

inokulierter *Chenopodium quinoa* Pflanzen. Eine Rückübertragung auf verschiedene Gräserarten, vorwiegend aus dem Tribus *Aveneae* bzw. *Poeae*, war erfolgreich. Beide Virusisolate konnten in Hafer vermehrt, mittels Ultrazentrifugation gereinigt und für Antiserumgewinnung verwendet werden. Für beide Viren, deren Genomorganisation typisch für monopartite Potyviren ist, konnte die komplette Genomsequenz ermittelt werden. Anhand der phylogenetischen Analysen können diese Viren den beiden Genera *Tritimovirus* bzw. dem neuen Genus *Poacevirus* zugeordnet werden.

Ein weiteres Kriterium für die Zuordnung zu den beiden genannten Genera sind die für den jeweiligen Genus charakteristischen Schnittstellen der vom Virusgenom kodierten Proteasen (cleavage sites). Diese stimmen im Fall des *Festuca*-Virus weitgehend mit denen des TriMV bzw. SCSMV überein, während das *Dactylis*-Virus hier am meisten den beiden Mitgliedern des Genus *Tritimovirus* ONMV bzw. WSMV ähnelt. Für die beiden neuen Virusarten werden die Bezeichnungen *Cocksfoot streak mosaic virus* bzw. *Festuca necrotic streak virus* vorgeschlagen.

50-2 - Vetten, H.-J.¹⁾; Grigoras, I.²⁾; Gronenborn, B.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ Institut des Sciences du Végétal, CNRS, Frankreich

Erster Nachweis eines *Nanovirus* für Deutschland und Zentraleuropa

First report of a *Nanovirus* from Germany and Central Europe

Nanoviren wie das *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV) und *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) haben ein zirkuläres, multipartites (aus acht Komponenten bestehendes) Einzelstrang-DNA-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. In Europa sind sie – abgesehen von einem sporadischen Auftreten des FBNYV in Spanien (Mallorca und Murcia) – bisher noch nicht gefunden worden. 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 Stauchesympptome 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 sechs 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 teilweise in ein Produkt von ca. 1 kb umwandeln ließ. Klonierung und Sequenzierung dieser DNA lieferten eindeutige Hinweise für das Vorliegen einer zirkulären DNA von 1.002 Nukleotiden, die als vollständige DNA-R-Komponente eines neuen Mitglieds der Gattung *Nanovirus* identifiziert wurde. Sie weist Nukleotidsequenzidentitäten von lediglich 73 bis 79 % mit den bisher bekannten Nanoviren auf. Nach Behandlung des hochmolekularen RCA-Produkts mit zehn weiteren Endonucleasen gelang danach auch die Klonierung der sieben anderen Komponenten des Nanovirusgenoms. Sequenzierung der acht DNAs zeigte, dass sie etwa gleich groß [von 978 (DNA-U1) bis 1.002 Nukleotiden (DNA-R) und in Bezug auf Lage und Orientierung von konservierten Bereichen und ORFs sehr ähnlich strukturiert sind. Das von uns charakterisierte *Nanovirus*-Isolat D15 wies mit anderen Nanoviren eine Gesamtnukleotidsequenzidentität von nur 61 bis 64 % und eine Hüllproteinsequenzidentität von lediglich 51 bis 57 % auf. Da es damit die molekularen Kriterien (Gesamtnukleotidsequenzidentität von < 75 % und Unterschiede in der Hüllproteinamino säuresequenz von > 15 %) für die Unterscheidung von Nanovirusarten ohne weiteres erfüllt, kann das Erbsenisolat D15 als Vertreter einer neuen Nanovirusart angesehen werden, für die der Name *Pea necrotic yellow dwarf virus* vorgeschlagen wird.

50-3 - Menzel, W.¹⁾; Barg, E.²⁾; Vetten, H.-J.²⁾

¹⁾ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); ²⁾ Julius Kühn-Institut

Erster Nachweis des *Carrot thin leaf virus* für Deutschland und Europa und Untersuchungen zur Variabilität und Verbreitung

Vor mehreren Jahren konnten wir aus einer Pastinakpflanze aus Braunschweig überraschend ein *Potyvirus* isolieren, welches durch Sequenzierung des 3'-Endes des Genoms eindeutig als Isolat des *Carrot thin leaf virus* (CTLV; Gattung *Potyvirus*) identifiziert werden konnte. Das CTLV war bis dahin nur aus den USA bekannt.

Mittels eines gegen das Pastinakisolat hergestellten Antiserums konnte CTLV in den Folgejahren vereinzelt in Möhren verschiedener Herkünften in Deutschland nachgewiesen werden. Serologisch lässt sich das CTLV eindeutig von den anderen an Umbelliferen vorkommenden Potyviren wie z. B. *Apium virus Y*, *Carrot virus Y* und *Celery mosaic virus* unterscheiden. CTLV verursacht an Möhre eine auffällige Fadenblättrigkeit, je nach Kulturbedingungen (insbesondere Gewächshaus) bleiben die infizierten Pflanzen auch völlig symptomlos.

Auf der Suche nach möglichen Überwinterungswirten wurde CTLV in zahlreichen Gierschproben verschiedener Standorte gefunden, die teilweise deutliche Virussympptome (Scheckung, Chlorosen) zeigten. Auch hier konnte an einzelnen Standorten ein deutliches Abschwächen der Symptome über den Sommer beobachtet werden. Da Giersch als weit verbreitete und ausdauernde Pflanzenart in Europa und Asien vorkommt, stellt sie eine mögliche Virusquelle dar. Untersuchungen des Hüllproteingens zeigten eine teils hohe Variabilität zwischen verschiedenen Isolaten. Die Aminosäuresequenzen des Hüllproteins variierten bis zu 14 %, wobei die Unterschiede insbesondere am N-Terminus vorliegen. In Versuchen mit der an Umbelliferen verbreiteten Lausart *Cavariella aegopodii* konnte eine Übertragbarkeit von Gierschisolaten des CTLV auf nicht-persistente Weise auf Möhre nachgewiesen werden.

50-4 - Maiss, E.¹⁾; Menzel, W.²⁾; Vetten, H.-J.³⁾

¹⁾ Leibniz Universität Hannover; ²⁾ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ);

³⁾ Julius Kühn-Institut

Molekulare Charakterisierung des *Parsley latent virus* (PILV)

Molecular Characterization of *Parsley latent virus* (PILV)

Im Jahr 1979 beschrieben Bos et al. [1] das Vorkommen des *Parsley latent virus* (PILV) in Petersilie (*Petroselinum crispum*). In 17 von 24 getesteten Petersiliensorten aus fünf verschiedenen europäischen Ländern wurde das Virus nachgewiesen, jedoch zeigten die infizierten Pflanzen keinerlei sichtbare Symptome. Gereinigte Viruspartikel wiesen einen Durchmesser von ca. 27 nm auf, mit einem RNA Gehalt von 36 %. Das Molekulargewicht des Hüllproteins wurde mit ca. 22 kDa bestimmt. Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war es, die komplette Sequenz des PILV zu ermitteln, um eine taxonomische Eingruppierung des Virus vornehmen zu können. Darüber hinaus sollten aktuelle Petersiliensorten auf das Vorhandensein des PILV getestet werden.

PILV enthält zwei einzelsträngige (+)RNAs. Die kompletten Sequenzen der RNA1 und RNA2 wurden mit 7.022 Basen bzw. 3.418 Basen ohne den 3'-poly(A)Schwanz bestimmt. Sowohl im 5'- wie im 3'-nicht translatiertem Bereich weisen beide RNAs Sequenzidentitäten auf, was darauf hindeutet, dass diese Bereiche eine Funktion bei der Replikation und/oder Verpackung der RNAs haben könnten. RNA1 und RNA2 zeigen jeweils ein durchgängiges offenes Leseraster (ORF), welches für RNA1 ein Protein mit einem MW von 256.8 kDa und für RNA2 ein MW von 114.7 kDa ergibt. Anhand von Sequenzanalysen und Motifvergleichen auf RNA1 kodierten Polyproteins kann auf das Vorliegen einer Helikase, einer RNA-abhängigen RNA Polymerase (RdRp), einer Protease vom Cystein-Typ (C-pro) und eines Proteasekofaktors (Pro-co) geschlossen werden. Das Polyprotein, kodiert durch RNA2, enthält am N-Terminus eine LDL-Movementproteinmotif. Des Weiteren sind in diesem Polyprotein drei Proteine mit Molekulargewichten um 22 kDa enthalten, welche die mutmaßlichen Hüllproteine repräsentieren. Sequenzvergleiche erbrachten die höchsten Ähnlichkeiten des PILV mit dem *Cherry rasp leaf virus* [2] und dem *Apple latent spherical virus* [3], so dass eine Einordnung in das Genus *Cheravirus* diskutiert wird.

Basierend auf den PILV Sequenzen wurden Oligonukleotide entwickelt, die es erlauben, mittels RT-PCR einen PILV Nachweis zu führen. In RT-PCRs wurden zehn Petersiliensorten (drei mit krausen Blättern, sieben mit glatten Blättern) auf das Vorkommen von PILV getestet. PILV wurde in keiner Petersiliensorte mit glatten Blättern nachgewiesen. In allen drei getesteten Petersiliensorten mit krausen Blättern ('Mooskrause 2', 'Afrodite', 'Gekruld/Triplex') konnte das PILV nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sind geplant, die zeigen sollen, ob das Virus in allen gegenwärtig genutzten krausblättrigen Sorten verbreitet ist und wie sich der Virusbefall auf den Ertrag dieser Petersiliensorten auswirkt.

Literatur

- [1] Bos, L., Huttinga, H., and Maat, D. Z. (1979). *Parsley Latent Virus*, a new and prevalent seed-transmitted, but possibly harmless virus of *Petroselinum Crispum*. Netherlands Journal of Plant Pathology 85(3), 125-136.
- [2] James, D. (2004). Nucleotide sequence analysis and detection of *cherry rasp leaf virus*. Proceedings of the Sixth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops: Fruit Tree Diseases(657), 99-101.
- [3] Li, C. J., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Yoshida, K., and Koganezawa, H. (2000). Nucleotide sequence and genome organization of *Apple latent spherical virus*: a new virus classified into the family Comoviridae. Journal of General Virology 81, 541-547.