46–7 – Mikona, C.; Jelkmann, W.

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau

Genetische Variabilität und Populationsstruktur von Grapevine leafroll-associated virus–1 Isolaten

Genetic variability of Grapevine leafroll–associated virus 1

Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV–1) gehört zur Gattung Ampelovirus der Familie Closteroviridae. Von mehreren Phloem limitierten Closteroviren ist GLRaV–1 ein Erreger der Blattrollkrankheit mit enger phylogenetischer Verwandtschaft zu Grapevine leafroll–associated virus 3 (GLRaV–3). Die Organisation des Einzelstrang RNA–Genoms mit zehn offenen Leserastern ist typisch für die Familie Closteroviridae, wobei GLRaV–1 als Besonderheit zwei Kopien des Hüllprotein–Duplikats besitzt. Begrenzte Sequenzinformationen einiger GLRaV–1 Isolate sind verfügbar. Bislang wurde ein Isolat (AF 195822) komplett sequenziert.

Die genetische Variabilität und potentiellen Rekombinationsereignisse sollten an einer Population von 48 Isolaten aus 14 verschiedenen Ländern untersucht werden. Dafür wurden spezifische Primerpaare in Genbereichen ausgesucht, die für die RNA abhängige RNA–Polymerase (RdRp), das Heatshock–70 Protein–Homolog (HSP70h) und das Hüllprotein (CP) kodieren.

Die Silica–capture–Methode wurde zur Totalnukleinsäure–Extraktion angewendet. Die virale RNA wurde mit Random Primern umgeschrieben und anschließend mittels PCR mit den spezifischen Primern amplifiziert. Die so erhaltene cDNA wurde kloniert und mittels Einzelstrang Konformations Polymorphismus (SSCP)–Methode und Sequenzierung analysiert.

Mit Hilfe der ClustalX –Software (Vers. 1.83) konnten die Nukleinsäuresequenzen verglichen werden. Die online verfügbare SNAP–Software ermöglichte die Ermittlung der Anzahl synonymer und nicht–synonymer Substitutionen.

Die SSCP Polyacrylamidgele zeigten zahlreiche Muster hinsichtlich des amplifizierten CP–Fragments. Für 35% der Isolate bestand dieses Muster aus mehr als drei Banden, vermutlich aufgrund der Infektion mit mehr als einer Variante von GLRaV–1 in diesen Isolaten. Zur Überprüfung wurden mehrere Klone dieser mischinfizierten Isolate sequenziert. Abweichungen in den Nukleinsäuresequenzen bestätigten das Vorhandensein unterschiedlicher Virusvarianten. Bisher konnte keine Hauptvariante festgestellt werden, weder innerhalb eines Isolats noch zwischen verschiedenen Isolaten. Das SSCP Muster ist sehr inhomogen und weist auf eine komplexe Populationsstruktur hin. Bisher wurden 60 Klone von 10 unterschiedlichen Isolaten sequenziert.

Innerhalb von 550 Nukleotide reichen die synonymen Substitutionen von Null bis 82.5 (15%) während die niedrigste und höchste Anzahl nicht–synonymer Substitutionen Null bzw. 32.5 (6%) ist. Die Substitutionsrate ist das Verhältnis beobachteter zu potentiellen Substitutionen. Sie liegt für synonyme Substitutionen bei durchschnittlich K_s=0.3 und für nicht–synonyme bei K_a=0.04, was auf einen hohen Selektionsdruck im CP–Genom hinweist. Das Verhältnis dieser Werte (K_a/K_s) war 0.13 und gleicht damit dem entsprechenden Wert einer genetischen Variabilitätsstudie an GLRaV–3.