

gleiche 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. Es wird vermutet, dass es sich bei diesem Protein um ein Transport-Protein handelt, das an der systemischen Ausbreitung in der Pflanze bzw. bei der Übertragung durch die als Vektor vermutete Gallmilbe *Phytoptus pyri* beteiligt sein könnte.

Bisher wurde die Variabilität des Nucleocapsid (NC)-kodierenden Genombereichs (RNA3) von EMARaV-Varianten verschiedener Standorte in Finnland und Russland untersucht und eine hohe Konservierung des Nucleocapsids (97 - 99 %) gezeigt (Kallinen et al., 2009, Valkonen und Rännäli 2010). Analog dazu wird die Variabilität des p4 untersucht und mit den bisherigen Ergebnissen diskutiert.

In den Jahren 2010 und 2011 wurden Proben von Ebereschen verschiedener europäischer Standorte mit charakteristischen Symptomen entnommen und die RNA3 sowie die p4-kodierende Genomregion mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA amplifiziert. Die generierten Produkte von insgesamt achtzehn Ebereschen wurden im Anschluss sequenziert und die Variabilität des Nicht-Strukturproteins p4 mit der Variabilität des NC-Proteins von EMARaV auf Nucleotid- und Aminosäureebene verglichen.

#### Literatur

- BENTHACK, W., MIELKE, N., BÜTTNER, C., MÜHLBACH, H.-P., 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* 150:37-52.
- KALLINEN, A. K., LINDBERG, I. L., TUGUME, A. K., VALKONEN, J. P. T., 2008: Detection, Distribution, and Genetic Variability of *European mountain ash ringspot-associated virus*. *Phytopathology* 99, 344-352.
- MIELKE, N., MUEHLBACH, H.-P., 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, 1337-1346.
- VALKONEN, J. P. T., RÄNNÄLI, M., 2010: First Report of *European mountain ash ringspot-associated virus* in *Sorbus aucuparia* from Eastern Karelia, Russia. *Disease Notes* 94 (7), 921.

### 33-3 - Nutz, S.; Rabenstein, F.; Kühne, T.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

## Entwicklung einer immunologischen Nachweismethode für Kartoffelviren mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz

*Development of an immuno-based detection method for potato viruses via Surface Plasmon Resonance*

Der Nachweis von Viren in Pflanzkartoffeln mittels ELISA (Enzyme-linked Immunoassay) ist das immunologische Standardverfahren im Zertifizierungsprozess. Allerdings kann mit einem ELISA immer nur ein Pathogen pro Reaktion nachgewiesen werden. Zudem ist dieser Nachweis zeitaufwändig, da mehrstündige Einwirkzeiten der Antikörper- und Blockierungslösungen sowie die Inkubation der zu untersuchenden Probe über Nacht in den meisten Protokollen vorgesehen sind.

Eine alternative Methode, die spezifische Bindung von Viruspartikeln an homologe Antikörper zu detektieren, stellt die Oberflächen-Plasmonenresonanz (SPR)-Technologie dar. Dabei werden die spezifischen Antikörper an eine Goldfläche auf einem Chip gebunden. Wird virushaltiger Pflanzensaft über diesen Chip gespült, werden die Viruspartikel von den Antikörpern gebunden: hierdurch erhöht sich die Schichtdicke auf der Goldfläche, zudem kommt es dort zu einer Änderung des Brechungsindex. Während einer Messung mit einem SPR-Spektrometer wird gerichtetes Licht in einem bestimmten Winkel von unten auf die Goldfläche gestrahlt. Dadurch kommt es zur Anregung freier Elektronen an der Oberfläche des Metallionengitters, welche kollektiv zu schwingen beginnen. Diese Schwingungen werden als Oberflächenplasmonen bezeichnet. Die Frequenz dieser Schwingungen wird vom Brechungsindex und von der Schichtdicke der auf der Oberfläche der Metallfläche gebundenen Substanz beeinflusst. Änderungen der Schwingungsfrequenz, beispielweise durch Anbindung eines Viruspartikels an den homologen Antikörper auf der Metalloberfläche, können mit einem SPR-Spektrometer gemessen werden. So wird ein immunologischer Virusnachweis möglich, bei dem die Herstellung markierter Antikörper entfällt. Durch den direkten Nachweis der Bindung des Antigens an den Antikörper ist ein Nachweis innerhalb von 1 bis 2 h möglich, da die Inkubations- und Reaktionsschritte entfallen, die beim ELISA nötig sind.

Bei Verwendung von Mehrkanal-Flusszellen können parallel verschiedene Antikörper auf einem Chip immobilisiert werden. Dadurch wird der simultane Nachweis mehrerer Pathogene, so z. B. von verschiedenen Kartoffelviren in einer Probe möglich.

Nach Etablierung eines entsprechenden Regenerierungsverfahrens bestünde zudem die Möglichkeit, einen Chip mehrfach zu nutzen.

In dem vorgestellten Assay wurde mittels Protein A die Goldfläche des SPR-Chips mit homologem polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen das *Potato virus X* (PVX) funktionalisiert und Presssaft von PVX- infizierten Pflanzen mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 µl/s über den Chip gespült. Ein deutliches Signal war auf den Flächen messbar, welche mit homologem Antikörper funktionalisiert worden waren. Auf den Referenzflächen, auf welchen heterologe Antikörper immobilisiert wurden, konnte keine oder nur eine geringe Signalerhöhung gemessen werden. Die Empfindlichkeit des Nachweises konnte durch den Einsatz eines sekundären Antikörpers noch erhöht werden. Hierbei wurde zunächst der virushaltige Pflanzen- Presssaft über den Chip gespült. Anschließend wurde ein weiterer spezifischer Antikörper über den Chip gespült, der seinerseits an die gebundenen Viruspartikel bindet. Dadurch konnte die Schichtdicke weiter erhöht und so die Empfindlichkeit gesteigert werden. Am Beispiel des PVX wurde so ein Nachweissystem optimiert, mit dem das Virus in Presssaft infizierter Pflanzen innerhalb 2 h nachgewiesen werden kann.

### **33-4 - Pastrik, K.-H.<sup>1)</sup>; Steinbach, P.<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup> Landwirtschaftskammer Niedersachsen

<sup>2)</sup> Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

## **Nachweisverfahren in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten der Kartoffel, Teil 1: Entwicklung und Validierung der qPCR als Knollentest**

Detection methods in post harvest official testing of seed potatoes for viral diseases, Part 1: Development and validation of a qPCR-method for tubertesting.

In der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten bei Pflanzkartoffeln wird gegenwärtig der ELISA-Test als Standardverfahren angewendet. Dabei wird ein Nachweis aus dem Blatt von Augenstecklingen bzw. aus Knollenkeimen geführt, da die zu testenden Viren zunächst angereichert werden müssen. Ein sicherer Nachweis der Viren direkt aus den Kartoffelknollen ist aufgrund der zu geringen Nachweisempfindlichkeit des ELISA-Tests nicht möglich. Die Prüfungsdauer je Kartoffelprobe (100 Knollen) beträgt bei diesem Verfahren ca. 6 bis 7 Wochen. Um die Konkurrenzfähigkeit der deutschen Pflanzgutproduktion zu gewährleisten, ist eine Verkürzung der Testdauer bei Export-Proben anzustreben.

Durch die Anwendung sensitiverer Nachweismethoden wie z. B. der quantitativen PCR (qPCR) kann eine Verkürzung der Testdauer erreicht werden. Im Pflanzenschutzamt Hannover wurde in Zusammenarbeit mit der Virusprüfung-Gülsow (LALLF, Mecklenburg/Vorpommern) ein qPCR-Test entwickelt, der die Untersuchung auf die wesentlichen Kartoffelviren PVY, PLRV und PVS direkt aus der Kartoffelknolle umfasst. Im Unterschied zum ELISA-Standardverfahren wird beim qPCR-Test die Kartoffelprobe in Probenpools zu 10 x 10 Knollen untersucht. Der qPCR-Test umfasst zwei unterschiedliche Multiplex-qPCR-Untersuchungen. In der einen Multiplex-Reaktion wird auf die Viren PVY und PLRV getestet, in der anderen erfolgt ein Nachweis von PVS bei gleichzeitiger Amplifikation einer internen PCR-Kontrolle (Cox).

In Pilotuntersuchungen wurde die Richtigkeit der qPCR-Ergebnisse validiert. Dazu wurden 26 Routine-Kartoffelproben aus der Beschaffenheitsprüfung von Pflanzkartoffeln sowohl mit dem ELISA-Standardverfahren als auch mit dem entwickelten qPCR-Test untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte eine hohe Übereinstimmung beider Verfahren trotz der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte. Weiterhin konnte durch den Einsatz der qPCR eine starke Verkürzung der Testdauer erreicht werden.

### **33-5 - Steinbach, P.<sup>1)</sup>; Pastrik, K.-H.<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup> Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

<sup>2)</sup> Landwirtschaftskammer Niedersachsen

## **Nachweisverfahren in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten der Kartoffel, Teil 2: Vergleichsuntersuchungen zu ELISA-Standardverfahren und q-PCR**

Detection methods in post harvest official testing of seed potatoes for viral diseases

Part 2: Comparison study for ELISA methods and qPCR

Gemäß Pflanzkartoffelverordnung (PflKartV) wird in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten als Bestandteil des Anerkennungsverfahrens von Pflanzkartoffeln der Besatz mit den Kartoffelviren PLRV, PVY, PVA, PVM, PVX und PVS ermittelt. Das erfolgt bundesweit einheitlich mittels Labortestung im ELISA-Verfahren (Standardverfahren) an Augenstecklingspflanzen bzw. vereinzelt an Knollenkeimen (Ausnahme: Z-Pflanzgut kann durch visuelle Symptomfeststellung zertifiziert werden). Infolge der Anzucht von Augenstecklingspflanzen