

Nachweis und Eliminierung von Pflanzenviren in Dahlien



Sabine Oster¹, Edgar Maiss² und Traud Winkelmann¹

¹Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften, ²Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Leibniz Universität Hannover
sabine-oster@gmx.de, traud.winkelmann@zier.uni-hannover.de

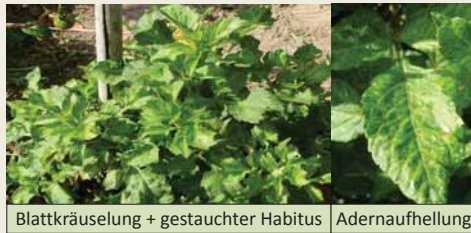
Hintergrund

Die vegetative Vermehrung von Dahlien durch Nutzung von Stecklingen und Knollenteilung erhöht das Risiko der Virusübertragung und -verbreitung. Weltweit sind Virusinfektionen in Dahlien ein großes Problem und senken ihren ökonomischen Wert.

Pflanzenmaterial

22 *Dahlia variabilis* hort. Genotypen (teilweise historisch wertvoll) mit Virussymptomen wurden vom Dahlienzüchter Prof. Otto aus Lüneburg und dem Dahlienzentrum in Bad Köstritz zur Verfügung gestellt.

Beispiele für typische Symptome an Dahlien bei Virusbefall



Zielsetzung

Gewinnung von virusfreien Dahlien durch Meristem-/Sprossspitzenkultur.

Entwicklung von PCR basierten Protokollen für den Nachweis von Dahlia Mosaic Virus (DMV), Tobacco Streak Virus (TSV) und Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV).

Viruseliminierung durch Sprossspitzenkultur

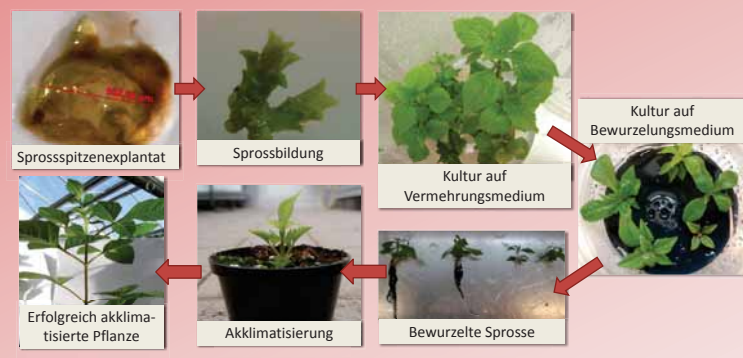
Material und Methoden:

- Oberflächensterilisation: 70% Ethanol, 5% NaOCl
- Nährmedien auf Basis des MS-Mediums mit Zugabe von PGRs und Aktivkohle

| Phase | BAP [mg/l] | IAA [mg/l] | NAA [mg/l] | GA3 [mg/l] | Aktivkohle [g/l] |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------------|
| Etablierung | 0,5 | 0,2 | - | - | - |
| Vermehrung | 0,2 | 0,2 | - | 1 | - |
| Bewurzelung | - | - | 0,5 | - | 2 |

- Kulturbedingungen: 24°C, Licht/Dunkel-Rhythmus 16/8 h, Etablierung und Vermehrung jeweils 6 Wochen, Bewurzelung 2 Wochen

Entwicklung von Dahlien aus Sprossspitzenkulturen:



Virusnachweis durch PCR

Es wurden die Ausgangspflanzen, sowie die aus Sprossspitzenkultur hervorgegangenen Dahlien auf die drei oben genannten Viren getestet.

Übersicht der PCR-Bedingungen für den Nachweis von DMV und TSV/TSWV:

| Phase | Nachweis von DMV | | | Nachweis von TSV/TSWV | | |
|--------------------------|------------------|-----------|--------------|-----------------------|-----------|--------------|
| | °C | Min : sek | Zyklusanzahl | °C | Min : sek | Zyklusanzahl |
| Initiale Denaturierung | 94 | 5:00 | 1 | 98 | 0:10 | 1 |
| Denaturierung | 94 | 0:30 | 49 | 98 | 0:05 | 34 |
| Annealing | 39 | 0:30 | | 58 | 0:05 | |
| Elongation | 72 | 0:45 | 1 | 72 | 0:10 | 1 |
| Abschließende Elongation | 72 | 7:00 | | 72 | 5:00 | |

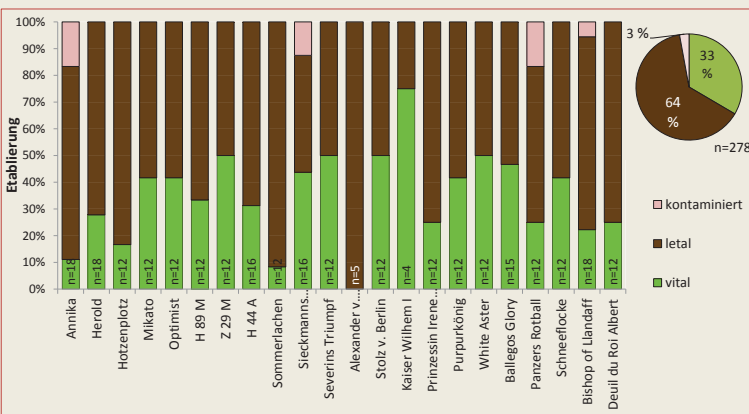
Nachweis von DMV:

- dsDNA-Virus (*Caulimoviridae*)
 - Isolation der DNA aus Blattmaterial (Kit der Firma Macherey Nagel)
 - PCR mit degeneriertem Primerpaar¹
- alle Ausgangspflanzen und Dahlien aus Sprossspitzenkultur wurden positiv auf DMV getestet



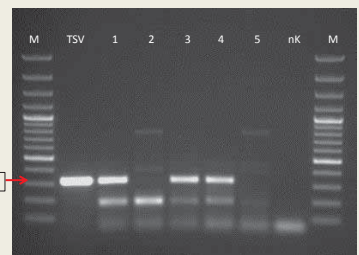
Primerpaar: Den518-F/Den1156
vgD: virusgetestete Dahlie, 1-8: Dahlien-Genotypen aus in-vitro Kultur, nK: Negativkontrolle H₂O

Etablierungserfolg der Sprossspitzenkulturen in den ersten 6 Wochen:



Nachweis von TSV:

- ssRNA(+)-Virus (*Bromoviridae*)
 - Isolation der RNA aus Blattmaterial (Kit der Firma Stratec molecular), mit anschließendem DNase-Verdau
 - cDNA-Synthese und PCR mit spezifisch abgeleitetem Primerpaar
- Ausgangspflanzen von 17 der 21 Genotypen waren infiziert
➤ von 17 infizierten wurden 9 Genotypen nach Sprossspitzenkultur negativ getestet



TSV: Positivkontrolle, 1-5: Dahlien-Genotypen aus in-vitro Kultur, nK: Negativkontrolle H₂O

(Testung auf TSWV wurde auf die gleiche Weise durchgeführt.)

In-vitro Kultureigenschaften der verschiedenen Genotypen:

| | Durchschnittliche Rate | Min./Max. |
|------------------|------------------------|------------|
| Vermehrung | 2,9 ± 1,9 | 2,2 / 5 |
| Bewurzelung | 51 % ± 35,1 | 16% / 96% |
| Akklimatisierung | 90,9 % ± 20,3 | 40% / 100% |

- Kontaminationsrate der Sprossspitzenkulturen war sehr gering
- Großteil der Explantate ist abgestorben
- Etablierung für 21 von 22 Genotypen war erfolgreich
- Trotz starker Variabilität in der Fähigkeit Wurzeln zu bilden, war die Akklimatisierungsrate der In-vitro-Pflanzen sehr hoch.

Fazit

- Eliminierung von DMV durch Sprossspitzenkultur ist nicht möglich. Es wurde berichtet, dass ein DMV-Stamm als endogenes Pararetrovirus integriert im Genom der Dahlie vorliegt und >90% der Dahlien mit DMV infiziert sind².
- Eliminierung von TSV konnte durch Sprossspitzenkultur erreicht werden.

Literatur: (1) Pahalawatta, V., Miglino, R., van Schadewijk A. R. und Pappu, H. R. (2007): Incidence and relative prevalence of distinct Caulimoviruses (Genus *Caulimovirus*, Family *Caulimoviridae*) associated with Dahlia Mosaic in *Dahlia variabilis*. Plant Disease Vol. 91 (9) 1194-1197.
(2) Eid, S. Saar, D. E., Druffel, K. L. and Pappu, H. R. (2010): Plant pararetroviral sequences in wild *Dahlia* species in their natural habitats in Mexican mountain ranges. Plant Pathology Vol. 60 (2) 378-383.