

35-2 - Zahn, V.

Landwirtschaftskammer Niedersachsen

Nachweismöglichkeiten von *Tobacco rattle virus* in der Routinetestung

Detection of *Tobacco rattle virus* in routine testing

Das *Tobacco rattle virus* (TRV) ruft in der Kartoffelproduktion in Deutschland starke Schäden hervor. Neben Nekrosen im Knollenfleisch von Kartoffeln, der sog. Eisenfleckigkeit oder Pflöpfenkrankheit kommt es bei Pflanzkartoffeln auch zu einer verminderten Keimfähigkeit. Über den Einfluss auf die Entwicklung einer infizierten Staude liegen nur sehr wenige Ergebnisse vor. Die aus einer infizierten Mutterknolle gebildeten Tochterknollen sind nicht alle mit TRV infiziert. Erschwerend kommt hinzu, dass die Knollennekrosen vielfach erst während der Lagerung auftreten und dann beim Auslagern und der Sortierung entdeckt werden. Virussympptome an den Pflanzen im Feld sind sehr selten und auch nicht eindeutig anzusprechen, so dass eine Selektion infizierter Stauden ausgesprochen schwer ist. Hauptüberträger dieses Virus sind freilebende Nematoden der Gattungen *Trichodorus* und *Paratrichodorus*, die sich entweder an infizierten Knollen oder an den über 300 anderen Wirtspflanzen beladen und über Wochen infektiös bleiben. Eine Kontakt- oder Blattlausübertragung von kranken zu gesunden Pflanzen konnte in einem Versuch ausgeschlossen werden.

Das Virus selbst hat ein zweigeteiltes Genom und kann in zwei Typen auftreten. Der sog. M-Typ mit einer Proteinhülle und der sog. NM-Typ, der nicht in der Lage ist eine Proteinhülle auszubilden. Serologisch ist der NM-Typ aufgrund des Fehlens einer Proteinhülle nicht nachweisbar.

Für den Kartoffelanbauer stellen sich im Zusammenhang mit dem TRV nun zwei Fragen:

- Sind meine Kartoffeln, in denen ich Nekrosen gefunden habe, wirklich mit TRV infiziert oder handelt es sich um eine physiologische Störung?
- Ist mein Feld, auf dem ich Kartoffeln anbauen will, mit TRV infiziert?

Ein Nachweis aus Knollen und Blatt mit Hilfe des ELISA-Testes ist nicht erfolgreich, da der NM-Typ nicht erfasst wird und im Falle des Knollennachweises der hohe Stärkegehalt den ELISA-Test inhibiert. Versuche mit dem Tissue-Print-Verfahren an der Knolle waren nur zum Teil erfolgreich, da die Viren nur in sehr geringer Menge im Knollenfleisch vorhanden sind und der NM-Typ ebenfalls nicht nachgewiesen wird. Eine gesicherte Aussage über eine Infektion mit TRV ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Ein sicherer Nachweis von TRV aus infiziertem Knollengewebe gelang mit einer Nested-PCR, die von der Fa. Bioplant in Ebstorf entwickelt wurde. Das Verfahren dauert einen Tag und ist auch in einem Routinelabor problemlos anwendbar. Nachteilig dabei ist, dass nur aus symptomtragenden Knollen sichere Nachweise erzielbar sind.

Eine Infektion mit TRV in der Erde der geplanten Anbaufläche kann durch einen Tabaktest nachgewiesen werden. Der in die Erdprobe des Testfeldes gepflanzte Tabak (*Nicotiana debney*) im 2-Blattstadium zeigt bei einer Kontamination mit beladenen Nematoden nach 5 – 6 Wochen Wachstum im Gewächshaus eindeutige Symptome einer TRV-Infektion. Aus den Tabakwurzeln kann dann mit Hilfe der PCR (Primerentwicklung von Prof. Varrelmann, Georg-August-Universität Göttingen) eine Infektion mit TRV sicher nachgewiesen werden. Ausschlaggebend für die Aussagekraft des Testes ist die Homogenität der Probenahme, da die Nematodennester auf einer Anbaufläche nicht gleichmäßig verteilt sind. Für zukünftige Arbeiten ist angedacht, Bodenproben von geplanten Kartoffelanbauflächen vorab auf freilebende Nematoden zu untersuchen. Werden darin Nematoden gefunden, so sollen diese mit Hilfe der PCR auf TRV untersucht werden.

35-3 - Hühnlein, A.¹⁾; Schubert, J.¹⁾; Thieme, T.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ BTL Bio-Test Labor GmbH Sagerheide

Quantitativer Nachweis des Kartoffel-Blattrollvirus in Vektoren

Quantitative detection of *Potato leafroll virus* in vectors

Für die Bewertung von Pflanzenschutzmitteln oder von Pflanzen mit neuen Eigenschaften (gewonnen im Rahmen einer konventionellen Züchtung, durch Einsatz biotechnologischer Verfahren oder durch gentechnische Methoden) können Effekte auf Insekten als Ziel- und Nicht-Zielorganismen mit Hilfe von Parametern der „life table statistic“ (z. B. Lebensdauer, Fortpflanzungs- oder Sterblichkeitsrate bei konstanten oder fluktuierenden Temperaturen) untersucht werden. Diese Experimente sind sehr zeitintensiv. Deshalb wird nach weiteren Merkmalen gesucht, die es besonders in Hinblick auf Pflanzen mit neuen Eigenschaften erlauben, mögliche Stoffwechseleränderungen in den Pflanzen aufzuzeigen. Es wird vermutet, dass ein veränderter Metabolismus der Pflanze Auswirkungen auf die Attraktivität für Herbivoren wie Aphiden haben kann (Birkett et al. 2000, Zvereva und Kozlov 2006, Beale et al.

2006, De Vos 2007). Somit werden zunehmend Untersuchungen über den Einfluss der Pflanzen auf das Nahrungsverhalten der Aphiden und die Akquisition bzw. Transmission von pflanzenpathogenen Viren durchgeführt. Da eine Virusinfektion der Pflanze die Attraktivität für Aphiden verändern kann (Castle et al. 1998, Mowry and Ophus 2006, Alvarez et al. 2007, Srinivasan and Alvarez 2007), müssen solche Experimente unter standardisierten Bedingungen für die Pflanzen durchgeführt werden. Weiterhin wird ein sehr sensitives quantitatives Nachweisverfahren für die Viren in den Vektoren benötigt, um die Menge von der Aphide aufgenommener Viren zu ermitteln.

Am Beispiel des *Potato leafroll virus* (PLRV) (Genus Polerovirus; Familie Luteoviridae) wird die Entwicklung einer neuen quantitativen Nachweismethode dargestellt. PLRV wird persistent und besonders effektiv von *Myzus persicae* übertragen, wobei sich das Virus im Vektor nicht vermehrt (zirkulativ). Daher ist es als Indikator für eine veränderte Nahrungsaufnahme der Aphiden besonders geeignet. Zudem stellt es neben dem *Potato virus Y* (PVY) eines der bedeutendsten Viren im Kartoffelanbau dar. In den letzten Jahren sind mehrere quantitative PCR (qPCR)-Verfahren für den Nachweis von PLRV in Kartoffelpflanzen oder -knollen entwickelt worden (Agindotan et al. 2007, Mortimer-Jones 2009). Die entwickelten Assays sind allerdings nur bedingt für den Nachweis in Aphiden geeignet, da Primer und Sonden häufig unspezifisch im Aphidengenom binden. Weil es sich bei PLRV um ein RNA-Virus handelt, müssen zudem spezielle Extraktionsverfahren entwickelt werden, die sich auf Grund des hohen Fettanteils in Aphiden von den RNA-Extraktionsverfahren bei Pflanzen unterscheiden können. Extraktionsverfahren, die als spezielle Kits erhältlich sind oder nur die Hämolymphe der Aphiden umfassen (Liu et al. 2005), sind sehr kostenintensiv und häufig für die Bearbeitung einer hohen Probenzahl ungeeignet. Andere, bereits entwickelte Extraktionsverfahren (Singh et al. 1995 und 1996) weisen häufig eine sehr geringe RNA-Ausbeute auf, die außerdem oft von schlechter Qualität und daher für die RT-qPCR nicht geeignet ist. Auf der Basis einer Immunocapture-RT-qPCR wurde ein kostengünstiges, spezifisches Assay für den quantitativen Nachweis von PLRV in Vektoren entwickelt, das einen hohen Probendurchsatz ermöglicht. Indem die Viruspartikel direkt mit Hilfe von Antikörpern an das Reaktionsgefäß gebunden werden, sind die anschließende reverse Transkription und qPCR sehr spezifisch. Da die Bindung des Antigens an die Antikörper ein dynamischer Prozess ist, wurde mit Antikörperüberschuss gearbeitet, um eine möglichst hohe Zahl an Viruspartikeln zu binden. Zudem wurden für die Herstellung der Standards zum Vergleich nicht nur RNA-Transkripte, sondern auch gereinigte PLRV-Partikel verwendet. Hinsichtlich der Virusreinigung wurde außerdem eine Kostenreduzierung geprüft, indem zur Freisetzung der Partikel aus dem Phloem eine Enzymmischung eingesetzt wurde, die auch industriell bei der Herstellung von Frucht- und Gemüsesäften Verwendung findet. Auf diesem Weg kann eine Reinigung von PLRV aus Pflanzengewebe preisgünstig und mit einer hohen Ausbeute durchgeführt werden. Die entwickelte Nachweismethode ist wesentlich sensitiver als der gewöhnlich eingesetzte ELISA.

Literatur

- [1] Agindotan et al. (2007) J. Virol. Meth. 142: 1-9.
- [2] Alvarez et al. (2007) Entomol. Exp. Appl. 125: 135-144.
- [3] Beale et al. (2006) Plant Biol. 103: 10509-10513.
- [4] Birkett et al. (2000) PNAS 97: 9329-9334.
- [5] Castle et al. (1998) Ann. Entomol. Soc. Am. 91: 661-667.
- [6] De Vos (2007) BioEssays 29: 871-883.
- [7] Liu et al. (2005) J Virol. Meth. 132: 174-180.
- [8] Mortimer-Jones (2009) J. Virol. Meth. 161: 289-296.
- [9] Mowry and Ophus (2006) J. Insect Sci. 6: 1-8.
- [10] Singh et al. (1995) J. Virol. Meth. 55: 133-143.
- [11] Singh et al. (1996) J. Virol. Meth. 59: 189-196.
- [12] Srinivasan and Alvarez (2007) Environ. Entomol. 35: 546-553.
- [13] Zvereva und Kozlov (2006) Glob. Chang. Biol. 12: 27-41.

35-4 - Moritz, G.¹; Brandt, S.¹; Sseruwagi, P.²; Myamba, A.²; Waiganjo, M.³; Subramanian, S.⁴

¹ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; ² National Crops Resources Research Institute (NACRRI), Uganda;

³ Kenya Agricultural Research Institute, Kenia; ⁴ International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE), Kenia

Entwicklung eines LucID 3.5-Identifikations- und Informationssystems für Schad-Thripse in Ostafrika

Thripse sind kleine Insekten, die an vielen Kulturpflanzen durch stechend-saugende Pflanzensaftaufnahme und Vektoreigenschaften (Tospoviren) zu enormen Schäden führen. In Afrika sind eine ganze Reihe von Kulturpflanzenarten, wie z. B. Auberginen, Bananen, Baumwolle, Bohnen- und Getreidearten, Kaffee, Kakao, Luzerne, Mais, Reis, Tee, Tomaten und Zitrusfrüchte, diesem Befall ausgesetzt. Im Gegensatz dazu sind lokal