
Poster

Diagnose- und Nachweisverfahren

122 - Ansatz zur Optimierung des molekularen Nachweises von Kartoffelviren

Approach for optimization of molecular biological detection of potato viruses

Johanna Stammler, Johannes Hadersdorfer, Michael Neumüller, Adolf Kellermann², Dieter Treutter²

Technische Universität München, Fachgebiet Obstbau

²Landesanstalt für Landwirtschaft, IPZ3a

Isothermale Methoden wie die Loop-Mediated Isothermal Amplifikation (LAMP, NOTOMI et al., 2000) sind Nukleinsäure basierte Nachweissysteme u.a. für Pathogene. Diese finden auf Grund ihrer kostengünstigen Anwendung im Agrarsektor immer breiteren Anklang und wird nun auch als Alternative zu DAS-ELISA und Onestep RT-qPCR für den Virusnachweis von Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) getestet. Dabei liegen die Vorteile in einer vereinfachten Probenaufbereitung und der kostengünstigen Geräteausstattung. Im Idealfall können die Ergebnisse mit dem bloßen Auge oder in Real-time mit interkalierenden Farbstoffen ermittelt werden.

Für *Potato virus Y (PVY)*, *Potato leaf roll virus (PLRV)*, *Potato virus M (PVM)*, *Potato virus S (PVS)* und *Potato virus A (PVA)* wurden jeweils mehrere LAMP-Primersets entwickelt. Für PVY wurde eine weitere isothermale Methode, Smart Amplification Process (SMAP, MITANI et al. 2007), getestet. In einem Selektionsverfahren wurde für jede Methode und jedes Virus ein vielversprechendes Primerset für weitere Reaktionsoptimierungen ausgearbeitet.

Unter Verwendung aufgereinigter RNA ist der Nachweis von Kartoffelviren mit der LAMP prinzipiell möglich. Jedoch neigt diese Methode zu Hintergrundamplifikationen, die oftmals auch anhand des Bandenmusters in der Gelelektrophorese nicht eindeutig unterscheidbar sind. Somit ist diese Methode bis jetzt für Kartoffelviren nicht verlässlich durchführbar. Hinsichtlich dessen zeigt sich die SMAP stabiler. Jedoch ist hier ein indirektes Visualisierungsverfahren wie z.B. der Nachweis von Pyrophosphat, das unter Abspaltung beim Einbau von Desoxynucleotidtriphosphaten in die DNA entsteht (GOTO et al. 2009), aufgrund der geringeren Amplifikationsrate im Vergleich zur LAMP undeutlicher.

Eine vereinfachte Probenaufbereitung wie bei HADERSDORFER et al. (2011) konnte bei beiden isothermalen Methoden bisher nicht etabliert werden. Vielversprechend ist hier die Anwendung von sog. Direct-Plant-PCR Kits zum Nachweis von genomischer DNA. Hierfür wird Pflanzenmaterial in Puffer homogenisiert und direkt in die PCR eingesetzt. Zum Nachweis von PVY in Kartoffelblätter und Kartoffelknollen läuft das Kapa3G Plant PCR Kit (Peqlab) ergänzt mit einer Reversen Transkriptase, den PVY-PCR-Primern nach SCHUBERT et al. 2006 und einer intronspannenden internen Kontrolle *nad5* (SEIGNER et al. 2008) zuverlässig.

Grundsätzlich sind isothermale Methoden, bei vergleichbarer oder höherer Sensitivität, eine interessante Alternative zur PCR hinsichtlich des Geräteaufwands und der Ergebnisvisualisierung. Jedoch zeigt das Beispiel Kartoffelviren auch deren mögliche Probleme auf, die die Zuverlässigkeit bzw. einfache Anwendung dieser Methoden beeinflussen.

Literatur

- GOTO, M., HONDA, E., OGIURA, A., NOMOTO, A. AND HANAKI, K.-I. 2009: Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. *Biotechniques* 46, 167–172.
- HADERSDORFER, J., NEUMÜLLER, M., TREUTTER, D., FISCHER, T. C. 2011: Fast and reliable detection of plum pox virus in woody host plants using the blue LAMP protocol. *Ann. of Appl. Biol.* 159, 456–466.
- MITANI, Y., LEZHAVA, A., KAWAI, Y., KIKUCHI, T., OGUCHI-KATAYAMA, A., KOGO, Y., USU, 2007: Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch suppression technology. *Nature* 4 (3), 257–262.
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., HASE, T. (2000): Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.

SCHUBERT, J., FOMITCHEVA, V., SZTANGRET-WIŚNIEWSKA, J. 2007: Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J. Virol. Methods* 140, 66-74.

SEIGNER, L., KAPPEN, M., HUBER, C., KISTLER, M., KÖHLER, D. 2008: First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *J. Plant Dis. Protect.*, 115 (3), 97–101.

123 - Nachweis des *Cherry leaf roll virus* in gepfropften *Betula pubescens* finnischer Herkunft mittels (semi-) nested RT-PCR

Detection of Cherry leaf roll virus in grafted Betula pubescens from Finish accessions by (semi-) nested RT-PCR

Rana Demiral¹, Artemis Rumbou¹, Risto Jalkanen², Susanne von Bargaen¹, Carmen Büttner¹

¹Humboldt-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

²The Finnish Forest Research Institute Metla, Northern Research Unit, Eteläranta 55, 96300 Rovaniemi, Finland

Seit 2002 werden in Finnland insbesondere an der Birkenart *Betula pubescens* (Moorbirke) zunehmend Symptome wie Blattrollen, Chlorosen und Nekrosen beobachtet, die mit Degenerations- und Absterbeerscheinungen der Bäume einhergehen. Symptome dieser Art sind für das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) charakteristisch (JALKANEN et al. 2007, BÜTTNER et al., 2011). CLRV ist ein *Nepovirus* der Subgruppe C (Familie *Secoviridae*) und besteht aus einem bipartitem, einzelsträngigen, positiv orientierten RNA-Genom. Bisherige Studien haben gezeigt, dass es schwierig bzw. nicht immer möglich ist, CLRV in Birken finnischer Abstammung nach zu weisen (BREUHANN, 2013). Aufgrund dieser Problematik wurden (semi-) nested RT-PCR Verfahren entwickelt, um drei verschiedene Bereiche des CLRV Genoms zu amplifizieren. Zur Testung wurden 19 *B. pubescens* eingesetzt, die 2011 mit Reisern CLRV-infizierter *B. pubescens* aus Rovaniemi (Finnland) gepfropft wurden. In dieser Studie konnte mithilfe der (semi-) nested RT-PCR gezeigt werden, dass 18 Bäume CLRV-infiziert waren. Mindestens eine der drei Genom-Regionen des CLRV (RdRp, CP, 3' UTR) konnte in der Mehrzahl der Bäume detektiert werden. Darüber hinaus belegten die Ergebnisse, dass die *nested* bzw. *semi-nested* RT-PCR gegenüber einer einstufigen RT-PCR zur CLRV Detektion eine größere Empfindlichkeit aufwies. Diese Ergebnisse korrelieren im Wesentlichen mit dem Auftreten von CLRV-typischen Symptomen an den Blättern der untersuchten Birken im Vegetationsverlauf des Jahres 2013. Das Virus konnte auch in *B. pubescens* detektiert werden, die keine Virus-verdächtigen Symptome entwickelten. Die CLRV-Infektion der Bäume konnte durch Klonierung und Sequenzierung der amplifizierten Bereiche des Virusgenoms bestätigt werden. Ein Sequenzvergleich mit bisher charakterisierten CLRV-Isolaten der Datenbank des NCBI zeigt, dass die CLRV-Varianten in den gepfropften Moorbirken überwiegend der phylogenetischen Gruppe A (REBENSTORF et al. 2006) zuzuordnen sind.

Literatur

BREUHANN M., 2013: Evaluation of and virus detection in *Betula* spp. grafted with Cherry leaf roll virus-infected scions of German and Finnish provenance. BSc-Arbeit Humboldt-Universität zu Berlin, 63 S.

BÜTTNER C., VON BARGEN S., BANDTE M., MYRTA A., 2011: Cherry leaf roll virus. In: Hadidi A, Barba M., Candresse T., Jelkmann W., eds. *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruit*. Minnesota, USA: APS Press, 119–25.

JALKANEN R., BÜTTNER C., VON BARGEN S., 2007: Cherry leaf roll virus abundant on *Betula pubescens* in Finland. *Silva Fennica* 41 (4): 755-762.

REBENSTORF K., CANDRESSE T., DULUCQ M.J., BÜTTNER C., OBERMEIER C., 2006: Host species dependent population structure of a pollen-borne plant virus, Cherry leaf roll virus. *Journal of Virology* 80, 2453-2462.