

115-Thiele, K.¹⁾; Leisering, L.²⁾; Rabenstein, F.¹⁾; Cordes, C.²⁾; Smalla, K.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

²⁾ Hochschule Anhalt

Untersuchungen zur Diversität von *Acidovorax valerianellae*, dem Erreger bakterieller Blattflecken an Feldsalat

Seit 1999 treten in Deutschland schwarze Blattflecken an Feldsalat [*Valerianella locusta* (L.) Laterr.] auf, die auf einen Befall durch das Bakterium *Acidovorax valerianellae* (Av) zurückzuführen sind [1] und im Erwerbsanbau hohe Verluste verursachen. Die Symptome sind vor allem nach feuchten Witterungsperioden sichtbar und können eine Vermarktung beeinträchtigen oder unmöglich machen. Als Übertragungswege wurden der Boden und eine Kontamination des Saatgutes diskutiert [2]. Zur Lösung der offenen epidemiologischen Fragen wurden serologische und molekularbiologische Diagnosemethoden entwickelt. So wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper und Elektronenmikroskopie erstmals das Vorhandensein des Erregers im und am Feldsalat-Samen nach natürlicher Infektion nachgewiesen [3]. Ein TAS-ELISA ermöglicht die Diagnose von Saatgutbefall und durch eine PCR mit anschließender Hybridisierung mit markierter Sonde kann der Erreger in kontaminierten Böden nachgewiesen werden.

Zur Validierung dieser Methoden wurde eine Sammlung von ca. 50 Av-Isolaten verwendet und hinsichtlich ihrer Diversität charakterisiert. Dabei wurden mit Amplified Ribosomal Dna-Restriction Analysis (Ardra) [4] und nachfolgender Sequenzierung zwei 16S-rDNA-Varianten gefunden, die sich durch einen Basenpaaraustausch unterscheiden. Dieser Befund konnte durch BOX-PCR [5] bestätigt werden, zwei der drei so gefundenen Cluster korrelieren mit der einen 16S-Variante, der dritte BOX-Cluster mit der anderen 16S-Variante.

Westernblot-Analysen und die in den letzten Jahren zur Identifizierung und Klassifizierung von Bakterien etablierte Methode der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) [6] sollte diese Diversität auch auf Proteinebene bestätigen.

Literatur

- [1] MOLTSMANN, E., BLUM, E., DETZEL, P., RIESTERER, K., KRAUSS, J., SCHRAMEYER, K., 2000: Blattflecken an Feldsalat durch das Bakterium *Acidovorax valerianellae*. *Gemüse* 36[12], 10 - 12.
- [2] GRONDEAU, C. SAMSON, R., 2009: Detection of *Acidovorax valerianellae* in corn-salad seeds, seed transmission of the pathogen and disease development in the field. *Plant Pathology* 58, 846 - 852.
- [3] THIELE, K., SMALLA, K., KROPP, S. RABENSTEIN, F.: Detection of *Acidovorax valerianellae*, the causing agent of bacterial leaf spots in corn salad [*Valerianella locusta* (L.) Laterr.], in corn salad seeds. *Letters in Applied Microbiology* 54[2], 112 - 118
- [4] VANECHOUTTE, M., ROSSAU, R., DEVOS, P., GILLIS, M., JANSSENS, D., PAEPE, N., DEROUCK, A., FIERS, T., CLAEYS, G., KERSTERS, K., 1992: Rapid Identification of Bacteria of the Comamonadaceae with Amplified Ribosomal Dna-Restriction Analysis (Ardra). *Fems Microbiology Letters* 93, 227 - 234
- [5] MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T., ANDREW, P., PRUDHOMME, M., ALLOING, G., HAKENBECK, R., MORRISON, D. A., BOULNOIS, G. J., CLAVERYS, J. P., 1992: A Highly Conserved Repeated Dna Element Located in the Chromosome of *Streptococcus-Pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* 20, 3479 - 3483
- [6] SAUER, S., FREIWALD, A., MAIER, T., KUBE, M., REINHARDT, R., KOSTRZEWA, M. GEIDER, K.: Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLOS ONE* 3 [7] .

116-Bimerew, M.¹⁾; Yacouba, S.²⁾; Nabhan, S.¹⁾; Wydra, K.³⁾

¹⁾ Leibniz Universität Hannover

²⁾ Afica Rice Centre, Benin

³⁾ Georg-August-Universität Göttingen

Multilocus Sequence Analysis-Based Genotypic and Metabolic Characterization of Strains of the Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from West Africa

Bacterial leaf blight of rice (BLB) is one of the most important diseases of rice causing a substantial yield loss of 50 - 90 % in severe epidemics in Africa (Sere et al., 2005). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, causal agent of BLB, is known to exhibit a high degree of pathogen variability. Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) was carried out to analyze the population structure of pathogen strains from West Africa and of some reference strains from Asia using four housekeeping genes. Ten sequence types were identified. Neighbor joining nucleotide sequence analyses with the best fit model of Tamura-Nei Gamma distribution revealed a distinct aggregation of African strains of *X. oryzae* pv. *oryzae* apart from Asian ones and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. The result demonstrated that African strains of the pathogen are genetically distant from Asian strains. Metabolic fingerprinting using the BIOLOG GN microplate assay revealed variations among strains in utilization of 95 carbon sources, where eleven substrates were used by all the strains, 17 only by some and 67 not by any strain, allowing a grouping of strains

in five clusteral phylogroups. Virulence assays carried out on rice near isogenic lines carrying defined resistant genes demonstrated a significant difference in genotype by strain interaction.

118-Langer, J.¹⁾; Gentkow, J.²⁾; von Bargaen, S.¹⁾; Büttner, C.¹⁾

¹⁾ Humboldt-Universität zu Berlin

²⁾ Leibniz-Institut Halle

Variabilität Protein-kodierender Genombereiche des *Cherry leaf roll virus*

Variability of protein-coding genome regions of Cherry leaf roll virus

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) der Gattung *Nepovirus* (Comovirinae, Secoviridae) ist weltweit in einer Vielzahl von verschiedenen Wirtspflanzenarten aus 26 Pflanzengattungen, vornehmlich in Gehölzen, verbreitet. Die beiden genomischen einzelsträngigen RNA-Moleküle des CLRV kodieren für Polyproteine, die durch die virale Protease in die funktionellen Proteine gespalten werden. Die Genomvariabilität wurde anhand der RNA1-kodierten Proteine VPg, Protease, RdRP und des RNA2-kodierten Hüllproteins von CLRV-Isolaten aus verschiedenen Wirtspflanzen bestimmt. Auf der Basis von Nukleotid- und Aminosäuresequenzidentitäten differieren die Variabilitätswerte der untersuchten Proteine nur geringfügig bei maximal 22,7 % bzw. 15,1 %. Dagegen zeigte das Verhältnis von synonymen zu nicht-synonymen Nukleotidsubstitutionen, dass insgesamt auf alle untersuchten Protein-kodierenden Genombereiche ein hoher ($dS/dN > 1$), auf die Protease aber der signifikant höchste negative Selektionsdruck wirkt. Dieses lässt vermuten, dass beim CLRV die genetische Evolution der Protease stark eingeschränkt ist und in anderen Protein-kodierenden Genombereichen beispielsweise funktionelle Interaktionen mit wirtsartspezifischen Faktoren eine höhere Variabilität bedingen können.

119-Rott, M.; Büttner, C.; von Bargaen, S.

Humboldt-Universität zu Berlin

Heterologe Expression der viralen Proteinase des *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

Heterologous expression of the viral proteinase of Cherry leaf roll virus (CLRV)

Cherry leaf roll virus (CLRV), ein *Nepovirus* der Subgruppe C, gehört zur 2009 eingeführten Familie der Secoviridae (Sanfacon et al., 2009). Das bipartite Genom besteht aus einzelsträngiger RNA, die zwei Polyproteine (P1 und P2) kodiert. 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 neben einer Region am 5'-Ende, der noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, das movement Protein (MP), sowie das coat Protein (CP) (von Bargaen et al., 2012). Die Polyproteine werden posttranslational durch die virale Proteinase zu funktionellen Einheiten prozessiert. Die Analyse der Vollängensequenz zeigt diverse putative Prozessierungsstellen, die analog zu experimentell bestätigten Schnittstellen verwandter Proteinasen aus den Nepoviren *Tomato ringspot virus* (ToRSV, Wang et al., 1999, Wang und Sanfacon, 2000) und *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV, Wetzel et al., 2008) liegen. Zur funktionalen Charakterisierung der Proteinase von CLRV wird diese, sowie Bereiche des P2-Polyproteins, die putative Erkennungsstellen kodieren, heterolog in *E. coli* exprimiert. Anschließend erfolgt die native Aufreinigung der Proteine unter Verwendung eines N-terminalen His-Tags über NTA-Agarose. Die proteolytische Aktivität der Proteinase, sowie die putativen Prozessierungsstellen des P2 werden *in vitro* experimentell verifiziert.

120-Landgraf, M.¹⁾; von Bargaen, S.¹⁾; Bandte, M.¹⁾; Büttner, C.¹⁾; Jalkanen, R.²⁾; Bergmann, K.-C.³⁾; Kube, M.¹⁾; Kneipp, J.¹⁾; Vogel, L.⁴⁾; Behrendt, H.⁵⁾

¹⁾ Humboldt-Universität zu Berlin

²⁾ Finnish Forest Research Institute, Finland

³⁾ Allergie-Centrum-Charité Berlin

⁴⁾ Paul-Ehrlich-Institut

⁵⁾ Technische Universität München

Alteration of allergen potential by *Cherry Leaf Roll Virus* (CLRV) in infected birch pollen

Our group has a major focus on the *Cherry Leaf Roll Virus* – CLRV a virus in trees which was correlated to a birch decline observed in Finland. The plant virus *Cherry leaf roll virus* infects many woody and herbaceous species and is widespread in temperate regions. The medical importance of the plant virus CLRV was never investigated. A negative impact on human health has to be seen in an allergen reaction to the virus modified pollen. Up to 80 %