



Prof. Dr. Edgar Maiss
Dipl. Ing. agr. Wulf Menzel
Universität Hannover
Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz
Abt. Molekulare Pflanzenpathologie und Virologie
Herrenhäuser Strasse 2, 30419 Hannover



Schlussbericht des Forschungsauftrages 98HS043

“Entwicklung, Optimierung und Erprobung von Nachweisverfahren von Viren an Apfel”

Laufzeit und Berichtszeitraum 01.10.1999 bis 30.09.2002

Kooperationen und unterstützende Stellen:

Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover (Dr. Zahn)
Wunstorfer Landstrasse 9, 30453 Hannover

BBA Dossenheim (Dr. Jelkmann, Dr. Seemüller)
Schwabenheimer Strasse 101, 69221 Dossenheim

BBA Braunschweig (Dr. Lesemann, Dr. Vetten)
Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

Landespflanzenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern (Dr. Kruse)
Graf-Lippe-Strasse 1, 18059 Rostock

Inhaltsverzeichnis

1 Ziele und Aufgabenstellungen des Projekts	1
1.1 Planung und Ablauf des Projekts	1
1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	2
1.2.1 Nachweisverfahren für ACLSV, ASGV, ASPV und ApMV	2
1.2.2 Ersatz der Gelelektrophorese durch ELISA-ähnliche Techniken	4
1.2.3 Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW)	4
1.2.4 Viroidnachweis	5
1.2.5 Fruchtvirosen an Apfel	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Chemikalien	9
2.1.2 Enzyme und Reaktionspuffer	11
2.1.3 Medien	15
2.1.4 Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren	16
2.1.5 Bakterienstämme	16
2.1.6 Geräte	16
2.1.7 Software	17
2.1.8 Sonstiges Material	17
2.1.9 Verwendete Proben und Virusisolate	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Indikatorrestung der Gehölze	19
2.2.2 Verwendetes Pflanzenmaterial	20
2.2.3 Phenol-Chloroform Extraktion	21
2.2.4 Natriumacetat-Ethanol Fällung	21
2.2.5 Gesamtnukleinsäureextraktion mit Silica Partikeln	22
2.2.6 Gesamtnukleinsäure-Schnellextraktion	23
2.2.7 RNA Extraktion mit dem QIAGEN RNeasy Kit	24
2.2.8 DNA Extraktion mit dem QIAGEN DNeasy Kit	24
2.2.9 Primerdesign	24
2.2.10 Standard RT-PCR	26
2.2.11 Kontrollen in der RT-PCR	27
2.2.12 Viroidnachweis mittels RT-PCR	31

2.2.13 Multiplex RT-PCR	32
2.2.14 Gelelektrophorese	34
2.2.15 Herstellung des λ-<i>Pst</i>I DNA Standards	35
2.2.16 DNA Isolierung aus Agarose-Gelen	35
2.2.17 Vektor Herstellung und Ligation	36
2.2.18 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden	37
2.2.19 Selektion transformierter Zellen	39
2.2.20 Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA	39
2.2.21 Kontrolle der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau	40
2.2.22 Aufarbeitung der Plasmide für die Auftragssequenzierung	41
2.2.23 Erstellung von Dauerkulturen	41
2.2.24 Multiplex RT-PCR-ELISA	41
2.2.25 Ersatz der NucleoLink-Strips (Nunc) durch DNA-Immobilizer (EXIQON)	45
2.2.26 Nachweis von PCR-Produkten mittels DIG-Detection Test-Strips (Roche)	45
2.2.27 Untersuchungen zur Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW)	46
2.2.27.1 PCR Nachweis von Phytoplasmen	46
2.2.27.1.1 Nested PCR nach Bertaccini <i>et al.</i> (1998)	47
2.2.27.1.2 Nested PCR nach Seemüller (pers. Mitteilung)	49
2.2.27.1.3 Nested PCR nach Heinrich <i>et al.</i> (2002)	50
2.2.27.2 Nachweistechiken für nicht charakterisierte Viren	52
2.2.27.2.1 Elektronenmikroskopie	52
2.2.27.2.2 Anzucht und Kultur von Pflanzen im Gewächshaus	53
2.2.27.2.3 Übertragungsversuche	53
2.2.27.2.4 Stamminokulation von Bakterien	54
2.2.27.2.5 DsRNA Extraktion	55
2.2.27.2.6 SISPA-Technik	56
2.2.27.2.7 Subtraktion von cDNA	57
2.2.27.2.8 Umkehr-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (R-PAGE)	68
3 Ergebnisse	69
3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	69
3.1.1 Apfelmavirusnachweis	69
3.1.1.1 Extraktionsverfahren	69

3.1.1.2 Interne Kontrolle	70
3.1.1.3 Multiplex RT-PCR	71
3.1.1.3.1 Erprobung mit verschiedenen Virusherkünften	71
3.1.1.3.2 Ermittlung der Detektionsgrenzen	73
3.1.1.3.3 Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen	74
3.1.1.4 Multiplex RT-PCR-ELISA	76
3.1.1.4.1 Vergleich der Detektionsgrenzen von Gelelektrophorese und ELISA	77
3.1.1.4.2 Vergleichstest NucleoLink-Strips (Nunc)/DNA-Immobilizer (EXIQON)	78
3.1.1.5 Nachweis von PCR-Produkten mittels DIG-Detection Test-Strips (Roche)	79
3.1.1.6 Paralleltestung Apfelmur infizierter Proben mit dem Pflanzenschutzamt Hannover-Ahlem	80
3.1.2 Viroidnachweis	81
3.1.3 Fruchtvirosen	83
3.1.4 Gummiholz (ARW)	84
3.1.4.1 Nachweis von Phytoplasmen	84
3.1.4.2 Übertragungsversuche	85
3.1.4.3 Extraktion von dsRNA	86
3.1.4.4 SISPA Technik	87
3.1.4.5 cDNA Subtraktion	88
3.1.4.6 Viroidnachweis aus ARW infizierten Pflanzen	90
3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	91
4 Zusammenfassung	94
5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen (weiterführende Fragestellungen)	96
6 Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit	99
7 Abbildungsverzeichnis	101
8 Tabellenverzeichnis	103
9 Literaturverzeichnis	104
10 Anhang	114

Abkürzungen

%	Prozent
α	Alpha
β	Beta
™	Trade Mark
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A	Adenin
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs	absolut
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
ADFVd	<i>Apple dimple fruit viroid</i>
AFCVd	<i>Apple fruit crinkle viroid</i>
AGOZ	Anbauverordnung für Gemüse-, Obst- und Zierpflanzenarten
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
ApMV	<i>Apple mosaic virus</i>
APScbV	Apple platycarpa scaly bark virus
ARW	Apple rubbery wood
as	antisense
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>
ASpdV	Apple Spy epinasty and decline virus
ASPV	<i>Apple stem pitting virus</i>
ASSVd	<i>Apple scar skin viroid</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BBA	Bilologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin

ca.	cirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CSVd	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>
cv	cultivar
d.h.	das heißt
DAPI	Diamidino-2-Phenylindol (Nukleinsäurefarbstoff)
dATP	Desoxyadenosin- Triphosphat
DAVd	<i>Dapple apple viroid</i>
dCTP	Desoxycytidin- Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin- Triphosphat
DIAPOPS	Nachweis von auf Kunststoffoberflächen immobilisierten Amplikons
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosid- Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidin- Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin- Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzym gekoppelter, Antikörper gebundener Nachweis (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
EM	Elektronenmikroskop
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fa.	Firma
FL	Flat limb
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,8 m/s ²)
G	Guanin
h	Stunde
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare

klx	Kilolux
l	Liter
λ	Lambda
LM	niedrigschmelzend (low melting)
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Mehrfachklonierungsort (multiple cloning site)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
<i>nad5</i>	NADH Dehydrogenase Untereinheit 5
NCBI	Biotechnologieinformationszentrum der Vereinigten Staaten von Amerika (National Center for Biotechnology Information)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OD _{550nm}	optische Dichte gemessen bei 550 nm
PBCVd	<i>Pear blister canker viroid</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Polyethylen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
P-PAGE	Umkehr-Polyacrylamid Gelelektrophorese
PRSVd	<i>Pear rusty skin viroid</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	sense
sek	Sekunden
SISPA	Sequenz-unabhängige Amplifikation mit einem Primer
spec.	Spezies

ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
u	Einheiten (units)
u.a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

Die Abkürzungen verwendeter Chemikalien sind in Kap. 2.1.1 aufgeführt.

Botanische Nomenklatur nach: RHS-Index of garden plants (Griffith, 1994).

1 Ziele und Aufgabenstellungen des Projekts

Als Routinenachweis von Pflanzenviren werden in der Regel serologische Verfahren eingesetzt. Diese Nachweismethodik wird jedoch insbesondere bei Gehölzen oftmals durch niedrige Viruskonzentrationen und hohe Hemmstoffgehalte limitiert. Zudem sind in vielen Fällen keine oder nur mangelhafte Antiseren verfügbar.

Diese Situation ist bei den Viren an Apfel besonders gravierend und führt dazu, daß in den Pflanzenschutzämtern (z.B. Hannover-Ahlem) die langwierigen (Abschlußbonitur im 2./3. Jahr) und teuren Indikatortests mit holzigen Indikatorpflanzen durchgeführt werden. Als Alternative bieten sich Nukleinsäure-gestützte Verfahren (insbesondere RT-PCR, RT-PCR-ELISA) an.

In diesem Projekt sollen auf der RT-PCR basierende Verfahren für die Diagnose der wirtschaftlich wichtigen Viren (*Apple mosaic virus*, ApMV; *Apple stem pitting virus*, ASPV; *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV; *Apple stem grooving virus*, ASGV) an Apfel entwickelt, optimiert und erprobt werden. Bei den erfaßten Viren handelt es sich ausschließlich um Pathogene, auf die im Rahmen der "Verordnung über das Inverkehrbringen von Anbaumaterial von Gemüse-, Obst- und Zierpflanzenarten sowie zur Aufhebung der Verordnung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten im Obstbau (Anonym, 1998) zur Anerkennung von Anbaumaterial von Kern- und Steinobst eine Virustestung erforderlich ist. Dabei soll besonders die Einsetzbarkeit der entwickelten Verfahren als Routinetest z.B. in den Pflanzenschutzämtern berücksichtigt werden, was unter anderem den möglichen Ersatz gelelektrophoretischer Verfahren durch z.B. ELISA-ähnliche Techniken und die generelle Berücksichtigung der möglichen Kosten einschließt. Desweiteren soll versucht werden, Erkenntnisse über die Ätiologien der Erreger der Fruchtvirose an Apfel und der Gummiholzkrankheit (ARW) zu gewinnen. Eine Überprüfung des möglichen Zusammenhangs der Fruchtvirose mit den bekannten Viroiden an Kernobst, über deren Verbreitung in Deutschland bisher keine Informationen vorliegen, soll durchgeführt werden.

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

Der im Projektantrag enthaltene Arbeitsplan gliedert sich thematisch in 4 Bereiche.

1. Eindeutiger Schwerpunkt ist die Entwicklung eines jahreszeitlich unabhängigen Routinenachweisverfahrens zum Nachweis von ACLSV, ASGV, ASPV und ApMV. Dies beinhaltet die Erprobung von Verfahren zur Isolierung von Gesamtnukleinsäure aus Pflanzengewebe und die Überprüfung der Amplifizierbarkeit der extrahierten RNA.

Anschließend sollen für den Nachweis der Viren geeignete Oligonukleotide (Primer) entwickelt, an einem größeren Probenumfang erprobt und optimiert werden. Das Nachweisverfahren soll für den Ersatz der Gelelektrophorese zu einem kombinierten RT-PCR-ELISA Verfahren weiterentwickelt werden. Dafür soll die Eignung von NucleoLink Strips (Nunc) zum Nachweis der RT-PCR Produkte überprüft und gegebenenfalls optimiert werden.

2. Ein weiteres Ziel ist es, neue Erkenntnisse über die Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit zu gewinnen. Dazu sollen unterschiedliche Primer für den unspezifischen Nachweis von Phytoplasmen an verschiedenen Gummiholz-Isolaten verwendet werden.

3. Ausserdem sollen Primer für den Nachweis von Viroiden an Apfel und Birne erprobt und an verdächtigen Proben eingesetzt werden, um Informationen über das Auftreten und die mögliche Verbreitung der Viroide in Deutschland zu erhalten.

4. Ein weiteres Ziel ist die Überprüfung des Zusammenhangs von an Apfel auftretenden Fruchtviren mit den an Apfel bekannten Viren und Viroiden. Hierbei sollen auch die unter Punkt 1 und 3 entwickelten neuen Verfahren eingesetzt werden.

Die einzelnen thematischen Bereiche bauen teilweise aufeinander auf, so daß eine gewisse zeitliche Abhängigkeit vom Erreichen der entsprechenden Ergebnisse der anderen Unterpunkte für die Bearbeitung besteht.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.2.1 Nachweisverfahren für ACLSV, ASGV, ASPV und ApMV

Schwerpunkt des Projekts war die praxisreife Entwicklung eines PCR-basierten Nachweisverfahrens, das für die Routinetestung einsetzbar ist, da derzeit an den Pflanzenschutzämtern immer noch die Testung auf diese vier bereits molekular charakterisierten Viren (*Apple mosaic virus*, ApMV; *Apple stem pitting virus*, ASPV; *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV; *Apple stem grooving virus*, ASGV) an Apfel mittels holziger Indikatoren durchgeführt wird (siehe dazu Kapitel 2.2.1). Bei den ausgewählten Viren handelt es sich ausschließlich um Erreger, auf die im Rahmen der "Verordnung über das Inverkehrbringen von Anbaumaterial von Gemüse-, Obst- und Zierpflanzenarten sowie zur Aufhebung der Verordnung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten im Obstbau" (Anonym, 1998) zur Anerkennung von Anbaumaterial von Kern- und Steinobst eine Testung erforderlich ist. Die Viren verursachen an den Apfel-Kultursorten nur in wenigen Ausnahmen

eindeutige Symptome und werden deshalb auch als latente Kernobstviren bezeichnet. So verursacht das ApMV vereinzelt ein blassgelbes Mosaik (z.B. an 'Gala', 'Lord Lambourne') auf den Blättern (Nemeth, 1986) und bei wenigen ACLSV-Isolaten konnte die Ausbildung von Ringberostung auf den Früchten nachgewiesen werden (z.B. an 'Golden Delicious', 'Jonathan') (Desvigne *et al.*, 1999). In Ertragsvergleichsuntersuchungen mit virusfreien Bäumen konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Viren, insbesondere in häufig vorkommenden Mischinfektionen (Zahn, 1996), zu hohen Ertragseinbußen (bis zu 60%) führen können (u.a. Campbell, 1963; Posnette *et al.*, 1963, Schmidt, 1972). Das Einzelfruchtgewicht und die Anzahl der Früchte ist verringert und der Wuchs der Apfelbäume ist häufig gestaut.

Die verwendete Indikatorrestung hat den Nachteil, daß gesicherte Ergebnisse erst im 2. oder 3. Jahr vorliegen und damit verbunden auch hohe Kosten entstehen. In der Vergangenheit sind für alle vier Viren ELISA-Tests entwickelt worden, die eine Verkürzung der Nachweisdauer auf ca. 2 Tage ermöglichen und eine sehr kostengünstige Alternative darstellen. Nachteilig ist jedoch, daß diese serologische Nachweismethodik bedingt durch geringe Viruskonzentrationen und hohe Störanfälligkeit gegenüber Hemmstoffen beeinträchtigt wird. Erschwerend kommt hinzu, daß für die Viren teilweise nur mangelhafte oder gar keine Antiseren (ASPV) kommerziell erhältlich sind (Nemchinov und Hadidi, 1998). Aus diesen Gründen konnte sich die ELISA-Testung, die zum Beispiel in der Kartoffelvirustestung etabliert ist, in der Apfelvirustestung nicht durchsetzen. Nachdem in den neunziger Jahren von allen vier Viren Nukleinsäuresequenzen vorlagen, wurden auch zahlreiche RT-PCR basierte Nachweisverfahren entwickelt (u.a. Candresse *et al.*, 1995; Rowhani *et al.*, 1995; Kinard *et al.*, 1996; Jelkmann und Keim-Konrad, 1997; James, 1999), die sich weitgehend deutlich in der Durchführung unterscheiden (verwendetes Pflanzenmaterial, Extraktionsverfahren, Ein- oder Zweischritt RT-PCR). Zudem lagen zu Beginn des Projekts Sequenzen weiterer Isolate vor, was eine Optimierung der verwendeten Primer notwendig machte, um alle bekannten Isolate zu erfassen. Aus diesen Gründen sollte ein neues Nachweisverfahren entwickelt werden, was es ermöglicht, aus einem Nukleinsäureextrakt eines Pflanzengewebes alle Viren unter gleichen Bedingungen nachweisen zu können.

Die Implementierung einer Internen Kontrolle (in der RT-PCR coamplifizierte pflanzliche RNA zum Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse aufgrund von Hemmstoffen oder RNA-Degradierung, siehe Kap. 2.2.11), die in allen bisher veröffentlichten Nachweisverfahren der vier Apfelviren fehlt und in den teilweise beschriebenen Immunocapture Verfahren auch nicht

möglich ist, war zur Erhöhung der Testsicherheit ebenfalls geplant. In der Literatur sind vereinzelt interne Kontrollen für Pflanzen zu finden (z.B. Bariana *et al.*, 1995; Nassuth *et al.*, 2000; Pastrik, 2000) die allerdings alle nicht zwischen RNA und DNA unterscheiden, so daß eine vollständige Eliminierung der DNA vor Durchführung der RT-PCR notwendig ist, da sonst die Amplifikation der internen Kontrolle von DNA erfolgen kann. Das macht die Einbeziehung eines DNase-Verdau in das Extraktionsverfahren unabdingbar, da auch als RNA-Extraktionen bezeichnete Verfahren häufig amplifizierbare DNA enthalten (Nassuth *et al.*, 2000). Dieser zusätzliche Schritt würde aber die Kosten und den Zeitaufwand für die Extraktion deutlich erhöhen. Zusätzlich erhöht jeder zusätzliche Schritt das Risiko für Kontaminationen. Eine Alternative ist, die Primer so zu wählen, daß der amplifizierte Bereich ein Intron enthält. So wird durch das DNA Template ein größeres (RT-)PCR Produkt als vom mRNA Template, dem das Intron fehlt, amplifiziert, d.h. man erhält immer zwei Kontrollfragmente (Nassuth *et al.*, 2000). Da aber jede Koamplifikation eine Konkurrenz zum viralen Template um z.B. Nukleotide oder Polymerasen darstellt, besteht das Risiko, daß die Sensitivität des Nachweises deutlich reduziert wird und zudem kann bei Verwendung der Gelelektrophorese jedes zusätzliche Fragment die Identifizierung des viralen Fragment erschweren.

Ein Ziel dieses Projektes war es, eine interne Kontrolle zu entwickeln, mit der spezifisch mRNA aus Gesamtnukleinsäureextrakten amplifiziert wird, um die oben genannten Schwierigkeiten zu umgehen.

1.2.2 Ersatz der Gelelektrophorese durch ELISA-ähnliche Techniken

Der Nachweis von PCR-Produkten wird routinemäßig mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Dies ist zwar eine schnelle und kostengünstige Methode, die aber auch Nachteile mit sich bringt. Für einen sensitiven Nachweis müssen giftige und/oder mutagene Nukleinsäurefarbstoffe wie Silbernitrat, Ethidiumbromid oder Syber Green eingesetzt werden, bei Verwendung von Polyacrylamidgelen zusätzlich noch gefährliche organische Lösungsmittel. Desweiteren kann die Identifizierung der einzelnen Banden durch unspezifisch amplifizierte DNA (einzelne Banden oder Schmier) erschwert werden (Sharmann *et al.*, 2000). Als mögliche Alternative für die Detektion der PCR-Produkte bieten sich ELISA-ähnliche Techniken an. Vorteil dieser Techniken ist, daß sie die Sensitivität der RT-PCR mit der einfachen Handhabbarkeit der ELISA Technik kombinieren und somit die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ersetzen. Es wurden bereits mehrere verschiedene PCR-ELISA Protokolle für den Nachweis von Viren aus Gehölzen

veröffentlicht (z.B. Rowhani *et al.*, 1998; Candresse *et al.*, 1998; Kummert *et al.*, 2001), aber keines umfasst die vier hier bearbeiteten Apfelviren. Desweiteren arbeiten diese Verfahren ohne interne Kontrolle, die für einen Ausschluß falsch negativer Ergebnisse bedingt durch RNA-Degradierung oder Hemmstoffe unabdingbar ist. In der Literatur sind zahlreiche verschiedene PCR-ELISA Varianten zu finden, die sich in der Markierung der PCR-Produkte, der Kopplung der Capture Oligonukleotide und der Art der Hybridisierung unterscheiden. So verwenden z.B. Kummert *et al.* (2001) nicht modifizierte PCR-Produkte, die durch eine Sandwichhybridisierung zwischen kovalent an die Oberfläche der ELISA-Platten gebundenen Capture-Oligonukleotide und mit Biotin markierten Detektionssonden nachgewiesen werden. Bei Borrow *et al.* (1997) und Shamloul *et al.* (2001) werden Biotin markierte Capture-Oligonukleotide oder ca. 800 Nukleotide lange cDNA oder cRNA Capture-Proben, die an Streptavidin beschichtete Oberflächen über die äußerst stabile Biotin-Streptavidin Bindung (Diamandis und Christopoulos, 1991) gebunden sind und in der PCR mittels Digoxigenin-dUTPs markierte PCR-Produkte verwendet.

Eine andere Möglichkeit die PCR-Produkte zu markieren besteht darin, einen markierte Primer (Digoxigenin, Fluorescein o.a.) in der PCR einzusetzen (z.B. Costa *et al.*, 1996; Ritzler und Altwegg, 1996). Desweiteren können auch beide PCR-Primer mit unterschiedlichen Markierungen verwendet werden (Menzel und Maiss, 2000) oder Biotin modifizierte Primer und Digoxigenin-dUTPs (Luk *et al.*, 1997), wobei bei den beiden letztgenannten Varianten durch den Einbau zwei unterschiedlicher Markierungen vollständig auf eine Hybridisierung verzichtet werden kann. Eine weitere Abwandlung der PCR-ELISA Technik ist die DIAPOPS-Technik (Rasmussen *et al.*, 1994; Nicolaisen *et al.*, 2001), bei der die PCR direkt mit einem an die Oberfläche der ELISA-Platten oder Strips gebundenen PCR-Primer durchgeführt wird und nach erfolgter Amplifikation die somit auch an die Oberfläche gebundenen PCR-Produkte mit einer markierten Sonde nachgewiesen werden. Die Reihe der Variationsmöglichkeiten ließe sich noch lange so fortsetzen.

In diesem Projekt sollte eine RT-PCR-ELISA Variante entwickelt werden, die für den Routinetest geeignet (schnell, zuverlässig, einfach in der Handhabung) und zudem ökonomisch interessant ist.

1.2.3 Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW)

Bei der als Gummiholz beschriebenen Krankheit führt eine verminderte Lignifizierung im Holz zu einer deutlich erhöhten Flexibilität der Zweige bei einigen Apfelsorten. Dadurch bedingt hängen die Zweige, zumindest bei entsprechendem Fruchtbesatz, bis auf den Boden

herunter und die Früchte werden somit unvermarktbar. Eine Übertragung ist nur durch vegetative Vermehrung/Veredelung möglich. Zu Beginn der Arbeiten konnte die Frage nach der Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit nicht eindeutig beantwortet werden. In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse dazu. So vermutete Crane (1945) bereits ein Jahr nach der Erstbeschreibung der Krankheit (Wallace *et al.*, 1944) ein Virus, ohne dies argumentativ oder experimentell zu belegen. Beakbane *et al.* (1971) waren die ersten, die ARW assoziierte Phytoplasmen im EM nachweisen konnten und 1982 wurden von Minoiu und Cracium ARW-assoziierte, Xylem-limitierte Bakterien beschrieben. In der Folgezeit gelang es im Gegensatz zu Souza und Parish (1992) Davies *et al.* (1984) nicht, mittels DAPI Färbung Phytoplasmen nachzuweisen. 1995 wurde von Poggi Pollini *et al.* erstmals versucht, unter Verwendung eines für Phytoplasmen als universell einsetzbar geltenden Primerpaares selbige nachzuweisen. Genau wie bei Smart *et al.* (1996), die ein anderes universelles Primerpaar verwendeten, blieb der Versuch erfolglos. Der Nachweis von mit ARW-assoziierten Phytoplasmen mittels PCR gelang erstmals Bertaccini *et al.* (1998) unter Verwendung einer nested PCR (zwei aufeinanderfolgende PCR Ansätze, wobei im zweite Ansatz mit einem Primerpaar das innerhalb dem vom ersten amplifizierten Bereichs liegt, reamplifiziert wird). Ihnen gelang auch wieder der Nachweis mittels DAPI Färbung. Unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen wurde die nachgewiesenen Phytoplasmen in die Aster yellows-Gruppe eingeordnet. Ein zuverlässiger Nachweis ist bis heute nur mittels Indikatorrestung möglich. Im Routinetest wird als Indikator die Apfelsorte 'Lord Lambourne' eingesetzt.

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war es, Informationen die zur Klärung der Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit beitragen, zu gewinnen.

1.2.4 Viroidnachweis

An Apfel und Birne sind verschiedene Viroide bekannt. An Apfel treten *Apple scar skin viroid*, *Apple dimple fruit viroid* und *Apple fruit crinckle viroid* auf, an Birne sind *Apple scar skin viroid* und *Pear blister cancer viroid* beschrieben. Die Viroide sind wie die Apfelviren nur durch vegetative Vermehrung/Veredelung, nicht aber durch Vektoren, Samen oder Pollen übertragbar. Übliche Nachweisverfahren sind die Indikatorrestung, Hybridisierung (u.a. Hurtt *et al.*, 1996; Desvignes *et al.*, 1999; Di Serio *et al.*, 1996; Ambroso *et al.*, 1995; Loreti *et al.*, 1995) und RT-PCR (u.a. Di Serio *et al.*, 1998; Shamloul und Hadidi, 1999; Nakahara *et al.*, 1999), wobei hier auch die bereits für die Apfelviren diskutierte Problematik gilt und somit

auch für die Viroide neue Verfahren entwickelt wurden. Ein ELISA-Nachweis ist aufgrund der fehlend spezifischen Erreger-Proteine bei Viroiden nicht möglich.

Das *Apple scar skin viroid* (ASSVd) ist das am längsten bekannte Viroid an Apfel. Die Symptome wurden erstmals in den 30er Jahren als Berostung und Rissigkeit an Äpfeln in Asien beschrieben. Die erste Sequenz des Viroids wurde von Hashimoto und Koganezawa (1987) veröffentlicht. Später wurden auch Symptome an Birnen mit dem Viroid in Verbindung gebracht und die Assoziation von ASSVd-RNA nachgewiesen (Osaki *et al.*, 1996; Kyriakopoulou und Hadidi, 1998). Von Kyriakopoulou und Hadidi (1998) konnte, neben der Verbreitung in Wildbirnenarten in Asien, in einer in Griechenland verbreiteten Birnenart (*Pyrus amygdaliformis*) und in Kultursorten ASSVd nachgewiesen werden. Diese Birnenart stellt somit eine mögliche natürliche Infektionsquelle dar, da in Griechenland teilweise vegetativ vermehrte Wildbirnen als Unterlagen verwendet werden. Auch in Polen (Paduch-Cichal *et al.*, 1996) und Frankreich (Desvignes *et al.*, 1998) konnte das vereinzelte Auftreten von ASSVd nachgewiesen werden. Die vermutete nahe Verwandtschaft der als *Dapple apple viroid* (DAVd) an Apfel und als *Pear rusty skin viroid* (PRSVd) an Birne beschriebenen Erreger mit dem ASSVd konnte durch umfangreiche Sequenzierungsarbeiten von Zhu *et al.* (1995) bestätigt werden. Die Sequenzidentitäten mit dem ASSVd lagen zwischen 92% und 97%. Aufgrund dieser Ergebnisse und den sehr ähnlichen biologischen Eigenschaften sollten das PRSVd und DAVd höchstens als Varianten oder Isolate des ASSVd angesehen werden (Flores *et al.*, 1998). Diese Viroide sind bis heute auch nicht in die offizielle Viroidklassifikation aufgenommen. Im Folgenden werden sie aufgrund dieser Tatsachen mit dem ASSVd zusammengefasst behandelt.

Der Viroidcharakter des *Pear blister cancer viroid* wurde von Flores *et al.* (1991) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den anderen hier behandelten Viroiden, die in anfälligen Apfelsorten Fruchtsymptome hervorrufen, verursacht es in Sortenabhängigkeit Rindensymptome (blasiges Aufplatzen der Rinde, Rindenschuppigkeit). Obwohl es experimentell auf verschiedene Apfelarten (*Malus baccata*, *Malus ioensis*, *Malus robusta*) übertragen werden konnte, ist es bisher noch nicht in gesammelten Apfelproben nachgewiesen worden. Das PBCVd konnte unter anderem von Flores *et al.* (1991) in Frankreich und Loreti *et al.* (1998) in Italien nachgewiesen werden.

Das *Apple dimple fruit viroid* (ADFVd) ist erstmals Mitte der neunziger Jahre in Süditalien an der Apfelsorte 'Starking Delicious' aufgetreten, deren Früchte Einbuchtungen der Oberfläche und nekrotische Bereiche im Fruchtfleisch aufwiesen. Der Erreger wurde von Di Serio *et al.*

(1996) molekular charakterisiert. In der Folgezeit konnte es in weiteren symptomtragenden Apfelsorten in Italien nachgewiesen werden (Di Serio *et al.*, 1998). Unter anderem in der Apfelsorte 'Golden Delicious', deren Symptome denen der als Rauhschaligkeit beschriebenen Fruchtvirose an Apfel ähnlich waren.

Die in Japan 1976 beobachtete Buckelfruchtigkeit verschiedener Apfelsorten wurde 1993 von Ito *et al.* mit einem möglichen Viroid als Erreger der Krankheit, dem *Apple fruit crinkle viroid* (AFCVd), in Verbindung gebracht. Sie konnten viroidähnliche RNA nachweisen, die nicht mit ASSVd-Sonden hybridisierte. Das ADFVd war zu dieser Zeit noch unbekannt. Später gelang Ito und Yoshida (1998) die erfolgreiche Rückübertragung isolierter Viroid RNA, was erneut zu den erwarteten Symptomen führte. Da erst im späteren Verlauf des Projekts für einen RT-PCR Nachweis notwendige Sequenzinformationen des AFCVd bekannt wurden (2001) und das Viroid bisher nur vereinzelt in Asien nachgewiesen werden konnte, wurden nur Primer für einen RT-PCR Nachweis der auch in Europa nachgewiesenen Viroide (ASSVd, ADFVd, PBCVd) entwickelt und eingesetzt.

Über das Auftreten und die Verbreitung der Viroide im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland lagen keine Informationen vor.

Ein Ziel dieses Projekts ist es, neue Informationen über die Verbreitung dieser Viroide zu gewinnen und einen möglichen Zusammenhang mit Fruchtviren zu überprüfen.

1.2.5 Fruchtviren an Apfel

Die Ätiologie der an Apfel als Fruchtviren beschriebenen Krankheiten, die Rauhschaligkeit ('Apple rough skin') und Sternrissigkeit ('Apple star crack') des Apfels, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. So beschreiben z.B. Desvigne (1999) und Leone *et al.* (1998) eine häufig nachgewiesene Assoziation mit ASPV. Außerdem ist bekannt, daß auch neben den Viroiden an Apfel einzelne ACLSV-Isolate Fruchtsymptome ('Apple russet ring') hervorrufen können (Ringberostung an z.B. 'Golden Delicious' und 'Jonathan'). Die Symptome der Fruchtviren treten nur an wenigen anfälligen Sorten (Rauhschaligkeit z.B. an 'Golden Delicious', 'Belle de Boskoop', Sternrissigkeit z.B. an 'Golden Delicious' und 'Cox`s Orange Pippin') auf und führen dazu, daß die Früchte nicht mehr zu vermarkten sind. Auch hier ist eine Übertragung nur über vegetative Vermehrung/Veredelung bekannt. Ein zuverlässiger Nachweis ist, ähnlich wie bei Gummiholz, nur mittels Indikatorrestung möglich. Als Indikator wird die Apfelsorte 'Golden Delicious' im Routinetest eingesetzt. Ziel ist es, den möglichen Zusammenhang der Fruchtviren mit den bekannten Viren und Viroiden an Apfel zu überprüfen.

2 Material und Methoden

Vorbemerkungen

Da das Hauptziel dieser Arbeit die Entwicklung von Nachweisverfahren war, die somit Ergebnisse dieser Arbeit darstellen, diese aber anschließend z.B. in den Paralleltests auch als Methoden für den Erhalt von Ergebnissen gedient haben, ist eine eindeutige Trennung von Methoden- und Ergebnisteil in diesem Bericht nicht logisch möglich und würde dem Leser die Nachvollziehbarkeit erschweren. Aus diesem Grund ist das neu entwickelte multiplex RT-PCR-ELISA Verfahren, das eines der Hauptergebnisse ist, im Methodenteil eingegliedert.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für Puffer und Lösungen entmineralisiertes Wasser verwendet, der pH-Wert mit NaOH oder HCl eingestellt und bei Bedarf autoklaviert. Mörser und andere mit Hitze sterilisierbare Gegenstände (z.B. Spatel, Meßzylinder aus Glas) wurden mindestens 2 h bei 180°C sterilisiert. Bei Zentrifugationsschritten beziehen sich die Angaben der Umdrehungen pro Minute, wenn nicht anders spezifiziert, auf handelsübliche Tischzentrifugen.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Feste Chemikalien

Substanz	Verwendete Abkürzung	Hersteller
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid	X-Gal	BioTech
Agar		Duchefa
Agarose		Biozym
Ampicillin		Serva
Ascorbinsäure		Fluka
Blocking Reagenz		Roche
Bovine Serum Album (Fraktion V)	BSA	Sigma
Bromphenolblau		Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂	Merck
Celite		Serva
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	Fluka
CF11 Cellulose		Whatman
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Na ₂ HPO ₄	Merck
Dithiotreitol	DTT	ICN

Ethidiumbromid		Sigma
Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid	EDC	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz	EDTA	Merck
Glucose		Sigma
Guanidin Hydrochlorid	GHCl	Sigma
Guanidin Thiocyanat	GSCN	Sigma
Hexamincobaltrichlorid	HaCoCl ₃	Sigma
Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase	IPTG	BioTech
Kaliumacetat	KAc	Merck
Kaliumhydroxyd	KOH	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck
Kaliumhydroxyd	KOH	Merck
Morpholinethansulfonsäure	MES	Roth
LM-Agarose		Biozym
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄	Merck
Maleinsäure		Merck
Manganchlorid-Dihydrat	MnCl ₂	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	NaAc	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumcitrat-Dihydrat	NaCitrat	Roth
Natriumdodecylsulfat Ultra Pure	SDS	Roth
Natriumhydroxyd	NaOH	Merck
Natriumjodid	NaI	Sigma
Natriumsulfit	Na ₂ SO ₃	Sigma
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Roth
para-Nitrophenylphosphat		Serva
Polyvinyl Polypyrrolidon 40	PVP-40	Sigma
Polyvinyl Polypyrrolidon 400	PVP-400	Sigma
Rubidiumchlorid	RbCl	Sigma
Select Peptone 140		Gibco BRL
Silica Partikel		Roth
Soy Broth		Gibco BRL
Sucrose		Merck

Trinatriumphosphat	Na ₃ PO ₄	Merck
Tris Acetat		Roth
Trishydrochlorid	Tris HCl	Roth
Uranylacetat		Merck
Yeast Extract		Gibco BRL

Tabelle 2: Flüssige Chemikalien

Chemikalie	Verwendete Abkürzung	Hersteller
1-Methyl-Imidazol		Sigma
2-MeEtOH	2-Mercaptoethanol	Merck
CDP- <i>Star</i>		Roche
Chloroform		Merck
Diethanolamin		Sigma
Dimethylformamid	DMF	Serva
Dimethylsulfoxyd	DMSO	Serva
Eisessig (100%)		Roth
Entwickler Roentogen		Tetenal
Ethanol (70%)	EtOH	Roth
Ethanol (99,6%)	EtOH _{abs.}	Roth
Fixierer Roentogen Superfix		Tetenal
Glycerin (99,5%)		Roth
Isopropanol (99,7%)		Roth
Isoamylalkohol		Roth
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Tween-20	Fluka
Roti-Phenol (redestilliert und äquilibriert)	Phenol	Roth
Triton X-100		Serva

2.1.2 Enzyme und Reaktionspuffer

In Tab. 3 und 4 werden die verwendeten Enzyme und Nukleotide sowie die zugehörigen, von den Herstellern bezogenen Puffer aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer

(Die Restriktionsschnittstellen sind durch das Symbol „↓“ gekennzeichnet.)

Enzym	Erkennungssequenz	Konzentration	Hersteller	Reaktionspuffer
<i>AluI</i>	AG↓CT	10 U/μl	MBI	NEB 1
<i>Csp6I</i>	G↓TAC	10 U/μl	MBI	B ⁺
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC	20 U/μl	MBI	NEB 3
<i>KpnI</i>	GGTAC↓C	10 U/μl	NEB	NEB 1
<i>PstI</i>	CTGCA↓G	20 U/μl	NEB	NEB 3
<i>RsaI</i>	GT↓AC	10 U/μl	NEB	NEB 1

MBI B⁺ (pH 7,5):

- 10 mM Tris HCl
- 10 mM MgCl₂
- 0,1 mg/ml BSA

NEB 1 (pH 7):

- 10 mM Bis-Tris-Propan HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

NEB 3 (pH 7,9):

- 0,1 M NaCl
- 50 mM Tris HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

Tabelle 4: Sonstige verwendete Enzyme, Nukleotide und zugehörige Reaktionspuffer

Enzyme und Nukleotide	Konzentration	Hersteller	Reaktionspuffer
50x Advantage cDNA Polymerase Mix		Clontech	10x cDNA PCR Puffer
50x Advantage 2 Polymerase Mix		Clontech	10x Advantage 2 PCR Puffer

AMV-Reverse Transkriptase	10 U/μl	Promega	5x RT Puffer
Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase Konjugat	0,75 U/μl	Boehringer	
Deoxynucleoside Triphosphat Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 100 mM	Roth/Sigma	
Digoxigenin dNTP Mix		Roche	
Hot Prime <i>Taq</i>		Q-Biogene	10x Hot Prime <i>Taq</i> PCR Puffer
HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/μl	QIAGEN	10x HotStar <i>Taq</i> PCR Puffer
Klenow DNA Polymerase I	1 U/μl	Promega	10x Klenow DNA Polymerase Puffer
PowerScript Reverse Transkriptase	20 U/μl	Clontech	5x Erststrang Puffer
Proteinase K	20 mg/ml	Boehringer	
RNase A	75 U/mg	Fluka	
RQ1 DNase	1 U/μl	Promega	10x RQ1 DNase Puffer
T4 DNA-Ligase	1 U/μl	MBI	10x Ligationspuffer
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/μl	Sigma	10x PCR Puffer

Zusammensetzungen der Reaktionspuffer (wenn vom Hersteller angegeben):

10x Advantage 2 PCR Puffer (pH 8,7)

- 0,4 M Tricin KOH
- 0,15 M KAc
- 35 mM MgAc₂
- 37,5 mg/ml BSA
- 0,05% Tween 20
- 0,05 % Nonidet P40

10x cDNA PCR Puffer (pH 9,2)

- 0,4 M Tricin KOH
- 0,15 M KAc

- 35 mM MgAc₂
- 37,5 mg/ml BSA

10x Ligationspuffer (pH 7,8)

- 0,4 M Tris HCl
- 0,1 M MgCl₂
- 0,1 M DTT
- 5 mM ATP

5x Erststrang Puffer (pH 8,3)

- 0,25 M Tris HCl
- 0,375 M KCl
- 30 mM MgCl₂

10x PCR Puffer (pH 8,8)

- 0,1 M Tris HCl
- 0,5 M KCl
- 0,8% Nonidet P40

10x RQ1 DNase Puffer (pH 8)

- 0,4 M Tris HCl
- 0,1 M MgSO₄
- 10 mM CaCl₂

5x RT Puffer (pH 8,3)

- 0,25 M Tris HCl
- 0,25 M KCl
- 50 mM DTT
- 50 mM Spermidin
- 50 mM MgCl₂

2.1.3 Medien

LB-Medium (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989):

- 15 g Agar
- 10 g Select Peptone 140
- 5 g Yeast Extract
- 10 g NaCl

In 1000 ml lösen und auf pH 7,5 einstellen.

LB-AIX-Medium:

- 150 mg Ampicillin/ml
- 40 mg X-Gal/ml DMF
- 46 mg IPTG/ml

Zu 1000 ml ca. 50°C warmem LB-Medium geben.

SOB-Flüssigmedium:

- 10 g Selecto Peptone 140
- 5 g Yeast Extract
- 584 mg NaCl
- 186 mg KCl

In 1000 ml lösen und auf pH 6-7 einstellen.

LB-AP-Flüssigmedium:

- 150 mg Ampicillin/ml Wasser

Zu 1000 ml ca. 50°C warmem LB-Medium (ohne Agar) geben.

SOC-Flüssigmedium:

- 1 ml 2 M Glucose
- 1 ml 2 M MgCl₂

Mit SOB-Medium auf 100 ml auffüllen.

C-Medium:

- 3 g Soy Broth
- 15 g Agar
- auf 100 ml A. bidest.

2.1.4 Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren

Tabelle 5: Verwendete Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren

Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren	Hersteller
pBluescript II SK ⁻	Stratagene
pGEM-T Easy	Promega
λ-Phagen DNA	MBI
Primer und Capture-Oligonucleotide	MWG Biotech, Invitrogen
Random Hexamere	Promega

2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 6: In der Transformation verwendete Bakterienstämme

Bakterium	Bakterienstamm	Hersteller
<i>Escherichia coli</i>	NM 522	Pharmacia
<i>Escherichia coli</i>	XL1-BlueMRF ⁺ Superkompetent	Stratagene

2.1.6 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Sterile Werkbank	Lamina Air HA 2448 GS	Heraeus
Elektronenmikroskop	EM 109	Zeiss
Elektrophoresekammern	Horizontal Midi Mini 440.000	Harnischmacher Polymehr
Biolog Lesegerät	MycroLog	Biolog
ELISA-Photometer	Microplate Reader 550	Bio-Rad
Feinwaage	Analytic 200 S	Satorius
Kamera	Cosucor TL	Intas
Minizentrifuge mit Ausschwingrotor	Minifuge 2	Heraeus
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor	RC 5 B plus	Sorval
Magnetrührer	MR 2000	Heidolph
Pipetten	2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
Schüttler	Certomat M	Braun Biotech
Schüttler mit Temperaturregelung	Certomat R + H	Braun Biotech
Spannungsquelle	E 714	Consort
Template Tamer		QBiogene

Thermoblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Thermocycler	PTC 200 T3	MJ Research Biometra
Thermoschränke	H-Inkubator Pt 100	Biometra
Tischzentrifuge	113	Sigma
Tischzentrifuge mit Kühlung	4 K 10	Sigma
UV-Tische	TVL 312 A Intas MW 312	Spectroline Intas
Vakuumpkonzentrator	Hetovac VR-1 + CT 60 e	Heto
Videoprinter	Video Copy Processor P 91 D	Mitsubishi Mitsubishi
Vortexer	MS 1 Minishaker	IKA
Waage	1205 MP	Satorius
Wasserbad	F 3	Haake

2.1.7 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Programm	Version	Rechte bei
ClustalX	1.64b, 1988	Higgins, D. G. und Sharp, P. M.
ELISA Microplate Manager	5.0 1/52	Bio-Rad
Excel	97, 1997	Microsoft
Gel-Dokumentation Intas GDS	2002	Intas
Oligo	4.0, 1991	Rychlik, W.
Vector NTI	4.0, 1997	InforMax Inc.
Biolog Microlog 1	3.5	Biolog

2.1.8 Sonstiges Material

Tabelle 9: Sonstiges Material

Material	Hersteller
Blattdünger 22+4+6	Berghoff
DIG-Detection Test-Strips	Roche
DNA-Immobilizer	EXIQON
Fruhstorfer Erde (Typ P)	Industrie-Erdenwerke Archut
Grids für die Elektronenmikroskopie	Dr. Lesemann, BBA Braunschweig

Membranfilter Porenweite 0,2 µm	Roth
NucleoLink-Strips	Nunc
Nylonmembran	Roche
Röntgenfilme Curix RP1	Agfa
Whatman 3M Papier	Whatman
Biolog GN Microplates	Biolog

2.1.9 Verwendete Proben und Virusisolate

Tabelle 10: Liste der verwendeten Proben

(Ohne die Proben aus der Paralleltestung mit dem Pflanzenschutzamt Hannover.)

Referenz- Nummer ^a	Pflanzenart	Geographische Herkunft	Erhalten durch ^b	Infiziert mit ^c
146/80	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	ASGV
40/85	<i>Malus x domestica</i>	Großbritannien	B	ASPV
38/88	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	ARW
41/87	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	ApMV, ACLSV, ASPV, ASGV
31/86	<i>Pyrus communis</i>	Deutschland	B	ASPV, ARW
56/86	<i>Malus x domestica</i>	Großbritannien	B	ASGV, ACLSV
22/85	<i>Pyrus communis</i>	Deutschland	B	ASPV
94/87	<i>Pyrus communis</i>	Deutschland	B	ASPV
33/88	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	ASPV, ACLSV
35/88	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	ASPV, ASGV, ACLSV, ARW
42/87	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	ASPV, ACLSV, ASGV
4/94	<i>Malus x domestica</i>	Frankreich	B	ASPV, <u>ASGV</u> , <u>ACLSV</u>
33/94	<i>Malus x domestica</i>	Großbritannien	B	ASPV, <u>ApMV</u> , <u>ACLSV</u>
41/94	<i>Malus x domestica</i>	Schweiz	B	ASPV, <u>ASGV</u> , <u>ACLSV</u>
5/94	<i>Malus x domestica</i>	Frankreich	B	ASPV, <u>ASGV</u> , <u>ACLSV</u>
7/94	<i>Malus x domestica</i>	Frankreich	B	ASPV, <u>ASGV</u> , <u>ACLSV</u>
8/94	<i>Malus x domestica</i>	Frankreich	B	ASPV, <u>ASGV</u> , <u>ACLSV</u>
10/94	<i>Malus x domestica</i>	Frankreich	B	ASPV, <u>ACLSV</u>
18/94	<i>Malus x domestica</i>	Frankreich	B	ASPV, <u>ASGV</u> , <u>ACLSV</u>
71/94	<i>Pyrus communis</i>	Italien	B	ASPV
62/94	<i>Pyrus communis</i>	Niederlande	B	ASPV
1/96	<i>Prunus x domestica</i>	Frankreich	B	ACLSV
3/96	<i>Malus x domestica</i>	Japan	B	ACLSV

81/83	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	rough skin, <u>ACLSV</u> , <u>ASPV</u>
83/82	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	rough skin, <u>ACLSV</u> , <u>ASPV</u>
D1	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	B	ASSVd
D2	<i>Pyrus communis</i>	Deutschland	B	PBCVd
F0	<i>x Pyronia veitchii</i>	Deutschland	A	ACLSV
F1	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	A	ARW
F2	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	A	ARW, ASPV, ACLSV
F3	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	A	FL, ACLSV, ASPV, ASGV
W1	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	C	ApMV, ASPV, ACLSV
W2	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	C	ApMV, ASPV, ACLSV, ASGV
W3	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	C	ApMV, ASGV, ACLSV
W4	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	C	ACLSV, ARW
W5	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	C	rough skin, ACLSV, ASPV
W6	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	C	star crack, ACLSV, ASPV
W7	<i>Malus x domestica</i>	Deutschland	C	star crack, ACLSV, ASPV, ASGV
C1	<i>Vinca spec.</i>	unbekannt	B	Coconut phyllody Phytoplasma

(^aFett gedruckte Proben waren nur auf ASPV vorgetestet. ^bA: Pflanzenschutzamt Hannover; B: Biologische Bundesanstalt Dossenheim; C: Proben die selbst gesammelt wurden. ^cMit Ausnahme aller mit W beginnenden Probenbezeichnungen waren die Proben von den Bezugsstellen vorgetestet. Mittels multiplex RT-PCR zusätzlich festgestellte Infektionen sind unterstrichen.)

2.2 Methoden

2.2.1 Indikatortestung der Gehölze

Für die Entwicklung der Nachweisverfahren wurden mittels holziger Indikatoren nach EPPO Empfehlungen (EPPO 1999) an der BBA Dossenheim oder dem Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover vorgetestete Gehölze verwendet. Die Proben des Paralleltests stammten ausschließlich vom Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover. Die für den Paralleltest verwendeten Indikatoren sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Auflistung der virusspezifischen Symptome ist nicht vollständig. Zudem ist wichtig anzumerken, dass nicht immer alle Symptome bei Vorliegen einer Infektion auftreten und die Schwere der Symptome stark von den Umweltbedingungen und dem jeweiligen Virusisolat abhängt. Bei Mischinfektionen von ASPV mit ACLSV an *Malus platycarpa* und ASPV mit ASGV an *Malus sylvestris* cv 'Virginia Crab' überlagern die Symptome von ASPV häufig die der anderen Viren und erschweren so eine eindeutige Diagnose. Bei der Indikatortestung am

Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover werden die zu testenden Sorten als Zwischenveredelung auf einjährige Sämlingsunterlagen und darauf die Indikatoren veredelt. Sämlingsunterlagen und Indikatorreiser stammen aus getesteten, virusfreien Beständen. Als Veredelungsart wird die Kopulation mit Gegenzunge verwendet (Zahn, pers. Mitteilungen).

Tabelle 11: Verwendete Indikatoren zum Nachweis der Virusinfektionen und Virussympptome (Zahn, 1995)

Indikator	Virus	wichtige virusspezifische Symptome
<i>Malus adstringens</i> cv 'Hopa'	ACLSV	Blattdeformationen (oft Weidenblättrigkeit), rötliche, teils nekrotische Blattflecken, Triebstauchung, Rindennekrosen, Xylemrillen
<i>Malus platycarpa</i>	ASPV (APScbV)	gelblich fahle Blätter, Blattrand nach oben eingerollt, Triebstauchung, Rindenschuppigkeit, unebene, buckelige Früchte
	ACLSV	diffuse Ringflecken oder Bänder auf den Blättern, Blätter teils leicht gedreht und schmaler
<i>Malus sylvestris</i> cv 'Spy 227'	ASPV (ASpdV)	nach unten eingerollte Blattspitzen, Triebstauchung, oftmals Absterben des Indikators
<i>Malus sylvestris</i> cv 'Virginia Crab'	ASPV	Triebstauchung, Stammnarbung im Xylem (insbesondere um die Veredelungsstelle), Früchte länglich und wülstig
	ASGV	Gelbfärbung der Blätter, dunkle Nekroselinie an der Veredelungsstelle, Stammfurchung (Xylemrillen)
<i>Malus x domestica</i> cv 'Golden Delicious'	ApMV	Blätter mit gelb- bis cremefarbenem Mosaik

2.2.2 Verwendetes Pflanzenmaterial

Für die unterschiedlichen Extraktionsmethoden und Verwendungszwecke wurden verschiedene Pflanzengewebe verwendet, die im einzelnen bei den Methoden selbst und/oder bei den Ergebnissen spezifiziert werden. Die Pflanzenproben wurden von gesunden und infizierten Wirtspflanzen (Arten/Sorten von *Malus*, *Pyrus*, *Prunus* und *Pyronia*) überwiegend während der Vegetationsperiode genommen. Zur Überprüfung der jahreszeitlichen Unabhängigkeit des Virusnachweises und der internen Kontrolle wurden zusätzliche Proben über das ganze Jahr verteilt genommen und getestet. Bei der Verwendung von Blattmaterial wurden ausgewachsene, möglichst junge Blätter gewählt. Rinde oder Rindenschildchen mit Knospen wurden mit einem Skalpell herausgeschnitten. Neben mittels holzigen Indikatoren

vorgetestetem Pflanzenmaterial wurden auch für z.B. die Viroidtestung und die Untersuchungen zu den Fruchtvirose im Gebiet der BRD selbst gesammelte Proben verwendet. Generell wurden die Proben, so sie nicht sofort nach der Entnahme verarbeitet wurden, in verschlossenen Plastikbeuteln (PE-Folie) im Kühlraum oder Kühlschrank bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert.

2.2.3 Phenol-Chloroform Extraktion

Diese allgemeine Methode dient der Extraktion (Ausschütteln) von Proteinen aus wässrigen Lösungen und ist in viele Verfahren eingebunden, um z.B. Enzyme (DNasen, RNasen, Polymerasen usw.) und allgemein Proteine aus Reaktionsansätzen zu entfernen. Um Phenolspuren anschließend aus dem wässrigen Überstand zu entfernen, wird dieser ein- bis zweimal mit Chloroform extrahiert. Die Nukleinsäuren werden abschließend meist mittels Natriumacetat-Ethanol Präzipitation konzentriert.

Die Probe wird mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, 1 min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 13000 upm zur Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand (die wässrige Phase) abgenommen, und mit dem gleichen Volumen Chloroform wieder für 1 min geschüttelt und 10 min bei 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und entsprechend weiter verwendet.

2.2.4 Natriumacetat-Ethanol Fällung

Die Natriumacetat-Ethanol Fällung dient der Konzentration von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen und gegebenenfalls Reinigung der Nukleinsäuren von Salzen und anderen löslichen Bestandteilen.

Dazu wird der Ansatz mit dem 0,1-fachen Volumen Natriumacetat (3 M) und 2,5-fachen Volumen EtOH_{abs} (bei -20°C gelagert) versetzt, kurz geschüttelt und 20 min bei 13000 upm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgegossen und das entstandenen Nukleinsäurepellet mit 150 µl EtOH (70%, bei -20°C gelagert) gewaschen, erneut zentrifugiert und nach abgießen des Überstandes im Vacuumkonzentrator getrocknet. Das Pellet wird, wie bei den einzelnen Techniken beschrieben, in TE 10/0,1 aufgenommen.

TE 10/01 (pH 7,5):

- 10 mM Tris HCl
- 0,1 mM EDTA

2.2.5 Gesamtnukleinsäureextraktion mit Silica Partikeln

Diese Gesamtnukleinsäureextraktion basiert auf einer von Boom *et al.* (1990) beschriebenen Extraktion für Nukleinsäuren aus Serum und wurde von MacKenzie *et al.* (1997), Malinowski *et al.* (1998) und Rott und Jelkmann (2001) für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzen adaptiert. Für diese Arbeit wurde das Verfahren weiter verändert, um es für den Gebrauch als Extraktionsmethode im Routinelabor weiter zu verbessern. Für die Extraktion werden 100 mg Pflanzenmaterial in 1 ml Extraktionspuffer 1 homogenisiert. Hierbei wurde gegenüber den Originalprotokollen 4 M GSCN durch 6 M GHCl ersetzt, um das Risiko der Bildung von hochgiftiger Blausäure aus dem Thiocyanatsalz auszuschließen. Der Ersatz von GSCN ist auch ohne weiteres möglich, da 6 M GHCl genauso effektiv Ribonukleasen inaktiviert und Nukleoproteinkomplexe in seine Nukleinsäure- und Proteinbestandteile dissoziiert (Lepanje, 1971; MacDonald *et al.*, 1987). Desweiteren wurde der in den Originalprotokollen dem Extraktionspuffer zugesetzte hochgiftige und leicht flüchtige 2-MeEtOH weggelassen, was keine erkennbaren Auswirkungen auf die Amplifizierbarkeit der extrahierten Nukeinsäuren hatte, wie in Paralleltests ermittelt wurde. Durch diese Änderungen besteht die Möglichkeit, bei der Extraktion auf einen Rauchabzug zu verzichten und das Gesundheitsrisiko, dem das Laborpersonal ausgesetzt ist, wird deutlich vermindert. Nach dem Homogenisieren werden 500 µl des Homogenats mit 100 µl SDS (10%) versetzt, unter wiederholtem Schütteln 10 min bei 70° C inkubiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird anschließend 10 min bei 13000 upm zentrifugiert und 300 µl des Überstandes werden mit 300 µl NaI-Lösung, 150 µl EtOH_{abs} und 25 µl Silicasuspension 10 min bei Rt unter wiederholtem Schütteln zur Bindung der Nukleinsäuren an die Silicapartikel inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 1 min bei 6000 upm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Silicapellet 2 mal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem 2. Waschschrift wird das Pellet 5 - 10 min bei Rt getrocknet und die Nukleinsäuren mit 150 µl TE 10/0,1 4 min bei 70°C eluiert. Abschließend werden die Silicapartikel 5 min bei 13000 upm abzentrifugiert und 100 µl des Nukleinsäureextraktes abgenommen. Die Nukleinsäureextrakte werden bei -20°C gelagert.

Extraktionspuffer 1 (pH 7,5):

- 6 M GHCl
- 0,2 M NaAc
- 25 mM EDTA

- 1 M KAc
- 2,5% PVP-40

NaI-Lösung:

- 6 M NaI
- 0,15 M Na₂SO₃

Silicasuspension (pH 2):

- 1 g/ml Silica (Sigma Katalog Nr. S5631)
- Nach dem Suspendieren in A. bidest. pH-Wert mit HCl einstellen und lichtgeschützt lagern.

Waschpuffer (pH 7,5):

- 10 mM Tris HCl
- 0,05 mM EDTA
- 50% EtOHabs

Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze für Mischproben wurde Gesamtnukleinsäure von vierfach infizierten Proben in Gesamtnukleinsäure von gesunden Kontrollpflanzen seriell verdünnt (1:2, :5, :10, :20, :40, :100, :200, :500, :1000) und im multiplex RT-PCR-ELISA I und II eingesetzt. Damit wird eine Verdünnung der viralen Templates erreicht, nicht aber der internen Kontrolle.

2.2.6 Gesamtnukleinsäure-Schnellextraktion

Diese von Edwards *et al.* (1991) als DNA-Extraktion beschriebene Methode konnte erfolgreich für den RT-PCR Nachweis von CSVd-RNA aus *in vitro* Pflanzen eingesetzt werden (Menzel und Maiss, 2000) und wurde aufgrund dieser Erfahrung und des minimalen Zeitaufwandes (ca. 30 min) auch für den Apfelvirusnachweis erprobt.

Für diese Extraktion werden 25 mg Pflanzenmaterial mit 400 µl Extraktionspuffer 2 homogenisiert, 1 min bei 13000 upm zentrifugiert, 300 µl des Überstandes mit dem gleichen Volumen Isopropanol vermischt und 2 min bei Rt inkubiert. Anschließend wird für 5 min bei

13000 upm zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wird im Vakuum getrocknet und in 100 µl TE 10/0,1 aufgenommen.

Extraktionspuffer 2 (pH 7,5):

- 0,2 M Tris HCl
- 0,25 M NaCl
- 25 mM EDTA
- 0,5% SDS

2.2.7 RNA Extraktion mit dem QIAGEN RNeasy Kit

Dazu werden 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 450 µl RLT-Puffer versetzt und für 2 min bei 13000 upm durch eine QIAshredder Säule zentrifugiert. Nach Zugabe von 225 µl Ethanol wird die Probe auf eine RNeasy mini Säule aufgetragen und für 15 sek bei 13000 upm zentrifugiert. Anschließend wird die Säule einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zwei mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (je 30 sek bei 13000 upm zentrifugiert). Die RNA wird abschließend mit 50 µl A. bidest. eluiert (30 sek bei 13000 upm zentrifugiert). Die Zusammensetzungen der Puffer sind vom Hersteller nicht angegeben.

2.2.8 DNA Extraktion mit dem QIAGEN DNeasy Kit

Für die DNA Extraktion werden 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 400 µl Puffer AP1 und 4 µl RNase (100 mg/ml) versetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend werden 130 µl Puffer AP2 zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Probe wird für 2 min bei 13000 upm durch die QIAshredder Säule zentrifugiert, mit dem 1,5-fachen Volumen Puffer AP3/E vermischt und für 1 min bei 13000 upm durch die QIASpin mini Säule zentrifugiert. Die Säule wird zwei mal mit 500 µl Puffer AW gewaschen (2 min, 13000 upm) und die gebundene DNA wird abschließend mit 100 µl auf 65°C vorgewärmten Puffer AE für 5 min bei Rt eluiert und abzentrifugiert (2 min, 13000 upm). Die Zusammensetzungen der Puffer sind vom Hersteller nicht angegeben.

2.2.9 Primerdesign

Bei der Entwicklung von RT-PCR basierten Nachweisverfahren nimmt die Auswahl geeigneter Primer eine zentrale Stellung ein, da eine möglichst breite, im Idealfall vollständige Erfassung aller Isolate/Sequenzvarianten eines Virus wünschenswert ist. Bedingt

durch die RNA-Genome der bearbeiteten Viren und dem damit verbundenen Fehlen von Korrekturlesemechanismen während ihrer Replikation ist eine hohe Variabilität zu erwarten (Hull, 2002). Selbst wenn die entwickelten Primer zu 100% auf alle bekannten Sequenzen passen, stellen sie somit immer nur eine Momentaufnahme für das jeweilige Virus dar, da die Sequenzierung von weiteren Virus-Herkünften neue Sequenzen ergeben kann, die nicht mehr optimal durch die entwickelten Primer abgedeckt sind.

Zu Beginn der Arbeiten existierten bereits für alle 4 Viren Veröffentlichungen von Einzelnachweisen mittels RT-PCR, aus denen die Primer hätten übernommen werden können. Da die Veröffentlichungen teilweise schon mehrere Jahre alt waren und überwiegend auf der Basis von sehr wenigen Sequenzen entwickelt wurden, konnten von den verwendeten Primern nicht mehr alle zu Projektbeginn sequenzierten Virus-Isolate abgedeckt werden. Diese Tatsache und die fehlende Kompatibilität (darunter versteht man bei Primern unter anderem nahe beieinanderliegende Schmelztemperaturen, keine stabile Dimerbildung bei den verwendeten Anlagerungstemperaturen sowie keine größeren Komplementaritäten an den 3'-Enden) der Primerpaare zueinander für eine Verwendung in einer multiplex RT-PCR, bzw. Eignung für einen multiplex RT-PCR-ELISA machten eine Verwendung dieser Primer nur sehr schwer möglich.

Die Entwicklung der Primer folgt weitgehend den Empfehlungen von Innis *et al.* (1999), die umfangreiche Untersuchungen dazu angestellt haben. Zu Beginn der Arbeit wurden Sequenzvergleiche mit allen in der Genbank und in der vorhandenen Literatur verfügbaren Nukleinsäuresequenzen für die einzelnen Viren durchgeführt. Desweiteren wurden, wenn vorhanden, Veröffentlichungen über Aminosäuresequenzen mit hinzugezogen. Außerdem mußte speziell für die multiplex RT-PCR zusätzlich zur Kompatibilität der einzelnen Primer eines Paares die Kompatibilität sämtlicher Primer aller Paare berücksichtigt werden. Bei der Auswahl der Primer wurde desweiteren berücksichtigt, daß für die Entwicklung einer multiplex RT-PCR Fragmente unterschiedlicher Größe für die einzelnen Viren amplifiziert werden, um sie gelelektrophoretisch voneinander trennen zu können, was allerdings bei der Weiterentwicklung der Nachweise zu multiplex RT-PCR-ELISA Verfahren, um die Gelelektrophorese zu ersetzen, unbedeutend ist. Hierfür ist wiederum von entscheidender Bedeutung, daß sich im von den Primern flankierten, amplifizierten Bereich ein Sequenzabschnitt befindet, in dem eine interne Hybridisierungssonde positioniert werden kann, d.h. wiederum ein Bereich möglichst hoher Sequenzidentität. Auch diese Hybridisierungssonden sind auf Ihre Kompatibilität untereinander zu überprüfen, damit eine maximale Sensitivität und Spezifität gewährleistet ist und das Risiko falsch-negativer und

falsch-positiver Ergebnisse sowie von Kreuzreaktionen minimiert werden kann. Wie bereits im oberen Abschnitt über die Variabilität der RNA-Genome angemerkt, ist ein absoluter Ausschluß dieser Möglichkeiten, insbesondere unter Berücksichtigung von zumindest theoretisch möglichen Rekombinationsereignissen der RNA Viren untereinander leider nicht möglich. Die Sequenzen der in der multiplex RT-PCR verwendeten Primer sind in Tab. 12 angegeben.

Tabelle 12: Primersequenzen und erwartete Produktgrößen

Primer	Primersequenz in 5'-3' Orientierung	Primerposition ^a	Produkt
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>			
sense	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	6860 – 6880	
antisense	AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	7507 – 7536	677 bp
<i>Apple stem pitting virus</i>			
sense	ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA	8869 – 8895	
antisense	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA	9211 – 9238	370 bp
<i>Apple mosaic virus</i>			
sense	ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA	1474 – 1499	
antisense	GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA	1711 – 1735	262 bp
<i>Apple stem grooving virus</i>			
sense	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA	6039 – 6064	
antisense	AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA	6286 – 6311	273 bp
<i>nad5</i>			
sense	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT	968 – 987 + 1836 – 1838	
antisense	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	1973 – 1995	181 bp

(^aDie Referenz Accession-Nummern [NCBI Genbank, National Center for Biotechnology Information] für die Bestimmung der Primerpositionen sind D14996 für *Apple chlorotic leaf spot virus*, D21829 für *Apple stem pitting virus*, U15608 für *Apple mosaic virus*, AB004063 für *Apple stem grooving virus* und D37958 für das *nad5* Gen.)

2.2.10 Standard RT-PCR

Im Folgenden wird zur Vereinfachung der häufig verwendete Standard RT-PCR Ansatz und das zugehörige Standard RT-PCR Programm aufgeführt. Wenn von dem Standard PCR Ansatz und Programm Gebrauch gemacht wird, sind im Ansatz die Reverse Transkriptase und im Programm der 1. Schritt (30 min bei 42°C) wegzulassen.

Standard RT-PCR Reaktionsansatz:

- 5 µl 10x HotStar *Taq* PCR Puffer
- 2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl Tween-20 (10%)
- 0,5 µl dNTP Mix (je 25 mM)
- 0,05 µl AMV Reverse Transcriptase (10 U/µl)
- 0,4 µl HotStar *Taq* Polymerase (5 U/µl)
- je 1 µl je sense und antisense Primer (10 µM)
- auf 50 µl A. bidest.

Standard RT-PCR Programm

Reverse Transkription für 30 min bei 42 °C

Enzymaktivierung 15 min 95°C

34 Zyklen (30 sek 94°C, 30 sek 62°C, 1 min 72°C)

Abschlusssynthese 10 min 72°C

2.2.11 Kontrollen in der RT-PCR

Für einen Routinenachweis ist die Zuverlässigkeit der Ergebnisse und somit der Ausschluß von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen von entscheidender Bedeutung. In der Regel werden zur Überprüfung der Arbeitsqualität bei RT-PCR-basierten Nachweisverfahren für Pflanzenviren zum Ausschluß falsch positiver Ergebnisse Negativkontrollen (Wasserkontrollen) eingebunden, bei denen zum Reaktionsansatz statt dem Nukleinsäureextrakt Wasser zugegeben wird. Alternativ kann, wenn vorhanden, eine definitiv Virus- (Template-) freie Probe verwendet werden. Sind nach erfolgter RT-PCR virusspezifische Amplifikate in dieser Negativkontrolle nachweisbar, muß der Reaktionsansatz bzw. mindestens ein Bestandteil mit Nukleinsäuren die als Template dienen kontaminiert gewesen sein. In diesem Fall ist der Ursprung der virusspezifischen Banden bei Proben mit unbekanntem Virusstatus zweifelhaft und der Nachweis muß wiederholt werden, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Mittels Positivkontrollen, für die Nukleinsäureextrakte verwendet werden, die definitiv das virale Template enthalten, wird überprüft, ob unter den gegebenen Bedingungen eine erfolgreiche Amplifikation möglich gewesen ist. Ist nach Ablauf der RT-PCR für die Positivkontrolle keine virusspezifische Amplifikation erfolgt (z.B. durch vergessene Bestandteile im Reaktionsansatz oder Fehler im

RT-PCR Programm im Thermocycler), ist die Ursache aller negativen Ergebnisse von Proben mit unbekanntem Virusstatus zweifelhaft und auch hier muß der Nachweis wiederholt werden, um diesmal falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Damit erschöpft sich für die überwiegende Zahl der publizierten Nachweisverfahren der Umfang der Kontrollen. Beim Ausschluß von falsch-negativen Ergebnissen wird jedoch als einziges nicht die Amplifizierbarkeit der einzelnen extrahierten Nukleinsäuren überprüft. Die Nukleinsäuren können z.B. durch Nukleasen degradiert oder durch Verunreinigungen im Extrakt (Inhibitoren) mittels RT-PCR nicht mehr amplifizierbar sein. Zusätzlich kann auch die Zugabe des Nukleinsäureextraktes zum Reaktionsansatz vergessen worden sein. Um dieses zu überprüfen ist eine interne Kontrolle, ein Template welches sich in jedem Nukleinsäureextrakt befindet und bei jeder RT-PCR (außer der Wasserkontrolle) koamplifiziert wird, notwendig. Ist nach Durchführung der RT-PCR für eine Probe die interne Kontrolle nicht erfolgreich amplifiziert worden und es sind auch keine virusspezifischen Amplifikate nachweisbar, besteht das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen und der Nachweis muß für diese Probe, gegebenenfalls mit einem neuen Nukleinsäureextrakt, wiederholt werden. Die Zusammenhänge der einzelnen Kontrollen sind zur Veranschaulichung in Abbildung 1 zusammenfassend dargestellt.

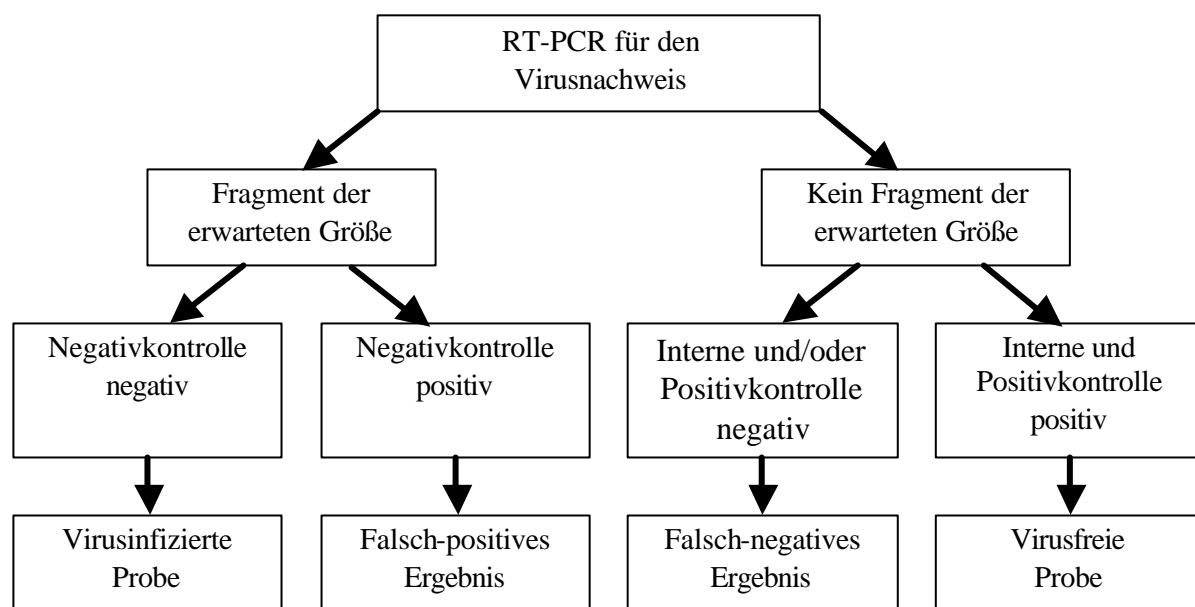


Abbildung 1: Zusammenhänge der einzelnen Kontrollmechanismen in der RT-PCR

Ein Ziel dieses Projektes war es, zur Verbesserung der Testsicherheit eine interne Kontrolle zu entwickeln, mit der spezifisch mRNA aus Gesamtnukleinsäureextrakten amplifiziert wird.

Durch ein geschicktes Primerdesign konnten die Probleme der bisher beschriebenen internen Kontrollen (siehe dazu Punkt 1.2.1) vermieden werden. Dazu muß ein Primer in der Weise gewählt werden, daß er ein Intron überspannt, so daß eine effiziente Anlagerung und Amplifikation nur dann möglich ist, wenn das Intron aus dem Zielgen gespleißt wurde, was nur bei reifer mRNA der Fall ist. Das 5'-Ende und das 3'-Ende eines solchen Primers müssen somit in verschiedenen Exons liegen. In Kombination mit einem zweiten Primer, der vollständig in einem an das Intron angrenzenden Exon positioniert ist, ist somit eine spezifische Amplifikation von mRNA auch in Gegenwart von DNA möglich, da bei Vorhandensein des Introns der Primer nicht ohne Fehlpaarungen anlagern kann und unter stringenten Bedingungen in der RT-PCR somit eine Elongation und Amplifikation verhindert wird (Kwok *et al.*, 1990; Innis *et. al.*, 1999).

Für die Entwicklung der internen Kontrolle wurde in der Genbank (NCBI) nach geeigneten Intron enthaltenden Genen, die bei Apfel bekannt sind, gesucht. Bei der Suche wurde zusätzlich berücksichtigt, daß das Gen zum Basisstoffwechsel des Apfels gehört, da eine Einsetzbarkeit über das ganze Jahr angestrebt wird. Gene, deren Transkription nur zu bestimmten Jahreszeiten oder Entwicklungsstadien abläuft, sind somit ungeeignet.

Kato *et al.* (1995) haben einen Abschnitt der mitochondrialen DNA des Apfels charakterisiert und die Existenz des *nad5* Gens (NADH Dehydrogenase Untereinheit 5) beschrieben. Dieses Gen besteht aus 2 Exons, separiert durch ein 848 bp Intron. Die Primer wurden so gewählt, daß die letzten 3 Nukleotide am 3'-Ende des sense Primers (*nad5-s*) homolog zu den ersten 3 Nukleotiden am 5'-Ende des Exon B und das vollständige 5'-Ende des Primers homolog zum 3'-Ende des Exon a ist. Der antisense Primer (*nad5-as*) wurde vollständig im Exon b positioniert (siehe Abb. 2).

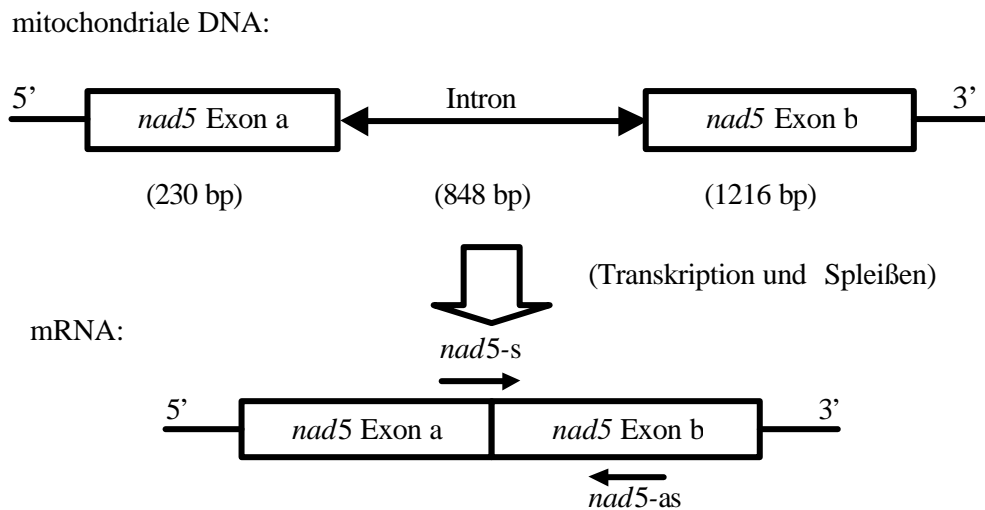


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primerposition der internen Kontrolle (Pfeile) im mitochondrialen *nad5* Gen

(Die Segmente und Primer sind nicht den Größenverhältnissen entsprechend dargestellt.)

Um die exklusive Amplifikation von RNA auch in Gegenwart von genomischer DNA zu überprüfen, wurden RT-PCR Ansätze mit und ohne Zugabe von Reverser Transkriptase mit Gesamtnukleinsäureextrakten und DNase behandelten Extrakten durchgeführt. Für diese Ansätze wurden nur die Primer der internen Kontrolle in erhöhter Konzentration (0,1 μ M statt 0,04 μ M) eingesetzt. Die Primersequenzen sind in Tab. 12 angegeben.

Überprüfung der internen Kontrolle an verschiedenen Pflanzen

Um eine Übertragbarkeit der internen Kontrolle auf andere Pflanzenarten zu überprüfen, wurden neben TNA Extrakten von Apfel auch TNA Extrakte von den in Tab. 13 angegebenen Pflanzenarten (bzw. nicht näher definierter Sorten) getestet.

Tabelle 13: Liste der mit der internen Kontrolle überprüften Pflanzen

Pflanzenarten
<i>Beta vulgaris</i>
<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Prunus avium</i>
<i>Prunus x domestica</i>
<i>Pyrus communis</i>

<i>Solanum tuberosum</i>
<i>x Pyronia veitchii</i>

2.2.12 Viroidnachweis mittels RT-PCR

An Apfel und Birne sind verschiedene Viroide bekannt. An Apfel treten *Apple scar skin viroid*, *Apple dimple fruit viroid* und *Apple fruit crinckle viroid* auf, an Birne sind *Apple scar skin viroid* und *Pear blister cancer viroid* beschrieben. Über das Auftreten und die Verbreitung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland lagen nahezu keine Informationen vor. Ein Ziel dieses Projekts war es, neue Informationen über die Verbreitung dieser Viroide zu gewinnen. Da erst gegen Ende des Projekts notwendige Sequenzinformationen des *Apple fruit crinckle viroid* bekannt wurden und das Viroid bisher nur vereinzelt in Asien nachgewiesen werden konnte, wurden nur Primer für einen RT-PCR Nachweis der auch in Europa nachgewiesenen *Apple scar skin viroid*, *Apple dimple fruit viroid* und *Pear blister cancer viroid* entwickelt. Zur Erprobung des Verfahrens wurden von Dr. Jelkmann bereitgestellte Positivkontrollen von *Apple scar skin viroid* und *Pear blister cancer viroid* verwendet. Für das *Apple dimple fruit viroid* konnte leider keine Positivkontrolle beschafft werden.

Tabelle 14: Primersequenzen und erwartete Produktgrößen

Primer	Primersequenz in 5'-3' Orientierung	Primerposition ^a	Produkt
<i>Apple scar skin viroid</i>			
sense	GTGAGAAAGGAGCTGCCAGCACTAA	102 – 126	
antisense	CGGCCTTCGTCGACGACGACAGGTGA	76 – 101	331 bp
<i>Apple dimple fruit viroid</i>			
sense	GTAAGCCGTGACGCGTGGAGGAGA	105 – 128	
antisense	CAGCCTTCGTCGACGACGACAGGTAA	79 – 104	306 bp
<i>Pear blister cancer viroid</i>			
sense	CTGTCCCGCTAGTCGAGCGGACAA	193 – 216	
antisense	AAGACGAGGCTCAGGCGGGAAGCAA	168 – 192	315 bp

(^aDie Referenz Accession-Nummern [NCBI Genbank, National Center for Biotechnology Information] für die Bestimmung der Primerpositionen sind X71599 *Apple scar skin viroid*, X99487 für *Apple dimple fruit viroid*, Y18043 für *Pear blister cancer viroid*.)

Die Primer (Tab. 14) wurden so gewählt, das die gesamte Viroidsequenz amplifiziert werden kann, um bei entsprechend positiven Proben, nach erfolgter Sequenzierung, Vergleiche mit vollständigen Sequenzen durchführen zu können. Grundsätzlich wurden auch hier, ausgenommen die unterschiedlichen Fragmentgrößen, die unter Punkt 2.2.9 beschriebenen Überlegungen zum Primerdesign berücksichtigt.

Es wurde ein Standard-Reaktionsansatz mit je 1µl Primerarbeitslösung (10 µM) (jeweils sense und antisense) und das Standard RT-PCR Programm verwendet. Der Nachweis wurde mit einzeln eingesetzten und kombinierten Primerpaaren durchgeführt.

2.2.13 Multiplex RT-PCR

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung und Erprobung von nukleinsäuregestützten Nachweisverfahren für die wirtschaftlich wichtigen Viren (*Apple mosaic virus*, ApMV; *Apple stem pitting virus*, ASPV; *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV; *Apple stem grooving virus*, ASGV) an Apfel. Da die RT-PCR zur Zeit als die sensitivste nukleinsäuregestützte Möglichkeit des Nachweises für RNA Viren gilt und zudem kostengünstig und schnell durchführbar ist, wurden andere Verfahren nicht in Betracht gezogen. Die multiplex RT-PCR Verfahren wurden weitgehend nach den Empfehlungen von Henegariu *et al.* (1997) optimiert. Dabei wurden u.a. die Konzentrationen der Bestandteile des Reaktionsansatzes (u.a. MgCl₂-, Puffer-, HotStar *Taq* Polymerase- und Primerkonzentration für die einzelnen Templates) und die einzelnen Schritte des RT-PCR Programms variiert. Zu Beginn der Arbeiten war es das Ziel, im Idealfall alle vier Viren plus interne Kontrolle parallel in einem multiplex RT-PCR Ansatz amplifizieren zu können, um die Anzahl der Proben und somit den Zeitaufwand und die entstehenden Kosten zu minimieren. Da jedoch beim parallelen Nachweis von 3 Viren (ACLSV, ASPV, ApMV) aus 3-fach infizierten Proben bereits teilweise erhebliche Unterschiede in den Bandenintensitäten der einzelnen Viren im Gel zu erkennen waren, und in wenigen Fällen sogar einzelne Banden gar nicht im Gel identifiziert werden konnten, was somit für das entsprechende Virus zu falsch negativen Ergebnissen führt, wurde ab diesem Zeitpunkt an der Entwicklung von zwei getrennten multiplex RT-PCR Verfahren gearbeitet. Jedes Verfahren für zwei Viren plus interne Kontrolle, also jeweils maximal drei Fragmente. Die parallele Amplifikation von 2 viralen Fragmenten und der internen Kontrolle führte nur zu leichten Schwankungen in den Bandenintensitäten, falsch negative Nachweise wurden nicht beobachtet, alle Fragmente konnten eindeutig identifiziert werden. Die beiden multiplex RT-PCR Verfahren I und II unterscheiden sich lediglich in der Zusammensetzung der virusspezifischen Primer, alle sonstigen Parameter des PCR-Programms und die

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sind identisch, um die Durchführung so einfach wie möglich zu gestalten. Der Nachweis erfolgt zudem aus dem selben Nukleinsäureextrakt. Multiplex RT-PCR I dient dem Nachweis von ACLSV und ASGV, multiplex RT-PCR II dem von ASPV und ApMV.

Multiplex Standard-Reaktionsansatz:

- 7,5 µl 10x HotStar *Taq* PCR Puffer
- 0,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,5 µl Tween-20 (10%)
- 0,5 µl dNTP Mix (je 25 mM)
- 0,05 µl AMV Reverse Transcriptase (10 U/µl)
- 0,4 µl HotStar *Taq* Polymerase (5 U/µl)
- je 0,2 µl nad5 sense und antisense Primer (10 µM)
- auf 50 µl A. bidest. nach Zugabe der virusspezifischen Primer

Virusspezifische Primer für multiplex I:

- je 1,5 µl ACLSV sense und antisense Primer (10 µM)
- je 1,75 µl ASGV sense und antisense Primer (10 µM)

Virusspezifische Primer für multiplex II:

- je 0,75 µl ASPV sense und antisense Primer (10 µM)
- je 1,5 µl ApMV sense und antisense Primer (10 µM)

Programm multiplex RT-PCR

Reverse Transkription für 30 min bei 42°C

Enzymaktivierung 15 min 95°C

35 Zyklen (30 sek 94°C, 30 sek 62°C, 1 min 72°C)

Abschlussynthese 10 min 72°C

Entsprechend den Empfehlungen von Kwok und Higuchi (1989) und Singh (1998) wurden zur Vermeidung von Kontaminationen die Extraktion der Nukleinsäuren, der Tempate Tamer (mit UV-Licht sterilisierbarer Plexiglastasten zum Ansetzen des Reaktionsmixes), der Thermocycler und die Elektrophorese/der RT-PCR-ELISA räumlich voneinander getrennt. In

jedem RT-PCR Lauf wurden zur Kontrolle der Arbeitsqualität Negativkontrollen (Wasserkontrollen) und Positivkontrollen mitgeführt.

2.2.14 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Nukleinsäureextrakten, PCR-Produkten und Restriktionsspaltungen wurden Agarosegele verwendet. Da das Trennungsverhalten von der Agarosekonzentration abhängig ist (kurzkettige Nukleinsäuren werden besser in hohen, langkettige besser in niedrigen Konzentrationen aufgetrennt), werden unterschiedliche Konzentrationen für die verschiedenen Zwecke verwendet. Als Standardkonzentration werden 1%-ige Gele, für die multiplex RT-PCR I und II 1,5%-ige Gele und für hochmolekulare dsRNA 0,8%-ige Gele verwendet. Wenn nicht anders angegeben, werden jeweils 10 µl des Ansatzes mit dem 0,3-fachen Volumen Stopplösung vermischt und aufgetragen. Um die Laufweite auch bei Tageslicht überprüfen zu können, enthält die Stopplösung den Farbstoff Bromphenolblau, dessen Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld etwa der von Oligonukleotiden entspricht. Zu Beginn werden für 2 min bei 250 mA 80 V, anschließend bis zur gewünschten Auftrennweite 120 V angelegt. Die Auftrennung erfolgt in unterschiedlichen mit 1x TAE-Puffer gefüllten Standard-Horizontalkammern verschiedener Hersteller mit variierendem Elektrodenabstand. Als Nukleinsäurefarbstoff wurde Ethidiumbromid verwendet, die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden auf einem Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurden selbst hergestellter λ -*Pst*I DNA Standard oder verschiedene kommerziell erworbene DNA Standards verwendet. Die Dokumentation erfolgte photographisch auf Photopapier oder in digitaler Form.

Agarosegel

- 0,8 –1,5% Agarose
- 1x TAE
- 0,15 µg/ml Ethidiumbromid

50x TAE-Puffer (pH 8,44, mit Essigsäure eingestellt)

- 2 M Tris Acetat
- 50 mM EDTA
- 5,7% Essigsäure

Stopplösung

- 3,44 ml Glycerin
- 6,56 ml A. bidest.
- Spatelspitze Bromphenolblau

2.2.15 Herstellung des λ -*Pst*I DNA Standards:

Es werden 140 μ l λ -Phagen-DNA (0,4 mg/ml), 4 μ l *Pst*I (10 U/ μ l) und 30 μ l 10x NEB-Puffer 3 mit A. bidest. auf 300 μ l vermischt. Der Reaktionsansatz wird zuerst für 3 h bei 37°C inkubiert, anschließend wird die Temperatur für 10 min auf 70°C erhöht. Danach werden 100 μ l Glycerin-Stopplösung zugegeben, die Lagerung erfolgt bei -20°C.

Aus der 48502 bp langen λ -Phagen-DNA entstehen 28 Fragmente (Sanger, 1982).

Fragmentlängen der *Pst*I verdauten λ -Phagen-DNA in bp:

11497	5077	4749	4507	2838	2560
2459	2443	2140	1986	1700	1159
1093	805	514	468	448	339
264	247	216	211	200	164
150	94	87	72	15	

2.2.16 DNA Isolierung aus Agarose-Gelen

Wenn mittels Elektrophorese aufgetrennte Nukleinsäuren (u.a. PCR-Produkte, Vektoren) z.B. in der Ligation mit anschließender Klonierung eingesetzt werden sollen, müssen sie vorab aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt werden.

Dafür wird das QIAEX™ II Gel Extraction Kit der Fa. QIAGEN verwendet. Dazu wird die auf dem Transilluminator sichtbare Bande mit einem sterilen Skalpell möglichst exakt aus dem Gel ausgeschnitten und mit 400 μ l QX 1-Puffer bis zum vollständigen Lösen des Gelstücks geschüttelt. Nach der Zugabe von 10 μ l Glasmilch, an die die Nukleinsäuren reversibel binden sollen, wird für 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wird für 30 sek bei 13000 upm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes das Pellet in 500 μ l QX 1-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation von 30 sek bei 13000 upm wird das Pellet zweimal mit PE-Puffer durch resuspendieren und abzentrifugieren (30 sek, 13000 upm) gewaschen und danach im Heizblock getrocknet. Zum Lösen der DNA wird mit 25 μ l TE 10/0,1 für 10 min inkubiert. Die Glasmilch wird anschließend abzentrifugiert (30 sek, 13000

upm) und der Überstand, der die DNA enthält, abgenommen. Die Zusammensetzungen der Puffer sind in den Herstellerunterlagen nicht angegeben.

2.2.17 Vektor Herstellung und Ligation

Damit eine erfolgreiche Ligation durchgeführt werden kann, müssen Fragment und Vektor passende Enden besitzen, die von der DNA-Ligase zusammengefügt werden können. Dazu werden der Vektor und das entsprechende Fragment jeweils in einem Spaltungsansatz 2 h bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen inkubiert, über ein LM-Gel aufgetrennt und mit der in Kap. 2.2.16 beschriebenen Methode aufgereinigt. Auf diese Weise vorbereitete Vektoren und Fragmente werden in der Ligation eingesetzt. Desweiteren besteht auch die Möglichkeit, PCR-Produkte unter Verwendung von T-Vektoren direkt zu klonieren, da die *Taq* DNA-Polymerase die Eigenschaft besitzt, den PCR-Produkten am 3'-Ende in der Regel ein Adenosin-Nucleotid anzufügen (Clark, 1988). Dadurch können die Fragmente für das sogenannte T/A-Klonieren eingesetzt werden, auf den Einsatz von Restriktionsenzymen zur Vorbereitung kann somit verzichtet werden (Holton und Graham, 1991). Lediglich der Vektor muß auf stumpfe Enden geschnitten und an den 3'-Enden enzymatisch um ein Thymidin verlängert sein. Die Herstellung des T-Vektors erfolgt nach einer modifizierten Methode von Marchuk *et al.* (1991).

Dazu wird der Spaltungsansatz des Vektors 2 h bei 37°C, und anschließend nach Zugabe des Thymidierungsansatzes für weitere 2 h bei 70°C inkubiert. Das in der Spaltung für die T Vektor Herstellung verwendete Enzym *EcoRV* schneidet den Vektor innerhalb der multiple cloning site (MCS). Danach wird der T-Vektor ebenfalls über ein LM-Gel aufgetrennt und mit der in Kap. 2.2.16 beschriebenen Methode aufgereinigt.

Spaltungsansatz für Vektoren

- 6 µg pBluescript II SK⁻
- 30 U Restriktionsenzym (bei zwei verschiedenen Enzymen je 15 U)
- 6,7 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer
- auf 67 µl A. bidest.

Spaltungsansatz für Fragmente

- 5 - 20 µl PCR Fragment
- 20 U Restriktionsenzym (bei zwei verschiedenen Enzymen je 10 U)

- 3 μ l 10x Restriktionsenzym-Puffer
- auf 30 μ l A. bidest.

Thymidierungsansatzes:

- 3 μ l *Taq* DNA-Polymerase (1 U/ μ l)
- 9 μ l 10x PCR Puffer
- 9 μ l MgCl₂ (25 mM)
- 2 μ l dTTP (0,1 M)

Um den Vektor mit dem gewünschten Fragment kovalent zu verbinden, wird der Ligationsansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wird anschließend in der Transformation (Kap. 2.2.18) eingesetzt.

Ligationsansatz

- 2 μ l Vektor
- 2-10 μ l DNA-Fragment
- 0,5 μ l T4 DNA-Ligase (1 U/ μ l)
- 2 μ l 10x Ligationspuffer
- auf 20 μ l A. bidest.

In dieser Arbeit wurden neben, wie oben beschrieben, selbst vorbereiteten Vektoren auch bereits fertig präparierte Vektoren kommerzieller Anbieter verwendet, die direkt in der Ligation eingesetzt wurden.

2.2.18 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Die Transformation wird nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1983) durchgeführt, der umfangreiche Untersuchungen über die Auswirkungen einzelner Faktoren auf den Transformationserfolg von *E. coli* mit Plasmiden durchgeführt hat.

Die Bakterienstämme, die als Dauerkultur vorliegen (siehe Kap. 2.2.23), werden auf Platten aus LB-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Mehrere Einzelkolonien werden in je 1 ml SOB-Flüssigmedium suspendiert und anschließend in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 30 ml SOB-Flüssigmedium und 300 μ l Magnesiumlösung überführt. Die Bakterien werden bei 180 upm und 37°C im Schüttler bis zu einer OD_{550nm} von etwa 0,5

angezogen. Um das Wachstum der Bakterien zu stoppen, wird die Bakteriensuspension 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wird für 12 min bei 4°C und 1130 upm (Kühlzentrifuge RC 5 B plus mit Ausschwingrotor) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird nach Verwerfen des Überstandes in 10 ml Transformationspuffer resuspendiert und nach 10 min Inkubation auf Eis erneut unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 4 ml Transformationspuffer aufgenommen und für 10 min auf Eis gestellt. Danach werden 140 µl DND-Lösung zugegeben und die Bakteriensuspension wird für 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Die nach dieser Methode behandelten Bakterienzellen sind nun kompetent für die Aufnahme von Plasmiden. Je 200 µl der Bakteriensuspension werden zu einem Ligationsansatz (siehe Kap. 2.2.17) hinzugegeben. Als Transformationskontrolle werden 10 ng eines Kontrollplasmids ebenfalls in 200 µl Bakteriensuspension gelöst. Die Ansätze werden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 sek auf 42°C erhitzt. Die Ansätze werden direkt darauffolgend für 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 800 µl SOC-Flüssigmedium für 1 h bei 37°C im Schüttler kultiviert.

Die Flüssigkulturen werden in der Selektion (Kap. 2.2.19) eingesetzt.

Magnesiumlösung

- 1 M MgCl_2
- 1 M MgSO_4

Transformationspuffer (pH 6,2)

- 0,1 M RbCl
- 45 mM MnCl_2
- 10 mM CaCl_2
- 10 mM MES (mit 10 M KOH auf pH 6,3 eingestellt)
- 3 mM H_2CoCl_3

DND-Lösung (pH 7,5)

- 153 mg/ml DTT
- 90% DMSO
- 1% 1 M KAc

2.2.19 Selektion transformierter Zellen

Um den Erfolg der Transformation gleichzeitig mit der Kultur der Bakterien kontrollieren zu können, werden Aliquote der Ansätze auf Selektivmedien ausplattiert. Dabei macht man sich die Eigenschaften der verwendeten Vektoren zunutze.

Diese besitzen eine Ampicillinresistenz und ein *lacZ*-Gen, innerhalb dessen sich die multiple cloning site (MCS) befindet. Entwickeln sich Bakterienkolonien auf dem ampicillinhaltigen AIX-Medium, enthalten diese Zellen entweder das intakte Plasmid oder ein Konstrukt aus Plasmid und ligierter DNA (Insert).

Durch das *lacZ*-Gen, welches für ein Peptid codiert, ist eine weitere Selektion möglich. Dieses Peptid vereinigt sich mit einem Protein, welches durch das Genom der *E. coli*-Bakterien kodiert wird, und es entsteht ein aktives Enzym, die β -Galaktosidase. Dieses Enzym kann das ebenfalls im AIX-Medium enthaltene Substrat X-Gal umsetzen und führt dadurch zu einer Blaufärbung des Mediums. Da die multiple cloning site innerhalb des *lacZ*-Gens liegt, kann das notwendige Peptid nur gebildet werden, wenn sich an dieser Stelle kein Insert im Plasmid befindet. Die Bakterienkolonien, deren Bakterien ein Plasmid mit Insert in der MCS enthalten, bleiben demnach weiß. Diese Methode der Selektion wird als "blue-white screening" oder α -Komplementation bezeichnet.

Aliquote von 100 μ l jeder Flüssigkultur werden auf Platten mit AIX-Medium ausplattiert und bei 37°C über Nacht angezogen. Vom Kontrollansatz wird eine Verdünnungsreihe hergestellt (10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4}). Es werden 100 μ l jeder Verdünnungsstufe auf AP-Medium ausplattiert und ebenfalls bei 37°C über Nacht angezogen.

Da die Bakterienzellen weißer Kolonien nicht immer das gewünschte Insert enthalten, ist es notwendig, den Erfolg durch Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA (Kap. 2.2.20) und anschließenden Restriktionsverdau (Kap. 2.2.21) zu überprüfen, bevor die Aufreinigung für die Auftragssequenzierung vorgenommen wird (Kap. 2.2.22).

2.2.20 Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wird nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt.

Dazu werden jeweils 3,5 ml LB-AP-Flüssigmedium mit einzelnen weißen Bakterienkolonien angeimpft und für 6 h bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Danach werden 2 ml abgenommen und 3 min bei 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 μ l Lösung A resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur

werden 400 µl Lösung B dazugegeben, kurz gemischt und mit 300 µl Lösung C versetzt. Der Ansatz wird für 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird nochmals auf Eis gestellt und zentrifugiert. Um die Plasmid-DNA auszufällen, wird der Überstand mit 400 µl EtOH_{abs.} (bei -20°C gelagert) vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Abschließend wird für 10 min bei 13000 upm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes das Pellet im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 80 µl RNase-Lösung resuspendiert.

Lösung A (pH 8)

- 15 mM Tris HCl
- 10 mM EDTA
- 50 mM Glucose

Lösung B

- 0,2 M NaOH
- 1% SDS

Lösung C (pH 4,8)

- 3 M NaAc

Lösung D (pH 8)

- 0,1 M NaAc
- 50 mM Tris HCl

RNase-Lösung

- 0,1 mg RNase (75 U/mg)
- Gelöst in 10 ml TE 10/0,1.

2.2.21 Kontrolle der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau

Um eine erfolgreiche Rekombination des gewünschten Fragments im Plasmid zu überprüfen, wird ein Aliquot der resuspendierten Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Dazu wird der Reaktionsansatz für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend zur Überprüfung der Spaltungsprodukte auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Da die Plasmidsequenz und die Länge des gewünschten Inserts bekannt sind, kann über den Vergleich der Laufweite der Spaltungsprodukte mit dem λ -*PstI* DNA Standard eine Kontrolle der Plasmid-DNA erfolgen.

Reaktionsansatz

- 3 μ l Plasmid-DNA
- 1,5 μ l 10x Restriktionsenzym-Puffer
- 10 U Restriktionsenzym (bei Verwendung mehrerer Enzyme je 10 U)
- auf 15 μ l A. bidest.

2.2.22 Aufarbeitung der Plasmide für die Auftragssequenzierung

Da die Qualität (Reinheit) der Lysate für die Sequenzierung nicht ausreichend ist, müssen die für die Auftragssequenzierung bestimmten Plasmidpräparationen mit dem QIAGEN Mini Kit (QIAGEN) nachgereinigt werden. Dazu werden die Lysate mit dem 5-fachen Volumen Puffer PB vermischt, auf eine QIAprep mini Säule gegeben und für 2 min bei 13000 upm zentrifugiert. Die Säule wird anschließend mit 750 μ l Puffer PE gewaschen (30 sek, 13000 upm) und für 1 min trocken zentrifugiert (13000 upm). Die DNA wird abschließend mit 50 μ l Puffer EB 1 min eluiert und dann abzentrifugiert. Die Zusammensetzungen der Puffer sind vom Hersteller nicht angegeben.

2.2.23 Erstellung von Dauerkulturen

Um eine dauerhafte Verfügbarkeit von Bakterienkulturen zu ermöglichen, können sogenannte „Dauerkulturen“ erstellt werden. Dabei nutzt man die Möglichkeit, daß Bakterienkulturen durch Zugabe von Glycerin bei -20°C nahezu unbegrenzt lagerbar sind.

Dazu werden 500 μ l der Bakterienlösung mit 675 μ l 87%-igem Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert. Die Bakterien können nach dem Auftauen sofort in den entsprechenden Medien weiterkultiviert werden

2.2.24 Multiplex RT-PCR-ELISA

Für das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren wurden die Vor- und Nachteile der in der Literatur zu findenden Varianten (siehe hierzu Punkt 1.2.2) gegeneinander abgewogen. So ist

zum Beispiel die Verwendung von Digoxigenin-dUTPs zur Markierung der PCR-Produkte etwa 40x so teuer wie die Verwendung eines Digoxigenin markierten Primers. Sandwichhybridisierungen haben den Nachteil, daß die PCR-Produkte zwei möglichst hoch konservierte Sequenzbereiche besitzen müssen und bei Verfahren ohne Hybridisierung ist das Risiko hoher Hintergrundreaktionen durch die Bildung von Primerdimeren oder unspezifischen Amplifikationen gegeben (Menzel und Maiss, 2002). Die Verwendung von längeren cDNA oder cRNA Proben (798 Nukleotide) ist zwar im Vergleich zu Capture-Oligonukleotiden (22 Nukleotiden) 2-7 mal so sensitiv (Shamloul *et al.*, 2001), hat aber den Nachteil, daß diese nicht, oder nur zu sehr hohen Preisen kommerziell erhältlich sind. Da außerdem die kovalente Kopplung von Capture Oligonukleotiden deutlich günstiger ist als die Verwendung von Biotin-Streptavidin Systemen und die DIAPOPS-Technik deutlich zeitaufwendiger ist als andere PCR-ELISA Verfahren, wurde die Variante gewählt, bei der mittels eines Digoxigenin-Primers markierte PCR-Produkte an kovalent gebundene Capture-Oligonukleotide hybridisiert werden. Als Reaktionsgefäße wurden NucleoLink-Strips (Nunc) verwendet, die eine sehr hohe Bindungskapazität für kovalent via Carbodiimide-Kondensation gebundene Capture-Oligonukleotide besitzen. Voraussetzung für eine Bindung ist das Vorhandensein einer freien Phosphatgruppe am 5'-Ende der Oligonukleotide. Die Detektion der hybridisierten PCR-Produkte erfolgt mit Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase Konjugat durch Umsetzung von para-Nitrophenylphosphat. Der Ablauf ist zur Verdeutlichung in Abb. 3 schematisch dargestellt.

Zur Beschichtung der Oberflächen der Vertiefungen mit den Capture-Oligonukleotiden werden 100 µl Kopplungslösung in den einzelnen Vertiefungen für 5 h oder über Nacht bei 50° C inkubiert. Die Nukleinsäuresequenzen der Capture-Oligonukleotide sind in Tab. 15 wiedergegeben. Im Anschluß werden die Strips 3 mal mit Waschpuffer gewaschen, 5 min mit Wasser gefüllt stehen gelassen und abschliessend 3 mal mit Wasser gespült. Danach werden 20 µl einer 1:1 Mischung aus RT-PCR-Produkt und 1 M NaOH in die mit den entsprechenden Capture-Oligonukleotiden beschichteten Vertiefungen pipetiert (für multiplex RT-PCR I je eine Vertiefung für ACLSV, ASGV bzw. *nad5*, für multiplex RT-PCR II je eine Vertiefung für ASPV, ApMV bzw. *nad5*). Nach 10 min Denaturierung werden 80 µl Hybridisierungspuffer zugegeben und es wird für 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend werden die Strips mit 0,5x SSC (enthält 0,1% Tween-20) 3 mal gewaschen, weitere 15 min damit eingeweicht und erneut 3 mal gewaschen. Darauffolgend wird mit 90 µl Antikörperlösung 30 min bei 37° C inkubiert, um danach mit Waschpuffer 3 mal die Strips zu waschen, 5 min einzuweichen und nochmals 3 mal zu waschen. Für den kolorimetrischen

Nachweis werden 80 µl Substratlösung zugegeben und die Absorptionwerte werden nach 30 min Inkubation bei 37° C bei 405 nm im ELISA Photometer gegen Luft gemessen. Alle Werte sind nach Abzug der Werte der Substratkontrolle angegeben. Proben mit einem ELISA-Messwert über 0,1 werden als positiv angesehen.

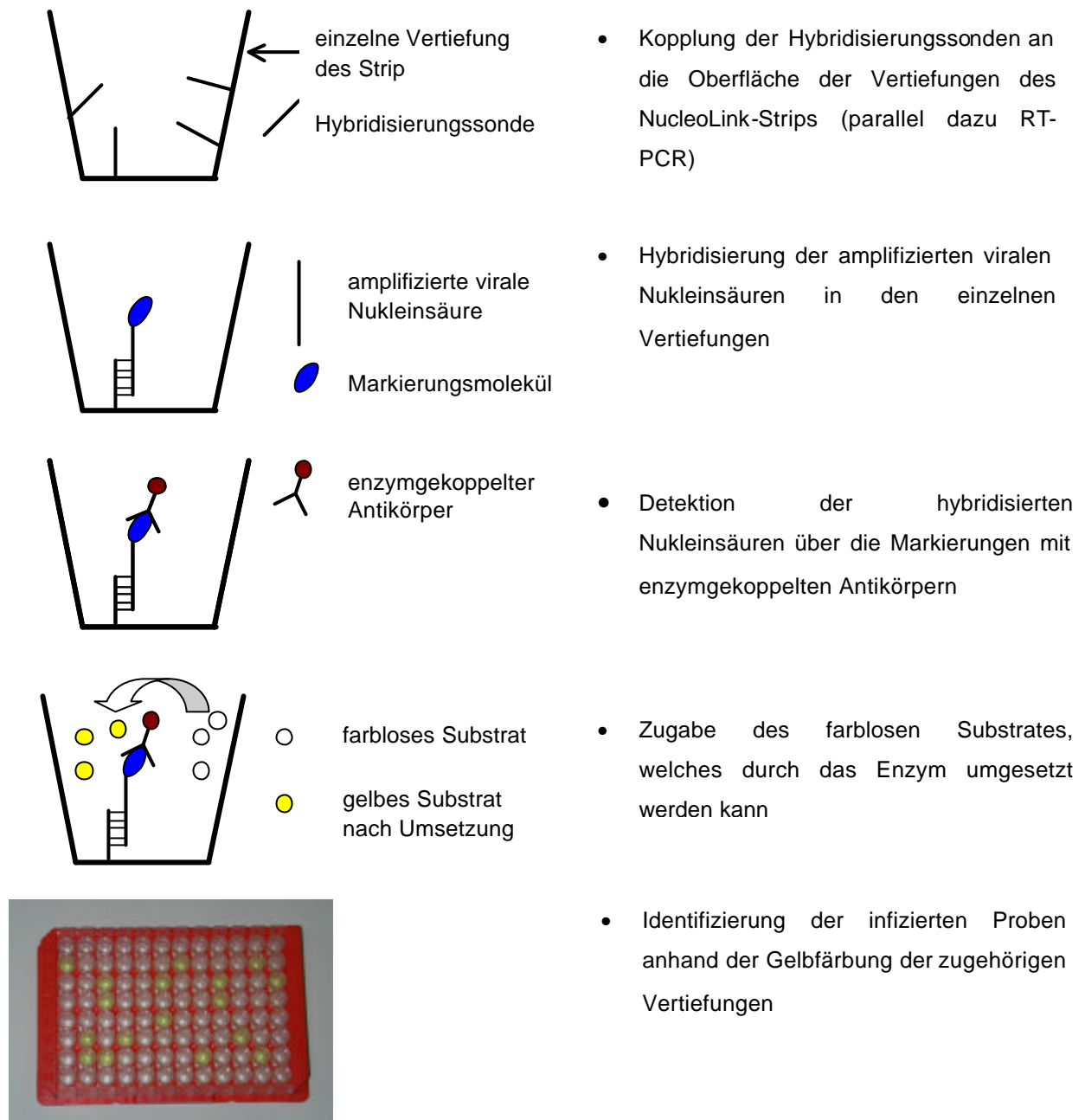


Abbildung 3: Schematische Darstellung des RT-PCR-ELISA Verfahrens

Tabelle 15: Capture-Oligonukleotid Sequenzen und Position

Capture Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3' Orientierung ^a	Position ^b
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	AAGATGGC/ACTCCAGTGTCTGTTCCAG	6883-6908
<i>Apple stem grooving virus</i>	TGTTTCTCATCAGGT/CGTTAGACGATTCA	6229-6256
<i>Apple stem pitting virus</i>	CAAAGAAGAAGTCAAAAGCTGCATACCT	8947-8974
<i>Apple mosaic virus</i>	AGTAATCCGAAAGGTCCGAATCCGAT	1534-1559
<i>nad5</i>	CTATGCGGATCCTCGGACATATATG	1910-1934

(^aDie Capture-Oligonukleotide tragen eine freie Phosphatgruppe am 5'-Ende. ^bDie Referenz Accession-Nummern (NCBI Genbank, National Center for Biotechnology Information) für die Bestimmung der Positionen sind D14996 für *Apple chlorotic leaf spot virus*, D21829 für *Apple stem pitting virus*, U15608 für *Apple mosaic virus*, AB004063 für *Apple stem grooving virus* und D37958 für das *nad5* Gen.)

Kopplungslösung (pH 7)

- 0,1 mM Capture-Oligonukleotid mit freier 5'-Phosphatgruppe
- 10 mM EDC
- 10 mM 1-Methyl-Imidazol

Waschpuffer (pH 7,5)

- 150 mM NaCl
- 10 mM Tris HCl
- 0,1% Tween-20

Hybridisierungspuffer (pH 7,5)

- 6,25x SSC
- 0,5 M Na₂HPO₄
- 0,625% Blocking Reagenz (Roche)

Antikörperlösung

- 1:2000 in Waschpuffer verdünntes Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase Konjugat
- 0,5% Blocking Reagenz (Roche)

Substratlösung (pH 9,8)

- 10% Diethanolamin
- 10 mg/ml para-Nitrophenylphosphat

2.2.25 Ersatz der NucleoLink-Strips (Nunc) durch DNA-Immobilizer (EXIQON)

Um bei dem RT-PCR-ELISA Verfahren bezüglich der Strips herstellerunabhängig zu sein, wurden die DNA-Immobilizer (EXIQON) im Vergleich zu den NucleoLink-Strips exemplarisch für ASPV getestet. Handhabung und Zeit-/Arbeitsaufwand sind vergleichbar, auch wenn die Kopplung der Capture-Oligonukleotide bei den DNA-Immobilizern auf einem anderen Mechanismus beruht. Nachteilig ist der mit ca. 10 Cent gegenüber ca. 4 Cent pro Vertiefung deutlich höhere Preis der EXIQON-Strips. Für die Kopplung der Capture-Oligonukleotide ist im Gegensatz zu den NucleoLink-Strips eine freie 5'-Aminogruppe und eine andere Kopplungslösung notwendig. Je Vertiefung werden 100 µl Kopplungslösung bei Rt für 2 h oder bei 4° C über Nacht inkubiert. Der restliche Ablauf entspricht dem für die NucleoLink-Strips beschriebenen.

Kopplungslösung (pH 9,6)

- 0,1 mM Capture-Oligonukleotid mit freier 5'-Aminogruppe
- 0,1 M NaCO₃

2.2.26 Nachweis von PCR-Produkten mittels DIG-Detection Test-Strips (Roche)

Eine weitere mögliche Alternative für die Gelelektrophorese stellen die DIG-Detection Test-Strips der Firma Roche für den Nachweis von RT-PCR Produkten dar. In der RT-PCR wird dafür wie bei der RT-PCR-ELISA Variante ein mit Digoxigenin modifizierter virusspezifischer Primer verwendet. Im Anschluß an die PCR wird kurz hitzedenaturiert und mit einem internen Biotin-modifizierten Oligonukleotid hybridisiert. Die Hybride, die im Falle einer vorausgegangenen Amplifikation (hier virusinfizierte Probe) aus einem mit Digoxigenin modifiziertem Strang und einem Biotin-Oligo bestehen, werden über eine Streptavidin-Biotin Bindung auf einer Streptavidin-Linie auf der Membran des Strips beim Lauf der Chromatographie gebunden. Die im Chromatographiepuffer enthaltenen Anti-Digoxigenin Gold-Konjugate (rotviolett gefärbt, aus Maus) binden an das Digoxigenin der Hybride und es bildet sich eine rotviolette Färbung auf der Streptavidin-Linie. Überschüssige Anti-Digoxigenin Gold-Konjugate werden von gegen sie gerichteten, auf der Membran an einer anderen Stelle fixierten Antikörpern (Anti-Maus Antikörper-Linie) als Kontrolllinie für

eine erfolgreiche Chromatographie sichtbar. Bei Ausbleiben einer Amplifikation (virusfreie Probe) entstehen keine Hybride und es wird im Laufe der Chromatographie nur die Kontrolllinie sichtbar. Das Verfahren wurde exemplarisch mit mehreren ASPV-Isolaten getestet. Der gesamte Nachweis dauert nur ca. 30 min nach Ablauf der RT-PCR, hat jedoch den Nachteil, daß ein Strip mit ca. 2,50 Euro relativ teuer ist.

Nach Ablauf der RT-PCR wird 1 µl 5'-Biotin-Oligonukleotidlösung (10 µM, sequenzidentisch mit dem in Tab. 15 angegeben Capture-Oligonucleotid für ASPV) zugegeben, für 5 min bei 95°C denaturiert und 10 min bei 37°C hybridisiert. Anschließend werden 5 µl des Ansatzes auf das Probenfeld aufgetragen und das Pufferfeld wird 5 sek in den Chromatographiepuffer (Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben) getaucht. Nach 10 min Wartezeit kann das Ergebnis abgelesen werden. Die Ergebnisse der Test-Strips verändern sich danach bei trockener Aufbewahrung nicht mehr und die Strips können somit für Dokumentationszwecke verwendet werden.

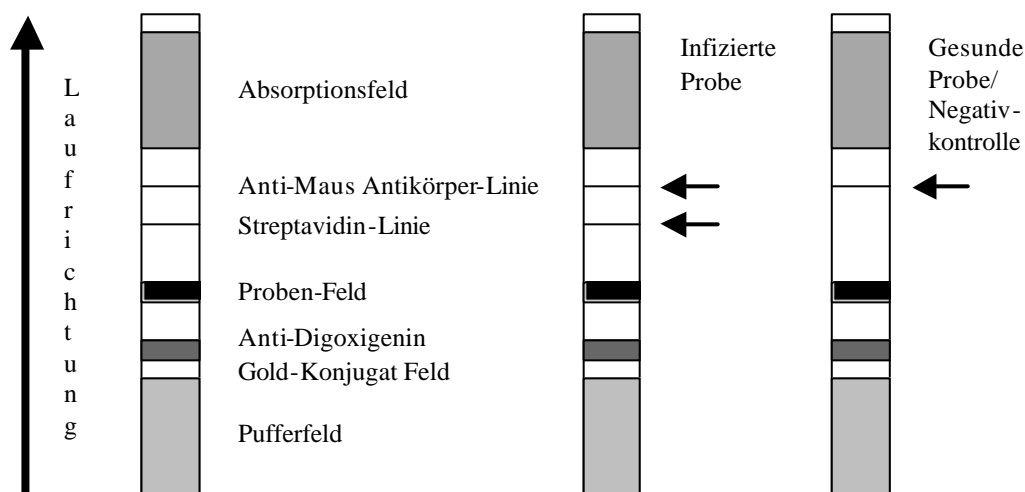


Abbildung 4: Schematische Darstellung der DIG-Detection Test-Strips (Roche)

2.2.27 Untersuchungen zur Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW)

2.2.27.1 PCR Nachweis von Phytoplasmen

Neben der Möglichkeit, Phytoplasmen spezifisch mit Indikatoren oder ELISA nachzuweisen, wurden von mehreren Autoren universell einsetzbare Primer für den PCR-Nachweis von Phytoplasmen beschrieben. Dabei werden die Primer in über alle Phytoplasmen hinweg konservierte Genombereiche (meist 16S-RNA/23S-RNA Gene) gelegt, so daß erst nach einem anschließenden Verdau der Amplifikate mit entsprechend selektiv schneidenden Restriktionsendonukleasen eine genau Bestimmung des Phytoplasmas möglich ist. Die unterschiedlichen Restriktions-Bandenmuster dienen auch der Klassifikation der Phytoplasmen. Die universelle PCR-Technik hat den Vorteil, das somit auch bisher nicht (auf

Nukleinsäureebene) charakterisierte Phytoplasmen detektiert und klassifiziert werden können. Aufgrund der widersprüchlichen Aussagen über die Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit wurde zu Beginn der Arbeiten versucht, die Ergebnisse von Bertaccini *et al.* (1998) mittels nested PCR zu reproduzieren. Ausserdem wurden zwei weitere nested PCR Verfahren zur Untersuchung von ARW infizierten Apfel- und Birnenbäumen eingesetzt (Seemüller, pers. Mitteilung; Heinrich *et al.*, 2002). Die 3 Verfahren unterscheiden sich wesentlich in der Nukleinsäureextraktionsmethode und den verwendeten Primerpaaren, sollen aber alle spezifisch und universell für Phytoplasmen einsetzbar sein.

2.2.27.1.1 Nested PCR nach Bertaccini *et al.* (1998)

DNA-Extraktion

Für die DNA Extraktion verwenden Bertaccini *et al.* (1998) ein Protokoll von Lee *et al.* (1991). Dabei werden 0,5 g Mittelrippen junger Blätter oder Phloemgewebe von 1 jährigen grünen Trieben in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 2 ml Extraktionspuffer 3 und 0,2 ml SDS (10%) vermischt und 1 h bei 55° C inkubiert. Anschließend wird für 10 min bei 6000 upm zentrifugiert, der Überstand zur Nukleinsäurefällung mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol versetzt und für weitere 15 min bei 8000 upm zentrifugiert. Das Pellet wird in 0,5 ml TEPS-Puffer aufgenommen und 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend werden erst 87,5 µl NaCl (5 M) und darauf 70 µl CTAB-Puffer zugegeben und der Ansatz wird 10 min bei 65°C inkubiert. Danach wird der Ansatz einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 24:1) und einmal mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1) extrahiert. Die DNA wird abschließend mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol gefällt, 10 min bei 8000 upm zentrifugiert und das resultierende Pellet mit 300 µl Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert und bei Rt getrocknet. Die extrahierte DNA wird in TE 10/0,1 bis zu einer Konzentration von 60 ng/µl aufgenommen.

Extraktionspuffer 3 (pH 8)

- 0,1 M Tris HCl
- 0,1 M EDTA
- 0,25 M NaCl
- 100 µg/ml Proteinase K

TEPS-Puffer (pH 8)

- 10 mM Tris HCl
- 1 mM EDTA
- 100 µg/ml Proteinase K
- 0,5% SDS

CTAB-Puffer

- 10% CTAB
- 0,7 M NaCl

PCR

Die Amplifikation erfolgt in zwei Abschnitten. Im ersten wird 1 µl Nukleinsäureextrakt von verschiedenen ARW infizierten und gesunden Proben eingesetzt, im zweiten dann 1 µl der 1:40 in A. bidest. verdünnten PCR-Produkte des ersten Abschnitts. Das PCR Programm und der Reaktionsansatz sind bis auf die eingesetzten Primer identisch. Im ersten Abschnitt wurde das Primerpaar R16F2/R16R2 und im zweiten das Primerpaar R16(X)F1/ R16(X)R1 verwendet (Primer nach Lee *et al.* [1995]; Tab. 16). Die Amplifikate wurden direkt und als Spaltungsprodukte von Ansätzen mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI*, *RsaI* und *AluI* gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Reaktionsansatz

- 1 µl Template (Extrakt oder verdünntes PCR Produkt)
- 5 µl 10x HotStar *Taq* PCR Puffer
- 2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,4 µl HotStar *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl)
- 0,5 µl dNTP-Mix (25 mM je dNTP)
- 0,5 µl Tween-20 (10%)
- je 1,5 µl je Primer (10 µM)
- auf 50 µl A. bidest.

Programm nested PCR

Enzymaktivierung 15 min 95°C

35 Zyklen (1min 94°C, 2 min 50°C, 3 min 72°C)

Abschlussynthese 10 min 72°C

Tabelle 16: Primer nach Lee *et al.* (1995)

Bezeichnung	Orientierung	Nukleinsäuresequenz (5'-3'-Orientierung)
R16F2	sense	ACGACTGCTAAGACTGG
R16R2	antisense	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG
R16(X)F1	sense	GACCCGCAAGTATGCTGAGAGATG
R16(X)R1	antisense	CAATCCGAACTGAGACTGT

2.2.27.1.2 Nested PCR nach Seemüller (pers. Mitteilung)

DNA Extraktion

Die Extraktion erfolgte nach einer von Ahrens und Seemüller (1992) beschriebenen Methode. Als Pflanzenmaterial werden 0,5 g zerkleinerte Blattmittelrippen oder Sproßspitzen verwendet, die anschließend für 10 min in 6 ml eiskaltem Homogenisationspuffer inkubiert werden. Anschließend wird das Pflanzenmaterial gemörsert, es werden weitere 8 ml Extraktionspuffer 4 zugegeben und erneut gemörsert. Das Homogenat wird für 4 min und 4°C bei 1100 g (Kühlzentrifuge RC 5 B plus mit Ausschwingrotor) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und erneut bei 4°C und 14600 g (Kühlzentrifuge RC 5 B plus mit Ausschwingrotor) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 1,5 ml 60°C warmen Extraktionspuffer aufgenommen und für 30 min inkubiert. Anschließend werden die Proben mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenmischungsverhältnis 24:1) extrahiert, mit dem 0,6 fachen Volumen Isopropanol (-20°C) vermischt und für 20 min bei 15000 g (Kühlzentrifuge RC 5 B plus mit Ausschwingrotor) zentrifugiert. Das so erhaltene Nukleinsäurepellet wird mit 300 µl Ethanol (70%) gewaschen, im Vacuum getrocknet und in 100 µl A. bidest. aufgenommen. Abschließend wird nach Zugabe von 5 µg RNase A bei 37°C für 30 min inkubiert, zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenmischungsverhältnis 24:1) extrahiert. Die Nukleinsäuren werden erneut wie oben beschrieben mit Isopropanol gefällt, gewaschen und getrocknet. Die extrahierte DNA wird in TE 10/0,1 bis zu einer Konzentration von 100 ng/µl aufgenommen.

Homogenisationspuffer (pH 7,6)

- 125 mM Na₃PO₄
- 30 mM Ascorbinsäure
- 10% Sucrose

- 0,16% BSA
- 2% PVP-40

Extraktionspuffer 4 (pH 8)

- 2% CTAB
- 1,4 M NaCl
- 0,2% 2-MeEtOH
- 20 mM EDTA
- 0,1 M Tris HCl

PCR

Die Amplifikation erfolgte bis auf ein anderes nested PCR-Programm und die Verwendung anderer Primer im Reaktionsansatz entsprechend der unter Punkt 2.2.27.1.1 beschriebenen. Im ersten Abschnitt wurde das Primerpaar P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995) und im zweiten das Primerpaar U5/U3 (Lorenz *et al.*, 1995) verwendet (Tab. 17). Die Amplifikate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Programm nested PCR

Enzymaktivierung 15 min 95°C

35 Zyklen (30 sek 95°C, 45 sek 55°C, 2 min 72°C)

Abschlussynthese 10 min 72°C

Tabelle 17: Primer nach Seemüller (pers. Mitteilung)

Bezeichnung	Orientierung	Nukleinsäuresequenz (5'-3'-Orientierung)
P1	sense	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA
P7	antisense	CGTCCTTCATCGGCTCTT
U5	sense	CGGCAATGGAGGAAACT
U3	antisense	TTCAGCTACTCTTTGTAACA

2.2.27.1.3 Nested PCR nach Heinrich *et al.* (2002)

DNA Extraktion

Die DNA Extraktion erfolgte mit dem GenElute™ Plant Genomic DNA Kit (Sigma). Dabei werden 100 mg Blattmaterial (Mittelrippen) in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 350 µl

Lysis Puffer A und 50 µl Lysis Puffer B versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Danach werden 130 µl Präzipitationspuffer zugegeben und die Proben werden 5 min auf Eis gehalten. Nach 5 min Zentrifugation bei 13000 upm wird der Überstand auf eine Filtersäule gegeben, 1 min bei 13000 upm zentrifugiert und das Filtrat wird, mit 700 µl Bindungspuffer vermischt, auf die DNA-Bindungssäule gegeben und 1 min bei 13000 upm zentrifugiert. Die Säule wird zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen (je 1 min bei 13000 upm zentrifugiert) und die DNA wird mit 100 µl Elutionspuffer (auf 65°C vorgewärmt) eluiert (2 min bei 13000 upm zentrifugiert). Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer ist vom Hersteller nicht angegeben.

PCR

Die Amplifikation erfolgte mit unterschiedlichen PCR-Programmen für die beiden Abschnitte. Bis auf die Verwendung anderer Primer und den Einsatz von 1,5 µl Nukleinsäureextrakt im 1. Abschnitt entspricht der Reaktionsansatz dem unter 2.2.27.1.1 beschriebenen. Im ersten Abschnitt wurde das Primerpaar PA2F/PA2R und im zweiten das Primerpaar NPA2F/NPA2R verwendet (Tab. 18). Die Amplifikate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Programm nested PCR

1. Abschnitt:

Enzymaktivierung 15 min 95°C

35 Zyklen (30 sek 94°C, 1:15 min 60°C, 1:30 min 72°C)

Abschlussynthese 10 min 72°C

2. Abschnitt:

Enzymaktivierung 15 min 95°C

35 Zyklen (30 sek 95°C, 30 sek 60°C, 45 sek 72°C)

Abschlussynthese 10 min 72°C

Tabelle 18: Primer nach Heinrich *et al.* (2002)

Bezeichnung	Orientierung	Nukleinsäuresequenz (5'-3'-Orientierung)
PA2F	sense	GCCCCGGCTAACTATGTGC
PA2R	antisense	TTGGTGGGCCTAAATGGACTC
NPA2F	sense	ATGACCTGGGCTACAAACGTGA
NPA2R	antisense	GGTGGGCCTAAATGGACTCG

2.2.27.2 Nachweistechniken für nicht charakterisierte Viren

Aufgrund der selbst gewonnenen Ergebnisse mittels drei verschiedener nested PCR Verfahren, bei denen keine eindeutige Assoziation von Phytoplasmen mit ARW gezeigt werden konnte, und der Tatsache, daß sich der Erreger der Gummiholzkrankheit bezüglich der Übertragung für Phytoplasmen untypisch verhält (für alle Phytoplasmen sind Vektoren bekannt (Seemüller, pers. Mitteilung), nicht aber für den Erreger der Gummiholzkrankheit, dessen spontanes Auftreten im Feld noch nie beschrieben wurde), wurde nun versucht, ein möglicherweise mit ARW assoziiertes Virus nachzuweisen. Für den Nachweis von bisher unbekanntem Viren/Viroiden gibt es im Gegensatz zu den Phytoplasmen keine als universell einsetzbar beschriebene Technik. Die Elektronenmikroskopie ist zwar für viele bekannte Viren universell einsetzbar und auch Viroide konnten elektronenmikroskopisch dargestellt werden, aber die verwendeten EM-Techniken unterscheiden sich teilweise erheblich voneinander. Desweiteren wird die Anwendbarkeit der Elektronenmikroskopie durch teilweise instabile Viruspartikel und insbesondere in Gehölzen auftretende sehr niedrige Viruskonzentrationen begrenzt. Gleiches gilt für Virusreinigungen, die sich aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Viruspartikel und Empfindlichkeiten gegen einzelne Chemikalien und Lösungsmittel stark voneinander unterscheiden. Die von Morris und Dodds (1979) beschriebene Technik der dsRNA-Extraktion erlaubt es, dsRNA selektiv aus Gesamtnukleinsäure zu isolieren. DsRNA konnte bisher für viele (+) ssRNA Viren aus infizierten Pflanzen isoliert werden (vermutlich Replikationsintermediate). Ebenso wurde die Extrahierbarkeit von dsRNA von vielen dsRNA Viren und von ambisense RNA besitzenden (-) ssRNA Viren (*Tospoviridae*) gezeigt (Dodds, 1993; Okuda und Hanada, 2001). Von anderen (-) ssRNA Viren (*Rhabdoviridae*, *Ophiovirus*, *Tenuivirus*), Retroviren und DNA Viren ist keine erfolgreiche dsRNA-Extraktion in der Literatur beschrieben. Neben der Elektronenmikroskopie und dsRNA-Extraktion wurden zwei weitere Techniken, die SISPA Technik und cDNA Subtraktion, eingesetzt, deren Anwendung zur Identifikation viraler Nukleinsäuren aus Pflanzen in der Literatur bisher nicht beschrieben ist.

2.2.27.2.1 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden überwiegend am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz selbst und zwischenzeitlich an der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig mit Unterstützung von Herrn Dr. Lesemann durchgeführt. Es wurden ausschließlich Tropfpräparate verwendet. Dazu wird mit der Rückseite einer Pasteurpipette ein kreisrundes Gewebstück ausgestanzt und in einem Tropfen Phosphatpuffer

homogenisiert. Anschließend wird ein mit Pyroloform beschichtetes und mit Kohle bedampftes Kupfergrid auf einem Tropfen des Homogenats 10 min inkubiert, mit 30 Tropfen A. bidest. gespült, mit einem Stück Filterpapier vom Rand aus getrocknet und mit 5 Tropfen Uranylacetat (1% in A. bidest.) kontrastiert. Das überschüssige Uranylacetat wird ebenfalls mit einem Stück Filterpapier seitlich abgezogen. Die Grids wurden bei verschiedenen Vergrößerungen (30000x bis 400000x) mikroskopiert.

Phosphatpuffer (pH 7)

- 38,8 ml KH_2PO_4 (0,5 M)
- 61,2 ml Na_2HPO_4 (0,5 M)
- auf 500 ml A. bidest.

2.2.27.2.2 Anzucht und Kultur von Pflanzen im Gewächshaus

Die Samen der verwendeten Pflanzen wurden in 12er Töpfen in Fruhstorfer Erde (Typ P) gesät und nach Erreichen der pikierfähigen Pflanzengröße direkt in einzelne 10er Töpfe mit dem selben Substrat pikiert. Die Kultur erfolgte bei 20°C/22°C Heizungs-/Lüftungstemperatur und mindestens 5 klx (Assimilationszusatzbelichtung) zwischen 6 h und 22 h. Es wurde 1 mal wöchentlich mit 0,02%-igem Blattdünger (22 + 4 + 6 mit Spurennährstoffen) gedüngt.

2.2.27.2.3 Übertragungsversuche

Da von einigen Viren bekannt ist, daß sie in krautigen Pflanzen deutlich höhere Virustiter als in ihren holzigen Wirten erreichen, wurde versucht, den vermeintlichen viralen Erreger der Gummiholzkrankheit auf krautige Pflanzen zu übertragen. Dabei wird Pflanzengewebe im Gewicht/Volumen Verhältnis von 1:4 in Inokulationspuffer gemörsert und mit dem Daumen mit leichtem Druck auf mit Celite bestäubte, nicht vollständig entwickelte Blätter gestrichen, um über die so erzeugten Verletzungen der Zellwände eine Virusinfektion zu ermöglichen. Anschließend werden die inokulierten Blätter mit Wasser abgespült. Die in den Übertragungsversuchen verwendeten Pflanzenarten sind in Tab. 19 in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

Tabelle 19: Liste der in den Übertragungsversuchen verwendeten Pflanzenarten und Sorten

Pflanzenart	Sorte (wenn bekannt)
<i>Chenopodium foetidum</i>	
<i>Chenopodium quinoa</i>	
<i>Cucumis sativus</i>	'Mervita'
<i>Cucurbita pepo</i>	'Gold Rush'
<i>Gomphrena globosa</i>	
<i>Helianthus annuus</i>	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	'Lizzy'
<i>Nicotiana benthamiana</i>	
<i>Nicotiana glauca</i>	
<i>Nicotiana occidentalis</i>	
<i>Nicotiana occidentalis</i>	'Obliqua'
<i>Nicotiana occidentalis</i>	'P1'
<i>Nicotiana tabacum</i>	'Xanthi'
<i>Nicotiana tabacum</i>	'Samsun nn'
<i>Phaseolus vulgaris</i>	'Carioca'
<i>Phaseolus vulgaris</i>	'Duffix'
<i>Phaseolus vulgaris</i>	'Saxa'
<i>Physalis alkekengi</i>	
<i>Vicia faba</i>	
<i>Zinnia elegans</i>	

Inokulationspuffer (pH 7)

- 38,8 ml KH_2PO_4 (0,5 M)
- 61,2 ml Na_2HPO_4 (0,5 M)
- 0,5% PVP-40
- auf 500 ml A. bidest.

2.2.27.2.4 Stamminokulation von Bakterien

Zur Übertragung von Bakterien auf Apfelbäume wurden diese in ca. 40 cm Stammhöhe mit einem 3 mm Bohrer mittig durchbohrt. Durch das entstandene Loch wurde ein Baumwollfaden gezogen und so am anderen Ende verknotet, daß er nicht zurückrutschen kann. Das freie Ende wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß durch ein in den Deckel gebohrtes

Loch gesteckt. Die Bakteriensuspension (2 ml, eingestellt auf OD von 0,785) wurde in das Gefäß gefüllt und der Deckel wieder verschlossen. Nach jeweil 24 h wurde die Bakteriensuspension 3 mal wieder aufgefüllt. Bei den Kontrollbäumen wurden mit Wasser inokuliert.

2.2.27.2.5 DsRNA Extraktion

Die Extraktion doppelsträngiger RNA wurde mit einer nach Morris und Dodds (1979) modifizierten Methode durchgeführt. Das Grundprinzip dieser Technik beruht auf der selektiven Bindung von dsRNA an CF11 Cellulose in wässrigen Lösungen mit 16,5% EtOH. Dabei werden ca. 15 g Pflanzenmaterial (Blätter, Rindengewebe mit vegetativen Knospen oder Blüten) mit 20 ml Chloroform, 20 ml 2x STE, 3 ml SDS (10%), 0,4 g PVP-400 und 0,4 ml 2-MeEtOH 30 min auf Eis gerührt. Anschließend wird für 30 min bei 6000 upm (Heraeus Minifuge 2 mit Ausschwingrotor) und 4°C zur Phasentrennung zentrifugiert und 20 ml des Überstandes werden abgenommen, mit 4 ml EtOH_{abs} auf 16,5% EtOH eingestellt und 10 min mit 2 g CF11 Cellulose zur Bindung der dsRNA gerührt. Die Cellulose wird für 2 min bei 6000 upm (Heraeus Minifuge 2 mit Ausschwingrotor) abzentrifugiert, 4 mal mit 40 ml 1x STE(+ 16,5% EtOH) gewaschen und mit 20 ml 1x STE (+ 16,5% EtOH) in eine Spritze gegeben, die mit etwas Baumwollwatte am Boden abgedichtet ist. Die so entstandene Cellulosesäule wird mit 100 ml 1x STE (+ 16,5% EtOH) gewaschen und die dsRNA anschließend mit 13 ml 1x STE eluiert. Die dsRNA wird mittels NaAc-EtOH-Fällung konzentriert und in 0,4 ml 1x DNase-Puffer aufgenommen. Gegebenenfalls noch vorhandene Cellulose wird kurz abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorftube überführt und zum Abbau kontaminierender DNA mit 15 U RQ1 DNase (1u/µl) 30 min bei 37°C inkubiert. Darauf folgend werden 0,2 ml 1 M MgCl₂ und 2 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und erneut 30 min bei 37°C inkubiert, um eventuell noch vorhandene ssRNA zu verdauen. Anschließend wird der Ansatz einer Phenol-Chloroform Extraktion unterzogen und die dsRNA erneut mittels NaAc-EtOH-Fällung konzentriert und in 20 µl TE 10/0,1 aufgenommen. Die dsRNA wird auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt.

2x STE (pH 6,8)

- 0,2 M NaCl
- 0,1 M Tris HCl
- 2 mM EDTA

2.2.27.2.6 SISPA-Technik

Mithilfe der von Allander *et al.* (2001) entwickelten SISPA-Technik (Sequence-Independent Single Primer Amplification) wurden in Blutserum bisher unbekannte Viren entdeckt. Diese Technik beruht darauf, Viruspartikel von anderen zellulären Bestandteilen und Pathogenen (z.B. Bakterien) mittels Filtration durch bakteriendichte Filter zu trennen, und anschließend freie Nucleinsäuren im Filtrat enzymatisch zu verdauen. Die viralen Nucleinsäuren bleiben durch ihre Proteinhülle geschützt unverdaut. Im Anschluß daran werden die viralen Nucleinsäuren extrahiert und stehen ohne Verunreinigungen mit Wirtsnucleinsäuren zur Verfügung. Anschließend werden die Nucleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen verdaut (für Viren mit dsDNA Genom), passende Adapter ligiert und anschließend mit Adaptersequenz-spezifischen Primern amplifiziert, kloniert und sequenziert. Handelt es sich nicht um Viren mit dsDNA Genom, muß eine Zweitstrangsynthese zwischengeschaltet werden, für RNA Genome zusätzlich noch vorab eine cDNA Synthese. In der Literatur gibt es bisher keine Hinweise auf eine Erprobung dieser Technik an virusinfizierten Pflanzen. Da Nucleinsäuren-enhaltende pflanzliche Zellbestandteile wie Mitochondrien, Plastiden und Zellkerne einen größeren Durchmesser als die Poren der verwendeten Filter (Porenweite 0,2 µm) haben (Nultsch, 1991), sollte eine Übertragbarkeit möglich sein.

Modifizierte SISPA für DNA und RNA Viren in Pflanzen

Für die Herstellung des Presssaftes werden 150 mg Blattgewebe oder Blütenblätter in 1 ml 1x DNase Puffer gemörsert. Anschließend werden grobe Bestandteile und Schwebstoffe, die die Filter verstopfen würden, mit 5 min bei 10000 upm abzentrifugiert und der Überstand wird von Hand durch einen Membranfilter (Porenweite 0,2 µm, Roth) gepresst. Die Ansätze für DNA und RNA Viren wurden ab diesem Schritt separat weiterverarbeitet. Zu jeweils 300 µl Filtrat werden 100 U DNase zugegeben und 2 h bei 37 inkubiert. Parallel dazu wird der Ansatz, der auf mögliche Präsenz von Viren mit RNA Genom getestet wird, zusätzlich mit 20 µg RNase versetzt. Die unverdauten Nucleinsäuren werden anschließend aus dem Ansatz für DNA Viren mit dem DNeasy Kit (QIAGEN), für RNA Viren mit dem RNeasy Kit (QIAGEN) extrahiert und anschließend in 30 µl A. bidest. aufgenommen. Die extrahierte RNA wird nun für die cDNA Synthese mit 8,4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (25 mM je dNTP), 1 µl Random-Hexameren (10 pm/µl) und 6 U AMV Reverse Transcriptase (10 U/µl) 1 h bei 42°C inkubiert. Zur Zweitstrangsynthese werden 8 µl 10x Klenow DNA Polymerase Puffer und 4 U Klenow DNA Polymerase I (1 U/µl) zugegeben und mit A. bidest. auf 80 µl aufgefüllt. Anschließend wird 1 h bei 12°C, 1 h bei 22 °C, 30 min bei 37°C und 10 min bei

72°C inkubiert. Auch die extrahierte DNA wird einer Zweitstrangsynthese unterzogen, um auch eventuell vorhandene ssDNA Viren mit zu erfassen. Dem DNA Ansatz wird zur Zweitstrangsynthese zusätzlich noch 1 µl Random-Hexamere (10 pm/µl) zugegeben. Im Anschluß an die Zweitstrangsynthese werden 2 µl der Restriktionsendonuklease *Csp6I* (10 U/µl) zugegeben und die Ansätze werden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Ansätze nach Phenol-Chloroform Extraktion und Natriumacetat-Ethanol Fällung in je 20 µl 1,5x Ligase Puffer aufgenommen, mit 6 U T4 DNA Ligase und 4µl Adapter Mix 1 h bei 4°C und 4 h bei 20°C inkubiert.

Die Amplifikation erfolgt in einem PCR Standard-Reaktionsansatz mit HotStar *Taq* DNA Polymerase mit je 2 µl Ligationsansatz und 4 µl Primer Arbeitslösung Primer NBam24 (10 µM). Die PCR-Produkte werden auf einem 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennt, die entsprechend differentiellen Banden, die nur bei der infizierten Probe auftreten, ausgeschnitten, aufgereinigt, kloniert und sequenziert.

Adapter Mix

- 1 µl Primer NBam24 (10 µM)
- 1 µl NCsp (10 µM)
- 8 µl A bidest.
- Für 1 min auf 95°C erhitzen, 5 min auf Eis abkühlen.

SISPA PCR Programm

Enzymaktivierung 15 min 95°C

40 Zyklen (1 min 94°C, 3 min 72°C)

Tabelle 20: Primer und Adapter der SISPA Technik

Bezeichnung	Nukleinsäuresequenz
NBam24	AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG
NCsp	TACTCCCTCGG

2.2.27.2.7 Subtraktion von cDNA

Die Anwendung von cDNA Subtraktionen ermöglicht es, stark vereinfacht formuliert, aus polyadenylierter RNA hergestellte Populationen von cDNA-Klonen aus ARW infizierten und gesunden Pflanzen miteinander zu vergleichen (Abb. 5).

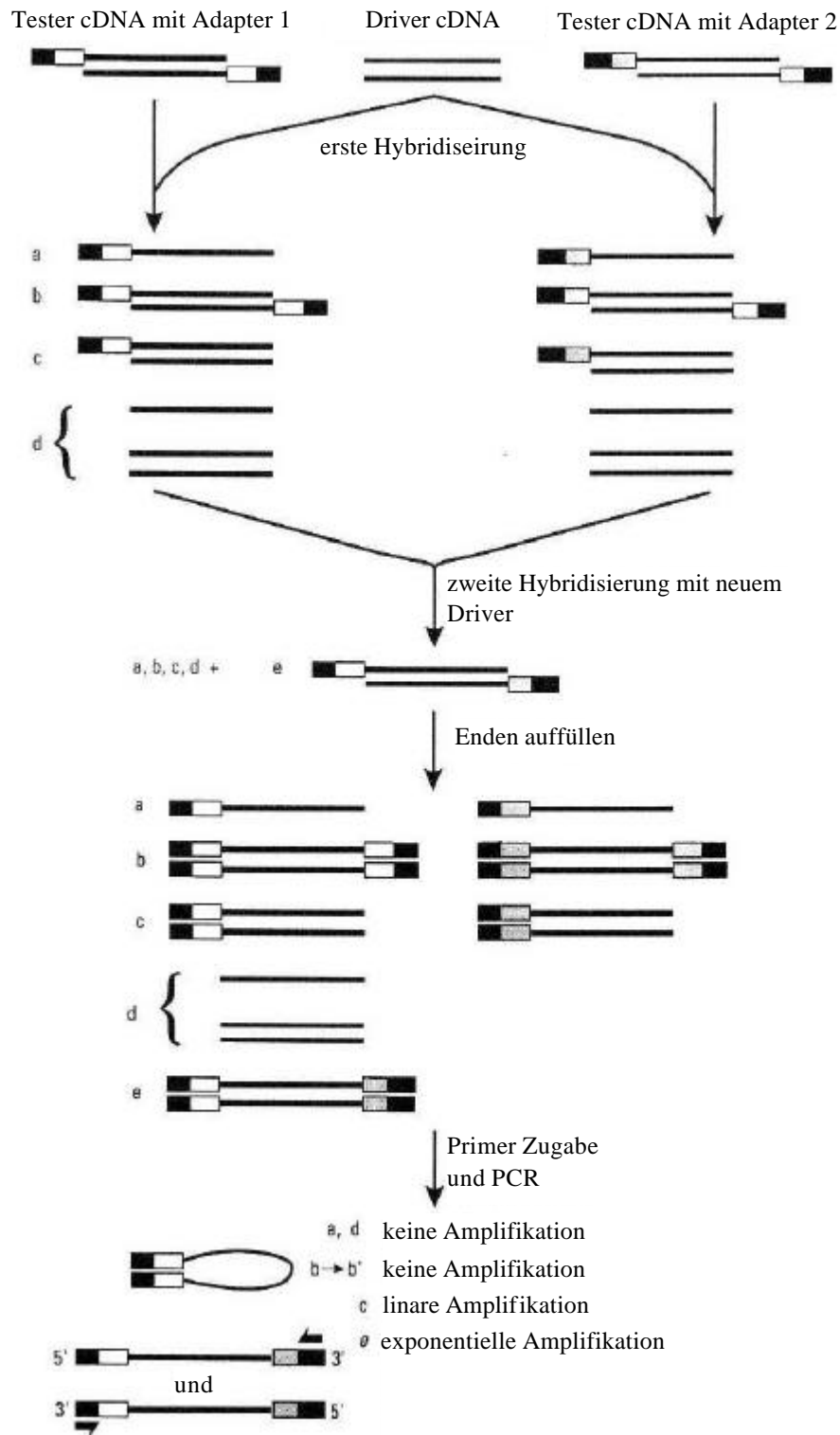


Abbildung 5: Schematische Darstellung der cDNA Subtraktion

(Die Abbildung wurde dem Handbuch entnommen [Clontech, 2000] und übersetzt.)

Werden einzelne differentielle cDNA-Klone in der infizierten Probe identifiziert, dann kann es sich hierbei um genomische Sequenzen oder mRNA des Erregers handeln, oder aber um mRNA von aufgrund der Infektion stärker transkribierten pflanzlichen Genen. Um genauen

Aufschluß über den Ursprung der differentiellen Klone zu erhalten, müssen diese sequenziert und die Sequenzen abschließend analysiert werden. Für die Untersuchungen wurden das SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit und PCR-Select™ cDNA Substraction Kit der Firma Clontech eingesetzt. Bei der Durchführung des Verfahrens wurde wir von Frau Dr. F. Krajinski (Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover) unterstützt.

Im Folgenden werden auch die in den Handbüchern verwendeten Bezeichnungen "Tester" für die ARW infizierte Probe und "Driver" für die gesunde Kontrollpflanze verwendet. Die Technik wurde auch parallel mit vertauschtem Tester und Driver durchgeführt, d.h. die nicht infizierte Pflanze als Tester und die infizierte als Driver. Somit besteht die Möglichkeit einzelne differentielle cDNA-Klone in der nicht infizierten Probe zu identifizieren. Bei diesen Klonen kann vermutet werden, daß die Transkription des entsprechenden Gens in der infizierten Pflanze bedingt durch den Erreger vermindert ist. Auch hier ist für einen genaueren Aufschluß über den Ursprung eine Sequenzierung der differentiellen Klone notwendig.

cDNA Synthese und Amplifikation

Zu Beginn wurde von einer ARW infizierten und einer gesunden Kontrollpflanze RNA unter Verwendung des QIAGEN RNeasy Kit extrahiert und auf 125 µg RNA/µl eingestellt. Die Erststrang cDNA Synthese und cDNA Amplifikation wurde mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit für Tester und Driver durchgeführt.

Dazu werden 3 µl RNA-Extrakt, 1 µl 3' SMART CDS Primer II A (10 µM) und 1 µl SMART II A Oligo (10 µM) gemischt und 2 min bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Rt werden 5 µl Erststrangmix zugegeben, 1 h bei 42°C inkubiert und anschließend wird der Ansatz mit 40 µl TE 10/1 verdünnt und für 7 min auf 72°C erhitzt. Zur cDNA Amplifikation werden 3 µl cDNA zum PCR Reaktionsmix gegeben und mit dem cDNA PCR Programm amplifiziert.

Erststrangmix

- 2 µl 5x Erststrang Puffer
- 1 µl DTT (20 mM)
- 1 µl dNTP Mix (10 mM je dNTP)
- 1 µl PowerScript Reverse Transcriptase (20 U/µl)

PCR Reaktionsmix

- 10 µl 10x Advantage 2 PCR Puffer
- 2 µl dNTP Mix (10 mM je dNTP)
- 2 µl 5' PCR Primer II A (10 µM)
- 2 µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix
- 81 µl A. bidest.

Tabelle 21: Primer für die Erst- und Zweitstragsynthese

Bezeichnung	Nukleinsäuresequenz (5'-3'-Orientierung)
3' SMART CDS Primer II A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
SMART II A Oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT ₍₃₀₎ N ₍₋₁₎ N
5' PCR Primer II A	AAGCAGTGGTATAACGCAGAGT

(N: A, C, G, T; N₍₋₁₎: A, G, C.)

cDNA PCR Programm

1 min 95°C

17 Zyklen (15 sek 95°C, 30 sek 65°C, 6 min 68°C)

Aufreinigung und Restriktionsverdau der amplifizierten cDNA

Die amplifizierte cDNA wurde mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit der Firma Invitex aufgereinigt. Dazu werden 130 µl Puffer P zum PCR Ansatz gegeben, auf eine Spin Filter Säule pipettiert und 1 min stehen gelassen. Anschließend wird für 30 sek bei 10000 upm zentrifugiert, die Säule mit 700 µl Waschpuffer gewaschen (30 sek bei 10000 upm zentrifugiert) und für 3 min bei 13000 upm trocken zentrifugiert. Die DNA wird abschließend mit 300 µl A. bidest. eluiert (3 min bei Rt inkubiert und 1 min bei 10000 upm zentrifugiert). Die Pufferzusammensetzungen sind vom Hersteller nicht angegeben.

Um für die anschließende Adapter Liagtion und Subtraktion kürzere dsDNA Fragmente zu erhalten, wird die DNA mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* gespalten. Dazu wird die eluierte DNA im Spaltungsansatz 3 h bei 37°C inkubiert. Um das Restriktionsenzym aus dem Ansatz zu entfernen und die DNA zu konzentrieren wird der Ansatz mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1) extrahiert, mit 1/10 des Volumens NaAc (3 M) und dem 2,5x Volumen Ethanol versetzt und abschließend für 30 min bei 13000 upm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird mit 300 µl Ethanol

(80%) gewaschen, erneut zentrifugiert, bei Rt getrocknet und in A. bidest. bis zu einer Konzentration von 300 ng/μl aufgenommen.

Spaltungsansatz

- 284 μl eluierte DNA
- 36 μl NEB 1
- 1,5 μl *RsaI* (10 U/μl)
- 38,5 μl A. bidest.

Ligation der Adapter

Es werden zwei verschiedene Tester-Populationen hergestellt, die unterschiedliche Adapter enthalten (Tester 1-1 mit Adapter 1 und Tester 1-2 mit Adapter 2). Die Adapter besitzen identische 5'-Enden und unterschiedliche 3'-Enden. Dazu werden die Ligationsansätze 24 h bei 16°C inkubiert und anschließend wird die Reaktion mit 1 μl Glycogen/EDTA-Mix (Zusammensetzung unbekannt) bei 72°C (5 min) gestoppt. An die Driver DNA werden keine Adapter ligiert.

Ligationsansatz

- 2 μl 1:5 verdünnte (A. bidest.) Tester DNA (*RsaI* gespalten)
- 1 μl 10x Ligationspuffer
- 1 μl T4 DNA Ligase (1 U/μl)
- 2 μl Adapter 1 oder 2
- 4 μl A. bidest.

Tabelle 22: Adaptersequenzen

Bezeichnung	Nukleinsäuresequenz
Adapter 1	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT
Adapter 2	CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

1. und 2. Subtraktive Hybridisierung

In der ersten subtraktiven Hybridisierung werden beide Tester Populationen mit einem Überschuß an Driver DNA hybridisiert, um differentielle Sequenzen als ssDNA anzureichern. Nicht differentielle Sequenzen liegen nach der Hybridisierung nahezu vollständig als dsDNA

vor. Dazu werden Tester 1 und Tester 2 in getrennten Ansätzen mit je 1,5 µl Driver DNA (300 ng/µl) und 1 µl 4x Hybridisierungspuffer (Zusammensetzung unbekannt) versetzt, mit Mineralöl überschichtet und nach Denaturierung bei 98°C für 1:30 min für 8 h bei 68°C hybridisiert. In der zweiten Hybridisierung werden die beiden Proben der ersten Hybridisierung gemischt und nochmals mit neuer Driver DNA hybridisiert. Durch das Vermischen der beiden Tester Populationen können sich nun die gesuchten Hybridmoleküle der differentiellen cDNAs mit unterschiedlichen Adaptern an den Enden bilden. Die nochmals zugegebene Driver DNA dient der Absättigung eventuell noch einzelsträngiger nicht differentieller Tester DNA. Dabei werden 1 µl Driver DNA (300 ng/µl) mit 1 µl 4x Hybridisierungspuffer und 2 µl A. bidest. vermischt und 1 µl dieser Mischung mit Mineralöl überschichtet und 1:30 min bei 98°C denaturiert. Die denaturierte Driver DNA wird zusammen mit dem 68°C warmen Tester 1-2 in eine Pipettenspitze aufgenommen und sofort in das Reaktionsgefäß mit dem auf 68°C gehaltenen Tester 1-1 gegeben. Der Ansatz wird anschließend über Nacht bei 68°C inkubiert, mit 200 µl Verdünnungspuffer versetzt und nochmal für 7 min bei 68°C inkubiert.

Selektive Amplifikation

Um die gesuchten Hybridmoleküle der differentiellen cDNAs aus den beiden Testerpopulationen anzureichern, werden sie unter Verwendung eines adapterspezifischen Primers (komplementär zu den 5'-Enden beider Adapter) amplifiziert. Ein µl des verdünnten Hybridisierungsansatzes wird mit 24 µl PCR-Reaktionsansatz versetzt, zum Auffüllen der überstehenden Adapter 5 min bei 75°C inkubiert und anschließend mit dem unten angegebenen PCR-Programm amplifiziert. In einer zweiten PCR (nested PCR) werden mit zwei verschiedenen adapterspezifischen Primern (jeweils zu dem 3'-Ende eines Adapters komplementär) die differentiellen Sequenzen weiter angereichert.

1. PCR-Reaktionsansatz

- 2,5 µl 10x cDNA PCR Puffer
- 0,5 µl dNTP Mix (10 µM je dNTP)
- 1 µl PCR Primer 1
- 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix
- 19,5 µl A. bidest.

1. PCR-Programm

27 Zyklen (30 sek 94°C, 30 sek 66°C, 1:30 min 72°C)

2. PCR-Reaktionsansatz

- 1 µl PCR Produkt der 1. PCR (1:10 in A. bidest. verdünnt)
- 2,5 µl 10x cDNA PCR Puffer
- 0,5 µl dNTP Mix (10 µM je dNTP)
- je 1 µl nested PCR Primer 1 und nested PCR Primer 2
- 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix
- 18,5 µl A. bidest.

2. PCR-Programm

12 Zyklen (30 sek 94°C, 30 sek 68°C, 1:30 min 72°C)

Tabelle 23: Primer für die 1. und 2. PCR

Bezeichnung	Nukleinsäuresequenz (5'-3'-Orientierung)
PCR Primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
nested PCR Primer 1	TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT
nested PCR Primer 2	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

Screening

Die Identifizierung der selektiv amplifizierten differentiellen cDNA der Tester Population erfolgt mittels Southern Blot und Hybridisierung von Einzelklonen der klonierten differentiellen cDNA mit markierter Driver und Tester cDNA. Einzelklone die nur mit der markierten cDNA des Tester hybridisieren, haben Ihren Ursprung in der differentiellen RNA des Testers. Aufgrund von nicht auszuschließenden Hintergrundreaktionen durch unspezifische Hybridisierungen können auch deutliche Unterschiede im Hybridisierungssignal bereits ausreichend sein, um auf differentielle Tester RNA schließen zu lassen.

Ligation und Transformation der differentiellen cDNA

Die Ligation wurde mit 2 µl nested PCR-Produkt mit dem pGEM-T Easy Vektor (Promega) durchgeführt (wie unter Punkt 2.2.17 beschrieben). Die Transformation erfolgte mit XL1-

Blue MRF' superkompetenten Zellen (Stratagene). Ein Aliquot von 100 µl Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1,7 µl 2-MeEtOH versetzt und unter regelmässigen Schwenken für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Ligationsansatz wurden die Ansätze erneut für 30 min auf Eis inkubiert, für 45 sek in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und sofort wieder für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Länge des Hitzeschocks ist dabei entscheidend für die Effizienz der Transformation. Anschließend werden 0,9 ml auf 42°C vorgewärmtes SOC Medium zugegeben und der Ansatz wird für 1 h bei 37°C und 250 upm geschüttelt. Abschließend werden auf 5 AIX Platten je 200 µl transformierte Zellen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Amplifikation der Inserts mittels Bakterien PCR

Für die folgenden Schritte Southern Blot und Hybridisierung werden die amplifizierten Plasmid-Inserts einzelner Bakterienkolonien verwendet. Hierbei kann auf eine Aufreinigung der Plasmide aus den Bakterien verzichtet werden. Die einzelnen Bakterienkolonien werden mit einem Zahnstocher oder einer Pipettenspitze in 100 µl LB Flüssigmedium überführt und nach kurzem schütteln bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Amplifikation erfolgt mit untenstehendem PCR-Reaktionsansatz und PCR-Programm. Die verwendeten Primer (Tab. 24) flankieren den Insertionsort in der Weise, daß an beiden Seiten des Inserts kurze Abschnitte des Plasmids mit amplifiziert werden.

PCR-Reaktionsansatz

- 1 µl Bakteriensuspension
- 2,5 µl 10x PCR Puffer
- 2,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,25 µl Tween-20 (10%)
- 0,25 µl dNTP Mix (25 µM je dNTP)
- je 0,75 µl M13f Primer und M13r Primer
- 0,15 µl *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl)
- auf 25 µl A. bidest.

PCR-Programm

34 Zyklen (30 sek 94°C, 30 sek 60°C, 1 min 72°C)

Abschlusssynthese 10 min 72°C

Tabelle 24: Primer der Bakterien PCR

Bezeichnung	Orientierung	Nukleinsäuresequenz
M13f	sense	GTAAAACGACGGCCAGT
M13r	antisense	GGAAACAGCTATGACCATG

Southern Blot

Bei einem Southern Blot wird DNA (negativ geladen) auf geeignete positiv geladene Membranen (Nylon oder Nitrocellulose) übertragen und für weitere Anwendungen fixiert. Da die Detektion in diesem Protokoll anschließend mittels der sehr sensitiven Chemilumineszenz erfolgt, die bei Nitrocellulosemembranen versagt, können nur Nylonmembranen verwendet werden. Dazu werden zuerst die mittels Bakterien PCR amplifizierten Inserts in einem 1% Agarosegel mit Wiederholung in identischer Reihenfolge aufgetrennt. Das Gel wird anschließend 2 mal für 15 min in frischer Denaturierungslösung und 2 mal in Neutralisierungslösung geschwenkt. Die denaturierte DNA wird über Nacht bei Rt auf die Nylonmembran übertragen. Dazu wird in eine Kunststoffschale der umgedrehte Gelträger gelegt. Auf diesen werden 2 Lagen Whatman 3M Papier gelegt, so daß deren Enden den Schalenboden berühren. In die Schale wird bis zur Unterkante der Gelträgerfläche 20x SSC gefüllt, das Gel auf den mit dem Whatman 3M Papier bedeckten Gelträger gelegt und mit einer auf Gelgröße zugeschnittenen Nylonmembran und zwei weiteren Lagen Whatman 3M Papier blasenfrei abgedeckt. Darauf wird eine etwa 5 cm starke Lage Papierhandtücher gleichmäßig ausgelegt und anschließend mit einer Glasplatte und einem 0,5 kg Gewicht beschwert. Der 20x SSC Puffer wird durch das Gel und die Membran in die Papiertücher gesogen. Die DNA wandert dabei mit dem Puffer bis zur Membran, von der sie aufgrund ihrer Ladung gebunden wird. Zur Fixierung der DNA wird die Membran anschließend 2 h bei 95°C gebacken. Die Membranen werden anschließend in der Hybridisierung eingesetzt.

Denaturierungslösung

- 0,5 M NaOH
- 1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung (pH 7,5)

- 0,5 M Tris HCl
- 3 M NaCl

20x SSC (pH 7)

- 3 M NaCl
- 0,3 M NaCitrat

Sondenherstellung

Die Sonden für das Screening wurden aus auf 300 ng/μl eingestellter cDNA (amplifizierte cDNA vor Spaltung und Adapterligation) von Tester und Driver amplifiziert. Zur Markierung der Sonden wurden anstelle der häufig verwendeten radioaktiven Markierung mit Digoxigenin markierte dNTPs in der Amplifikation eingesetzt. Dies ist zwar mit einem geringen Verlust an Sensitivität verbunden, für diese Anwendung aber völlig ausreichend und vermeidet das Arbeiten mit Radioaktivität. Anschließend wird der PCR-Reaktionsansatz mit 5 ml Hybridisierungspuffer verdünnt, 10 min bei 68°C denaturiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Die Sonde wird direkt in der Hybridisierung eingesetzt und kann nach erneuter Denaturierung abhängig vom schwächer werdenden Hybridisierungssignal mehrmals wiederverwendet werden.

PCR Reaktionsmix

- 1 μl amplifizierte cDNA (300 ng/μl)
- 2,5 μl 10x Advantage 2 PCR Puffer
- 0,25 μl dNTP Mix (10 mM je dNTP)
- 1,25 μl Digoxigenin dNTP Mix
- 2 μl 5' PCR Primer II A (10 μM)
- 0,5 μl 50x Advantage 2 Polymerase Mix
- auf 25 μl A. bidest.

PCR Programm

1 min 95°C

24 Zyklen (15 sek 94°C, 30 sek 65°C, 6 min 68°C)

Hybridisierung und Detektion

Zur Hybridisierung wird die Membran zwischen den Wiederholungen der Proben getrennt. Die Hybridisierung erfolgt mit Digoxigenin markierten Sonden. Eine Membranhälfte wird mit Tester-Sonde, die andere mit Driver-Sonde hybridisiert. Um eine gleichmäßige

Hybridisierung zu erreichen und ein partielles Trockenfallen der Membran zu verhindern, werden langsam rotierende Glasröhren im Hybridisierungssofen verwendet. Die Membranen werden bei 42°C für 1 h in 20 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert und anschließend mit der vorbereiteten Sonde bei gleicher Temperatur über Nacht hybridisiert. Anschließend werden die Membranen je 2 mal mit 2x SSC (+ 0,1% SDS) bei 42°C und 0,5x SSC (+ 0,1% SDS) bei 68°C in den rotierenden Glasröhren gewaschen, um überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Die Membranen werden aus den Glasröhren genommen, für 1 min in Maleinsäurepuffer äquilibriert und anschließend zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran in 300 ml Blockingpuffer geschwenkt. Nach 30 min werden 15 µl Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase Konjugat (zum Erreichen einer 1:20000 Verdünnung) zugegeben und die Membranen werden für weiter 30 min geschwenkt. Überschüssige Antikörper werden durch zweimaliges Waschen (Schwenken) für 15 min mit Maleinsäurepuffer (+ 0,3% Tween-20) entfernt. Anschließend werden die Membranen 2 min in Detektionspuffer äquilibriert, in eine an den Seiten aufgetrennte Prospekthülle gelegt und unmittelbar mit CDP-*Star* Lösung (1:100 in Detektionspuffer verdünnt) überschichtet. Die Prospekthülle wird zugeklappt und nach 10 min Wartezeit in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm für ca. 1min exponiert. Der Film wird anschließend 5 min im Entwicklerbad, 2 min im Wasserbad und 8 min im Fixiererbad entwickelt. Anschließend kann der Film im Gegenlicht unter Zuhilfenahme der entsprechenden Gelphotos sofort ausgewertet werden.

Hybridisierungspuffer

- 5x SSC
- 1% Blocking Reagenz (Roche)
- 0,02% SDS

Maleinsäurepuffer (pH 7,5)

- 0,1 M Maleinsäure
- 0,15 M NaCl

Blockingpuffer

- 99% Maleinsäurepuffer
- 1% Blocking Reagenz (Roche)
- Zum Lösen des Blockingreagenz autoklavieren.

Detektionspuffer (pH 9,5)

- 0,1 M Tris HCl
- 0,1 M NaCl

2.2.27.2.8 Umkehr-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (R-PAGE)

Die Umkehrgelelektrophorese ist eine Technik, bei der zirkuläre, kovalent geschlossene RNA, wie sie z.B. bei Viroiden vorliegt, mittels zweistufiger Elektrophorese von linearer RNA getrennt wird. Während der ersten Stufe wird die gesamte RNA ihrer Größe nach aufgetrennt um in der zweiten Stufe unter denaturierenden Bedingungen und Umkehr der Polung der Elektrophoresekammer wieder zurückzuwandern, wobei die Viroid-RNA durch Ihre denaturierte, zirkuläre Form deutlich langsamer als lineare RNA im Gel wandert, und somit von bezüglich der Nukleotidzahl gleichlangen linearen RNA separiert wird.

Die Umkehrgelelektrophorese wurde mangels eigener Ausstattung und Erfahrung für diese Technik von Herrn Dr. Kruse am Landespflanzenchutzamt Mecklenburg-Vorpommern in Rostock durchgeführt. Dabei wurden je 1g Blattmaterial einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Natriumacetat-Ethanol-Fällung unterzogen, und das in A. bidest. aufgenommene Pellet mittels Umkehrelektrophorese nach Schumacher *et al.* (1986) unspezifisch auf Viroid-RNA untersucht (Kruse, pers. Mitteilung).

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Apfelmavirusnachweis

3.1.1.1 Extraktionsverfahren

Zu Beginn des Projekts wurde nach einem geeigneten Extraktionsverfahren gesucht, was einen schnellen, zuverlässigen RT-PCR basierten Nachweis der Viren und Viroide aus Apfel ermöglicht. Zudem sollte es bezüglich des verwendeten Pflanzenmaterials unabhängig von der Jahreszeit einsetzbar sein, um die Nachweise ganzjährig durchführen zu können. Als geeignet hat sich eine Silica-Extraktion erwiesen, die nach wenigen Modifikationen (Ersatz von GSCN durch GHCl, Ausschluß von 2-MeEtOH) sich für einen Routinenachweis als geeignet erwiesen hat. Die Modifikationen erlauben eine Durchführung ohne Rauchabzug und erleichtern die Handhabung der Abfallprodukte. Das Extraktionsverfahren (Kap. 2.2.5) wurde mit verschiedenen Geweben (Rinde, vegetative Knospen, Blätter) infizierter Proben durchgeführt und die Extrakte in der RT-PCR eingesetzt. Der Einsatz von Rinde und vegetativen Knospen (Rindenschildchen mit Knospen) führte durchweg zu zufriedenstellenden Ergebnissen, d.h. die erwarteten Fragmente konnten erfolgreich amplifiziert werden. Bei Verwendung von Blattproben war in den meisten Fällen eine deutliche Reduktion in der Intensität der entsprechenden Banden im Agarose-Gel feststellbar, für ApMV traten vereinzelt sogar falsch negative Ergebnisse auf. Von verschiedenen Referenzbäumen wurden Proben (Rindenschildchen mit Knospen) über das ganze Jahr verteilt genommen. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Nachweisbarkeit der Viren konnte nicht festgestellt werden. Einige Proben wurden bis zu 4 Wochen in PE-Folie verpackt bei 4°C gelagert, was auch keinen negativen Effekt auf die Nachweisbarkeit der Viren und der internen Kontrolle hatte. Bei versehentlich vertrockneten Zweigen zeigte sich, dass ein Virusnachweis aus diesen Proben nicht mehr zuverlässig möglich ist. Die Verwendung von Rindenschildchen mit vegetativen Knospen erleichtert die Lagerbarkeit der Proben und ermöglicht es, üblicherweise entlaubt gehandelten Reiser ohne vorheriges Antreiben zu testen. Während des Projektzeitraums wurden hunderte verschiedene Silica-Extrakte in der RT-PCR eingesetzt. Nur bei sehr wenigen (unter 10) war eine erfolgreiche Amplifikation nicht möglich, wobei die Ursache dafür ungeklärt bleibt. Auch diese sehr geringen Ausfallquoten zeigen jedoch, wie wichtig die Implementierung einer internen Kontrolle zum Ausschluß falsch negativer Ergebnisse ist.

Die Nukleinsäureextrakte wurden teilweise über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren (Lagerung bei -20°C) wiederholt in der RT-PCR eingesetzt, ohne daß ein negativer Einfluß der langen Lagerzeit auf die Amplifikation beobachtet wurde.

Die Erprobung der Schnellextraktionsmethode, die für den Viroidnachweis aus Chrysanthemen erfolgreich eingesetzt werden konnte, war nicht erfolgreich (Rinde, Blätter). Auch der Einsatz unterschiedlicher Verdünnungsstufen (1:5, 1:10, 1:100, 1:200) führte in keinem der Versuche zu einer erfolgreichen Amplifikation (weder Virus noch interne Kontrolle).

3.1.1.2 Interne Kontrolle

Mit dem für die interne Kontrolle (endogenes Template) entwickelten Primerpaar konnte konsistent ein RT-PCR Produkt der erwarteten Größe (181 bp) amplifiziert werden, unabhängig davon ob die Extrakte von infizierten oder gesunden Pflanzen stammten. Auch gelang der Nachweis aus verschiedenen Pflanzenarten. Um die exklusive Amplifikation von mRNA in Gegenwart von DNA zu überprüfen, wurden Tests ohne den Einsatz von Reverser Transkriptase und mit DNase behandelten Extrakten durchgeführt.

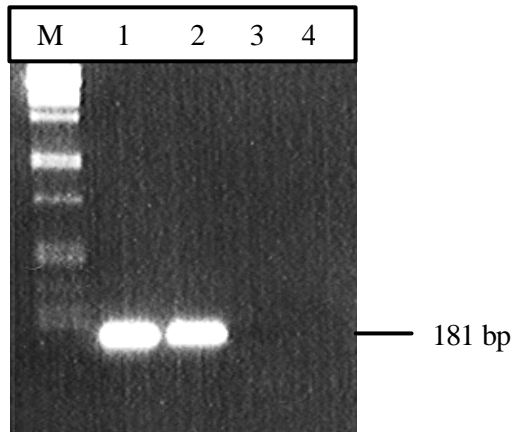


Abbildung 6: Überprüfung der mRNA Spezifität der internen Kontrolle

(M: λ -*Pst*I DNA Standard, Spuren 1 und 3: Gesamtnukleinsäureextrakt eingesetzt; Spuren 2 und 4: RNA Extrakt eingesetzt; Spuren 1 und 2: RT-PCR mit Reverser Transkriptase; Spuren 3 und 4: RT-PCR ohne Reverse Transkriptase)

Wie erwartet konnte nur in Gegenwart von Reverser Transkriptase das entsprechende Fragment aus Gesamtnukleinsäure und RNA amplifiziert werden. Ohne Reverse Transkriptase wurde keine Amplifikation, auch nicht eines größeren, Intron enthaltenden Fragments beobachtet. Somit kann auch die Existenz von sequenzidentischen, Intron freien

Kopien im Genom (Pseudogenen) ausgeschlossen werden. Um die Amplifikation des endogenen Templates zu begrenzen, wurde die Primerkonzentration für die multiplex RT-PCR auf 0,4 μ M herabgesetzt, um eine zu starke Konkurrenz zu den viralen Templates zu vermeiden. Auch aus den über das Jahr verteilt genommenen Proben konnte die interne Kontrolle erfolgreich amplifiziert werden.

3.1.1.3 Multiplex RT-PCR

Zu Beginn wurden für jedes Virus anhand der verfügbaren Sequenzinformationen Alignments durchgeführt, um möglichst stark konservierte Bereiche zu ermitteln, in welche dann die Primersequenzen gelegt wurden. Die Notwendigkeit des Nachweises mehrerer Viren aus einer Pflanze/einem Nukleinsäureextrakt eröffnet die Möglichkeit der Anwendung der multiplex RT-PCR. Dabei wird beim spezifischen Nachweis pro Template ein virusspezifisches Primerpaar verwendet. Von Beginn an wurde beim Primerdesign die Einsetzbarkeit in einer Multiplex RT-PCR berücksichtigt. Nach Optimierung der Einzelnachweise für die 4 Viren wurden verschiedene Kombinationen in Multiplex Tests erprobt, wobei sich zeigte, daß der Nachweis von zwei Viren parallel noch problemlos möglich ist, jedoch bei 3 oder 4 viralen Templates einzelne aufgrund der Konkurrenz in der Amplifikation um Faktoren wie z.B. Enzyme und dNTPs und vermutlich durch unterschiedliche Ausgangskonzentrationen der Viren in den Pflanzengeweben/Nukleinsäureextrakten nur extrem schwach oder nicht mehr nachweisbar waren. Ähnliche Beobachtungen wurden z.B. von Nie und Singh (2000) beim Versuch des parallelen Nachweises von 5 Viren aus Kartoffel gemacht. Da zusätzlich eine interne PCR-Kontrolle in den Nachweis integriert werden sollte, und somit bei vorliegender Infektion mit allen 4 Viren 5 Fragmente parallel amplifiziert werden müßten, wurden 2 identischen Multiplex Nachweise (nur die virusspezifischen Primer müssen ausgetauscht werden) für je 2 Viren plus interne Kontrolle entwickelt, um die notwendige Zuverlässigkeit zu gewährleisten.

3.1.1.3.1 Erprobung mit verschiedenen Virusherkünften

Die entwickelten multiplex RT-PCR wurden erfolgreich an einem größeren Probenumfang unterschiedlicher geographischer Herkunft (u.a. Deutschland, Großbritannien, Frankreich, Schweiz, Italien) und zusätzlich unterschiedlichen Wirtspflanzen der Viren (*Prunus*, *Pyrus*, *Pyronia*) getestet und optimiert. In Abbildung 7 (multiplex RT-PCR I für ACLSV und ASGV) und 8 (multiplex RT-PCR II für ASPV und ApMV) ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate von verschiedenen mischinfizierten Proben dargestellt.

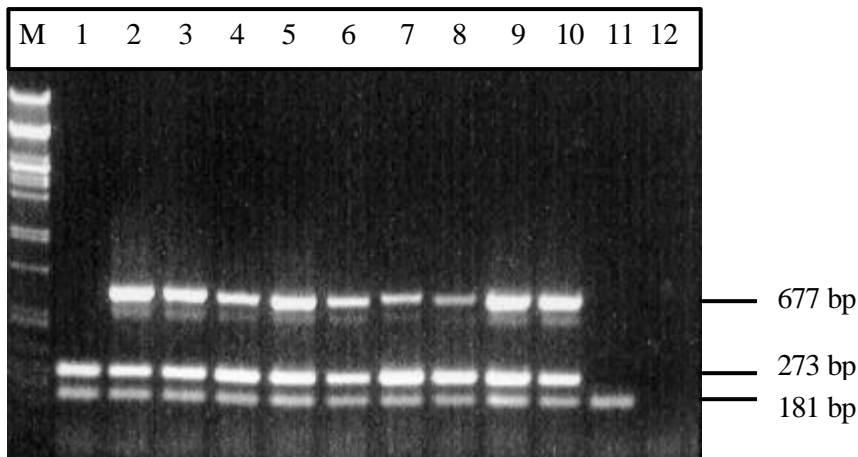


Abbildung 7: Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von *Apple chlorotic leaf spot virus* und *Apple stem grooving virus* mittels multiplex RT-PCR I

(Spur M: λ -*Pst*I DNA Standard; Spuren 1-10: RT-PCR Produkte von verschiedenen infizierten Proben [146/80, 56/86, 41/94, 35/88, 5/94, 7/94, 8/94, 41/87, 42/87, W2]; Spur 11: RT-PCR Produkt einer gesunden Kontrollpflanze; Spur 12: Negativkontrolle)

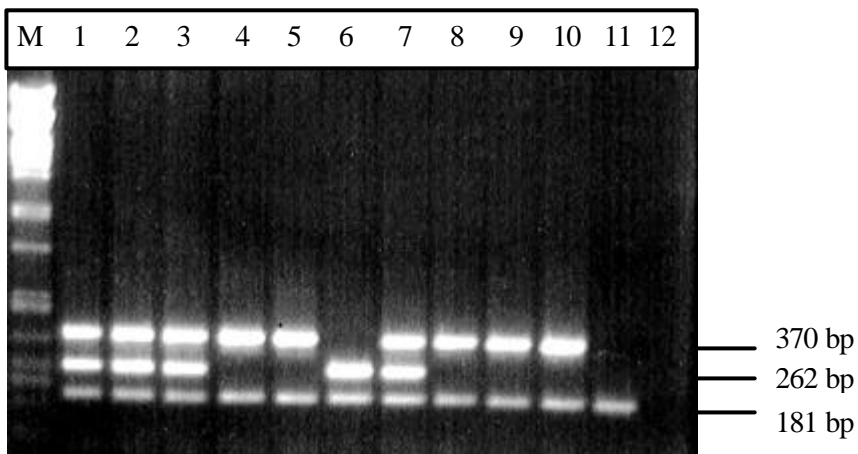


Abbildung 8: Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von *Apple stem pitting virus* und *Apple mosaic virus* mittels multiplex RT-PCR II

(Spur M: λ -*Pst*I DNA Standard; Spuren 1-10: RT-PCR Produkte von verschiedenen infizierten Proben [41/87, 33/94, W1, 40/85, 31/86, W3, W2, 4/94, 41/94, 71/94]; Spur 11: RT-PCR Produkt einer gesunden Kontrollpflanze; Spur 12: Negativkontrolle)

In allen Proben wurden Negativ- und bei Testung von Proben mit unbekanntem Infektionsstatus Positivkontrollen mitgeführt. Bei den Negativkontrollen und nicht infizierten Proben wurden in keinem Fall virusspezifische Banden amplifiziert. Zur Überprüfung der Identität wurden alle 5 verschiedenen PCR-Produkte mittels T/A-Klonierung kloniert und

sequenziert (Auftragssequenzierung MWG Biotech). Sequenzvergleiche mit den in der Genbank (NCBI) verfügbaren Sequenzen führten zu Sequenzidentitäten zwischen 82 – 98% (ACLSV 82 - 93%, ASPV 86 – 87%, ApMV 94 – 96%, ASGV 90 – 91% und nad5 98%). Die teilweise niedrigen Sequenzidentitäten ergeben sich auch für die entsprechenden Bereiche der in der Genbank (NCBI) verfügbaren Sequenzen untereinander.

3.1.1.3.2 Ermittlung der Detektionsgrenzen

Um die Verwendbarkeit von Mischproben zwecks Minimierung von Zeitaufwand und Kosten zu überprüfen, wurde TNA-Extrakt vierfach infizierter Proben in TNA-Extrakt gesunder Proben verdünnt und in den multiplex RT-PCR Verfahren eingesetzt. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate unterschiedlicher Verdünnungsstufen für multiplex RT-PCR I und II. Durch die Verdünnung von Nukleinsäure-Extrakten infizierter mit Extrakten nicht infizierter Proben wird zwar die Konzentration der viralen Templates verringert, nicht jedoch die der internen Kontrolle, was durch die für alle Verdünnungsstufen gleich intensive Bande der internen Kontrolle deutlich wird.

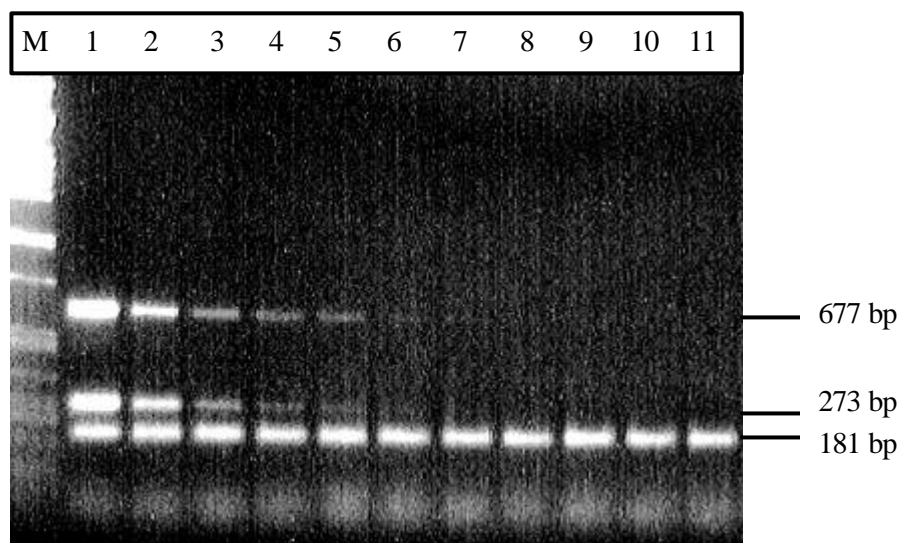


Abbildung 9: Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR I für *Apple chlorotic leaf spot virus* and *Apple stem grooving virus*

(Spur M: λ -*Pst*I DNA Standard; Spur 1: RT-PCR Produkt eines unverdünnten TNA Extrakts einer vierfach infizierten Probe; Spuren 2-10: RT-PCR Produkte von einem TNA Extrakt einer vierfach infizierten Probe seriell verdünnt in TNA Extrakt einer gesunden Kontrollpflanze [1:2, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 500, 1000]; Spur 11: RT-PCR Produkt eines TNA Extrakts einer gesunden Kontrollpflanze)

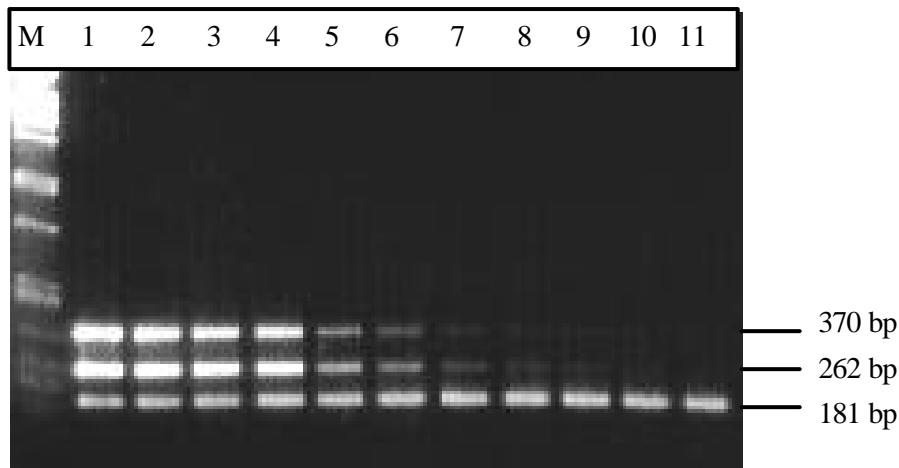


Abbildung 10: Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR II für *Apple stem pitting virus* und *Apple mosaic virus*

(Spur M: λ -*Pst*I DNA Standard; Spur 1: RT-PCR Produkt eines unverdünnten TNA Extrakts einer vierfach infizierten Probe; Spuren 2-10: RT-PCR Produkte von einem TNA Extrakt einer vierfach infizierten Probe seriell verdünnt in TNA Extrakt einer gesunden Kontrollpflanze [1:2, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 500, 1000]; Spur 11: RT-PCR Produkt eines TNA Extrakts einer gesunden Kontrollpflanze)

Eine Virus-spezifische Bande ist dabei für ACLSV, ASGV und ASPV bis zu einer Verdünnung von 1:40, für ApMV bis 1:100 zu erkennen. Dies ließe unter Berücksichtigung eines Sicherheitspuffers z.B. Mischproben von 10 Extrakten problemlos zu, jedoch hat die Verwendung von Mischproben auch generelle Nachteile. Ist die RNA eines Extraktes einer infizierten Probe degradiert/nicht amplifizierbar, so wird bei Mischproben mit Extrakten nicht infizierter Pflanzen keine Virus-spezifische Bande auftreten, aber die interne Kontrollbande trotzdem amplifiziert werden, da die RNA der anderen Proben als Template der Kontrolle fungiert, d.h. bei Mischproben ist die Verwendung einer internen Kontrolle zum Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse nicht möglich.

3.1.1.3.3 Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen

Für die Durchführung von RT-PCR-Anwendungen ist generell die genaue Einhaltung der beschriebenen Protokolle notwendig. Lediglich bei der Auswahl der Anbieter von z.B. Chemikalien, dNTPs und Oligonukleotiden sind aufgrund allgemein hoher Qualitätsstandards Abweichungen möglich, wie eigene Erfahrungen zeigen. Kritisch kann dies jedoch bei der Verwendung von Enzymen anderer Hersteller werden, da diese sich, bedingt durch verschiedene Optima bezüglich z.B. $MgCl_2$ -Konzentration oder pH-Wert, unter gleichen Reaktionsbedingungen unterschiedlich verhalten können. Um eine Ersetzbarkeit der

verwendeten HotStar *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) zu testen wurde eine Probe Hot Prime *Taq* (Q-Biogene) inklusive des mitgelieferten PCR Puffers in einem Paralleltest eingesetzt (gleiche Anzahl U/Ansatz). Die Ergebnisse für multiplex RT-PCR I und II sind in Abb. 11 wiedergegeben.

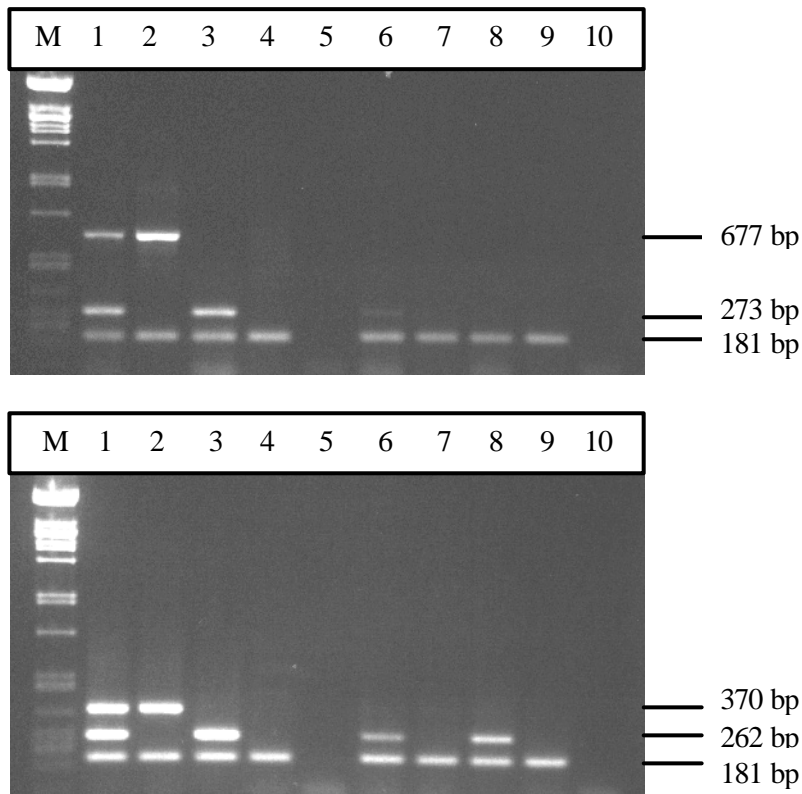


Abbildung 11: Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen für multiplex RT-PCR I (oberes Gel) und II (unteres Gel)

(Spuren M: λ -*Pst*I DNA Standard; Proben des oberen Gels: Spuren 1 und 6: ACLSV und ASGV infizierte Probe [56/86]; Spuren 2 und 7: ACLSV infizierte Probe [F 00]; Spuren 3 und 8: ASGV infizierte Probe [146/80]; Spuren 4 und 9: gesunde Kontrollpflanze; Spuren 5 und 10: Negativkontrolle.

Proben des unteren Gels: Spuren 1 und 6: ASPV und ApMV infizierte Probe [41/87]; Spuren 2 und 7: ASPV infizierte Probe [62/94]; Spuren 3 und 8: ApMV infizierte Probe [W3]; Spuren 4 und 9: gesunde Kontrollpflanze; Spuren 5 und 10: Negativkontrolle. Die Proben 1-5 sind jeweils mit HotStar *Taq* [QIAGEN], die Proben 6-10 mit Hot Prime *Taq* [Q-Biogene] amplifiziert.)

Die Bandenintensitäten der virusspezifischen Banden sind deutlich bis extrem (größere Amplifikate) abgeschwächt. Für ACLSV und ASPV waren sie zwar auf dem Gel noch erkennbar, aber für eine Dokumentation zu schwach. Die Banden der internen Kontrolle

waren von vergleichbarer Intensität. Unspezifische Amplifikationen konnten nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, daß bei der *Taq* Polymerase, zumindest mit Hot Prime *Taq* (Q-Biogene), ein Ersatz nicht ohne weiteres möglich ist. Dies würde Optimierungen am Reaktionsansatz der RT-PCR notwendig machen.

3.1.1.4 Multiplex RT-PCR-ELISA

Ziel bei der Entwicklung dieses Nachweises ist es, die Sensitivität der RT-PCR mit der einfachen Handhabbarkeit der ELISA Technik zu kombinieren und somit die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zu ersetzen und auf den Einsatz von toxischen oder mutagenen Nukleinsäurefarbstoffen zu verzichten. Die Ergebnisse sind für die vier Viren vergleichbar und lassen aufgrund der minimalen Hintergrundreaktion bei den gesunden Proben und Negativkontrollen eine eindeutige Identifizierung der infizierten Proben zu. Bezüglich der internen Kontrolle ist auch trotz der durchschnittlich niedrigen Meßwerte, die zur Vermeidung einer starken Konkurrenz in der multiplex RT-PCR gewollt sind, eine eindeutige Trennung von Nukleinsäureextrakt-enthaltenden Proben und Negativkontrollen möglich. Es sind bisher keine falsch-negativen oder falsch-positiven Meßwerte aufgetreten. In Abb. 12 und 13 ist exemplarisch an Proben mit verschiedenem Infektionsstatus und Negativkontrollen die Auswertung von Gelelektrophorese und ELISA für multiplex RT-PCR I und II gegenübergestellt.

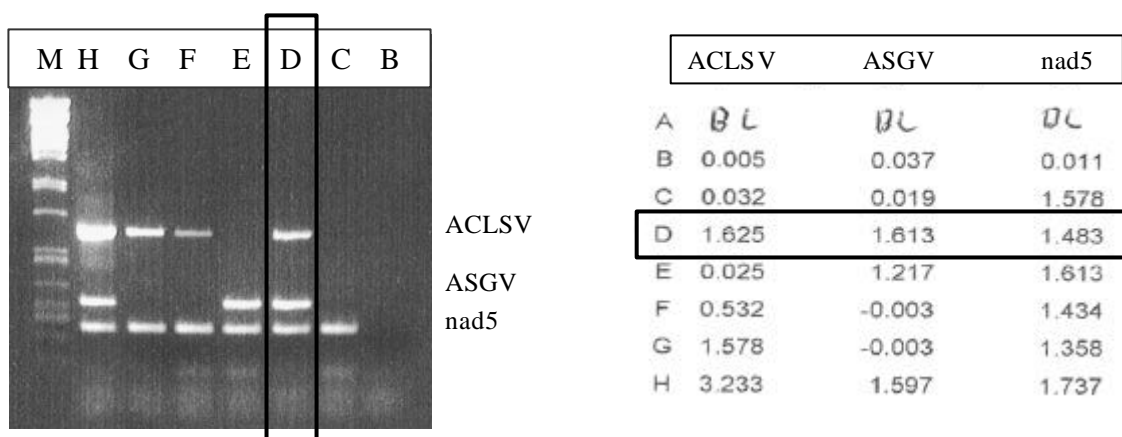


Abbildung 12: Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR I mittels Gelelektrophorese und ELISA

(Dargestellt sind ein Gelphoto und der Ausdruck der Absorptionsmeßwerte der gleichenn Proben, die parallel im ELISA detektiert wurden. Gemessen wurde nach 30 min Substratumsetzung. Die zusammengehörenden Ergebnisse einer Probe sind zur besseren Nachvollziehbarkeit umrandet. Spur A: Pufferkontrolle [nicht gezeigt]; Spur B: Negativkontrolle; Spur C: gesunde Kontrollpflanze; Spuren

D-H: Proben mit verschiedenem Infektionsstatus [56/86, 1/96, 3/96, 146/80, 18/94]; Spur M: λ -PstI DNA Standard)

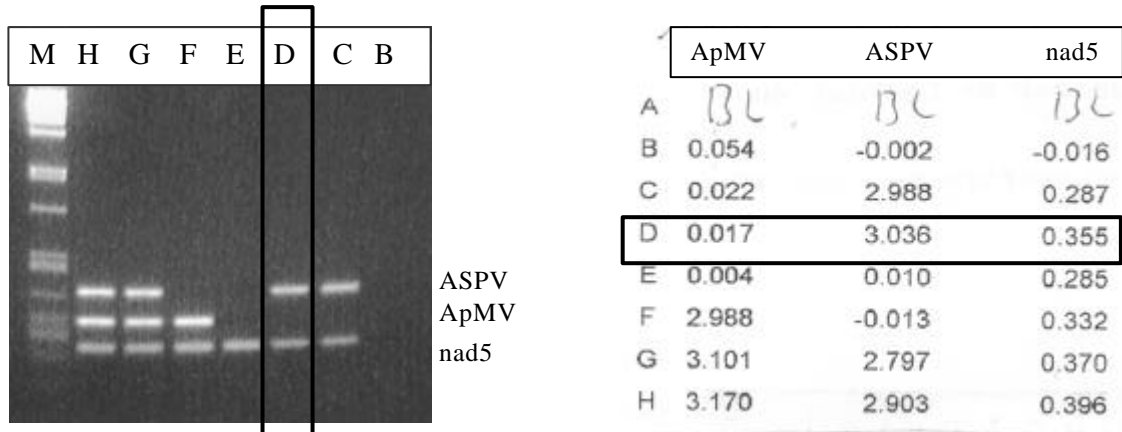


Abbildung 13: Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR II mittels Gelelektrophorese und ELISA

(Siehe Abb. 12. Spur A: Pufferkontrolle [nicht gezeigt]; Spur B: Negativkontrolle; Spur E: gesunde Kontrollpflanze; Spuren C-D und F-H: Proben mit verschiedenem Infektionsstatus[71/94, 31/86, W3, 33/94, 41/87]; Spur M: λ -PstI DNA Standard))

Es wurden keine Kreuz-Hybridisierungen mit nicht spezifischen RT-PCR Produkten beobachtet, was die Spezifität der Capture-Oligonucleotide bestätigt.

3.1.1.4.1 Vergleich der Detektionsgrenzen von Gelelektrophorese und ELISA

Um die relative Sensitivität der ELISA-ähnlichen Technik mit der Gelelektrophorese (1,5%-iges Agarosegel, Ethidiumbromid gefärbt) zu vergleichen, wurden seriell verdünnte RT-PCR Produkte parallel analysiert (Abb. 14 und 15).

Für alle vier Viren und die interne Kontrolle besitzt die ELISA-ähnliche Technik zum Nachweis der PCR-Produkte in Bezug auf die Gelelektrophorese eine vergleichbare oder geringfügig höhere Sensitivität.

Spur	Gel (+/-)			ELISA (+/-)		
	A	B	C	A	B	C
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+
6	+	+	-	+	+	+
7	+	+	-	+	+	+
8	+	-	-	+	+	-
9	-	-	-	+	+	-
10	-	-	-	-	-	-

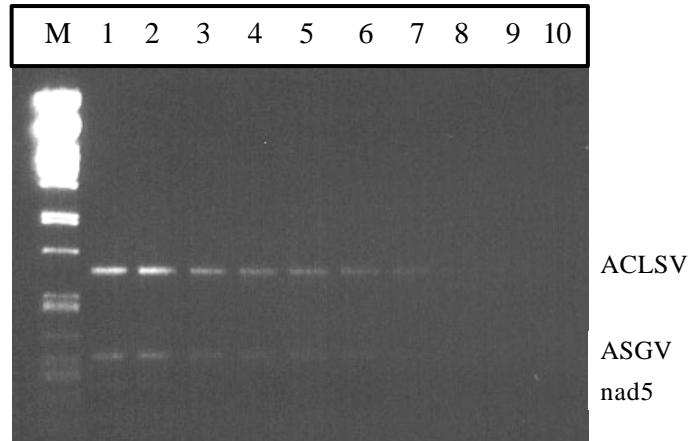


Abbildung 14: Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR I

(Gelphoto: Spuren M: λ -PstI DNA Standard; Spuren 1-10: unterschiedliche eingesetzte Mengen 1:20 verdünnter RT-PCR Produkt [20 μ l, 15 μ l, 10 μ l, 7,5 μ l, 5 μ l, 3,75 μ l, 2,5 μ l, 1,5 μ l, 1 μ l, 0,5 μ l]. In der nebenstehenden Tabelle sind für die jeweiligen Viren und Verdünnungen die Ergebnisse mit "+" für auf dem Gel identifizierbare Bande/positiver Meßwert oder "-" für nicht mehr identifizierbar/negativer Meßwert [unter 0,1] angegeben. A: ACLSV; B: ASGV; C: nad5)

Spur	Gel (+/-)			ELISA (+/-)		
	A	B	C	A	B	C
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+
6	+	+	-	+	+	+
7	+	+	-	+	+	-
8	+	+	-	+	+	-
9	-	-	-	-	+	-
10	-	-	-	-	-	-

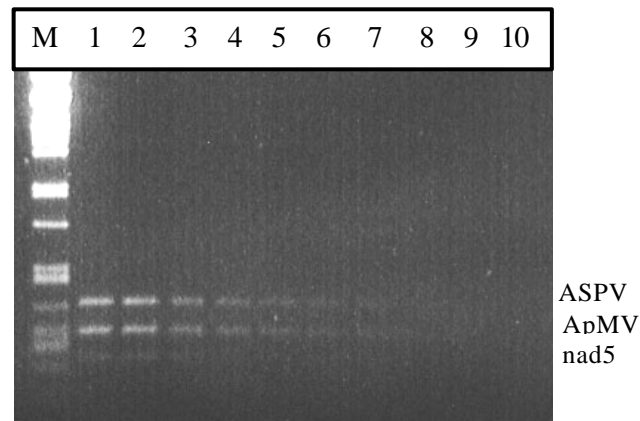


Abbildung 15: Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR II

(Siehe Abb. 14; A: ASPV; B: ApMV; C: nad5)

3.1.1.4.2 Vergleichstest NucleoLink-Strips (Nunc)/DNA-Immobilizer (EXIQON)

Seit 2001 wird in Deutschland von der Firma Biozym ein den NucleoLink-Strips der Firma Nunc vergleichbares Produkt der Firma EXIQON, die DNA-Immobilizer, vertrieben. Diese DNA-Immobilizer wurden exemplarisch für den RT-PCR-ELISA Nachweis von ASPV parallel mit den bisher erfolgreich verwendeten NucleoLink-Strips getestet, um deren Einsetzbarkeit für das entwickelte Nachweisverfahren zu überprüfen. In Abb. 16 sind die

Absorptionsmittelwerte mit Standardabweichung für jeweils 12 infizierte und 12 gesunde Proben sowie 4 Negativkontrollen nach 30 minütiger Substratumsetzung dargestellt.

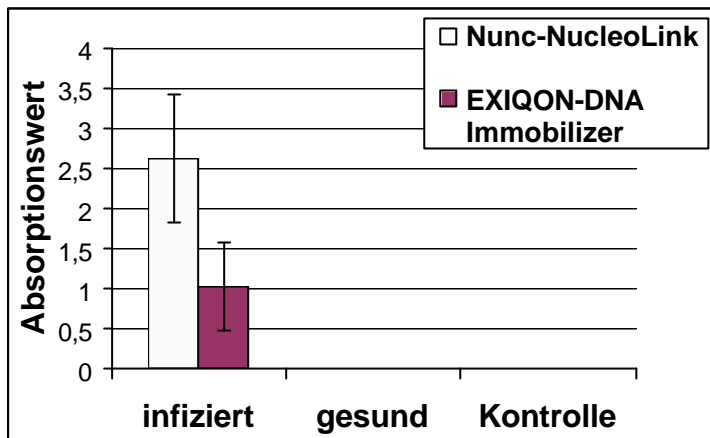


Abbildung 16: Vergleich Nunc/Exiqon Strips im RT-PCR-ELISA für ASPV

(Dargestellt sind jeweils die Absorptionsmittelwerte und Standardabweichung von 12 infizierten Proben, 12 gesunden Proben und 4 Negativkontrollen.)

Die Meßwerte der DNA-Immobilizer liegen nur bei etwa 40% der Werte der verwendeten NucleoLink-Strips für die infizierten Proben bei vergleichbarer Streuung. Die Meßwerte der nicht infizierten Proben und Negativkontrollen sind von vergleichbarer Höhe. Auch bei Verwendung der DNA-Immobilizer war eine eindeutige Unterscheidung von infizierten und gesunden Proben möglich. Die Hintergrundreaktionen waren minimal. Handhabung und Zeit-/Arbeitsaufwand sind etwa gleich, auch wenn die Kopplung der Capture-Oligonukleotide auf einem anderen Mechanismus beruht. Trotz niedrigerer Meßwerte stellen die DNA-Immobilizer eine einsetzbare Alternative für die NucleoLink-Strips dar, und machen das RT-PCR-ELISA Verfahren somit bezüglich der Strips herstellerunabhängig. Eventuell können durch geringfügige Änderungen des Protokolls (z.B. höhere Antikörperkonzentration, längere Substratumsetzung) den NucleoLink-Strips vergleichbare Meßwerte erreicht werden. Nachteilig ist jedoch der mit ca. 10 Cent gegenüber ca. 4 Cent pro Vertiefung deutlich höhere Preis der EXIQON-Strips.

3.1.1.5 Nachweis von PCR-Produkten mittels DIG-Detection Test-Strips (Roche)

Als weitere Alternative für die Gelelektrophorese wurden die DIG-Detection Test- Strips der Firma Roche exemplarisch für den Nachweis von RT-PCR Produkten von verschiedenen ASPV-Isolaten getestet. In Abb. 17 sind verschiedene Test-Strips nach Ablauf der

Chromatographie dargestellt. In allen Fällen konnte eine erfolgreiche Amplifikation (parallel mittels Gelelektrophorese überprüft) eindeutig nachgewiesen werden. Falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse traten nicht auf.

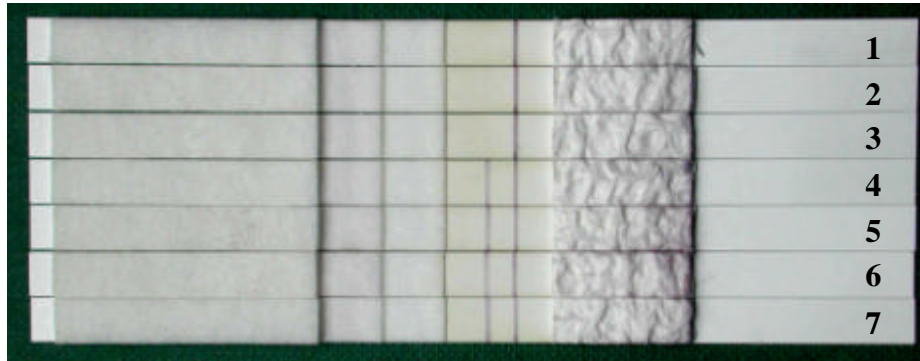


Abbildung 17: Nachweis von RT-PCR Produkten von ASPV mittels DIG-Detection Test-Strips (1: Negativkontrolle; 2-3: nicht infizierte Probe; 4-7: ASPV infizierte Proben [22/85, 94/87, 33/88, 10/94]; der Pfeil weist auf die Virusspezifische Bande hin)

Dieses Verfahren stellt somit prinzipiell eine Alternative zur Gelelektrophorese dar und ist vermutlich durch Verwendung der Capture-Oligonukleotide der RT-PCR-ELISA Technik (hier dann Biotin markiert) leicht auch auf die anderen Fragmente inklusive interner Kontrolle zu übertragen. Es wurden keine Sensitivitätsvergleiche mit der Gelelektrophorese oder dem RT-PCR-ELISA durchgeführt. Nachteilig ist der hohe Preis mit ca. 2,50 Euro pro Test-Strip.

3.1.1.6 Paralleltestung Apfelmavirus infizierter Proben mit dem Pflanzenschutzamt Hannover-Ahlem

Um die Zuverlässigkeit und Praxisreife des Entwickelten Nachweisverfahrens zu überprüfen, wurde ein umfangreicher Paralleltest mit dem Pflanzenschutzamt Hannover-Ahlem (Dr. Zahn) durchgeführt. Die Proben, die dort in der Routinetestung zur Zertifizierung mittels holziger Indikatoren getestet wurden, wurden parallel im multiplex RT-PCR-ELISA getestet. Dabei erfolgte die Probennahme von den Indikatoren oder den zu testenden Reisern selbst. Die Ergebnisse der Paralleltestung von 138 Proben aus den Jahren 1999-2002 sind in Tab. 25 wiedergegeben.

Tabelle 25: Ergebnisse der Paralleltestung mit dem Pflanzenschutzamt Hannover

(Indikatorrestung [A] und Multiplex RT-PCR-ELISA [B])

	infiziert/ getestet	Infektionen				
		ACLSV	ASPV	ASGV	ApMV	?
A	27/138	20	20	6	1	47
B	28/138	21	22	8	4	55

Die Ergebnisse der Paralleltestung bestätigen die sehr guten Ergebnisse die bereits bei der Entwicklung des Nachweisverfahrens an vorgetestetem Probenmaterial der BBA Dossenheim erzielt wurden. Alle an den Indikatoren bonitierten Infektionen konnten eindeutig nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden 8 weitere Infektionen nachgewiesen, 1 x ACLSV, 2 x ASPV, 2 x ASGV und 3 x ApMV. Überraschend war dabei der hohe Anteil der an den Indikatoren nicht bonitierten ApMV Infektionen. Bei erfolgter Nachbonitur konnten in 2 Fällen sehr kleine, schwachgelbe Flecken die auf eine Infektion hindeuten auf einzelnen Blättern identifiziert werden, die bei "normaler" Bonitur der Indikatoren nicht auffallen (Zahn, pers. Mitteilung). Die zusätzlich nachgewiesenen ASGV Infektionen lagen in Mischinfektionen mit ASPV vor, so daß in diesen Fällen eine Überlagerung der ASGV Symptome durch ASPV wahrscheinlich ist und eine Bonitur unmöglich macht. Alle zusätzlichen Infektionen konnten in Wiederholungen der RT-PCR aus Extrakten neu genommener Proben eindeutig bestätigt werden. Eine Probe, die nach der Indikatorrestung als virusfrei eingestuft wurde, war nach unseren Ergebnissen eindeutig infiziert.

Die Ergebnisse zeigen, daß das neu entwickelte Nachweisverfahren eine eindeutige Alternative zur Indikatorrestung darstellt, die darüber hinaus in einzelnen Fällen einen genaueren und zuverlässigeren Aufschluß über die vorliegenden Infektionen, insbesondere bei Mischinfektionen, gibt.

3.1.2 Viroidnachweis

Zu Beginn des Projekts wurden Oligonukleotid-Primer für die Viroide ASSVd, ADFVd und PBCVd an den in der Genbank (NCBI) und der Literatur verfügbaren Sequenzen entwickelt. Für ASSVd und PBCVd wurden Positivkontrollen in Form von infizierten Zweigen von Dr. Jelkmann (BBA Dossenheim) zur Verfügung gestellt. ADFVd infiziertes Pflanzenmaterial konnte leider nicht beschafft werden. Die Nukleinsäuren wurden mittels Silica-Extraktion isoliert und in der RT-PCR eingesetzt (Standardreaktionsansatz, Standardprogramm). In

beiden Fällen war eine erfolgreiche Amplifikation eines Fragments der erwarteten Größe möglich, unspezifische Amplifikationen konnten nicht beobachtet werden (Abb. 18).

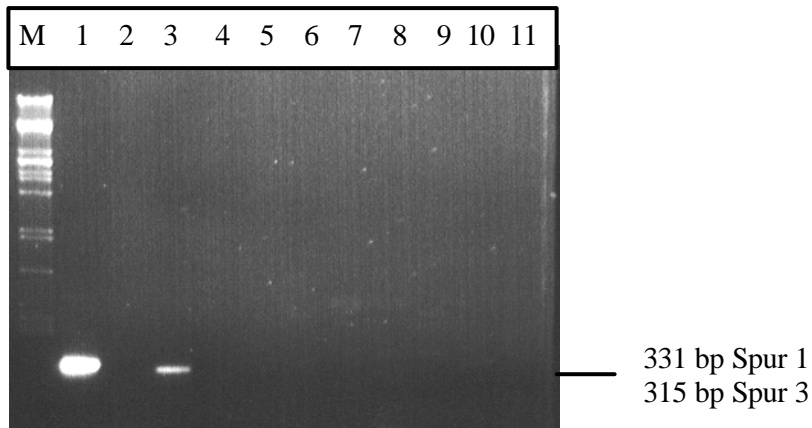


Abbildung 18: Nachweis von ASSVd, PBCVd und ADFVd mittels RT-PCR

(Spur M: λ -*Pst*I DNA Standard; Spur 1: ASSVd Nachweis aus der Positivkontrolle [D1]; Spur 2: ASSVd Nachweis aus dem Apple rough skin-Isolat 81/83; Spur 3: PBCVd Nachweis aus der Positivkontrolle [D2]; Spur 4: PBCVd Nachweis aus dem Apple rough skin-Isolat 81/83; Spuren 5-8: ADFVd Nachweis aus der ASSVd Positivkontrolle, aus der PBCVd Positivkontrolle und aus den Apple rough skin-Isolaten 81/82 und 83/82; Spur 9: ASSVd Nachweis aus der PBCVd Positivkontrolle; Spur 10: PBCVd Nachweis aus der ASSVd Positivkontrolle; Spur 11: RT-PCR Produkt eines TNA Extrakts einer gesunden Kontrollpflanze unter Kombination aller 3 Primerpaare)

Die entwickelten Primer wurden an ca. 40 auffälligen Proben, die Symptome zeigten, die den durch eine Viroidinfektion verursachten Symptomen ähnlich sahen und in Gärten und Streuobstwiesen selbst gesammelt wurden, getestet. In keiner der Proben konnte eines der Viroide nachgewiesen werden. Um die Untersuchungen auf eine breitere Basis zu stellen und an weiteres verdächtiges Pflanzenmaterial zu gelangen, wurde in der Zeitschrift Obstbau ein Aufruf veröffentlicht (Menzel und Maiß, 2000), uns bei entsprechenden Beobachtungen zu informieren. Außerdem wurde von Herrn Dr. Jelkmann 2001 auf der Tagung Muttergärten an der BBA Dossenheim ein Streckbrief für die Viroide verteilt. Beide Initiativen sind ohne Resonanz geblieben, was zusammen mit den Testergebnissen zumindest gegen eine weite Verbreitung der Viroide in Deutschland spricht, auch wenn das Vorhandensein insbesondere durch den Nachweis der Viroide in einzelnen europäischen Nachbarländern nicht ausgeschlossen werden kann. Nicht zuletzt auch durch den interkontinentalen Handel ist eine Einfuhr von Viroid-infiziertem Pflanzenmaterial jederzeit möglich.

3.1.3 Fruchtvirosen

Die zur Verfügung stehenden Isolate der Fruchtvirosen wurden ebenfalls der Silica-Extraktion unterzogen und auf Viroide getestet. Auch hier konnte weder für die 3 Isolate von Apple rough skin (81/82, 83/82, W5) noch für die 2 Isolate von Apple star crack (W6, W7) ein Viroid nachgewiesen werden. Die Untersuchung mittels R-PAGE, die mangels eigener Ausstattung für diese Technik von Herrn Dr. Kruse am Landespflanzenchutzamt Mecklenburg-Vorpommern in Rostock durchgeführt wurden, ergab für das getestete Apple rough skin Isolat (83/82) ebenfalls keinen Hinweis auf Assoziation mit einem Viroid. In allen getesteten Isolaten konnten dagegen Mischinfektionen mit ASPV und ACLSV, in einem Apple star crack Isolat zusätzlich mit ASGV, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen wiederum den möglichen Zusammenhang der Fruchtvirosen mit den Viren ASPV und ACLSV.

3.1.4 Gummiholz (ARW)

3.1.4.1 Nachweis von Phytoplasmen

Zu Beginn der Untersuchungen zur Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit wurde versucht, die Ergebnisse von Bertaccini *et al.* (1998) zu reproduzieren, die eine Assoziation mit Phytoplasmen nachweisen konnten. Dazu wurden verschiedene ARW infizierte und nicht infizierte Proben getestet, bei denen sämtlichst, auch bei den nicht infizierten, Fragmente der erwarteten Größe mittels der nested PCR amplifiziert werden konnten. Die Restriktionsmuster der Spaltungen mit *AluI*, *RsaI* und *KpnI* stimmten bei allen Proben nicht mit den für Gummiholz erwarteten überein. Das Ergebnis, daß auch aus nicht infizierten Bäumen ein entsprechendes Fragment amplifiziert werden kann, deckt sich mit einer neueren Publikation von Bertaccini *et al.* (2001). Dort wird gezeigt, daß mit den verwendeten Primern auch Phytoplasmen aus verschiedenen Gruppen in symptomlosen Kontrollbäumen, die auch ARW-frei sind, nachgewiesen werden können.

Mit der von Seemüller (pers. Mitteilung) empfohlenen nested PCR konnte nur für die in diesen Experimenten verwendete Positivkontrolle (Coconut phyllody Phytoplasma, C1) ein Fragment erwarteter Größe amplifiziert werden. Bei den ARW infizierten und nicht infizierten Proben konnten keinerlei Amplifikate detektiert werden.

Die von Heinrich *et al.* (2002) beschriebene nested PCR zum unspezifischen Nachweis von Phytoplasmen wurde ebenfalls eingesetzt. Auch hier konnte, wie bei der nested PCR von Bertaccini *et al.* (1998), sowohl von einigen gesunden als auch von infizierten Proben ein Fragment von erwarteter Größenordnung amplifiziert werden. Zusätzlich wurden auch die in

Reinkultur vorhandenen Bakterien *Pseudomonas syringae* (siehe hierzu Kap. 3.1.4.2) und *Escherichia coli* eingesetzt. Auch hier gelang die Amplifikation eines entsprechenden Fragments (Abb. 19).

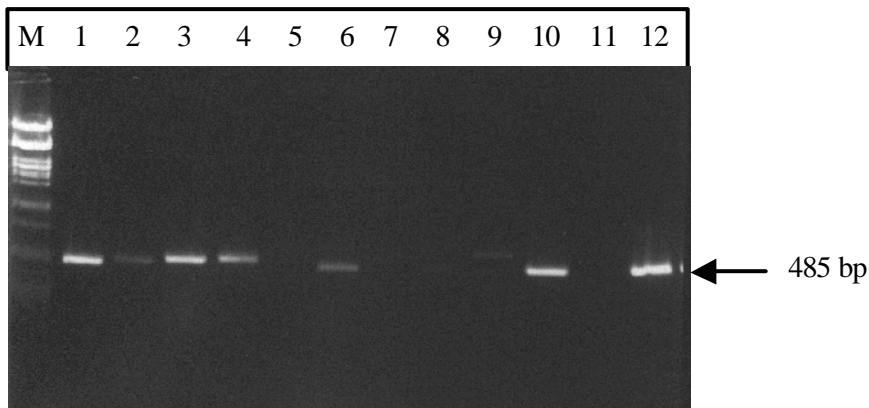


Abbildung 19: Nachweis von Phytoplasmen mittels nested RT-PCR nach Heinrich *et al.* (2002)

(Spur M: λ -*Pst*I DNA Standard; Spur 1: Isolat 31/86; Spur 2: Isolat 38/88; Spur 3: Isolat 56/86, Spur 4: Isolat 35/88; Spur 5: Isolat F1; Spuren 6 - 8: gesunde Kontrollpflanzen; Spur 9: *Escherichia coli*; Spur 10: *Pseudomonas syringae*; Spur 11: Negativkontrolle; Spur 12: Coconut phyllody Phytoplasma, C1)

Die Ergebnisse der nested PCR Protokolle lassen schlußfolgern, daß nicht alle der als spezifisch für Phytoplasmen beschriebenen Primer auch tatsächlich spezifisch sind. Vermutlich läßt sich mit Ihnen auch DNA anderer Bakterien, die z.B. als Saprophyten auf den Pflanzen existieren könnten, amplifizieren. Ähnliche Ergebnisse wurden von Skrzeczkowski *et al.* (2001) für ein anderes Phytoplasma-spezifisches Primerpaar gezeigt. Sie konnten bakterielle DNA von aus Rinde verschiedener Obstbäume isolierten Bakterien der Gattungen *Staphylococcus* und *Pseudomonas* erfolgreich amplifizieren.

Da mit den Protokollen von Bertaccini *et al.* (1998) und Heinrich *et al.* (2002) auch von nicht infizierten Proben Fragmente erwarteter Größe amplifiziert werden konnten, die Negativkontrollen (Wasserkontrollen) aber jeweils frei von Amplifikaten waren und Kontaminationen der Reaktionsansätze somit sehr unwahrscheinlich sind, kann auf eine eindeutige Assoziation eines Phytoplasmas mit ARW nicht geschlossen werden. Das Verfahren nach Seemüller erlaubte nur den Nachweis der Positivkontrolle, und hat somit keine Assoziation eines Phytoplasmas mit ARW nachgewiesen. Da auch in den gesunden Proben keine Phytoplasmen detektiert wurden, kann bei diesem Verfahren am ehesten von einer Spezifität für Phytoplasmen ausgegangen werden. Beobachtungen von Skrzeczkowski *et*

al. (2001) bestätigen diese Ergebnisse. Ihnen gelang es in Kontrollexperimenten nicht, mit dem von Seemüller vorgeschlagenem Primerpaar U3f/U5r DNA von verschiedenen Bakterien, wohl aber von Phytoplasmen, zu amplifizieren.

3.1.4.2 Übertragungsversuche

Unter Verwendung verschiedener Gummiholz-Isolate (Herkunft BBA Dossenheim [31/86, 38/88] und Pflanzenschutzamt Hannover [F1, F2]) und Gewebe (Rinde, Blätter, teilweise Blütenblätter) wurde versucht ein möglicherweise assoziiertes Virus auf verschiedene Pflanzen zu übertragen (siehe Tab. 19). Es wurden jeweils 3 Pflanzen mit einem Isolat und Gewebe inokuliert und alle 3 Tage bis zu 4 Wochen bonitiert. Mit Ausnahme von drei Pflanzenarten, die nekrotische Lokalläsionen entwickelten (*Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana*, *Gomphrena globosa*), die mit Blütenblättern von zwei ARW infizierten Birnen (Isolate 31/86 und 38/88 der BBA Dossenheim) inokuliert wurden, blieben die inokulierten Pflanzen symptomlos. Die Lokalläsionen ließen sich ohne Probleme auf den entsprechenden Wirten vermehren. Alle symptomlos gebliebenen Pflanzenarten wurden auf *Nicotiana benthamiana* und *Chenopodium quinoa* rückgetestet um mögliche latente Infektionen nachzuweisen. In keinem der Fälle entwickelten sich Lokalläsionen oder andere Symptome. Auch nicht bei weiteren Übertragungsversuchen mit Blütenblättern von zwei ARW-Isolaten aus Apfel. Alle Bemühungen, im Elektronenmikroskop Hinweise auf assoziierte Viruspartikel zu finden, blieben auch mit fachkundiger Unterstützung der BBA-Braunschweig (Dr. Lesemann, Dr. Vetten) uneindeutig. Es konnten nur sehr vereinzelt Rhabdovirus ähnliche Partikel, stäbchenförmige Strukturen und Partikel, die denen von Tosspoviren ähneln, beobachtet werden. Auch die anderen Pflanzenarten wurden auf mögliche latente Virusinfektion im Elektronenmikroskop ergebnislos untersucht. Versuche mittels fraktioniertem Ausstrich auf C-Medium ein Bakterium aus den nekrotischen Lokalläsionen zu isolieren, waren erfolgreich. Es konnte mit Unterstützung einer Bakteriologin des Institutes, Frau Dr. Wydra, ein Bakterium in Reinkultur isoliert werden, was mittels Biolog GN Microplates (Firma Biolog), bei dem die unterschiedliche Verwertbarkeit von 95 verschiedene organischen Substraten zur Identifizierung herangezogen wird, eindeutig als *Pseudomonas syringae* pv. bestimmt werden. Rückübertragungen auf *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana* und *Gomphrena globosa* verursachten den ursprünglichen vergleichbare nekrotische Lokalläsionen. Eine erneute Isolierung des Bakteriums aus den Lokalläsionen war ebenfalls möglich. Um den, wenn auch unwahrscheinlichen Zusammenhang des *Pseudomonas syringae* pv. mit Gummiholz zu überprüfen, wurden

Bakteriensuspensionen in den Stamm von 2-jährigen Veredelungen der Apfelsorte 'Lord Lambourne' auf Sämlingsunterlagen inokuliert (siehe Kap. 2.2.27.2.4) und die Bäume 8 Monate lang bonitiert. Der neue Austrieb entwickelte sich normal, eine verminderte Verholzung oder andere Symptome konnten nicht festgestellt werden. Die Assoziation eines Virus konnte mittels der Übertragungsversuche nicht gezeigt werden und das isolierte Bakterium scheint lediglich als Kontamination in den Blüten der Birnen (beide Isolate stammen aus Dosenheim und die Bäume stehen nur wenige Meter auseinander) vorhanden gewesen zu sein. Da sich aus den Blütenblättern der ARW-Isolate auf Apfel aus Hannover auf den krautigen Pflanzen keine Lokalläsionen entwickelten und nach Rücktestung des Bakteriums mit dem Indikator keine Gummiholzsymptome ausgebildet haben, ist ein Zusammenhang des Bakteriums mit ARW äußerst unwahrscheinlich.

3.1.4.3 Extraktion von dsRNA

Unter Verwendung der in Kap. 2.2.27.2.5 beschriebenen Methode wurde versucht, dsRNA aus ARW infizierten Apfel- und Birnenbäumen zu extrahieren. Dabei wurden Blätter, Rinde und Knospen verwendet, bei denen sämtlichst keine detektierbaren Mengen dsRNA extrahiert werden konnten, die nicht den in den meisten Gummiholzisolaten zusätzlich vorhandenen Infektionen mit ASPV und/oder ACLSV zuzuordnen waren. In Abb. 20 sind die dsRNA Extrakte von Gummiholzisolaten in Mischinfektion mit ACLSV (Isolat W4), ASPV (31/86), ohne Mischinfektion mit einem anderen Virus (38/88) und von einem gesunden Kontrollbaum dargestellt. Außer den für ACLSV und ASPV charakteristischen dsRNA Fragmenten ist keine dsRNA identifizierbar. Die Identität der dsRNA Fragmente wurde mittels RT-PCR überprüft. Dazu wurden die dsRNA Banden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und nach 2 min Denaturierung bei 99°C in der RT-PCR mit den jeweils virusspezifischen Primern unter Standardbedingungen erfolgreich amplifiziert.

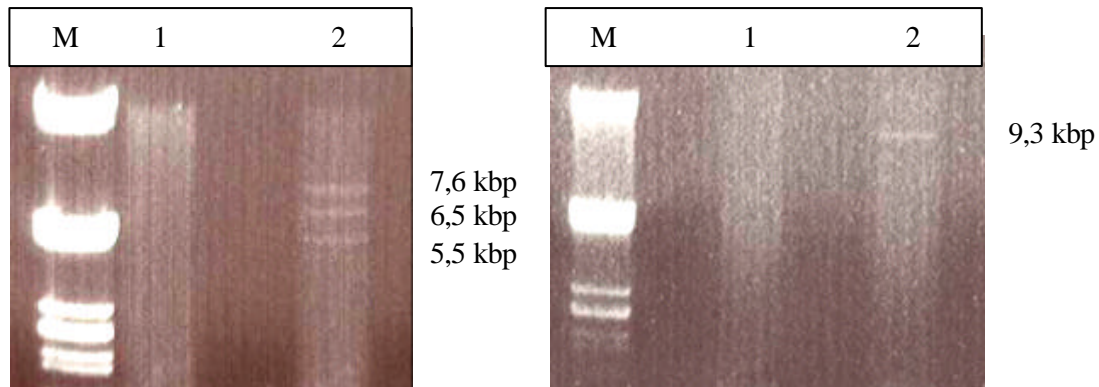


Abbildung 20: Gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener dsRNA Extrakte

(Spuren M: λ -*Pst*I DNA Standard; Spur 1: dsRNA Extrakt einer gesunden Kontrollpflanze; Spur 2: dsRNA Extrakt aus der Probe W 4; Spur 3: dsRNA Extrakt der Probe 38/88; Spur 4: dsRNA Extrakt der Probe 31/86. Angegeben sind jeweils die in der Literatur beschriebenen erwarteten dsRNA Fragmentgrößen für ACLSV und ASPV.)

Auch aus gepoolten Extrakten aus insgesamt 90 g Blattmaterial eines Gummiholzisolates aus Birne, das keine Mischinfektion aufweist (Isolat 38/88 der BBA Dossenheim), konnte keine dsRNA nachgewiesen werden.

3.1.4.4 SISPA Technik

Mit Hilfe der modifizierten SISPA Technik wurde versucht, spezifisch virale Nukleinsäuren aus Blütenblättern einer ausschließlich mit Gummiholz infizierten Birne (Isolat 38/88 der BBA Dossenheim) zu amplifizieren. Die Technik wurde als DNA-SISPA und RNA-SISPA durchgeführt, d.h. daß einmal DNA Extrakte und einmal RNA Extrakte aus dem mit Nukleasen behandelten Filtrat hergestellt und entsprechend weiter verwendet wurden. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Proben mitgeführt. Die nach Auftrennung der Amplifikate in Agarosegelen identifizierbaren Banden waren sehr schwach (nicht dokumentierbar) und wurden direkt aus dem Gel reamplifiziert. Dazu wurde mit einer 200 μ l Pipettespitze ein winziges Gelstück aus der Bande ausgestochen und in einen neuen Reaktionsansatz überführt, anstatt Nukleinsäureextrakt zuzugeben. Die Durchführung der PCR und die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurden nicht verändert. Fragmente, die auch bei der Kontrolle (gesunde Pflanze) auftraten wurden nicht berücksichtigt, da es sich hierbei offensichtlich um Fragmente pflanzlichen Ursprungs handelt. Bei der DNA SISPA wurden 3 Fragmente (SISPA 1-3), bei der RNA SISPA 1 Fragment (SISPA 4) kloniert und sequenziert. Anschließend wurden Sequenzvergleiche mit den in der Genbank (NCBI) enthaltenen

Sequenzen auf Nukleinsäureebene (automatisch vom homologen und komplementären Strang) mittels blastn (NCBI) und auf Aminosäureebene (dazu wird die Sequenz automatisch in allen sechs möglichen Leserastern vom homologen und komplementären Strang mit Überlesen von Stopp-Kodons translatiert) mittels blastx (NCBI) durchgeführt. Für alle Fragmente der DNA SISPA ergaben die Sequenzvergleiche keine hohen Homologien zu pflanzlichen Genen, woraufhin Primers entwickelt wurden, um gesunde und Gummiholz infizierte Pflanzen (Standardreaktionsansatz und Programm) zu testen. In allen Fällen konnte sowohl von infizierten, als auch von gesunden Proben aus RNA und DNA Extrakten ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich hierbei höchstwahrscheinlich um Amplifikate kontaminierender pflanzlicher Nukleinsäuren in den Extrakten, die in der SISPA Technik verwendet wurden, handelt und diese während der Behandlung der Filtrate mit den Nukleasen nicht verdaut wurden. Eine Zusammenfassung der Sequenzvergleiche ist in Tab. 26, die Sequenzen selbst sind im Anhang gegeben. Es ist jeweils das Gen mit der höchsten Sequenzidentität (für Nukleinsäuren oder Aminosäuren, mindestens 50 Score bits), die Größe des Identitätsbereichs und die Höhe der Sequenzidentität wie im Suchergebnis angegeben aufgeführt.

Tabelle 26: Sequenzvergleiche mit den Fragmenten der SISPA-Technik

Klon	NT	Accession Nummer, Bezeichnung und Organismus	Leseraster oder Strang	Identitätsbereiche und Identität
SISPA 1	542	NC_002696, Hypothetisches Protein, <i>Caulobacter crescentus</i>	-3	A 314 – 480, Z 159 - 202 24/44 (54%)
SISPA 2	357	ZP_00016326, hypothetisches Protein, <i>Rhodospirillum rubrum</i>	+1	A 1 – 96, Z 473 – 503 25/32 (78%)
SISPA 3	504	NC_003295, putatives Lipoprotein, <i>Ralstonia solanacearum</i>	-2	A 6 – 224, Z 14 - 86 32/73 AS (43%)
SISPA 4	261	AB049723, putatives Seneszens assoziiertes Protein, <i>Pisum sativum</i>	-3	A 2 – 127 Z 2 - 43 40/42 AS, (95%)

(NT: Anzahl Nucleotide; A: Ausgangssequenz; Z: Zielsequenz; AS: Aminosäuren; NS: Nukleinsäuren)

3.1.4.5 cDNA Subtraktion

Ziel der Durchführung der cDNA Subtraktion war es, cDNA-Klone aus ARW infizierten und gesunden Pflanzen miteinander zu vergleichen und einzelne differentielle cDNA-Klone in der infizierten Probe zu identifizieren. Bei den entsprechenden Klonen kann es sich um

genomische Sequenzen oder mRNA des Erregers handeln, oder aber um mRNA von aufgrund der Infektion stärker transkribierten pflanzlichen Genen. In Abb. 21 ist beispielhaft der belichtete Röntgenfilm einer Hybridisierung von 16 Tester Klonen mit Digoxigenin markierter cDNA von Tester und Driver gegenübergestellt. Als differentiell sind die Klone zu bezeichnen, deren Hybridisierungssignale sich deutlich unterscheiden (die Schwärzungen der entsprechenden Stellen auf dem Film).

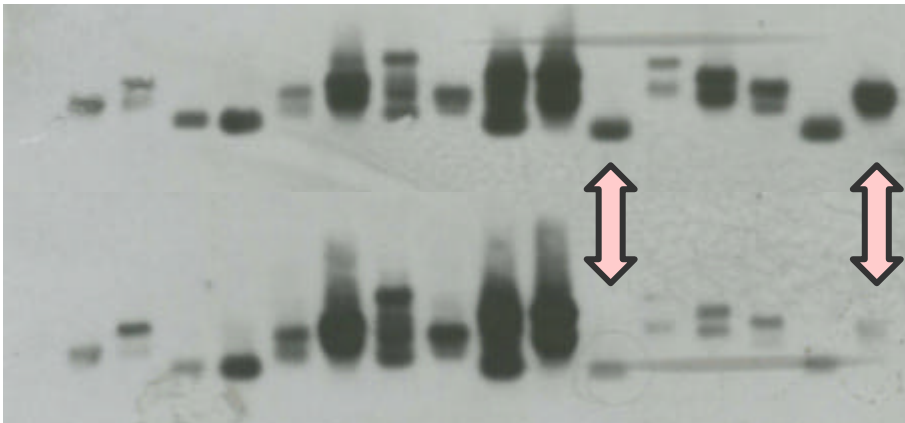


Abbildung 21: Hybridisierung von Tester Klonen mit markierter Tester und Driver cDNA

(In der oberen Reihe wurde mit Tester cDNA, in der unteren Reihe mit Driver cDNA hybridisiert. Exemplarisch sind zwei sich deutlich im Hybridisierungssignal unterscheidende Klone mit Pfeilen gekennzeichnet.)

Um genauen Aufschluß über den Ursprung der differentiellen Klone zu erhalten, wurden diese sequenziert. Anschließend wurden, wie bei den Ergebnissen der SISPA Technik beschrieben, Sequenzvergleiche mit den Sequenzen der NCBI Genbank durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche sind in Tab. 27 zusammengefasst, die Sequenzen selbst sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 27: Sequenzvergleiche mit den Fragmente der Subtraktiven Hybridisierung

Klon	NT	Accession Nummer, Bezeichnung und Organismus	Leseraster oder Strang	Identitätsbereiche und Identität
SH 11/1	251	NP199832, putatives Protein, <i>Arabidopsis thaliana</i>	+2	A 32 – 217, Z 371 – 432 50/62 (80%)
SH 13/1	775	keine signifikanten Treffer		
SH 14/1	857	AF353094, BEL1 ähnliches Protein, <i>Solanum tuberosum</i>	-2	A 116 – 685, Z 115 – 304 149/190 (78%)

SH 15/1	183	AF349963, Endoxyloglucan Transferase, <i>Daucus carota</i>	+3	A 43 - 167, Z 643 - 768 49/60 (81%)
SH 16/1	285	keine signifikanten Treffer		
SH 13/3	649	AJ243427, Thaumatin ähnliches Protein, <i>Malus x domestica</i>	komplementär	A 342 - 639, Z 1 - 298 289/299 (96%)

(NT: Anzahl Nukeotide; A: Ausgangssequenz; Z: Zielsequenz; AS: Aminosäuren; NS: Nukleinsäuren)

Die cDNA Klone SH 11/1, 14/1, 15/3 und 13/3 zeigen hohe Sequenzidentitäten zu pflanzlichen Genen, die keinen direkten Bezug zu an der Verholzung beteiligten Stoffwechselprozessen und somit zur Symptomausprägung von ARW haben. Bei cDNA Klon SH 11/1 sind keine Informationen über das vermeintliche Protein verfügbar und somit ist eine Zuordnung nicht möglich. Klone, bei denen keine Sequenzidentitäten festgestellt werden konnten (SH 13/1, SH 16/1), wurden mittels RT-PCR und PCR rückgetestet, d.h. es wurden Primer für die Amplifikation der Fragmente entwickelt und unter Standardbedingungen mit Reverse Transkriptase an RNA Extrakten und ohne Reverse Transkriptase an DNA Extrakten von ARW infizierten und nicht infizierten Proben getestet. In allen Fällen war eine erfolgreiche Amplifikation von RNA und DNA aus infizierten und nicht infizierten Proben möglich. Daraus läßt sich schließen, daß auch diese Fragmente von pflanzlichen Nukleinsäuren amplifiziert wurden. Da diese differentiellen Klone pflanzlichen Ursprungs deutliche quantitative Unterschiede in der Hybridisierung gezeigt haben (wie auch Klon 11/1), bleibt offen, inwieweit die unterschiedlich starke Transkription durch die Infektion mit dem Erreger der Gummiholzkrankheit bedingt ist.

Bei der Durchführung der cDNA Subtraktion mit vertauschtem Tester und Driver, d.h. die nicht infizierte Pflanze als Tester und die infizierte als Driver, konnten keine differentiellen cDNA Klone identifiziert werden. Bei diesen Klonen hätte vermutet werden können, daß die Transkription des entsprechenden Gens in der infizierten Pflanze bedingt durch den Erreger vermindert ist.

3.1.4.6 Viroidnachweis aus ARW infizierten Pflanzen

Um die mögliche Assoziation eines Viroids mit Gummiholz zu überprüfen, wurden 2 Gummiholz-Isolate und ein Flachästigkeit-Isolat (F1, F2, F3), ein Erreger der von einzelnen Autoren mit Gummiholz in Verbindung gebracht wird (Desvignes, 1999), mittels RPAGE, die am Landespflanzenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern in Rostock (Dr. Kruse)

durchgeführt wurde, auf Viroide untersucht. Die Ergebnisse ergaben keinen Hinweis auf Assoziation mit einem Viroid.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Schwerpunkt des Projekts war die Entwicklung eines Routinenachweisverfahrens für den Nachweis von vier molekular charakterisierten, wirtschaftlich wichtigen Viren (*Apple mosaic virus*, ApMV; *Apple stem pitting virus*, ASPV; *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV; *Apple stem grooving virus*, ASGV) an Apfel bis zur Praxisreife. Die Ergebnisse des entwickelten multiplex RT-PCR-ELISA Verfahrens aus der Entwicklungsphase und Validierung in der Paralleltestung mit dem Pflanzenschutzamt Hannover zeigen, daß eine Einsetzbarkeit in den Pflanzenschutzdiensten und somit der Ersatz für die nachteilige Indikatorrestung für diese 4 Viren bereits möglich ist. Die in der Paralleltestung verwendeten Proben wurden der regulären jährlichen Testung zur Zertifizierung entnommen und erlaubten somit das Verfahren unter realitätsnahen Bedingungen zu erproben und zu validieren. Die Weiterentwicklung zum multiplex RT-PCR-ELISA ermöglicht den Verzicht auf die Gelelektrophorese und die damit verbundenen mutagenen und/oder toxischen Nukleinsäurefarbstoffe. Dies stellt nicht nur eine Verbesserung der Arbeitssicherheit für das Laborpersonal dar, sondern vermeidet auch die sonst notwendige Entsorgung der Gele als Sondermüll. Entsprechend den Zielen des Projekts wurde das gesamte Verfahren von der Extraktion bis zur ELISA-ähnlichen Detektion der Amplifikate in zwei ausführlichen Protokollen veröffentlicht, so daß es jederzeit nachvollzogen werden kann.

Das Verfahren kann die Indikatorrestung für Apfel zwar noch nicht vollständig ersetzen, da außer den erfaßten Apfelviren noch weitere Erreger (Fruchtvirosen, Gummiholz, Flachästigkeit) gemäß AGOZ zur Anerkennung von Anbaumaterial von Apfel relevant sind. Der Umfang der Indikatorrestung könnte aber deutlich reduziert werden. Von den zur Zeit verwendeten 16 Indikatorveredelungen könnten 9, die ausschließlich für den Nachweis der hier im Mittelpunkt stehenden vier Viren verwendet werden, eingespart werden (Zahn, pers. Mitteilung). Zu dieser Einsparung kommen noch alle restlichen Indikatorveredelungen der Proben hinzu, die sich bei einer vorgeschalteten Testung mittels multiplex RT-PCR als infiziert erweisen und so schon vorab ausgesondert werden könnten. Somit ist eine Reduzierung des gesamten Aufkommens an Veredelungen von ca. 60% bei Berücksichtigung der Testergebnisse der Paralleltestung, bei der ca 20% der Proben infiziert waren, realistisch möglich. Dies ist, aufgrund der hohen Kosten der Indikatorrestung und relativ niedrigen

Kosten für einen RT-PCR basierten Nachweis, mit einer deutlichen Reduzierung der Gesamtkosten verbunden. Zudem haben die Baumschulen und Züchter, die Ihre Sorten zur Zertifizierung geben, aufgrund der Schnelligkeit des Tests bereits nach wenigen Tagen die Möglichkeit, die mit Viren infizierten Proben aus ihren Beständen zu entfernen, ohne die langwierige Indikatorrestung abwarten zu müssen. Aufgrund der Seltenheit der anderen Erreger (Fruchtviren, Gummiholz, Flachhästigkeit), die nur sehr selten nicht in Mischinfektionen mit den 4 Viren auftreten, bieten diese vorläufigen Ergebnisse zumindest eine relative Sicherheit für die Zertifizierung der anderen Proben und ermöglichen es, die Entscheidungssicherheit in der Baumschule zu verbessern.

Das weiterentwickelte Extraktionsverfahren konnte auch an anderen Pflanzenarten erfolgreich eingesetzt werden. Daher bietet es sich an, diese Technik auch in anderen Nachweisverfahren zu erproben, die eine aufwendigere Extraktion oder giftige Lösungsmittel, die das Arbeiten unter einem Rauchabzug notwendig machen, beinhalten. Ähnliches gilt für die neu entwickelte interne Kontrolle, die zur Verbesserung der Nachweissicherheit ein fester Bestandteil von PCR-basierten Verfahren sein sollte. Die Implementierung erfordert nur ein zusätzliches Primerpaar, was einen Mehraufwand pro Probe bei z.B. herkömmlichen Verfahren mit Gelelektrophorese von weniger als 1 Cent bedeutet.

Die Untersuchungen über das Auftreten der Viroide ASSVd, ADFVd und PBCVd in Deutschland ergaben keine Hinweise auf eine Verbreitung im deutschen Obstbau. Auch am Pflanzenschutzamt Hannover ist bisher kein Auftreten der Viroide dokumentiert. Eine Untersuchung auf die Viroide ist in der AGOZ (Anonymus, 1998) zur Zertifizierung nicht vorgesehen, könnte aber ohne größeren zusätzlichen Aufwand mittels RT-PCR aus den für die Virustestung verwendeten Nukleinsäureextrakten parallel erfolgen. Da das Auftreten der Viroide im europäischen Raum in Kultursorten und teilweise auch Wildgehölzen nachgewiesen ist, kann eine Präsenz oder auch zukünftige Einschleppung nach Deutschland nicht ausgeschlossen werden.

Bei den Fruchtviren konnte keine Assoziation mit Viroiden nachgewiesen werden, weder in den spezifischen RT-PCR basierten Nachweisen noch mittels der alle Viroide detektierenden R-PAGE aus einem Isolat der Rauhschaligkeit des Apfels. In allen getesteten Fruchtviren lag eine Mischinfektion mit ASPV und ACLSV vor, was die Vermutungen anderer unterstützt, daß diese mit den Fruchtviren assoziiert sind. Da dies jedoch lediglich Indizien sind, die den ursächlichen Zusammenhang der Fruchtviren mit den oben genannten Viren

nicht beweisen, kann für den Nachweis der Fruchtvirosen auch weiterhin nicht auf die Indikatorrestung verzichtet werden.

Die umfangreichen Untersuchungen zur Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit des Apfels konnten leider keine Klärung erreichen. Aufgrund der nicht eindeutigen eigenen Ergebnisse zur Assoziation mit Phytoplasmen und unterstützt von in der Literatur zu findenden aktuellen Ergebnissen ist die Einsetzbarkeit von unspezifischen Primern zum Phytoplasmanachweis als kritisch zu beurteilen. Eine genaue Überprüfung der Spezifität für Phytoplasmen ist unbedingt notwendig, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Aufgrund der eigenen Untersuchungsergebnisse ist dagegen eine Assoziation eines Viroids mit ARW als äußerst unwahrscheinlich anzusehen. Die Versuche, spezifische virale Nukleinsäuren aus ARW infizierten Bäumen zu extrahieren oder spezifisch zu amplifizieren blieben erfolglos. Da bei allen Techniken z.B. die jeweilige Sensitivität des Verfahrens, der Zeitpunkt der Durchführung und das verwendete Gewebe die Ursache für die negativen Nachweisergebnisse sein können, ist ein Ausschluß eines mit ARW assoziierten Virus so noch nicht möglich. Auch für ARW gibt es deshalb zur Zeit keine Alternative zur bisher verwendeten Indikatorrestung.

4 Zusammenfassung

Apfel (*Malus x domestica* Borkh.) ist eine der weltweit wirtschaftlich wichtigsten Obstkulturen, die, neben anderen Pathogenen, häufig mit *Apple chlorotic leaf spot virus* (*Trichovirus*), *Apple stem pitting virus* (*Foveavirus*), *Apple mosaic virus* (*Ilarvirus*) und *Apple stem grooving virus* (*Capillovirus*) infiziert ist. Dies kann, insbesondere bei oft auftretenden Mischinfektionen dieser Viren, zu Ertragseinbußen bis 60% führen. Als Routinenachweis von Pflanzenviren werden in der Regel serologische Verfahren eingesetzt. Diese Nachweismethodik wird jedoch insbesondere bei Gehölzen oftmals durch niedrige Viruskonzentrationen und hohe Hemmstoffgehalte limitiert. Zudem sind in vielen Fällen nur mangelhafte oder keine Antiseren (ASPV) kommerziell erhältlich. Diese Situation ist bei den Viren an Apfel besonders gravierend und führt dazu, daß in den Pflanzenschutzämtern (z.B. Hannover-Ahlem) die langwierigen (Abschlußbonitur im 2./3. Jahr) und teuren Indikatortests mit holzigen Indikatorpflanzen durchgeführt werden. Als Routinenachweis bieten sich PCR Techniken als Alternative an und um die Gelelektrophorese und die notwendigen giftigen oder mutagenen Nukleinsäurefarbstoffe zu ersetzen, sind ELISA ähnliche Strategien für die Detektion der PCR Produkte interessant. Zwei multiplex RT-PCR-ELISAs, jeweils für den Nachweis von 2 Viren plus interne Kontrolle (zum Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse) aus Gesamtnukleinsäure (TNA) wurden an einem breiten Isolatspektrum unter Einbeziehung verschiedener geographischer Herkünfte entwickelt und evaluiert. Das entwickelte Nachweisverfahren erlaubt den Nachweis der Viren aus Rindenschildchen mit Knospen unabhängig von der Jahreszeit und läßt sich in 1-2 Tagen durchführen. Die interne Kontrolle basiert auf dem *nad5* Gen des Apfels und durch die Wahl eines Intronüberspannenden Primers wird die interne Kontrolle auch in Gegenwart von pflanzlicher DNA selektiv von mRNA amplifiziert. Der ELISA-ähnliche Nachweis beruht auf einer Hybridisierung der in der RT-PCR mittels Digoxigenin-modifizierter Primer markierten Amplifikate an Capture-Oligonukleotide, die an die Kunststoffoberfläche der verwendeten NucleLink-Strips (Nunc) kovalent gebunden sind. Die Detektion erfolgt mittels Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase-Konjugat und Substratumsetzung (para-Nitrophenylphosphat). Im Vergleich zur Gelelektrophorese (1% Agarose, Ethidiumbromid gefärbt) hat die ELISA-Variante eine vergleichbare oder geringfügig höhere relative Sensitivität. Aus Mischproben von Nukleinsäureextrakten infizierter mit gesunden Proben war ein Virusnachweis bis zu einer Verdünnung von 1:40 möglich.

In einem Paralleltest mit dem Pflanzenschutzamt Hannover wurden 136 Proben getestet, die auf Infektionen mit den vier Viren mittels holziger Indikatoren nach EPPO Empfehlungen dort getestet wurden. Mittels multiplex RT-PCR-ELISA konnten alle an den Indikatoren bonitierten Infektionen bestätigt werden und für einzelne Proben wurden zusätzliche Infektionen nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, daß das neu entwickelte Verfahren eine zuverlässige, sensitive Alternative zur bisher verwendeten Indikatorrestung ist.

Desweiteren wurden Versuche unternommen, die Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW), einer pflanzübertragbaren Krankheit des Apfels, aufzuklären. Die Ergebnisse verschiedener Studien über die mögliche Assoziation mit Phytoplasmen sind widersprüchlich. Unter Verwendung von 3 verschiedenen nested PCR Protokollen konnte die Assoziation eines Phytoplasmas mit ARW nicht bestätigt werden und mittels cDNA Subtraktion, dsRNA Extraktion, SISPA Technik oder R-PAGE konnte keine viralen oder Viroid Nukleinsäuren nachgewiesen werden.

Um Informationen über das Auftreten von Kernobst-Viroiden in Deutschland zu gewinnen, wurden zahlreiche verdächtige Proben mittels spezifischer Primer in der RT-PCR auf *Apple scar skin viroid*, *Apple dimple fruit viroid* und *Pear blister cancer viroid* getestet. In keinem der Fälle konnte ein Viroid nachgewiesen werden. Eine Überprüfung des möglichen Zusammenhangs der Fruchtvirose Apple rough skin und Apple star crack mit den bekannten Viren und Viroiden an Kernobst wurde durchgeführt. Veröffentlichungen, die eine Assoziation mit den Viren ASPV und ACLSV beschreiben, konnten dabei bestätigt werden. In alle Fällen wurden diese beiden Viren nachgewiesen, in einem Isolat zusätzlich ASGV. Viroide konnten in den Fruchtvirose weder mittels spezifischer Primer in der RT-PCR noch mittels R-PAGE nachgewiesen werden.

5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen (weiterführende Fragestellungen)

Das Projekt gliedert sich, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, thematisch in 4 Bereiche, aus denen sich folgende Ziele ableiten lassen:

1. Schwerpunkt dieses Projekts ist es, ein auf der RT-PCR basierendes Verfahren für den Routinenachweis der wirtschaftlich wichtigen Viren (*Apple mosaic virus*, ApMV; *Apple stem pitting virus*, ASPV; *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV; *Apple stem grooving virus*, ASGV) an Apfel zu entwickeln, optimieren und erproben.
2. Es soll der mögliche Ersatz gelelektrophoretischer Verfahren durch z.B. ELISA-ähnliche Techniken mit in das Nachweisverfahren integriert werden.
3. Es sollen Untersuchungen durchgeführt werden, die neue Erkenntnisse über die Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW) an Apfel liefern.
4. Eine Überprüfung des möglichen Zusammenhangs der Fruchtvirosen mit den bekannten Viren und Viroiden an Kernobst soll durchgeführt und parallel dazu sollen bisher fehlende Erkenntnisse über das Auftreten der Viroide an Kernobst in Deutschland gewonnen werden.

Die Ziele 1 und 2, ein als Routinenachweis einsetzbares RT-PCR basiertes Verfahren zu entwickeln und erproben, bei dem auf die Gelelektrophorese verzichtet werden kann, konnte, wie die in Kapitel 3 und 4 dargestellten Ergebnisse belegen, erreicht werden. Die erfolgreiche Paralleltestung von über 130 Proben unter realitätsnahen Bedingungen mit dem Pflanzenschutzamt Hannover zeigt, daß das Verfahren die Praxisreife erreicht hat. Weitere Paralleltests mit der Indikatorrestung würden die Zuverlässigkeit des entwickelten Verfahrens verdeutlichen. Diese könnten anhand der veröffentlichten ausführlichen Protokolle problemlos z.B. an den Pflanzenschutzämtern selbst durchgeführt werden. Eine Anwendung des Verfahrens am Pflanzenschutzamt Hannover wurde von Herrn Dr. Zahn bereits zugesagt. Aufgrund von neu hinzukommenden Sequenzinformationen für die Viren/Viroide, die weltweit gewonnen werden, ist auch eine zukünftige Überprüfung der Primersequenzen notwendig. Gegebenenfalls kann aufgrund der hohen Sequenzvariabilität, die für RNA-Viren typisch ist, eine Anpassung der Primer-/Capture-Oligonukleotid-Sequenzen notwendig werden. Diese Notwendigkeit der Überprüfung von neu gewonnenen Sequenzinformationen besteht generell für PCR-basierte Nachweisverfahrenverfahren und nicht nur für das hier entwickelte. Die Überprüfung, gegebenenfalls notwendige Anpassung der Primer-/Capture-

Oligonukleotid-Sequenzen und deren Implementierung in das bestehende Nachweisverfahren sollte ohne größeren Arbeitsaufwand möglich sein.

Das Ziel, neue Erkenntnisse über die Ätiologie des Erregers der Gummiholzkrankheit an Apfel zu gewinnen, unter dem Aspekt, auch für diesen Erreger auf die Indikatorbestimmung zukünftig verzichten zu können, konnte zwar nicht erreicht werden, die Untersuchungsergebnisse zeigen jedoch, daß die von einzelnen Autoren beschriebene Theorie, es handle sich bei dem Erreger um ein Phytoplasma, stark anzuzweifeln ist. Eine Assoziation mit einem Viroid oder Virus konnte nicht nachgewiesen werden, wobei aus diesen Ergebnissen zumindest bezüglich der Viren kein Ausschluß gefolgert werden kann, da die Ergebnisse der Untersuchungen nur auf einzelnen Proben basieren. Es müßte z.B. die cDNA-Subtraktion zur besseren Absicherung der Ergebnisse zu verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Geweben verschiedener Gummiholz-Isolate erneut durchgeführt werden. Bei nur 5 Zeitpunkten, 3 Geweben (Blatt, Rinde, Wurzeln) und 4 Isolaten wären das aber schon 60 Ansätze, die einen nicht unerheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwand bedeuten würden. Dieses konnte in diesem Projekt nicht geleistet werden, wäre aber für ein Folgeprojekt denkbar. Da sich die Untersuchungen auf die Nukleinsäuren eines mit Gummiholz assoziierten Erregers konzentriert haben, wären weiterführende Untersuchungen auf "Protein-Ebene" mit z.B. zweidimensionaler Proteinelektrophorese (Young, 1984) sinnvoll. So könnte ein möglicher Zusammenhang mit einem Phytoplasma oder Virus weitergehend untersucht werden. Desweiteren wären weiterführende Arbeiten zur Identifikation und Evaluierung von Primern, die tatsächlich ausschließlich Phytoplasma-spezifisch sind, sinnvoll und wünschenswert.

Da bisher in Deutschland kein Fall einer Viroidinfektion im Obstbau mit ASSVd, ADFVd oder PBCVd dokumentiert ist und auch die in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen kein Auftreten dieser Viroide nachweisen konnten, kann eine weite Verbreitung der Viroide in Deutschland ausgeschlossen werden.

Das Risiko, die Viroide aus z.B. europäischen Nachbarländern, Asien oder Nordamerika einzuschleppen, wo eine teilweise starke Verbreitung besteht, darf allerdings nicht unterschätzt werden. Wie in Kapitel 3.2 bereits erwähnt, wäre eine Implementierung eines Viroidnachweises in die Zertifizierung unter Verwendung von RT-PCR-basierten Verfahren ohne weiteres möglich. Zudem wären weiterführende Untersuchungen von Wildgehölzen in Deutschland (insbesondere Wildapfel- und Wildbirnenarten) als mögliche natürliche Viroidquellen sinnvoll.

Ein Zusammenhang der Viroide mit den Fruchtviren konnte nicht gezeigt werden. Da alle in diesem Projekt untersuchten Isolate mit anderen Apfelnviren mischinfiziert waren, und es in der Literatur auch keinen gesicherten Hinweis auf ein alleiniges Auftreten der Fruchtviren gibt, hat die Theorie, daß die Viren ACLSV und ASPV mit den Fruchtviren in Verbindung stehen, weiterhin Bestand. Um den Sachverhalt zu klären, müßten die Koch'schen Postulate erfüllt werden. D.h. die Viren ACLSV und ASPV müßten aus den entsprechenden Pflanzen isoliert werden und nach Übertragung auf gesunde Pflanzen wieder die entsprechenden Symptome hervorrufen, aus denen sie dann erneut isoliert werden müßten. Diese stellt einen nicht geringen Arbeits- und Zeitaufwand dar, der im Rahmen dieses Projekts nicht nebenbei geleistet werden konnte. Alleine die Rücktestung würde mehrere Jahre in Anspruch nehmen, da die Fruchtviren ausschließlich an den Früchten spezifische Symptome zeigen. Hieraus könnte sich ein interessantes, weiterführendes Projekt ergeben, insbesondere im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen zu den Erregern der Gummiholzkrankheit und Flachhätigkeit, um in der Zukunft vollständig auf die Indikatorrestung verzichten zu können.

6 Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt und in deutsch- und englisch-sprachigen Fachzeitschriften veröffentlicht.

Die Veröffentlichungen in den Tagungsbänden und Zeitschriften sind unten zusammenfassend in chronologischer Reihenfolge wiedergegeben. Die Veröffentlichungen, die wie im Projektantrag vorgesehen als ausführliche diagnostische Protokolle anzusehen sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Mit Ihrer Hilfe ist es möglich, das gesamten multiplex RT-PCR-ELISA Verfahren für den Nachweis der vier Apfelviren anzuwenden. Desweiteren ist, entsprechend der Forderung des 2. Statustreffens die Verfahren der "Praxis" näherzubringen, das Nachweisverfahren mit Herrn Dr. Zahn vom Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover einmal zusammen durchgeführt worden, um ihm die Etablierung des Verfahrens in seinem Testlabor zu erleichtern und damit auch eventuell nach Ablauf dieses Projekts die weitere Evaluierung im Rahmen von Paralleltestungen fortgesetzt werden kann. Die Resonanz war äußerst positiv und Herr Dr. Zahn hat bereits begonnen, die Testung in seinem Labor selbst durchzuführen. Für die Klärung von eventuell auftretenden Detailfragen stehen wir auch nach Ablauf des Projektes zur Verfügung. Zusätzlich sind die ersten Ergebnisse des Verfahrens in allgemeinverständlicher Form in der Zeitschrift Obstbau veröffentlicht worden. Als Resonanz auf diese Veröffentlichung wurden wir von der Landesanstalt für Pflanzenschutz (Herr Petruschke) kontaktiert und haben 15 Apfelproben, bei denen die dortige Indikatorrestung uneindeutige Ergebnisse geliefert hat, erfolgreich nachtesten können. Das Protokoll des Nachweisverfahrens wurde Herrn Petruschke für eine eigene Erprobung zur Verfügung gestellt.

Menzel, W., Maiß, E., 2000. Nachweis des *Apple mosaic virus* (ApMV) mittels RT-PCR-ELISA. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 376, 178-179.

Menzel W., Maiß, E., 2000. Viroide an Apfel und Birne. Obstbau 9, 525.

Menzel, W., Jelkmann, W., Maiß, E., 2001. Detection of four apple viruses by one-tube multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft 31 (2), 42.

*Menzel, W., Jelkmann, W., Maiß, E., 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99, 81-92.

Menzel, W., Zahn, V., Maiß, E., 2002. Neue Techniken in der Obstvirustestung. *Obstbau* 7, 363-364.

Maiß, E., Zahn, V., Menzel, W., 2002. Multiplex RT-PCR-ELISA detection of four apple viruses and of plant mRNA as internal control. *The World of Microbes. XIIth International Congress of Virology*, Paris, 229.

Menzel, W., Zahn, V., Maiß, E., 2002. Erprobung eines multiplex RT-PCR-ELISA Tests als Routinenachweis von 4 Viren an Apfel. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 390, 501.

*Menzel, W., Zahn, V., Maiß, E., 2002. Multiplex RT-PCR-ELISA detection of four apple viruses in comparison to bioassay. *Journal of Virological Methods*, zur Veröffentlichung eingereicht.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenhänge der einzelnen Kontrollmechanismen in der RT-PCR	28
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primerposition der internen Kontrolle (Pfeile) im mitochondrialen <i>nad5</i> Gen	30
Abbildung 3: Schematische Darstellung des RT-PCR-ELISA Verfahrens	43
Abbildung 4: Schematische Darstellung der DIG-Detection Test-Strips (Roche)	46
Abbildung 5: Schematische Darstellung der cDNA Subtraktion	58
Abbildung 6: Überprüfung der mRNA Spezifität der internen Kontrolle	70
Abbildung 7: Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> und <i>Apple stem grooving virus</i> mittels multiplex RT-PCR I	72
Abbildung 8: Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von <i>Apple stem pitting virus</i> und <i>Apple mosaic virus</i> mittels multiplex RT-PCR II	72
Abbildung 9: Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR II für <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> and <i>Apple stem grooving virus</i>	73
Abbildung 10: Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR II für <i>Apple stem pitting virus</i> und <i>Apple mosaic virus</i>	74
Abbildung 11: Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen für multiplex RT-PCR I (oberes Gel) und II (unteres Gel)	75
Abbildung 12: Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR I mittels Gelelektrophorese und ELISA	76
Abbildung 13: Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR II mittels Gelelektrophorese und ELISA	77
Abbildung 14: Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR I	78
Abbildung 15: Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR II	78
Abbildung 16: Vergleich Nunc/Exiqon Strips im RT-PCR-ELISA für ASPV	79
Abbildung 17: Nachweis von RT-PCR Produkten von ASPV mittels DIG-Detection Test-Strips	80
Abbildung 18: Nachweis von ASSVd, PBCVd und ADFVd mittels RT-PCR	82
Abbildung 19: Nachweis von Phytoplasmen mittels nested RT-PCR nach Heinrich <i>et al.</i> (2002)	84
Abbildung 20: Gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener dsRNA Extrakte	87

Abbildung 21: Hybridisierung von Tester Klonen mit markierter Tester und Driver
cDNA

89

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Feste Chemikalien	9
Tabelle 2: Flüssige Chemikalien	11
Tabelle 3: Verwendete Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer	12
Tabelle 4: Sonstige verwendete Enzyme, Nukleotide und zugehörige Reaktionspuffer	12
Tabelle 5: Verwendete Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren	16
Tabelle 6: In der Transformation verwendete Bakterienstämme	16
Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte	16
Tabelle 8: Verwendete Software	17
Tabelle 9: Sonstiges Material	17
Tabelle 10: Liste der verwendeten Proben	18
Tabelle 11: Verwendete Indikatoren zum Nachweis der Virusinfektionen und Virussymptome (Zahn, 1995)	20
Tabelle 12: Primersequenzen und erwartete Produktgrößen	26
Tabelle 13: Liste der mit der internen Kontrolle überprüften Pflanzen	30
Tabelle 14: Primersequenzen und erwartete Produktgrößen	31
Tabelle 15: Capture Oligonukleotid Sequenzen und Position	44
Tabelle 16: Primer nach Lee <i>et al.</i> (1995)	49
Tabelle 17: Primer nach Seemüller (pers. Mitteilung)	50
Tabelle 18: Primer nach Heinrich <i>et al.</i> (2002)	51
Tabelle 19: Liste der in den Übertragungsversuchen verwendeten Pflanzenarten und Sorten	54
Tabelle 20: Primer und Adapter der SISPA Technik	57
Tabelle 21: Primer für die Erst- und Zweitstragsynthese	60
Tabelle 22: Adaptersequenzen	61
Tabelle 23: Primer für die 1. und 2. PCR	63
Tabelle 24: Primer der Bakterien PCR	65
Tabelle 25: Ergebnisse der Paralleltestung mit dem Pflanzenschutzamt Hannover	81
Tabelle 26: Sequenzvergleiche mit den Fragmenten der SISPA-Technik	88
Tabelle 27: Sequenzvergleiche mit den Fragmente der Subtraktiven Hybridisierung	89

9 Literaturverzeichnis

Ahrens, U., Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828-832.

Allander, T., Emerson, S.U., Engle, R.E., Purcell, R.H. und Bukh, J., 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10.1073/pnas.211424698 (Online-Ausgabe).

Ambroso, S., Desvignes, J.C., Llacer, G., Flores, R., 1995. Peach latent mosaic and pear blister canker viroids: Detection by molecular hybridization and relationships with specific maladies affecting peach and pear trees. *Acta Horticulturae* 386, 515-521.

Anonymus, 1998. Verordnung über das Inverkehrbringen von Anbaumaterial von Gemüse-, Obst- und Zierpflanzenarten sowie zur Aufhebung der Verordnung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten im Obstbau. *Bundesgesetzblatt Teil I*, 36, 1322-1327 und 1352-1353.

Bariana, H.S., Shannon, A.L., Chu, P.W.G., Waterhouse, P.M., 1995. Detection of five legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology* 84, 1201-1205.

Beakbane, A.B., Mishra, M.D., Posnette, A.F., Slater, C.H.W., 1971. Mycoplasma-like organisms associated with chat fruit and rubbery wood disease of apple, *Malus domestica* Borkh., compared with those in strawberry with green petal disease. *Journal of General Microbiology* 66, 55-62.

Bertaccini, A., Martini, M., Paltrinieri, S., Brighetti, M., Fialova, R., Navratil, M., Franova, J., Davies, D., Karesova, R., 2001. A molecular survey to identify phytoplasmas associated with apple trees showing different diseases symptoms. *Acta Horticulturae* 550, 371-376.

Bertaccini, A., Vibio, M., Janeckova, M., Franova-Honetslegrova, J., 1998. Molecular detection of phytoplasmas in apple with rubbery wood symptoms. *Acta Horticulturae* 472, 693-700.

- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim van Dillen, P.M.E., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503.
- Borrow, R., Claus, H., Guiver, M., Smart, L., Jones, D.M., Kaczmarek, E.B., Frosch, M., Fox, A.J., 1997. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. *Epidemiology and Infection* 118, 111-117.
- Campbell, A. I., 1963. The effect of some latent virus infections on the growth and cropping of apples. *Journal of Horticultural Sciences* 38, 15-19.
- Candresse, T., Kofalvi, S.A., Lanneau, M., Dunez, J., 1998. A PCR-ELISA procedure for the simultaneous detection and identification of prunus necrotic ringspot (PNRSV) and apple mosaic (ApMV) ilarviruses. *Acta Horticulturae* 472, 219-225.
- Candresse, T., Lanneau, M., Revers, F., Grasseau, N., Macquire, G., German, S., Malinowsky, T., Dunez, J., 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leafspot virus. *Acta Horticulturae* 386, 136-147.
- Clark, J.M., 1988. Novel non-templated nucleotide reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 16, 9677-9686.
- Clontech, 2000. PCR-select cDNA subtraction kit user manual. Nummer PT1117-1, 6.
- Costa, J.M., Durand, R., Deniau, M., Rivollet, D., Izri, M., Houin, R., Vidaud, M., Bretagne, S., 1996. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1831-1833.
- Crane, M.B., 1945. Origin of viruses. *Nature* 156, 115-116.
- Desvignes, J.C. 1999. Virus diseases of fruit trees. Ctifl, Paris.

- Desvignes, J.C., Boyle, R., Grasseau, N., 1998. Sensibilite varietale a l'apple scar skin viroid. *L'Arboriculture Fruitiere* 515, 17-20.
- Desvignes, J.C., Grasseau, N., Boye, R., Cornaggia, D., Aparicio, F., Di Serio, F., Flores, R., 1999. Biological properties of apple scar skin viroid: Isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission. *Plant Disease* 83, 768-772.
- Di Serio, F., Alioto, D., Ragozzino, A., Giunchedi, L., Flores, R., 1998. Identification of apple dimple fruit viroid in different commercial varieties of apple grown in Italy. *Acta Horticulturae* 472, 595-601.
- Di Serio, F., Aparicio, F., Alioto, D., Ragozzino, A., Flores, R., 1996. Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. *Journal of General Virology* 77, 2833-2837.
- Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K., 1991. The biotin-(strept)avidin system: Principles and application in biotechnology. *Clinical Chemistry* 37, 625-636.
- Dodds, A., 1993. DsRNA in diagnosis. In: Matthews R.E.F., Hrsg., *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, 273-294.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. 1991: A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19, 1349.
- EPPO 1999. Certification schemes-Pathogene-tested material of Malus, Pyrus and Cydonia. *EPPO Bulletin* 29, 239-252.
- Flores, R., Hernandez, C., Llacer, G., Desvignes, J.C., 1991. Identification of a new viroid as the putative causal agent of pear blister canker disease. *Journal of General Virology* 72, 1199-1204.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T.O., 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143, 623-629.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

- Hashimoto, J., Kongezawa, H., 1987. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Research* 15, 7045-7052.
- Heinrich, M., Botti, S., Caprara, L., Arthofer, W., Strommer, S., Hanzer, V., Katinger, H., Bertaccini, A., Laimer da Camara Machado, M., 2001. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 169-179.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23, 504-511.
- Holton, T.A., Graham, M.W., 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research* 19, 1156.
- Hull, R., 2002. *Matthews' plant virology*. Vierte Auflage, Academic Press, San Diego.
- Hurt, S.S., Podleckis, E.V., Howell, W.E., 1996: Integrated molecular and biological assays for rapid detection of apple scar skin viroid in pear. *Plant Disease* 80, 458-462.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sinninsky, J.J., Hrsg., 1999. *PCR applications: Protocols for functional genomics*. Academic Press, San Diego.
- Ito, T., Kanematsu, S., Koganezawa, H., Tsuchizaki, T., Yoshida, K., 1993. Detection of a viroid associated with apple fruit crinkle disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 59, 520-527.
- Ito, T., Yoshida, K., 1998. Reproduction of apple fruit crinkle disease symptoms by apple fruit crinkle viroid. *Acta Horticulturae* 472, 587-593.
- James, D., 1999. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods* 83, 1-9.
- Jelkmann, W., Keim-Konrad, R., 1997. An immunocapture polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. *Journal of Phytopathology* 145, 499-504.
- Kato, S., Shimamoto, Y., Mikami, T., 1995. The apple mitochondrial atp9 gene: RNA editing and cotranscription with exons a and b of the nad5 gene. *Physiologia Plantarum* 93, 572-575.

- Kinard, G.R., Scott, S.W., Barnett, O.W., 1996. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving virus using RT-PCR. *Plant Disease* 80, 616-621.
- Kummert, J., Vendrame, M., Lepoivre, P., Steyer, S., 2001. Development of routine RT-PCR ELISA tests for fruit tree certification. *Acta Horticulturae* 550, 45-52.
- Kwok, S., Higuchi, R. 1989: Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.
- Kwok, S., Kellog, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J., 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* 18, 999-1005.
- Kyriakopoulou P.E., Hadidi, A., 1998. Natural infection of wild and cultivated pears with apple scar skin viroid in Greece. *Acta Horticulturae* 472, 617-626.
- Lee, I.M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85, 728-735.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Hiruki, C., 1991. Genetic interrelatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridisation and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3565-3569.
- Leone, G., Lindner, J.L., Jongedijk, G., 1998. Symptoms on apple and pear indicators after backtransmission from *Nicotiana occidentalis* confirm the identity of apple stem pitting virus with Pear vein yellows virus. *Acta Horticulturae* 472, 61-65.
- Lepanje, S., 1971. Denaturation of globular proteins by guanidine thiocyanate. *Biochimica et Biophysica Acta* 243, 349-365.
- Loreti, S., Faggioli, F., Barba, M., 199. A rapid extraction method to detect peach latent mosaic viroid by molecular hybridization. *Acta Horticulturae* 386, 560-564.
- Loreti, S., Faggioli, F., Barrale, R., Barba, M., 1998. Occurrence of viroids in temperate fruit trees in Italy. *Acta Horticulturae* 472, 555-559.

- Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
- Luk, J.M., Kongmuang, U., Tsang, R.S.W., Lindberg, A.A., 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 714-718.
- MacDonald, R.J., Swift, G.H., Przybyla, A.E., Chirgwin, J.M., 1987. Isolation of RNA using guanidine salts. *Methods in Enzymology* 152, 219-227.
- MacKenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S., Green, M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81, 222-226.
- Malinowski, T., Komorowska, B., Golis, T., Zawadzka, B., 1998. Detection of apple stem pitting virus and pear vein yellows virus using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae* 472, 87-95.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S., 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research* 19, 1154.
- Menzel, W., Maiss, E., 2000. Detection of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) in cultivars of *Argyranthemum frutescens* by RT-PCR-ELISA. *Journal of Plant Diseases and Protection* 107, 548-552.
- Minoiu, N., Craciun, C., 1982. Electron microscopy detection of apple rubbery wood pathogens and cobalt-therapy of infected fruit trees. *Acta Horticulturae* 130, 313-315.
- Morris, T.J., Dodds, J.A., 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69, 854-858.
- Nakahara, K., Hataya, T., Uyeda, I., 1999. A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridization and RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 77, 47-58.

- Nassuth, A., Pollari, E., Helmecczy, K., Stewart, S., Kofalvi, S.A., 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *Journal of Virological Methods* 90, 37-49.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., 1998. PCR-detection of apple stem pitting virus from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates. *Acta Horticulturae* 472, 67-73.
- Nemeth, M. 1986. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Nicolaisen, M., Rasmussen, H.N., Husted, K., Nielsen, S.L., 2001. Reverse transcription-detection of immobilized, amplified product in a one-phase system (RT-DIAPOPS) for the detection of potato virus Y. *Plant Pathology* 50, 124-129.
- Nie X. und Singh R.P. (2000): Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 86, 179-185.
- Nultsch, W., Hrsg., 1991. Allgemeine Botanik. Vierte Auflage, Georg Thieme, Stuttgart.
- Okuda, M., Hanada, K., 2001. RT-PCR for detecting five distinct tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. *Journal of Virological Methods*, 96, 149-156.
- Osaki, H., Kudo, A., Ohtsu, Y., 1996. Japanese pear fruit dimple disease caused by apple scar skin viroid. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 62, 379-385.
- Paduch-Cichal, E., Welnicki, M., Skrzeczkowska, S., Slowinski, A., 1996. Occurrence of apple scar-skin viroids group in polish orchards. *Phytopathologica Polonica* 11, 121-126.
- Pastrik, K.H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology* 106, 155-165.
- Poggi Pollini, C., Giunchedi, L., Seemüller, E., Filippini, G., Vindimian, G., 1995. Etiological studies of apple rubbery wood disease. *Acta Horticulturae* 386, 503-505.
- Posnette, A. F., Croleley, R., Ellenberger, C. E., 1963. The effect of virus infection on the growth and crop of apple, pear, and plum trees. *Phytopathologica Mediterranea* 2, 158-161.

- Rasmussen, S.R., Rasmussen, H.B., Larsen, M.R., Hoff-Jorgensen, R., Cano, R.J., 1994. Combined polymerase chain reaction-hybridisation microplate assay used to detect bovine leukemia virus and salmonella. *Clinical Chemistry* 40, 200-205.
- Ritzler, M., Altwegg, M., 1996. Sensitivity and specificity of a commercially available enzyme-linked immunoassay for the detection of polymerase chain reaction amplified DNA. *Journal of Microbiological Methods* 27, 233-238.
- Rott, M.E., Jelkmann, W., 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaption of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Phytopathology* 107, 411-420.
- Rowhani, A., Biardi, L., Golino, D.A., 1998. Detection of viruses of woody host plants using colorimetric PCR. *Acta Horticulturae* 472, 265-271.
- Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile, L.S., Daubert, S.D., Golino, D.A., 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85, 347-352.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F. (1982): Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology* 162, 729-773.
- Schmidt, H., 1972. The effect of "latent" virus infections on the yield of maiden trees on 20 apomictic apple seedling rootstocks. *Journal of Horticultural Sciences* 47, 159-163.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin, S., Tully, J.G., Hrsg. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Erster Band, Academic Press, San Diego, 369-380.
- Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., Weidemann, H.L., 1986. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by „return-gel electrophoresis“. *Journal of Phytopathology* 115, 332-343.

Shamloul, A.M., Abdallah, N.A., Madcour, M.A., Hadidi, A., 2001. Sensitive detection of the Egyptian species of sugarcane streak virus by PCR-probe capture hybridization (PCR-ELISA) and its complete nucleotide sequence. *Journal of Virological Methods* 92, 45-54.

Shamloul, A.M., Hadidi, A., 1999. Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction-probe capture hybridization. *Journal of Virological Methods* 80, 145-155.

Sharman, M., Thomas, J.E., Dietzgen, R.G., 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *Journal of Virological Methods* 89, 75-88.

Singh, R.P., 1998. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *Journal of Virological Methods* 74, 125-138.

Skerzeczkowski, L.J., Howell, W.E., Eastwell, C.K., 2001. Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasmas by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon. *Acta Horticulturae* 550, 417-424.

Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B.C., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2988-2993.

Souza, C.H., Parish, C.L., 1992. Apple decline in Brazil. *Acta Horticulturae* 309, 241-243.

Wallace, T., Swarbrick, T., Oglivie, L., 1944. Rubbery wood in apple trees. *Grower* 22, 12.

Young, D.A., 1984. Advantages of separations on "giant" two-dimensional gels for detection of physiologically relevant changes in the expression of protein gene-products. *Clinical Chemistry* 30, 2104-2108.

Zahn, V., 1995. Nachweis und Identitätsbestimmungen von Virose bei Apfelbäumen. Dissertation, Universität Hannover.

Zahn, V., 1996. Obstvirustestung im Wandel der Zeit. *Obstbau* 21, 547-550.

Zhu, S.F., Hadidi, A., Hammond, R.W., Yang, X., Hansen, A.J., 1995. Nucleotide sequence and secondary structure of pome fruit viroids from dapple apple diseased apples, pear rusty skin diseased pears and apple scar skin symptomless pears. *Acta Horticulturae* 386, 554-557.

10 Anhang

Sequenzen

Unter den jeweiligen Bezeichnungen sind die für die Sequenzvergleiche verwendeten Sequenzen der SISPA Technik und subtraktiven Hybridisierung angegeben. Die Sequenzen sind um Vektor- und Primersequenzen bereinigt und in 5'-3' Orientierung angegeben.

SISPA 1

CGAAGTCGGGGGCGAAGACGCCGTGCACTCGGCTCACATGCACCCCCACCTTTTC
GGTGAATCTGGGCTCGATCTTCGACCTCATGGATTTTCGTGCCGGTTGAGGGCGAC
AGCGCGCCGGGCGCCGGCGACCTGCCGCAGCCGGCGGTGGAAGACGAGGAATTC
GACGAGGGTGAAGTCGCCGAGGAGGAGGGCGAAGCCTGAAGTGATCGCTGAAGC
GCCTCCGATCGCCGAGCCCCGATGACGGCGATCCAGGGGGAGACCCAGCCCAG
GAGGCCGAGGGGAATGGACAGCAACATGGCCACCGGGATCAGGGCGGGCGATCA
GTCAAGCCGGCCTGAACCTTGGGCCACTCATCCACCAGGATCGAAAAGACCACA
GTGTCGCGCACCCGACCGGTCCAAGTGACGCGATCCTGGCGCAAGATTCCATCTT
GGTGCGCCCCAGCTTGGTCATGGCCGCGCGGGCGTGGCCATCATCGAATGGCCGC
AGCGGCTGGAGGGTCGCCTGCCGGCGGATCGCTCCCTCCCCCTCGGATAGCAC

SISPA 2

GTGGACCAACTGTTCCGCTGCATCAGCGGCAGTGTCGCAGTCTCGGCTTTCGAAC
TTGAATCGCTTCCGCTTCCGTCCGTCCGAGGCGATGGGGGCGACCACCGAGGGCT
GAGCCATGAGCCAAGCCAGCGCCGCCTGAGCCGGCGAGCACCGCCAGGGCCGAC
AGGCCCTGGATAATCAGGAAGCTCGAAGACATCTGGACGTTTTCTCTTTTCGTC
AGCCTCATCGAGCGTGACGGCCTCGTCAAGTTTCTCTGGGACTGCTCGGGCCTT
CGAGGCGCTGAAGCCGCACGAGGCCGCGCCGTTTCGTGGAGGAGACCTCCAAGCT
GGCCAATCTCTACCGGCTGGAGAGCCAT

SISPA 3

GTGGCATTGACATACGCTCCCAGTTGAAGATCGCCGGTCAGACCGTATTCCAGTT
CCGAGCGATAGAGACCGAAGTCGTAGGTTCCGACCGCCTGCCGGTGGGTGACAT
CCACCTTCTGCTCGAATTCCAGCTTGCCCCTGGGCTGCAGATCGAGCGTATAGAC
CCAGCCCATGACGCCCTCGCCCGCATGGGCCGAAGGCAGGCACGTACAGGTGGC
GCAGGCGAGCACTGCCAACAGCCGACGGACCGGCCACTCCCTTTTCTTCTCATG

AAGACTCCCTTTTTGTATGGTTTTGGAGGACTCAAATGCGACTATATCTCATTTCGC
ATCTTAGAGATCCACCATGCCATGTCGCCATGCGGGCGCCGA ACTCCACCGGCATC
CGCAGTCCTGCTTTGTCCCCGCGGGGAACGGTCGCTCGCCGACTATGGGAAAATC
CGGCCCTCTCCACGTCCGGCGCACCCCTGCACGCCCGACCGGCCTTCTCTGCGAAA
CCAATGTCCG

SISPA 4

ACCGTTGATTTCGCACAATTGGTCATCGCGCTTGGTTGAAAAGCCAGTGGCGCGAA
GCTACCGTGCGCTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCAGAATCCGGGCTAGAA
GCGACGCGTGCGCCCCGCCGCCCGATTGCCGACCTGCAGTAGGGGCCTCGCCCCC
AAAGGCTCGTGTCTGTTGGTCAGGCCGTCGCGGGCGGACCAGCCGCGCCGGCCGCCT
TGAATCGTAATTCCCACCGAGCGGGCGGGTAGAATCCTTTGC

11/1

CACTAGTGATTTTCGAGCGGGCGCCCGGGCAGGTACATGAGCTGTCTTGAGGCAGCT
TCTAGGTCTCCACATTCGTTGCACGTTGTCTACATTAATACTTCTCTAGAAACAAA
AGCATATGCTCATGAGGTTGTGCCAACAATTACGTGCACATCTTCAAATGTTGTC
CAAACCATTTTGCAGGCTTTTGTTC AAGTGCCAGATACAAACATATGGTACCTCG
GCCGCGACCACGCTAATCGAATTCCC GCGG

13/1

ACCTTCTCTACCACATCATTGCACTGCTGTAGATTTGAATGGACATTGACAACGG
ACCCGAAGTGTTACATAGAAAGGTCTCATGGCACTACATTGTTTCAGTTCCC ACTT
CTCTTCTCTTCC TAGTAATCCAGGAACCTTTTCTGCGACATTATGGACATCCAGCC
AGAAAACCCAACAGCTCGAGGCAACATTCCAATCAGACGCCGGTTCCATGGATTT
GGCGAGAACCATTGTTTCGTAATTTTCGTCATCAGCATCTGTCTTCTTCAATTCCTT
GCTCTTCATTTT GCGACATTAATCAGTTGTAGCTTTTTTGGCCGCTTGACTTATGATT
CATCTTGCTTTATATATAGATTATTTGTATTTTGAAGAACA CTAGAAGAACATCTT
CTGCAGTATCCGAATGTGATGAAACTCAAAGCAGTCCTCTGTCAGCTGTGCAAG
ATGGAGGAGAGAATCCGTGAGCCTGTTATTAGCAAAGCTGATACAACAAGCCA
TTACATAGGAGCTCAACCAGAATTGCTTTGGAGATGGTTTTTTCTGCTCAAGAA
ACTTTTAGTTCCGCTTCAAATCTTTTTCATGACGAGGTTCTAATTCCTTGAAATTT
CCGACGAGCCGTGCGAACAGAGATGAGAGGGGTTCAACCTCTGCCCTGGCAACC

AGGATAAGAACATTTGGATGCTTTCAAGTTTTGAGCACTTGAGAATCCATC AGAC
GCTCATTTTTGGTGGAGCAGAAGACTTTGCATATCCAGCTCTACACGACGTTGA

14/1

CTACTACGGCACAGTGAATTGTAGTACCACTCACTATAGGGCCGAGTTGGGCCCCG
ACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGCGTGGTTCG
CGGCCGAGGTACATCTCCTCCACCATTGGCTTCCACAGCCGGACACGAGCGTTTA
TAAACCAATTGGAAACCTGACTCCTAGTGAGTCCAGTTTTGTTTTGCAAGCATGTG
CTTATCTGAATCCTTCGGATATGGGTGGAGGAAGTGTTCTGAAGAGCCAAGCGCGA
AGAACAGAAACAGATCTTTCTGGCAATCCTCTTTGTGGTCTCCAAGCATTGTGCT
GGACCATTCCCAACTGTTGGAGAGCCCTTTGCTGCCTCAGCTGATGGTCAACATA
TTTGAGCCTTGAGCCTTCAATCTTACCTCCAACGCTATCTTCTTCTCCAAGCTCTT
GTTGGCGGATCGAATTTGGTTCGTTATGGCGTCCTTCAGGCACCTGAATTGCTTTG
AGATTGTTTGCAGTGCCAGAGCAGTGTATGTTCTTGCTGAGCCAATTCCAGCTGCT
TGCTCAAATGATGAAATCACCATTTGCATCTGCCGGCGGTATTGCCTGTATCTTTG
GTCCACCTCATCAAGCATGTTGATTAGCTTCCCCTTCTTCATCTGAATTTCTGCCT
CTCAGCAGTGCTCAACTCAGCCGCACGCTTTCTACTCCCTTCACGCCTACTGAACC
GTCTCTGGCCTCCGCCATCGAGGACCCAGCTGCCGCTTACTCTGCTGCCCATAC
CCTTTCTTTGGCAACTCAGTCCTCATCCCATTCCCGACGTTCCCAACTCATCGAGC
AGCTCCTGCGCCGCTTCAAGT

15/1

ACAGCATTCTCTGGACTGACTCTCAGATCATCTTTTATGTTGACAATGTTCCCATT
AGAGAGTTCAAGAAAACAGAGTCGATGGATGGTGACTTCCCTGCTAAGCCGATG
TCATTGTATGCCACAATATGGGATGGATCTGATTGGGCTACCAATGGTGGCAAAT
ACCGAGTGAATTACAAGT

16/1

AGCGTGGTTGCGGCCGAGGTACCATTATTGGACTAATTCATTCTTTATCTGAAAG
AGTCGTTCTAACTCTAACTATATATTTTAAAACAATTATGGATATATTAATTAAT
GGATTTTCAATCCAAATTAAGACGCGTTTCTTACCAACCAATCAATAGTTGGTATT
TGTAGTTATTGACCAAACAACACGAAAGAAACCTAAATTCCTTCTATATTAGTTA
TTAGTAAAGTAATTATAAATTATTCGTTAATAAGAGATTTACTTATTTATTTGAGG
CGAATT

13/2

ACACAACGAGATTCTGGGTCCAATCAAACATCTACACAGGCAGCTGCTGCTCATG
TGAATGACATTATTCTTGCTAGATCATTGTTACATGCTCGTGACATACTGCTTGAA
AAACTGCAGAACTTATCAAGGCTATTGACCAAGCTATTGATTTGACTGATTTTA
TATCTAAAATACGACGACGCATAAGTTTCGATTTCCCTGCTAGAAAATTGGGGTGCA
GCATATGACAAAGTTTCAGGACAAGGCAAGCCACTGAAATGGTCTTGAGAAATT
AAATGGCACATCGAACCTTTGGTAAGCGGTGAGTTGGGACTTTTTTCCATCTGCG
TCCGTTGTGAACATCTGGTTCGGCCCCATAAGCGACCATACCATGGAGATGGAGC
GTCCACTGATCGGCTAGCTTTTGGATGCTAGTTCGAAGCCGGTGAGTGATAACTG
AGGTTTTTGGTCACCGGATAAGGTTCCCTGGCCAGACAGTGTTGGGGCAGTTGTTT
GTGAAAGTGATTTTCGCTGCATGTGCACCTGAGAAGAAGACGATGGCCAAGTGA
CGCCCAAGAGGGAAGCTACTTGGCTCTTCATCATCGACATTGAATATGTCTTAAT
TGCTGGTTGCTGCTAATTAACTTACTTCTGATTTGATCCCGCGT

Danksagung

Dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft möchten wir für die Bereitstellung der Forschungsmittel zur Durchführung dieses Projekts ganz besonders danken.

Unser Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. M. Poehling für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der Universität Hannover.

Außerdem danken wir Herrn Dr. W. Jelkmann für die Bereitstellung von einem umfangreichen Virusisolatspektrum für die Entwicklung des Nachweisverfahrens, Herrn Dr. V. Zahn für die Durchführung der Indikatorrestung und die Bereitstellung des Pflanzenmaterials für die Paralleltestung, Herrn Dr. E. Seemüller für die Unterstützung bei der Auswahl geeigneter Primer für den Phytoplasmanachweis, Herrn Dr. E. Lesemann und Dr. H.J. Vetten für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie, Herrn Dr. Kruse für die Durchführung der Viroidtestung mittels R-PAGE, Frau Dr. K. Wydra für die Bestimmung des isolierten Bakteriums und Frau Dr. F. Krajinski für die Unterstützung und Beratung bei der cDNA Subtraktion.

Ebenso gilt unser Dank der gesamten Arbeitsgruppe "Molekulare Phytopathologie und Virologie" für die tägliche Unterstützung im Labor.