
Sektion 24

Diagnose- und Nachweisverfahren

24-1 - Agroinfiltration des p3- und p4-Proteins des *European mountain ash ringspot-associated virus* zur Lokalisation viraler Proteine in Pflanzen

Agroinfiltration of p3 and p4 protein of European mountain ash ringspot-associated virus for localization of virus proteins in plants

Jenny Robel, Hans-Peter Mühlbach², Susanne von Bargaen, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin; Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland
phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

²Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek; Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg, Deutschland

Das in Nord- und Mitteleuropa weit verbreitete *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) (Büttner et al. 2013) konnte 2005 mit der Ringfleckigkeit der Eberesche assoziiert werden (Benthack et al. 2005), wenig später wurde das gesamte Genom charakterisiert (Mielke und Mühlbach 2007). Jede RNA des viergeteilten ss(-)RNA-Genoms kodiert für ein Protein. Durch Sequenzvergleiche gelang die Zuweisung der möglichen Funktionen der Proteine, die von den ersten drei RNAs kodiert werden. Die RNA4 kodiert für ein Protein (p4, 233 aa), das keine Sequenzähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen aufweist.

Da die Expression eines Transportproteins für phytopathogene Viren essentiell ist, um eine systemische Ausbreitung in der Wirtspflanze zu gewährleisten (Seron und Haenni 1996), wird vermutet, dass es sich beim p4-Protein des EMARaV um ein Transport-Protein handelt. Bei anderen Emaraviren wurden bereits Hinweise auf ein Transportprotein gefunden und erste funktionale Studien durchgeführt (Ishikawa et al. 2013; McGavin et al. 2012). Diese Proteine unterscheiden sich in Größe und Sequenz grundlegend vom p4 des EMARaV (Yu et al. 2013). Zur Überprüfung der Hypothese, ob das p4-Protein von EMARaV am Transport des Virus beteiligt ist, wurden GFP-Fusionskonstrukte erzeugt. Neben dem p3- und p4-Protein von EMARaV wurde das Transportprotein (NSm) des *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) kloniert und vergleichend analysiert. Mittels Agroinfiltration wurden die GFP-fusionierten viralen Proteine in Biotestpflanzen eingebracht und dort lokalisiert. Erste Ergebnisse zur Agroinfiltration der viralen Proteine werden vorgestellt und diskutiert.

Literatur

- W. BENTHACK, N. MIELKE, C. BÜTTNER, H.-P. MÜHLBACH, 2005: Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Arch. Virol.* **150** (1), 37-52.
- C. BÜTTNER, S. VON BARGAEN, M. BANDTE, H.-P. MÜHLBACH: Forest diseases caused by viruses. In: *Infectious forest diseases*. Gonthier, P. und G. Nicolotti, Oxfordshire, CABI, 50-75 S.
- K. Ishikawa, K. Maejima, K. Komatsu, O. Netsu, T. Keima, T. Shiraiishi, Y. Okano, M. Hashimoto, Y. Yamaji, S. Namba, 2013: Fig mosaic emaravirus p4 protein is involved in cell-to-cell movement. *J. Gen. Virol.* **94** (3), 682-686.
- W. J. MCGAVIN, C. MITCHELL, P. J. COCK, K. M. WRIGHT, S. A. MACFARLANE, 2012: Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus Emaravirus, encodes a novel genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **93** (2), 430-437.
- N. MIELKE, H.-P. MÜHLBACH, 2007: A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *J. Gen. Virol.* **88** (4), 1337-1346.
- K. SERON, A. L. HAENNI, 1996: Vascular movement of plant viruses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **9** (6), 435-442.
- C. Yu, D. G. Karlin, Y. Lu, K. Wright, J. Chen, S. MacFarlane, 2013: Experimental and bioinformatic evidence that raspberry leaf blotch emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *J. Gen. Virol.* **94** (9), 2117-2128.

24-2 - Detektion des Tabakmosaikvirus mit Antikörper-Mimics aus Phagen Bibliotheken

Detection of tobacco mosaic virus with antibody mimics derived from a phage library

Dominik Klinkenbuss, Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, Deutschland, - Kompetenznetz WeGa

Für den Nachweis von Phytopathogenen werden weltweit routinemäßig serologische Methoden wie z.B. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) eingesetzt. Neben diversen Vorteilen (u.a. Robustheit, relativ einfache Handhabung, Eignung für Massentests) hängen serologische Verfahren jedoch von begrenzten Ressourcen ab, da die benötigten Antikörper produziert und validiert werden müssen. Das Ziel dieser Studie war die Verringerung dieser Nachteile durch die Verwendung sogenannter antibody mimics. Diese stammen aus einer Phagen Bibliothek und sind, ähnlich wie Antikörper, gegen spezifische Zielmoleküle gerichtet. Die Bibliothek beinhaltet dabei Millionen unterschiedlicher Phagen mit einzigartigen artifiziellen Fusionsproteinen und wird in einem sogenannten Biopanning verwendet. Dabei werden Kombinationen aus Phage und Fusionsprotein gesucht, die eine hohe Bindungsaffinität zum Zielmolekül aufweisen (Smith 1985).

In dieser Arbeit wurden die kommerziell erhältlichen Phagen-Bibliotheken Ph.D.TM-12 und Ph.D.TM-C7C (New England Biolabs GmbH) in Panningrunden gegen das Tabakmosaikvirus (TMV) eingesetzt. Dieses phytopathogene Virus kann über 200 Pflanzenspezies infizieren (Scholthof 2004) und dabei zu stark ausgeprägten Symptomen bis hin zum Absterben der Wirtspflanzen führen. Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass Phagen mit Virusproteinen eine Protein-Protein Bindung eingehen können (z.B. Bai *et al.*, 2002, Heng *et al.* 2007).

In diesem Projekt konnten im Folgenden konservierte Sequenzen artifizierlicher Fusionsproteine von Phagen bestimmt werden, die positive Ergebnisse im ELISA mit TMV ergaben, während Phagen ohne die spezifischen Aminosäuremotive (Peptide) keinen Nachweis ermöglichten.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auf Phagen basierende „antibody mimics“ möglicherweise nützliche Werkzeuge für die Vereinfachung und Verbesserung von ELISAs beim Nachweis von Phytopathogenen sind.

Diese Studie läuft innerhalb des WeGa Kompetenznetzes und wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert.

Literatur

Bai, F. W., H. W. Zhang, J. Yan, Z. C. Qu, J. Xu, J. G. Wen, M. M. Ye, D. L. Shen, 2002: Selection of phage-display peptides that bind specifically to the outer coat protein of Rice black streaked dwarf virus. *Acta Virol* **46** (2), 85–90.

Heng, C. K., S. M. Noor, T. S. Yee, R. Y. Othman, 2007: Biopanning for banana streak virus binding peptide by Phage display peptide library. *J Biol Sci.* **7** (8), 1382–1387.

Scholthof, K. B. 2004: Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 13-34.

Smith, G. P. 1985: Filamentous Fusion Phage - Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **228** (4705), 1315-1317.

24-3 - Molekularbiologischer Assay zur schnellen Quantifizierung von *Rhizoctonia solani* AG2-2

Molecular assay for rapid quantification of Rhizoctonia solani AG2-2

Anne-Catherine Renner, Barbara Boine, Jan Nechwatal, Rudolf Apfelbeck², Michael Zellner

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz (IPS3c), 85354 Freising, Deutschland

²Arbeitsgemeinschaft zur Förderung des Zuckerrübenanbaues, ARGE Regensburg, 93092 Barbing, Deutschland

Rhizoctonia solani AG2-2 ist der Erreger der Späten Rübenfäule, er verursacht weltweit beträchtliche Schäden an Zuckerrüben (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*). Ein hohes Bodeninokulumpotential

von *R. solani* ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung der Wurzelfäule an Zuckerrüben. *R. solani* ist ein bodenbürtiges Pathogen und die Quantifizierung des *R. solani*-Inokulumpotentials eines Bodens ist schwierig. Bis heute existiert noch kein Monitoringsystem das routinemäßig für die Messung von *R. solani*-Bodenkonzentrationen eingesetzt wird. Um den Einfluss von verschiedenen ackerbaulichen Maßnahmen auf das *R. solani*-Inokulumpotential zu untersuchen, wurde innerhalb dieses Forschungsprojektes ein spezifischer molekularbiologischer Assay zur Erregerquantifizierung im Boden entwickelt. Der Assay basiert auf der Kombination eines Köderverfahrens mit Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Samen und der anschließenden Quantifizierung von *R. solani* AG2-2 mittels Real-Time PCR (qPCR) (Quinoa-qPCR-Assay). Entnommene Feldbodenproben werden zuerst gesiebt und anschließend in 300 g-Teilproben portioniert. Anschließend werden Quinoa-Samen auf dem zu analysierenden Boden ausgelegt um dort das aktiv wachsende Myzel von *R. solani* zu ködern. Die Inkubationszeit beträgt 5 Tage, danach wird DNA aus den Quinoa Samen extrahiert um im Anschluss mittels qPCR *R. solani* AG2-2 zu quantifizieren. Um die Anzahl an Sklerotien im Boden mit dem Quinoa-qPCR-Assay abzuschätzen, wurde eine Standardkurve mit bekannten *R. solani* Mengen erstellt. Zur Inokulation wurden *R. solani*-infizierte Mohnsamen, die in Größe und Form vergleichbar mit typischen Sklerotien von *R. solani* sind, verwendet. Wobei ein mit *R. solani* bewachsener Mohnsamen einem Sklerotium bzw. einer Infektionseinheit (IE) entspricht. Der Quinoa-qPCR-Assay war sehr sensitiv (1 IE in 1 kg Erde) und schnell (7 Tage). Eine Mischprobe von 300 g Erde war für eine Standard-Bodenbeprobung am kosten- und zeiteffektivsten. Je nach Ausstattung können bis zu 100 Bodenproben gleichzeitig analysiert werden. Erste Ergebnisse werden vorgestellt.

Literatur

BUDGE, G. E., M. W. SHAW, A. COLYER, S. PIETRAVALLE, N. BOONHAM, 2004: Molecular tools to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. *Plant Pathol.*, **58**, 1071–1080.

24-4 - Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in der Virusdiagnose

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for virus diagnosis

Heiko Ziebell

Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kann zur isothermalen Amplifikation von Nukleinsäuren genutzt werden. Gegenüber herkömmlichen PCR-Methoden weist LAMP einige Vorteile auf: Die Amplifikation bei konstanter Temperatur kann so z. B. auch in Wasserbädern oder Inkubatoren durchgeführt werden. Die besonderen Eigenschaften der genutzten Primer sowie der Polymerase erlauben eine schnellere Amplifikation der Zielregion im Vergleich zur (RT)-PCR, so dass positive Ergebnisse bereits nach 15 Minuten erzielt werden können; ein Extraschritt für die reverse Transkription von RNA entfällt. Zur Auswertung stehen verschiedene Methoden (Gelelektrophorese, Trübungsreaktionen, Farbumschlag, Fluoreszenzmessung) zur Verfügung. Zur Diagnose von Pflanzenviren mit RNA- oder DNA-Genom wurden verschiedene LAMP-Protokolle erfolgreich entwickelt.

24-5 - Beschreibung des Mikroorganismenspektrums von gelagerten Zuckerrüben in Abhängigkeit von Genotyp, Umwelt und Lagerungstemperatur

Microorganism spectrum of stored sugar beets in relation to genotype, environment and storage temperature

Sebastian Liebe, Mark Varrelmann

Institut für Zuckerrübenforschung, Abteilung Phytomedizin, Holtenser Landstr. 77, 37077 Göttingen, Deutschland

Zuckerrüben können während der Lagerung von verschiedenen bakteriellen und pilzlichen Fäulniserregern befallen werden, die erhebliche Zuckerverluste verursachen und die Verarbeitungsqualität in der Zuckerfabrik verschlechtern. Faktoren, die ihr Auftreten begünstigen, wurden bisher nicht identifiziert. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit das Auftreten der wichtigsten Fäulniserreger in Abhängigkeit von Genotyp, Umwelt und Lagerungstemperatur zu untersuchen.

Für den Erregernachweis wurde ein "Microarray" (ALERE Technologies, Jena Germany) etabliert mit dessen Hilfe 33 Mikroorganismenarten nachgewiesen werden können. Zu den Zielorganismen gehören Pflanzenpathogene (z.B. *Rhizoctonia solani*), Wundpathogene (z.B. *Fusarium* spp.), Saprophyten (z.B. *Aspergillus* spp.) und Bakterien (z.B. *Leuconostoc mesenteroides*). Um das Auftreten dieser Organismen zu untersuchen wurden drei Zuckerrüben genotypen in zwei Umwelten angebaut und nach der Ernte für 12 Wochen bei 8°C und 20°C im Klimacontainer gelagert. Am Ende der Lagerung wurde der Anteil verfallener Fläche im Längsschnitt bestimmt und der "Microarray" basierte Erregernachweis durchgeführt.

Sowohl durch die Bonitur als auch mittels Erregernachweis konnte eine starke Besiedlung von Zuckerrüben mit Fäulniserregern während der Lagerung nachgewiesen werden. Am häufigsten konnten Vertreter aus den Gattungen *Botrytis*, *Fusarium* und *Penicillium* detektiert werden. Obwohl in Abhängigkeit von Genotyp, und Umwelt signifikante Unterschiede im Ausprägungsgrad der Lagerfäulen vorhanden waren, ließen sich mittels "Microarray" kaum Unterschiede im nachweisbaren Mikroorganismenspektrum feststellen.

24-6 - Symptome der Gelben Welke an Feldsalat (*Valerianella locusta*): Mögliche Ursachen und Bekämpfungsstrategien

Symptoms of vascular wilt in lamb's lettuce: possible causes and control strategies

Katharina Piel, Jana Zinkernagel, Annette Reineke

Hochschule Geisenheim University

Seit einigen Jahren stellt das Auftreten der „Gelben Welke“ ein großes Problem im Feldsalatanbau dar. Die Pflanzen entwickeln sich zunächst normal, aber ungefähr zwei Wochen nach der Pflanzung sind erste gravierende Wurzelreduktionen gefolgt von typischen Welkesymptomen wie gelben, chlorotischen und schlaffen Blättern zu beobachten. Die Vergilbungen breiten sich ausgehend von den äußeren, älteren Blättern weiter zu den inneren, jüngeren Blättern aus. Am Ende der Kultivierung sind die Pflanzen in Folge der Wurzelreduktionen und der verringerten Photosynthese erheblich kleiner.



Abb. 1 Symptome der Gelben Welke an Feldsalat (Foto. W. Schönbach)

In Gewächshäusern wurde eine zunehmende Ausbreitung der Symptomatik im Laufe mehrerer Jahre beobachtet. Bisher konnten Faktoren wie Presstopffestigkeit, unzureichende Wasserversorgung, Salzstress oder Einflüsse der Vorfrucht Tomate nicht als Auslöser bestätigt werden. Erste Biotests haben ergeben, dass der das Symptom auslösende Faktor im Boden lokalisiert und auch mit diesem übertragbar ist, und daher biotischen Ursprungs sein muss. Mittels 454-Pyrosequenzierung wurde die mikrobielle Zönose in Böden mit symptomatischen und asymptomatischen Pflanzen sowie in deren Rhizosphäre untersucht, wodurch aber bislang kein Erreger eindeutig identifiziert werden konnte. Im Zuge einer Analyse des Vorkommens von Nematoden wurden in Bodenproben aus Gewächshäusern keine pflanzenpathogenen Nematoden gefunden, womit Nematoden als Verursacher der Gelben Welke an Feldsalat ausgeschlossen werden können. Mit Hilfe von Biotests wurde nachgewiesen, dass bestimmte Oomyzeten (*Pythium* spp., *Phytophthora* spp. o. a.) ebenfalls nicht für die Symptomatik verantwortlich gemacht werden können. Eine Analyse von Blättern asymptomatischer und symptomatischer Feldsalatpflanzen mittels ELISA auf virale Infektionen führte zu keinem positiven Nachweis. Eine Analyse des Metaboloms von symptominduzierendem Boden zeigte Veränderungen in der Zusammensetzung vorhandener Metabolite im Vergleich zu symptomfreiem Boden. Zudem werden aktuell weitere Versuche zu möglichen praxisrelevanten Bekämpfungsstrategien durchgeführt, so wird z. B. der Einfluss von Fonganiil (Wirkstoff: Metalaxyl-M) oder FZB24® (*Bacillus amyloliquefaciens*) auf die Symptomatik untersucht.

24-7 - Q-bank – Ein umfassendes Informationssystem für regulierte Pflanzenviren und ihre Verfügbarkeit in Sammlungen

Q-bank – A comprehensive information system for regulated plant viruses and their availability in collections

Wulf Menzel, Stephan Winter

Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Q-bank ist ein umfassendes Informationsportal (www.q-bank.eu) für in der EU regulierte Schaderreger und Schadorganismen an Pflanzen. Der Q-bank Inhalt wird fortlaufend durch die Kuratoren der einzelnen Bereiche überprüft und erweitert. Q-bank verbindet Informationen zu Organismen - Sequenzdaten, Nachweismethoden, Symptombilder, biologische Eigenschaften - mit den in Sammlungen vorgehaltenen Isolaten. Die Pflanzenvirussammlung der DSMZ, die in Europa/weltweit bedeutendste Virussammlung, nimmt in Q-bank eine zentrale Stellung ein, weil eine große Zahl umfassend charakterisierter und authentifizierter Referenzisolate vorhanden ist und

erprobte Protokolle und Standardverfahren zur Authentifizierung und Konservierung der Isolate verfügbar sind.

Derzeit wird in zwei EU Projekten, Viruscollect (Euphresco) und Q-collect (FP7) am weiteren Ausbau des Datenbestandes, der Verfügbarkeit von Referenzisolaten und der Definition von Mindestanforderungen an Daten und Referenzmaterial gearbeitet. Q-bank und die Projekte werden am Beispiel Pflanzenviren vorgestellt.