

Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz  
Fachbereich Gartenbau  
Universität Hannover



**Entwicklung, Optimierung und Erprobung von  
Nachweisverfahren von Viren an Apfel und Untersuchungen zur  
Ätiologie der Gummiholzkrankheit (ARW)**

Vom Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaften

-Dr. rer. hort.-

genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Ing. agr. Wulf Menzel**

geboren am 09.05.1971 in Bad Neuenahr

Angefertigt am

**Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**

Hannover, April 2003

**Referent:** Prof. Dr. Edgar Maiss

**Koreferent:** PD Dr. Wilhelm Jelkmann

**Tag der Promotion:** 16.07.2003

**Für Iris Angela und Cosima Lea**

"There are many ways to do PCR and there's not only one right way to do PCR."

**David Gelfand** (Innis und Gelfand, 1999)

## Deutsches Abstract:

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 dabei 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 Intron überspannenden 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-Nitrophenyloosphat). 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 138 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 zusätzliche Infektionen nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse zeigen, daß das neu entwickelte Verfahren eine zuverlässige, sensitive und kostengünstige Alternative zur bisher verwendeten Indikatorrestung ist.

Desweiteren wurden Versuche unternommen, die Ätiologie 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 Fruchtviren 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 Fruchtviren weder mittels spezifischer Primer in der RT-PCR noch mittels R-PAGE nachgewiesen werden.

**Schlagerworte:** Nachweis, Apfelviren, Gummiholz

## **Englisches Abstract:**

Apple (*Malus x domestica* Borkh.) is one of the most widely grown and economically important fruit crops worldwide. Common viral pathogens infecting apple are Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV, Trichovirus), Apple stem pitting virus (ASPV, Foveavirus), Apple mosaic virus (ApMV, Ilarvirus) and Apple stem grooving virus (ASGV, Capillovirus) and can result in significant yield reductions of up to 60 %, particularly when they occur in mixed infections. ELISA tests are routinely used for the detection of plant viruses, however, these techniques often fail due to low virus titer and/or the inhibitory effects of compounds found in the sap of woody plants. Furthermore, often only low quality antibodies or no antibodies (as for ASPV) are commercially available. These difficulties are particularly true for ELISA detection of viruses infecting apple. Hence, woody indicators are widely used for their detection, but indexing is time consuming (taking up to 3 years) and expensive. PCR techniques provide a powerful alternative for routine diagnosis, and when combined with ELISA like strategies for the detection of amplification products can avoid the need for detection by conventional gel electrophoresis.

Two multiplex RT-PCR-ELISAs, each for two viruses plus an internal control (to detect false negatives) using total nucleic acids (TNA) template, have been developed and evaluated with a broad range of virus isolates from various geographic locations. The viruses (ACLSV, ApMV, ASGV, ASPV) could be reliably detected in bark chips containing vegetative buds within 1-2 days, independent of the growing season. The RT-PCR internal control is based on the spliced intron of the *nad5* gene of apple. One primer is designed so that it only anneals following splicing of the intron of the target gene allowing specific amplification of mRNA even in the presence of plant DNA. RT-PCR-ELISA involves the incorporation of digoxigenin into the RT-PCR amplicon via a digoxigenin labeled primer. PCR products are hybridised to specific capture oligonucleotides, covalently bound to the surface of NucleoLink" strips and visually detected using anti-digoxigenin antibodies and p-nitrophenol phosphate substrate.

Colourimetric detection of multiplex RT-PCR products (for all four viruses and the internal control) were at least as sensitive as detection by ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis. Serial dilutions of TNA extracts from infected samples in TNA extracts from healthy samples allowed virus detection up to a dilution factor of 1:40. 138 samples previously tested for ACLSV, ASPV, ApMV and ASGV by indexing according to EPPO recommendations, were retested by multiplex RT-PCR-ELISA, confirming all infections

detected by woody indicators. In some samples additional infections were also detected, indicating that the RT-PCR-ELISA technique is a more sensitive and reliable assay for the detection of these apple viruses than indexing by woody indicators. This technique also has the advantages of being both cost and time effective over current methods in future certification schemes. Attempts were also made to determine the etiology of apple rubbery wood (ARW), a graft transmissible disease affecting apple. Results from several studies associating the presence of phytoplasmas with this disease are contradictory. Using three different nested PCR protocols, the results could not confirm the presence of an ARW associated phytoplasma. Furthermore, analysis by cDNA subtraction, dsRNA extraction, SISPA (sequence independent single primer amplification) or R-PAGE (return-polyacrylamide gel electrophoresis) could detect no viral or viroid nucleic acid.

The presence of viroids infecting pome fruits in Germany is unknown. To obtain information on viroid infection, several suspicious samples were tested for Apple scar skin viroid (ASSVd), Apple dimple fruit viroid (ADFVd) and Pear blister cancer viroid (PBCVd) by RT-PCR using specific primers. In all cases no viroids were detected. Furthermore, the association of the fruit virus diseases, apple rough skin and apple star crack, with the known viruses and viroids infecting apple, was tested. As described previously by several authors, the association with ASPV and ACLSV could be confirmed. In all cases, both viruses were detected and one sample was additionally infected with ASGV but no viroids were found using RT-PCR and R-PAGE.

**Keywords:** Detection, Apple viruses, Apple rubbery wood

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Übersicht</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.1 Vorstellung der einbezogenen Viren</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.2 Ersatz der Gelelektrophorese durch ELISA-ähnliche Techniken</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2.3 Viroide an Apfel und Birne</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2.4 Fruchtvirosen an Apfel</b> .....	<b>24</b>
<b>1.2.5 Gummiholzkrankheit ('Apple rubbery wood', ARW)</b> .....	<b>26</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1.1 Chemikalien</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1.2 Enzyme und Reaktionspuffer</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1.3 Medien</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1.4 Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1.5 Bakterienstämme</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1.6 Geräte</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1.7 Software</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1.8 Sonstiges Material</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1.9 Verwendete Proben und Virusisolate</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>40</b>
<b>2.2.1 Indikatorrestung der Gehölze</b> .....	<b>40</b>
<b>2.2.2 Verwendetes Pflanzenmaterial</b> .....	<b>41</b>
<b>2.2.3 Phenol-Chloroform Extraktion</b> .....	<b>41</b>
<b>2.2.4 Natriumacetat-Ethanol Fällung</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2.5 Gesamtnukleinsäureextraktion mit Silica Partikeln</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2.6 Gesamtnukleinsäure-Schnellextraktion</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2.7 RNA-Extraktion mit dem QIAGEN RNeasy Kit</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2.8 DNA-Extraktion mit dem QIAGEN DNeasy Kit</b> .....	<b>45</b>
<b>2.2.9 Primerdesign</b> .....	<b>45</b>
<b>2.2.10 Standard RT-PCR</b> .....	<b>48</b>
<b>2.2.11 Kontrollen in der RT-PCR</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2.12 Viroidnachweis mittels RT-PCR</b> .....	<b>53</b>



2.2.13 Multiplex RT-PCR.....	54
2.2.14 Spezifitätsverstärkende Zusätze zum Reaktionsansatz.....	58
2.2.15 Gelelektrophorese.....	58
2.2.16 Herstellung des $\lambda$ - <i>Pst</i> I DNA Standards.....	59
2.2.17 DNA Isolierung aus Agarose-Gelen.....	60
2.2.18 Vektor Herstellung und Ligation.....	60
2.2.19 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	62
2.2.20 Selektion transformierter Zellen.....	63
2.2.21 Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA.....	64
2.2.22 Kontrolle der Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau.....	65
2.2.23 Aufarbeitung der Plasmide für die Auftragssequenzierung.....	65
2.2.24 Erstellung von Dauerkulturen.....	66
2.2.25 Multiplex RT-PCR-ELISA.....	66
2.2.26 Ersatz der NucleoLink-Strips (Nunc) durch DNA-Immobilizer (EXIQON).....	69
2.2.27 Nachweis von PCR-Produkten mittels DIG-Detection Test-Strips (Roche).....	70
2.2.28 Untersuchungen zur Ätiologie der Gummiholzkrankheit (ARW).....	71
2.2.28.1 PCR Nachweis von Phytoplasmen.....	71
2.2.28.1.1 Nested PCR nach Bertaccini <i>et al.</i> (1998) .....	72
2.2.28.1.2 Nested PCR nach Seemüller (pers. Mitteilung).....	74
2.2.28.1.3 Nested PCR nach Heinrich <i>et al.</i> (2001) .....	75
2.2.28.2 Nachweistechiken für nicht charakterisierte Viren.....	76
2.2.28.2.1 Elektronenmikroskopie.....	77
2.2.28.2.2 Anzucht und Kultur von Pflanzen im Gewächshaus.....	77
2.2.28.2.3 Übertragungsversuche.....	77
2.2.28.2.4 Stamminokulation von Bakterien.....	79
2.2.28.2.5 DsRNA-Extraktion.....	79
2.2.28.2.6 SISPA-Technik.....	80
2.2.28.2.7 Subtraktion von cDNA.....	82
2.2.28.2.8 Umkehr-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (R-PAGE).....	92
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>94</b>
<b>3.1 Apfelvirusnachweis.....</b>	<b>94</b>

3.1.1 Optimiertes Extraktionsverfahren.....	94
3.1.2 Interne Kontrolle.....	95
3.1.3 Multiplex RT-PCR.....	96
3.1.3.1 Ergebnisse aus der Entwicklung der multiplex RT-PCR.....	96
3.1.3.2 Gradienten multiplex RT-PCR.....	100
3.1.3.3 Erprobung mit verschiedenen Viruserkünften.....	101
3.1.3.4 Ermittlung der Detektionsgrenzen.....	102
3.1.3.5 Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen.....	104
3.1.3.6 Sequenzvergleiche der sequenzierten amplifizierten Fragmente mit Sequenzen der Genbank (NCBI).....	105
3.1.4 Multiplex RT-PCR-ELISA.....	105
3.1.4.1 Vergleich der Detektionsgrenzen von Gelelektrophorese und ELISA..	109
3.1.4.2 Vergleichstest NucleoLink-Strips (Nunc)/DNA-Immobilizer (EXIQON).....	110
3.1.5 Nachweis von PCR-Produkten mittels DIG-Detection Test-Strips (Roche).....	111
3.1.6 Paralleltestung Apfelmur infizierter Proben mit dem Pflanzenschutzamt Hannover-Ahlem.....	112
3.2 Viroidnachweis.....	113
3.3 Fruchtvirosen.....	114
3.4 Gummiholz (ARW) .....	114
3.4.1 Nachweis von Phytoplasmen.....	114
3.4.2 Übertragungsversuche.....	115
3.4.3 Extraktion von dsRNA.....	117
3.4.4 SISPA-Technik.....	118
3.4.5 cDNA-Subtraktion.....	120
3.4.6 Viroidnachweis aus ARW infizierten Pflanzen.....	121
4 Diskussion.....	123
4.1 Entwicklung der Nachweisverfahren für die vier Apfelmur.....	123
4.1.1 Entwicklung der multiplex-RT-PCR Nachweise.....	123
4.1.2 ELISA-ähnlichen Detektion der Amplifikate der multiplex RT-PCR.....	128
4.1.3 Vergleich des neu entwickelten Verfahrens mit der Indikator- testung.....	131
4.2 Viroide und Fruchtvirosen.....	135

<b>4.3 Untersuchungen zur Ätiologie der Gummiholzkrankheit.....</b>	<b>136</b>
<b>5 Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit.....</b>	<b>143</b>
<b>6 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>144</b>
<b>7 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>146</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>148</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>181</b>
<b>9.1 Alignments der Primer und Capture Oligonukleotide.....</b>	<b>181</b>
<b>9.2 Sequenzen der verschiedenen Fragmente der multiplex RT-PCR I und II.....</b>	<b>183</b>
<b>9.3 Meßwerte der multiplex RT-PCR ELISA I und II.....</b>	<b>186</b>
<b>9.4 Sequenzen der SISPA-Technik und subtraktiven Hybridisierung.....</b>	<b>189</b>

## Abkürzungen

%	Prozent
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
<sup>TM</sup>	Trade Mark
°C	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	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>
APScb	Apple platycarpa scaly bark
ARW	Apple rubbery wood
as	antisense
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>
ASpd	Apple Spy epinasty and decline
ASPV	<i>Apple stem pitting virus</i>
ASSVd	<i>Apple scar skin viroid</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
b	Basen
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure

cm	Zentimeter
CMLV	<i>Cherry mottle leaf virus</i>
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CSVd	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>
CTLV	<i>Citrus tatter leaf virus</i>
cv	cultivar
d.h.	das heißt
DAPI	Diamidino-2-Phenylindol (Nukleinsäurefarbstoff)
DAS-ELISA	doppel-Antikörper Sandwich ELISA
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	Desoxynukleosid-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
fg	Femtogramm
FL	Flat limb
g	Erdbeschleunigung (9,8 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
Hrsg	Herausgeber
Kap.	Kapitel

kbp	Kilobasenpaare
klx	Kilolux
l	Liter
$\lambda$	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
NASBA	Nukleinsäuresequenz basierte Amplifikation (nucleic acid sequence based amplification)
NCBI	Biotechnologieinformationszentrum der Vereinigten Staaten von Amerika (National Center for Biotechnology Information)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OD <sub>550nm</sub>	optische Dichte gemessen bei 550 nm
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PBCVd	<i>Pear blister canker viroid</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Polyethylen
pg	Picogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PRSVd	<i>Pear rusty skin viroid</i>
PSP	pear stony pit
pv.	Pathovar
PVYV	pear vein yellows virus
QFD	quince fruit deformation

QSR	quince sooty ringspot
RM	red mottle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
R-PAGE	Umkehr-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	sense
sek	Sekunden
SISPA	Sequenz-unabhängige Amplifikation mit einem Primer (sequence independent single primer amplification)
spec.	Spezies
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMV	<i>Tulare apple mosaic virus</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TNA	Gesamtnukleinsäure
U	Einheiten (units)
u.a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

Die Abkürzungen verwendeter Chemikalien sind in Kap. 2.1.1 aufgeführt. Die Abkürzungen der Autoren der Pflanzennamen sind nach Erhardt *et al.* (2000) angegeben.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Übersicht**

An Apfel treten, neben anderen Erregern, vier wirtschaftlich wichtige Viren (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV; *Apple mosaic virus*, ApMV; *Apple stem pitting virus*, ASPV; *Apple stem grooving virus*, ASGV), mehrere Viroide und verschiedene pflanzübertragbare Erreger unbekannter Ätiologie auf. Für den 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.

In dieser Arbeit sollen alternative Verfahren für die Diagnose der Viren 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" (Anonymus, 1998) zur Anerkennung von Anbaumaterial von Kern- und Steinobst eine Virustestung erforderlich ist. Dabei sollte 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 sollte versucht werden, Erkenntnisse über die Ätiologien der Erreger der Fruchtvirosen an Apfel und der Gummiholzkrankheit (ARW) zu gewinnen. Darüber hinaus sollte das Auftreten der an Kernobst bekannten Viroide in Deutschland untersucht werden.

Diese Arbeit gliedert sich somit in 4 Bereiche:

1. Eindeutiger Schwerpunkt dieser Arbeit 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 verschiedenen 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. Eine interne Kontrolle soll implementiert werden und 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. Die Entwicklung soll bis zur Praxisreife durchgeführt werden.

2. Ein weiteres Ziel ist es, Primer für den Nachweis von Viroiden an Apfel und Birne zu erproben und an verdächtigen Proben einzusetzen, um Informationen über das Auftreten und die mögliche Verbreitung der Viroide in Deutschland zu erhalten, da darüber bis heute keine Informationen vorliegen.

3. Ausserdem soll der Zusammenhang von an Apfel auftretenden Fruchtvirosen mit den an Apfel bekannten Viren und Viroiden überprüft werden. Hierbei sollen auch die unter Punkt 1 und 2 entwickelten neuen Verfahren eingesetzt werden.

4. Ein weiteres Ziel ist es, neue Erkenntnisse über die Ätiologie der Gummiholzkrankheit zu gewinnen. Dazu sollen unterschiedliche Primer für den unspezifischen Nachweis von Phytoplasmen an verschiedenen Gummiholz-Isolaten verwendet werden. Desweiteren soll, so keine eindeutige Assoziation mit Phytoplasmen nachweisbar ist, an der Identifizierung eines anderen möglicherweise mit Gummiholz assoziierten Erregers (z.B. Virus oder Viroid) gearbeitet werden.

## **1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand**

### **1.2.1 Vorstellung der einbezogenen Viren**

#### Allgemeines

Apfel (*Malus x domestica* Borkh.) ist eine der weltweit wirtschaftlich wichtigsten Obstkulturen, die auch in Deutschland mit jährlich ca. 1 Million Tonnen Marktproduktion eine bedeutende Stellung einnimmt (Ellinger und Görgens, 2000). In Europa nimmt die Bundesrepublik Deutschland bei einer europäischen Gesamtproduktion von ca. 8 Millionen Tonnen Position 3 hinter Italien und Frankreich ein. *Apple chlorotic leaf spot virus* (*Trichovirus*), *Apple stem pitting virus* (*Foveavirus*), *Apple mosaic virus* (*Ilarvirus*) und *Apple stem grooving virus* (*Capillovirus*) sind ökonomisch bedeutende und weit verbreitete Pathogene in den kommerziell angebauten Sorten (Nemeth, 1986; Mink, 1989a, b; Stouffer, 1989; Welsh und van der Meer, 1989; Desvignes, 1999). Die Ertragseinbußen können bis zu 60% betragen, insbesondere bei häufig auftretenden Mischinfektionen und die Fruchtqualität/-größe kann auch beeinflusst sein (Campbell, 1963; Posnette *et al.*, 1963; Schmidt, 1972; Noack, 1988; Zahn, 1996). Zusammen mit der Verwendung empfindlicher Unterlagen

wurden von Noack (1988) sogar Ertragseinbußen bis 80% beschrieben. Alle 4 Viren werden durch vegetative Vermehrung übertragen, ein spontanes Auftreten im Feld und eine Samen- oder Pollenübertragbarkeit sind bis heute an Apfel nicht beschrieben worden. Als einzige natürliche Ausbreitung gilt die Wurzelverwachsung zwischen benachbarten Bäumen, die bei Apfel häufig vorkommt (für ApMV Hunter *et al.*, 1958; für ACLSV McCrum, 1965; für ASPV Rich, 1967; Desvignes, 1999).

Wie bei allen anderen Pflanzenviren ist eine Bekämpfung im Bestand nicht möglich, allerdings können mittels Thermotherapie und Gewebekultur von Sproßspitzen oder Meristemen infizierter Pflanzen virusfreie Pflanzen etabliert werden. Erste Erfolge wurden von Posnette und Copley (1956) und Welsh und Nyland (1965) beschrieben. Das ASGV ist nach Campbell (1968) das am schwierigsten zu eliminierende von den 4 Viren. Auch heute hat die Thermotherapie noch ihre Bedeutung und wird zur Erzeugung von virusfreiem Apfelmateriale verwendet (Knapp *et al.*, 1995a; Laimer *et al.*, 2002). Dies ist insbesondere für die Erhaltung von alten Apfelsorten wichtig, da diese teilweise nur virusinfiziert erhalten geblieben sind. Für das ASGV konnte James (2001) mittels Chemotherapie von in vitro Pflanzen mit Quercetin und Ribavarin gute Erfolge verzeichnen und die Schwierigkeiten einer Eliminierung mittels Thermotherapie bezüglich ASGV umgehen. Hansen und Lane (1985) gelang es, nur mit Ribavarin ACLSV aus in vitro Pflanzen zu eliminieren.

### **Apfelmosaik Virus (*Apple mosaic virus*, ApMV, *Illavirus*)**

#### Wirtspflanzen und Schadsymptome

Das Apfelmosaik Virus ist das am längsten bekannte Virus an Apfel, was vermutlich daran liegt, daß es im Gegensatz zu den anderen hier behandelten Viren häufig zur Ausbildung deutlicher Symptome führt. Es ruft an einer Vielzahl von Kultursorten des Apfels (u.a. 'Jonathan', 'Lord Lambourne', 'Golden Delicious', 'Boskoop', 'Ontario') verschieden ausgeprägte Mosaiksymptome hervor. Das gelb- bis cremefarbene Mosaik kann sich dabei auf der vollständigen Blattspreite nahezu aller Blätter eines Baumes flecken- oder linienförmig zeigen, oder aber auch nur als vereinzelte kleine Sprenkelungen, die leicht mit z.B. Saug- oder Herbizidspritzschäden verwechselt werden können (Nemeth, 1986). Auch eine Aderbänderung ist möglich. Im Laufe des Sommers werden die gelblichen Blattbereiche teilweise nekrotisch und das Laub kann im Herbst verfrüht fallen. In manchen Fällen werden die Symptome mit steigenden Temperaturen im Sommer maskiert (Gilmer *et al.*, 1971). Bei hochanfälligen Sorten wie z.B. 'Jonathan' oder 'Lord Lambourne' können die Ertragsverluste bis zu 40% betragen, wogegen z.B. bei den Sorten 'McIntosh', 'Granny Smith' oder 'Klarapfel'

keine Symptome zu beobachten sind (Kegler, 1968; Desvignes, 1999). Der Wuchs ist ebenfalls stark beeinflusst. So beobachteten Posnette und Cropley (1956), daß die Stammhöhe, der Stammdurchmesser und die Anzahl der Triebe infizierter Bäume der Sorte 'Bramley's Seedling' deutlich reduziert sind. Nach Untersuchungen von Baumann und Engel (1988) führten Streßfaktoren wie z.B. ungünstige Witterungsverhältnisse oder Nachbauprobleme zu besonders hohen Ertragseinbußen bei gleichzeitiger Virusinfektion. Untersuchungen in Baumschulen in Ungarn haben ergeben, daß bei infiziertem Veredelungsmaterial ca. 20% der Veredelungen nicht verwachsen (Nemeth, 1986). Die Symptomausprägung ist dabei von der Sortenanfälligkeit, dem Virusisolat und den Umweltbedingungen (insbesondere Licht und Temperatur) abhängig (Gilmer, 1958b; Mallach, 1956; Kegler, 1968) und führt, bedingt durch eine reduzierte Photosyntheseleistung der symptomtragenden Blätter, zu unterschiedlichen Ertragsrückgängen (Ferree und Clayton-Greene, 1990).

Der Wirtspflanzenkreis des ApMV beschränkt sich nicht nur auf die Kultursorten von *Malus x domestica* Borkh. sondern ApMV ist auch auf eine Vielzahl anderer Apfelarten (u.a. *Malus adstringens* Zab., *M. cerasifera* Spach, *M. x platycarpa* Rehd.) und Arten weiterer Gattungen (u.a. *Amelanchier*, *Corylus*, *Cydonia*, *Prunus*, *Pyrus*, *Rosa*, *Rubus*, *Humulus*) aus 19 Familien übertragbar bzw. in ihnen nachgewiesen worden (Kristensen und Thomson, 1962; Fulton, 1965, 1968; Kegler, 1968; Thomsen, 1975). Nach Schmelzer (1968) ist das ApMV auch für die Buntblättrigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) verantwortlich. Der Nachweis von ApMV in Birken (*Betula* spec.) in Deutschland gelang erstmals Grüntzig *et al.* (1996) in ca. 2% der getesteten Allee- und Parkbäume. Eine Samenübertragbarkeit von ApMV konnte an Haselnuß (*Corylus avellana* L.) beobachtet werden (Cameron und Thompson, 1986), jedoch nicht an Apfel. Auch an Haselnuß haben Untersuchungen gezeigt, daß gesunde Sträucher einen deutlich höheren Ertrag (bis zu 77%) haben als mit ApMV infizierte (Aramburu und Rovira, 1998). Untersuchungen mit verschieden reagierenden Stämmen des ApMV haben ergeben, daß die Infektion mit einem schwachen Stamm vor Nachinfektion mit einem stärkeren Stamm schützt oder dessen Schadwirkung mindert (cross protection) (Posnette und Cropley, 1956; Kristensen und Thomsen, 1962; Thomsen 1975). Ein anderes Apfelvirus, das Tulare Apfelmosaik Virus (*Tulare apple mosaic virus*, TAMV, *Ilarvirus*), das bisher nur in einer Region in den USA nachgewiesen wurde (Yaarwood, 1955) und nach Fulton (1971) nur noch in experimentellem Material existiert, verursacht ähnliche, verwechselbare Mosaiksymptome. Später konnte das TAMV in Haselnuß nachgewiesen werden (Marenaud und Germain, 1975). Im Gegensatz zu ApMV läßt sich das TAMV mit Kleeseiden (*Cuscuta* spec.) auf krautige Pflanzen übertragen (Gilmer, 1958a).

### Taxonomie und Genomorganisation

Das ApMV gehört zur Untergruppe 3 der Gattung *Illarvirus* der Familie der *Bromoviridae* (Roossinck *et al.*, 2001). Das Virus besitzt ein tripartites (+) ssRNA Genom von ca. 8,5 kb. Die RNA 1 und 2 wurden erst im Jahr 2000 von Shiel und Berger sequenziert. RNA 1 (3476 b) kodieren in einem ORF (Offenem Leserahmen) für ein Protein mit Methyltransferase- und Helikase-Aktivität, RNA 2 (2979 b) für eine RNA-abhängige RNA Polymerase. Die RNA 3 (2056 b) ist bicistronisch und kodiert neben dem Hüllprotein für ein putatives Movement Protein, dessen Translation direkt von der RNA 3 erfolgt (Shiel *et al.*, 1995), wogegen das Hüllprotein von einer subgenomischen mRNA der RNA 3, der RNA 4 (984 b) translatiert wird (Alrefai *et al.*, 1994). Die salzempfindlichen, instabilen Viruspartikel haben eine quasi-isometrische Struktur, etwa 30 nm im Durchmesser und werden durch Protein-RNA Bindungen stabilisiert (Bol, 1999; Hull, 2002). Das ApMV ist mit den anderen Viren der Untergruppe 3 serologisch verwandt, was insbesondere beim ELISA-Nachweis aus z.B. *Prunus spec.* Schwierigkeiten durch Kreuzreaktionen mit dem *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) verursachen kann (De Sequera, 1967a; Casper, 1973; McMorran und Cameron, 1983), obwohl die Aminosäuresequenzen der Hüllproteine nur zu etwa 50% übereinstimmen (Guo *et al.*, 1995). Einzelne Sequenzbereiche des Hüllproteins weisen allerdings wesentlich höhere Homologien auf (Sanchez-Navarro und Pallas, 1997; Scott *et al.*, 1998). Die serologische Verwandtschaft beeinflusst jedoch nicht die Apfeltestung, da das PNRSV Apfel nicht infiziert.

### Nachweisverfahren

Neben der in Kap. 2.2.1 beschriebenen Indikatorrestung mit holzigen Indikatoren sind krautige Indikatoren (z.B. nekrotische Läsionen an *Cucumis sativus* L.) und serologische Verfahren möglich. In den Anfängen der serologischen Virusdiagnose wurden Gel-Diffusionstests (Fulton, 1967, 1968; Seneviratne und Posnette, 1970) und Latex-Tests (de Sequera und Lister, 1969b; Fuchs, 1980) für ApMV entwickelt, später dann ELISA-Tests (Barbara, 1980; McMorran und Cameron, 1983; Ambrozic Turk, 1996). Der Nachweis aus Apfelblättern war dabei stark vom Zeitpunkt der Probenahme abhängig und ab August nicht mehr möglich. Clark *et al.* (1976) und Barbara (1980) vermuteten niedrige Viruskonzentrationen bedingt durch die hohen Temperaturen der Sommermonate als Ursache. Nach Otto *et al.* (1990) und Grüntzig *et al.* (1994) ist das ApMV nicht systemisch in der Baumkrone verteilt und nicht in allen Knospen nachweisbar. Der Prozentsatz der infizierten

Knospen schwankte in Abhängigkeit vom Genotyp des Apfels zwischen 1,8% und 97,8%, wobei die Autoren darauf hinweisen, daß fraglich ist, ob die getesteten Knospen tatsächlich virusfrei waren oder ob Hemmstoffe oder zu geringe Sensitivität des für die Untersuchungen verwendeten ELISA zu den negativen Ergebnissen geführt haben. In Untersuchungen über die Probennahme zum ELISA Nachweis von ApMV aus Apfel und Pflaume konnten Torrance und Dolby (1984) dagegen keine ungleiche Verteilung in der Baumkrone feststellen, wohl aber eine Abhängigkeit der Nachweisbarkeit vom Zeitpunkt der Testung. Mit jungem Material (Probennahme Mai oder Juni) waren deutlich höhere Meßwerte zu erzielen als zu späteren Zeitpunkten, allerdings konnten sie, im Gegensatz zu den Vermutungen von Clark *et al.* (1976) und Barbara (1980), unter klimatisch kontrollierten Bedingungen zeigen, daß die höheren Temperaturen nicht die Ursache dafür sind, sondern der physiologische Zustand der Blätter oder Knospen.

Auf RT-PCR basierende Nachweisverfahren wurden von Rowhani *et al.* (1995) und Petrzik und Svoboda (1997) entwickelt. Candresse *et al.* (1998) entwickelten einen RT-PCR-ELISA für den gleichzeitigen Nachweis von ApMV und PNRSV mit einem Primerpaar und Saade *et al.* (2000) entwickelten neben einem Nachweis mittels Hybridisierung eine multiplex RT-PCR, um ApMV parallel mit zwei anderen Ilarviren nachweisen zu können. Der Nachweis unter Verwendung der RT-PCR war deutlich sensitiver als mittels Hybridisierung. Von diesen Autoren ist keine zeitliche Abhängigkeit der Nachweisbarkeit oder ungleiche Verteilung des ApMV in der Baumkrone beschrieben.

Das Apfelmosaik Virus galt früher als häufig und weit verbreitet (Nemeth, 1986) und ist nach neueren Untersuchungen, die auf Indikatorrestung beruhen, in den jüngeren Beständen praktisch nicht mehr vorhanden (Zahn, 1999).

### **Apfelstammfurchung Virus (*Apple stem grooving virus*, ASGV, *Capillovirus*)**

#### Wirtspflanzen und Schadsymptome

Das ASGV gehört in Europa zu den erst in jüngerer Zeit eingeschleppten Viren, das in Asien und Nordamerika im Kernobst schon länger bekannt ist und heute im Apfelanbau weltweit vorkommt (Nemeth, 1986; Desvignes, 1999). Entdeckt wurde es als Unverträglichkeit bei der Veredelung der Unterlagensorte 'Virginia Crab', die zur Verbesserung der Frosttoleranz in den USA als Zwischenveredelung verwendet wurde, auf infizierte Unterlagen (De Sequera, 1967b). Die Bäume wiesen eine nekrotische Linie an der Veredelungstelle auf, waren nicht belastbar miteinander verwachsen und es entwickelten sich Xylemrillen. Da das ASGV in anderen (Kultur-) Sorten keine spezifischen Symptome hervorruft, war die Sorte 'Virginia

Crab' lange Zeit der einzige brauchbare Indikator für die Testung (Desvignes *et al.*, 1992). Das ASGV ist in Kernobst (Apfel, Birne, Nashi) verbreitet und konnte experimentell auf viele holzige (u.a. *Aronia melanocarpa* Elliott., *Cotoneaster spec.*, *Sorbus aucuparia* L.; van der Meer, 1975, 1976) und krautige (u.a. *Chenopodium quinoa* L., *Cucumis sativus* L., *Nicotiana rustica* L.; Lister *et al.*, 1965; Waterworth und Gilmer, 1969) Pflanzen übertragen werden. Desweiteren ist das ASGV in *Citrus*-Arten als *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) beschrieben und in Asien, Australien und Nordamerika verbreitet. Der Ursprung des CTLV wurde eindeutig in China nachgewiesen (Wallace und Drake, 1962). Auch an *Citrus* sind nur in wenigen Ausnahmefällen Symptome beschrieben. CTLV verursacht vereinzelt Blattdeformationen und bei Veredelung auf Unterlagen von *Poncirus trifoliata* L. Nekrosen an der Veredelungstelle und der Wuchs der Edelreiser ist gestaucht. In einzelnen Fällen kann dies bis zum Absterben führen (Calavan *et al.*, 1963). Im Gegensatz zu ASGV an Apfel ist CTLV an *Citrus* leicht mit Schneidwerkzeugen bei Kulturarbeiten übertragbar (Roistacher *et al.*, 1980). Eine Samenübertragbarkeit des CTLV in *Lilium longiflorum* Thunb. und des ASGV in *Chenopodium quinoa* L. gilt als gesichert, in Apfel konnte sie bisher nicht beobachtet werden (Martelli *et al.*, 2001a). Die ökonomische Bedeutung des ASGV an Apfel scheint gering zu sein (Desvignes, 1999), es liegen allerdings keine gesicherten Ergebnisse über die Ertragsverluste durch eine latente ASGV Infektion vor, da es fast ausschließlich in Mischinfektionen mit den anderen Apfelviren auftritt (Nemeth, 1986). In Untersuchungen von James (2001) zeigten ASGV freie Bäume gegenüber mit ASGV einzeln infizierten Bäumen einen stärkeren Wuchs.

### Taxonomie und Genomorganisation

Das ASGV ist die Typspezies der Gattung *Capillovirus*, die keiner Familie zugeordnet ist (Martelli *et al.*, 2001a). Das Virus besitzt ein unipartites (+) ssRNA Genom von ca. 6,5 kb. Die erste vollständige Sequenz wurden von Yoshikawa *et al.* (1992) veröffentlicht. Die RNA kodiert für zwei überlappende ORFs und besitzt einen Poly(A) Schwanz am 3'-Ende. Das Polyprotein des ORF 1 enthält Konsensussequenzen einer Methyltransferase, Protease, Helikase und RNA-abhängigen RNA Polymerase am N-terminalen Bereich und das Hüllprotein ist am C-terminalen Bereich lokalisiert. Das ORF 2, das in einem anderen Leserahmen im Bereich des ORF 1 lokalisiert ist, kodiert für das Movement Protein (Salazar, 1999). Die Expression von Movement Protein und Hüllprotein basiert wahrscheinlich auf subgenomischen RNAs, da das dsRNA Profil von ASGV auch kürzere Fragmente (1 kbp, 2 kbp) aufweist (Yoshikawa und Takahashi, 1988; Martelli *et al.*, 2001a). Das ASGV besitzt

flexible, filamentöse Viruspartikel von 600 – 700 nm Länge und einem Durchmesser von 12 nm (De Sequera und Lister, 1969a). Die Viruspartikel besitzen nur eine geringe Stabilität und können aus natürlich und experimentell infizierten Wirtspflanzen in nur sehr kleinen Mengen gewonnen werden (Fuchs und Merker, 1985a).

Das *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), ein in Asien und Australien in Citrus verbreitetes Virus (Miyakawa, 1978; Zhao *et al.*, 1990; Broadbent *et al.*, 1994; Hailstones *et al.*, 2000), das auch in der Lilie (*Lilium longiflorum*) auftritt (Inouye *et al.*, 1979; Ohira *et al.*, 1995), wurde von Yoshikawa *et al.* (1993) durch Sequenzierung des 3'-Endes mit dem ASGV in Verbindung gebracht. Sie zeigten, daß sehr hohe Homologien (der C-terminale Bereich des ORF 1 zu 86,1%, das ORF 2 zu 97,3%) auf Aminosäureebene mit dem ASGV bestehen. Hinweise für eine enge Verwandtschaft der Erreger hatten zuvor bereits serologische (Nishio *et al.*, 1989) und elektronenmikroskopische Untersuchungen (Ohki *et al.*, 1989) ergeben. Das CTLV wird heute dem ASGV zugeordnet und nicht mehr als eigenständige Virusspezies behandelt (Martelli *et al.*, 2001a).

### Nachweisverfahren

Neben der Indikatorstestung (Kap. 2.2.1) mit holzigen Indikatoren sind auch für das ASGV krautige Indikatoren (z.B. nekrotische Läsionen und chlorotische Ringflecken an *Chenopodium quinoa* L.) und serologische Verfahren verwendbar. Neben dem routinemäßig verwendeten Indikator 'Virginia Crab' wird in den letzten Jahren auch vielfach *Malus micromalus* 'GMAL 273' für den Nachweis von ASGV verwendet (Howell und Mink, 1995), der in Vergleichstests sicherere Ergebnisse lieferte (Howell *et al.*, 1996). Als serologische Verfahren wurden Latex-Test (De Sequera und Lister, 1969b), ELISA (Kegler *et al.*, 1979; Fuchs, 1980; Rankovic und Vuksanovic, 1983; Ambrozic Turk, 1996) und Gewebe-Blots auf Nitrocellulose (Knapp *et al.*, 1995b) angewendet. Der Latex-Test war nur bei ASGV infizierten krautigen Pflanzen erfolgreich einsetzbar. Mittels ELISA war ein zuverlässiger Nachweis mit Blütenblättern oder ruhenden vegetativen Knospen möglich, unter Verwendung von Rinde oder Blattmaterial konnten die Infektionen häufig nicht nachgewiesen werden (Ambrozic Turk, 1996). Die von Knapp *et al.* (1995b) verwendete Blot Technik erwies sich als deutlich sensitiver als der ELISA.

Eine Vielzahl von RT-PCR Protokollen zum Nachweis von ASGV (Marinho *et al.*, 1998; Magome *et al.*, 1997; MacKenzie *et al.*, 1997; Crossley *et al.*, 1998; Daniels *et al.* 1998; James, 1999, Kummert *et al.*, 2001) oder CTLV (Hailstones *et al.*, 2000, Ito *et al.*, 2002) wurden in den letzten Jahren entwickelt, die sich in ihrer Durchführung z.B. bezüglich dem

verwendeten Extraktionsverfahren und der Position der Primer im Genom deutlich voneinander unterscheiden. Teilweise wurden die PCR-Produkte der verschiedenen getesteten Isolate kloniert und sequenziert. Dabei identifizierten Magome *et al.* (1997) höchste Sequenzidentitäten zwischen Isolaten aus Europa und Asien am 3'-Ende des Hüllprotein-Gens und stellten fest, daß die ASGV Isolate aus 2 bis 4 verschiedenen Sequenzvarianten bestehen. Crossley *et al.* (1998) stellten bei Sequenzvergleichen fest, daß die europäischen ASGV Isolate höhere Sequenzidentitäten aufweisen, als europäische mit japanischen Isolaten. Unspezifische Amplifikate wurden beim RT-PCR Nachweis von ASGV aus Mischinfektionen mit ACLSV von Daniels *et al.* (1998) beobachtet. Sie verwendeten Primer, die am 3'-Ende des Polymerasegens positioniert waren. Bereits 1992 hatten Yoshikawa *et al.* gezeigt, daß ASGV und ACLSV hohe Sequenzidentitäten am 3'-Ende des Polymerasegens besitzen. Das von James (1999) entwickelte Verfahren weist, warum auch immer, in einer multiplex RT-PCR ASGV parallel mit *Cherry mottle leaf virus* (CMLV) nach. Er verwendete dabei mischinfizierte *Chenopodium quinoa* L. Pflanzen, da die beiden Viren keinen gemeinsamen natürlichen Wirt besitzen. Kummert *et al.* (2001) beschrieben erstmals einen RT-PCR-ELISA Nachweis von ASGV unter Verwendung des Lambdatech Systems (Fa. Lambdatech, Belgien). Dabei werden die Amplifikate in einer Sandwichhybridisierung nachgewiesen.

In einem Vergleich von Indikatorrestung ('Virginia Crab', 'GMAL 273'), ELISA und immunocapture RT-PCR konnten Kirby *et al.* (2001) zeigen, daß die Indikatorrestung bei 3 von 22 infizierten Proben für beide Indikatoren keinen Virusnachweis erbracht hatte. Auch der ELISA zeigte vereinzelt falsch-negative Ergebnisse, mittels RT-PCR konnten alle Infektionen eindeutig nachgewiesen werden.

### **Chlorotisches Blattfleckungsvirus des Apfels (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV, *Trichovirus*)**

#### Wirtspflanzen und Schadsymptome

Das Chlorotische Blattfleckungsvirus des Apfels ist weltweit verbreitet und wurde 1959 von Luckwill und Campbell in England an *Malus x platycarpa* Rehd. und von Mink und Shay in den USA an der russischen Unterlagensorte 'R12740-7A' beschrieben. Letztere waren es, die den Symptomen entsprechend dem Virus den bis heute gültigen Namen gaben. Kurz darauf stellte Cropley (1963a) fest, daß das ACLSV auch für die Ringfleckenkrankheit der Birne und die Mosaikkrankheit der Quitte verantwortlich ist. Später wurde auch der Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten an Steinobst nachgewiesen (u.a. Aprikose: Morvan und Castelein,



1967; Pena Iglesias und Ayuso Gonzales, 1975; Pflaume: Bernhard und Dunez, 1971; Kirsche: Nemeth, 1986). Neben vielen weiteren Arten der Familie der *Rosaceae* die das ACLSV infizieren kann, wurde es u.a. in Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum* L.) nachgewiesen (Hentsch *et al.*, 1996). Auch lassen sich heute noch als Indikatoren verwendete krautige Pflanzen wie z.B. *Chenopodium quinoa* L. oder *Nicotiana occidentalis* L. infizieren (Jelkmann, 2001). Obwohl Fritzsche und Kegler (1968) eine Nematodenübertragbarkeit vermuteten, konnte für das ACLSV bisher keine vektorielle Übertragung eindeutig nachgewiesen werden (Hull, 2002). Das ACLSV verursacht am Kern- und insbesondere Steinobst erhebliche wirtschaftliche Schäden (Nemeth, 1986). Zum Beispiel die an Pflaume durch einzelne Isolate von ACLSV hervorgerufenen, als Pseudoscharka beschriebenen Symptome, die denen vom *Plum pox virus* (PPV) verursachten Scharkasymptomen sehr ähnlich sehen (Posnette und Ellenberger, 1963; Kunze und Jelkmann, 1995). Die symptomtragenden Früchte sind nicht mehr vermarktbar. Gleiches gilt für die verursachten Fruchtnekrosen an Süßkirsche (Desvignes und Boye, 1988). Der Zusammenhang von ACLSV mit der Rindenrissigkeit bei Pflaume wurde von Dunez *et al.* (1972) beschrieben. An Apfel ist das Virus bis auf wenige Ausnahmen (u.a. die holzigen Indikatoren) latent. Die für Apfel teilweise als Bestäuber verwendete Sorte 'Golden Gem' reagiert auf sehr viele Isolate mit Blatt- und Rindennekrosen, was teilweise bis zum Absterben des Baumes führt (Desvignes und Boye, 1988). Einzelne Isolate verursachen u.a. an den Apfelsorten 'Golden Delicious' und 'Jonathan' eine Ringberostung der Früchte, die ebenfalls dazu führt, daß die Äpfel nicht mehr als Tafelobst vermarktet werden können (Posnette und Copley, 1963; Nemeth, 1986). Versuche, mit ACLSV Isolaten aus *Prunus spec.* Ringberostung an Apfel hervorzurufen, waren nicht erfolgreich (Desvignes und Boye, 1988). Desweiteren werden die Fruchtvirosen Rauhschaligkeit und Sternrissigkeit des Apfels mit ACLSV in Verbindung gebracht (siehe Kap. 1.2.4). Die Isolate verschiedener Herkunft und Wirtspflanzen des ACLSV lassen sich durch ihre serologischen und biologischen Eigenschaften teilweise gut voneinander unterscheiden (Chairez und Lister, 1973; Yanase *et al.*, 1975; Marenaud *et al.*, 1976). Cieslinska *et al.* (1995) verwendeten RFLP Muster von RT-PCR Produkten zur Unterscheidung verschiedener Isolate. Nach Zahn (1996) tritt das ACLSV selten in Einzelinfektion an Apfel auf und ist nach dem ASPV das am häufigsten auftretende Virus.

### Taxonomie und Genomorganisation

Das ACLSV ist das Typvirus der Gattung *Trichovirus*, die auch noch keiner Familie zugeordnet ist (German-Retana und Candresse, 1999; Martelli *et al.*, 2001b). Seit Beginn der

90er Jahre wurden mehrere vollständige Sequenzen von Isolaten aus Apfel (Sato *et al.*, 1993, Genom mit 7552 b) und *Prunus spec.* (German *et al.*, 1990, Genom mit 7555 b; German-Retana *et al.*, 1997, Genom mit 7549 b) veröffentlicht. Das ACLSV hat ein (+) ssRNA Genom mit einer Größe von ca. 7,5 kb und besitzt einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende. Es kodiert für 3 ORFs, von denen das ORF 2 ORF 1 und ORF 3 an den Enden überlappt. ORF 1 zeigt Motive, die für RNA-abhängige RNA Polymerasen, Methyltransferasen und Helikasen charakteristisch sind und besitzt desweiteren eine Protease Domäne. ORF 2 kodiert für ein putatives Movement Protein und ORF 3 für das Hüllprotein. Die Assoziation des Movement Proteins mit Zellwand und Membran wurde von Sato *et al.* (1995) nachgewiesen. Das ORF 1 wird von genomischer, ORF 2 und 3 von subgenomischer RNA translatiert (German-Retana und Candresse, 1999; Martelli *et al.*, 2001b; Hull, 2002). Aus ACLSV infizierten Pflanzen lassen sich 5 dsRNA Fragmente isolieren (Yoshikawa und Takahashi, 1988), von denen 3 hochmolekulare der genomischen bzw. am 3'-Ende verkürzten genomischen RNA entsprechen (7,5 kbp, 6,5 kbp, 5,5 kbp) und 2 kleinere (2,2 kbp, 1,1 kbp) den subgenomischen RNAs (German *et al.*, 1992; Martelli *et al.*, 1994). Das ACLSV besitzt sehr flexible, filamentöse Virionen von ca. 700 nm Länge und einem Durchmesser von 12 nm (de Sequera und Lister, 1969a; Bar-Joseph *et al.*, 1974), die nur schwache antigene Eigenschaften besitzen und mit anderen Spezies der Gattung *Trichovirus* keine serologische Verwandtschaft zeigen (Martelli *et al.*, 2001b).

### Nachweisverfahren

Neben der Entdeckung von krautigen (siehe oben) und holzigen Indikatoren (Kap. 2.2.1) sind serologische Verfahren entwickelt worden. Lister und Hadidi (1971) entwickelten einen Gel-Diffusionstest, der allerdings sehr unzuverlässig war und Schade (1971) und andere Autoren zeigten den möglichen Nachweis von ACLSV mit einem Latex-Test. Kurz darauf wurden verschiedene ELISA Protokolle (Flegg und Clark, 1979; Detienne *et al.*, 1980; Fuchs, 1980; Rankovic und Vuksanovic, 1983) und später ein Gewebe-Blot auf Nitrocellulose (Knapp *et al.*, 1995b) beschrieben. In den letzten Jahren sind weitere Doppel-Antikörper Sandwich ELISA Tests (DAS-ELISA) entwickelt worden, mit denen keine einheitlichen Ergebnisse erzielt wurden. Nach Ambrozic Turk (1996) ist ein zuverlässiger Nachweis von ACLSV nicht immer möglich, das von Corvo und Barros (2001) beschriebene Verfahren erlaubte dagegen ganzjährig einen Nachweis. Karesova und Paprstein (2001) beobachteten ebenfalls zeitweise falsch negative Ergebnisse mit dem ELISA und stellten Unterschiede bei der Verwendung von Antiseren verschiedener Hersteller fest. Desweiteren wurde von Kerlan *et al.* (1981) ein

antikörpergestützter, elektronenmikroskopischer Nachweis (ISEM) entwickelt, der ebenso wie der Gewebe-Blot (Knapp *et al.*, 1995b) eine dem ELISA vergleichbare Sensitivität besaß. Vergleichstests mittels DAS-ELISA und holzigem Indikator ('R12740 7A') ergaben, daß beide Verfahren nicht alle getesteten Isolate nachweisen konnten, einzelne Isolate wurden nur mittels ELISA, andere nur mit dem Indikator detektiert (Schimanski, 1993). Untersuchungen von Zahn (1995) ergaben, daß weder mit einer 1,8 kb langen cRNA Sonde und anschließender chemilumineszenter Detektion noch mittels ELISA ganzjährig zuverlässige Ergebnisse zu erzielen waren. Fridlund (1973) führte fehlgeschlagene Übertragungsversuche auf eine ungleiche Verteilung des ACLSV zurück und nach Fuchs und Merker (1985b) liegt ACLSV in seinen Wirtspflanzen nur in geringen Konzentrationen vor, was einen Nachweis erschwert. In weiteren Untersuchungen über die Verteilung stellte Fridlund (1982) mittels Indikatorrestung fest, daß im oberen Bereich von Trieben aus einzelnen Knospen kein Nachweis möglich war. Untersuchungen über die Verteilung des ACLSV in *in vitro* Pflanzen mittels Gewebe-Blot zeigten, daß in schwach infizierten Pflanzen im Meristem kein Virus nachweisbar war und die Viruskonzentration zur Basis hin zunimmt (Knapp *et al.*, 1995c).

In den letzten Jahren ist auch für ACLSV eine Vielzahl von verschiedenen RT-PCR Nachweisverfahren veröffentlicht worden (Candresse, *et al.*, 1995; Nemchinov *et al.*, 1995; Kinard *et al.*, 1996; Foissac *et al.*, 2001). Candresse *et al.* (1995) entwickelten eine immunocapture RT-PCR und verglichen in einem Ganzjahrestest die Zuverlässigkeit des entwickelten Tests mit einem ELISA für ACLSV. Im Gegensatz zum ELISA, der in den Sommermonaten häufig zu falsch negativen Ergebnissen führte, war mit der RT-PCR ein ganzjähriger Nachweis möglich. Die Sequenzvergleiche von verschiedenen in den Tests verwendeten Isolaten zeigten, daß im Bereich des Hüllproteins hohe Sequenzidentitäten vorliegen, im Bereich des Movement Proteins deutlich niedrigere. Sequenzvergleiche von Kinard *et al.* (1996) ergaben, daß nordamerikanische Isolate aus Apfel, Birne und Kirsche hohe Identitäten (>97%) mit einem Isolat aus Pflaume (German *et al.*, 1990) und niedrigere Identitäten (ca. 81%) mit einem japanischen Isolat aus Apfel (Sato *et al.*, 1993) im amplifizierten Bereich (Hüllprotein) besitzen. Das von Nemchinov *et al.* (1995) entwickelte Verfahren (multiplex RT-PCR) ermöglicht den parallelen Nachweis von ACLSV und PPV aus Steinobst und die von Foissac *et al.* (2001) verwendeten degenerierten Primer waren nicht ACLSV spezifisch, sondern für den polyvalenten Nachweis von Viren der Gattungen *Trichovirus*, *Foveavirus* (auch ASPV) und *Capillovirus* (auch ASGV) und wurden in einer nested RT-PCR verwendet.

Desweiteren wurde von Kummert *et al.* (2001) ein RT-PCR-ELISA Verfahren und von Salmon *et al.* (2002) ein Nuklease Assay, eine Form der real-time (Echtzeit) RT-PCR, bei der unter Verwendung eines mit einem Fluoreszenz-Farbstoff und einem Quencher (Unterdrücker, der die Fluoreszenz unterdrückt, solange beide Moleküle dicht beieinander sind) markierten Sonde der Nachweis der Amplifikate parallel während der RT-PCR in den geschlossenen Reaktionsgefäßen erfolgt und somit keine Gelelektrophorese oder andere Handhabung der PCR-Produkte notwendig ist. Nach Hybridisierung der Sonde an die amplifizierte DNA wird durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase die Sonde abgebaut und durch die Trennung des Quenchers vom Fluorophor kann eine Fluoreszenz gemessen werden, deren Stärke exponentiell mit dem Anstieg der Amplifikatkonzentration zunimmt. Nachteilig bei allen real-time Verfahren ist der hohe Preis der Sonden und des notwendigen speziellen Thermocyclers. Die relative Sensitivität von real-time und gelelektrophoretischer Detektion der Amplifikate war vergleichbar.

In keiner der zitierten Publikationen über den RT-PCR Nachweis des ACLSV werden Abhängigkeiten der Testsicherheit vom Zeitpunkt der Probennahme oder eine ungleiche Verteilung des Virus in den Bäumen beschrieben.

### **Apfelstammnarbungs Virus (*Apple stem pitting virus*, ASPV, *Foveavirus*)**

#### Wirtspflanzen und Schadsymptome

Das ASPV ist weltweit im Apfelanbau verbreitet und wurde ursprünglich ebenso wie ASGV als vermeintliche Inkompatibilität von der Unterlagensorte 'Virginia Crab' mit bestimmten Sorten beschrieben, bis Guengerich und Millikan (1956) die Übertragbarkeit mittels Veredelung demonstrierten und so die mögliche virale Natur des Erregers zeigten (Nemeth, 1986). Drei Jahre später brachten Guengerich und Millikan (1959) das ASPV mit der Krankheit Spy Epinastie und Verfall (ASpd) in Verbindung und Posnette und Cropley (1961) vermuteten wiederum eine Verbindung zwischen Spy Epinastie und Verfall und der Rindenschuppigkeit von *Malus x platycarpa* Rehd. (APScb), die von Luckwill und Campbell (1959) erstmals beschrieben wurde. Die Übertragbarkeit des Erregers von ASpd über Veredelung wurde bereits 1946 von Gardner *et al.* beschrieben. Seit den 60er Jahren wurde der Zusammenhang dieser Krankheiten (zu den Symptomen siehe Kap. 2.2.1) mit dem ASPV kontrovers diskutiert. Posnette und Cropley (1961), Cation und Carlson (1962) und Gilmer *et al.* (1971) stellten fest, daß ASpd und ASPV immer gemeinsam auftraten, wogegen Mink und Shay (1962) auch Einzelinfektionen von beiden beobachteten. Nach erfolgter Thermo-therapie von mit ACLSV, ASPV und ASpd infizierten Klonen stellte Cropley (1968) mittels

Indikatorrestung fest, daß einzelne Pflanzen nur noch mit ASpd infiziert waren. Daraufhin vermutete er, daß es sich bei ASPV und ASpd um zwei verschiedene Erreger mit unterschiedlichen Temperatursensitivitäten handelt. Die Reihenfolge der Eliminierung war dabei immer ACLSV gefolgt von ASPV und zuletzt ASpd. Nach Übertragung von ASpd infizierten Rindenstücken auf Quitte beobachtete Cropley (1968) die Ausbildung von Rußfleckigkeitssymptomen und Rindenrissen. Kegler *et al.* (1976, 1979) kamen wiederum zu dem Ergebnis, daß es sich bei ASPV und ASpd und den vermutlich viralen Erregern von anderen Krankheiten an Kernobst (Steinfrüchtigkeit der Birne ['pear stony pit', PSP], Rotscheckung der Birne ['red mottle', RM], Gelbaderigkeit der Birne ['pear veine yellows', PVYV]) um Varianten eines Virus handelt. Auch Desvignes and Savio (1975) beschreiben die mögliche Identität der Erreger von ASPV und ASpd und bezogen auch noch die Rußfleckigkeit der Quitte ('quince sooty ringspot', QSR) mit ein. Umfangreiche Untersuchungen von Zahn (1995, 1996), der die Testergebnisse der Indikatorrestung von über 10 Jahren und 1700 Proben auswertete, bestätigten wieder die Vermutung, daß der Komplex ASPV, APScb und ASpd in der Regel gemeinsam auftritt, die einzelnen Erreger aber in der Thermotherapie unterschiedlich empfindlich reagieren. In 375 von 1732 Proben zeigten die entsprechenden Indikatoren (siehe Kap. 2.2.1) für alle drei die entsprechenden Symptome, nur in 30 Fällen waren unterschiedliche Kombinationen nachweisbar, die auch auf mögliche Übertragungs- oder Boniturfehler zurückzuführen sein können (Zahn, 1995). Die Ergebnisse mit vorab wärmetherapierten Pflanzen waren dagegen davon stark abweichend. Von 531 Proben waren nur in 92 Fällen alle drei Erreger nachweisbar, in 131 Fällen dagegen nur Kombinationen von zwei oder einzelne Infektionen. Eindeutig belegt ist bis heute nur die Identität der Viren ASPV und PVYV durch Rückübertragungsversuche mit isolierten Viren (Leone *et al.*, 1995, 1998). Weitere Hinweise auf Zusammenhänge von ASPV mit anderen Krankheiten sind durch serologische und molekularbiologische Untersuchungen beschrieben worden (siehe unten).

Ausgenommen von Inkompatibilitäten verursacht durch ASPV bei Veredelungen auf bestimmte Unterlagen mit der Sorte 'Chardon' (Lemoine, 1971) verursacht das ASPV (eingeschlossen die Erreger der Krankheiten ASpd und APScb) keine spezifischen Symptome an den kultivierten Apfelsorten. Der Einfluß auf den Ertrag (Fruchanzahl, Größe und Qualität) ist nur schwer abschätzbar, scheint aber insbesondere in Mischinfektionen hoch zu sein (Desvignes, 1999). Desweiteren scheint ASPV zu einem verringerten vegetativen Wachstum der infizierten Bäume zu führen (Nemeth, 1986; Stouffer, 1989; Desvignes, 1999). Nach Lemoine und Desvignes, (1975) führt eine Infektion der Sorte 'Golden Delicious' mit

ASPV zu einer stärkeren Berostung der Früchte und das Holz der Bäume ist brüchiger. Das ASPV wird auch mit verschiedenen Fruchtviren des Apfels in Verbindung gebracht (siehe Kap. 1.2.4). Auch für verschiedene Birnensorten sind zum Teil hohe Ertragsverluste und Wuchsdepressionen durch PVYV und PSP beobachtet worden (Mejnkes *et al.*, 1965).

Das ASPV wurde bisher in vielen Arten/Sorten der Gattungen *Malus* und *Pyrus* nachgewiesen bzw. konnte auf diese übertragen werden. Desweiteren konnte es in *Crataegus monogyna* Jacq., *Aronia floribunda* Spach und *Sorbus discolor* Maxim. nachgewiesen werden (Sweet und Campbell, 1976; Sweet *et al.*, 1978; Sweet, 1980). Desvignes (1999) beschreibt eine gleichmäßige Verteilung des ASPV in seinen Wirtspflanzen.

### Taxonomie und Genomorganisation

Das ASPV ist das Typvirus der Gattung *Foveavirus*, die ebenfalls noch keiner Familie zugeordnet ist (Martelli und Jelkmann, 1998, 2001). Die erste vollständige Sequenz wurde von Jelkmann (1994) zusammen mit einer Teilsequenz des Pear vein yellows virus (PVYV) veröffentlicht. Das Genom enthält 5 ORFs. ORF 1 zeigt Motive für an der Replikation beteiligte Proteine (Methyltransferase, Helikase, RNA-abhängige RNA Polymerase), ORF 2 bis ORF 4 bilden einen Triple-Gen Block, dessen Proteine vermutlich an der Virusausbreitung von Zelle zu Zelle beteiligt sind und das Hüllprotein wird von ORF 5 kodiert. Das Genom besitzt eine Länge von ca. 9,3 kb und besitzt einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende. Die Translation von ORF 1 erfolgt vermutlich von genomischer, die von ORF 2 bis ORF 5 von subgenomischer RNA. In extrahierter dsRNA von ASPV infizierten Pflanzen lassen sich mehrere Fragmente identifizieren. Eine prominente Bande von ca. 10 kbp repräsentiert das Replikationsintermediat der genomischen RNA, 4 weitere kleinere Fragmente vermutlich die der subgenomischen RNAs (Hull, 2002). Das ASPV besitzt flexible, filamentöse Virionen, die ca. 800 nm lang und 12 nm im Durchmesser sind. Die Partikel neigen zu Ende-zu-Ende Aggregationen (Koganezawa und Yanase, 1990) und zeigen keine serologische Verwandtschaft zu anderen Viren der Gattung *Foveavirus* (Martelli und Jelkmann, 2001). James *et al.* (1996) beobachteten dagegen eine serologische Kreuzreaktion mit bisher nicht charakterisierten Viren aus Steinobst und dem *Plum pox virus* (PPV, *Potyvirus*). Der vermutete Zusammenhang mit anderen Erkrankungen an Kernobst wurde teilweise serologisch und molekular nachgewiesen. So beobachteten Giunchedi und Poggi Pollini (1992) und Pilotti *et al.* (1995) vergleichbare Partikel in PVYV infizierten Pflanzen, die mit von Koganezawa und Yanase (1990) gegen ASPV hergestelltem Antiserum reagierten. Die von Jelkmann (1994) veröffentlichte Teilsequenz (1489 b) nahe dem 3'-Ende

des Genoms (Hüllproteinbereich) eines PVYV Isolates aus Birne zeigte nur 8 Nukleotidaustausche, die zu 5 Aminosäureaustauschen führen. Bereits 1992 zeigten Jelkmann *et al.*, daß aus einem in vitro exprimierten Teil des Hüllproteins von ASPV hergestellte Antikörper mit ASPV und gleichermaßen PVYV reagierten und sie erhielten mit radioaktiv markierten Sonden des ASPV Hüllproteingens positive Reaktionen mit PVYV infizierten Proben. Mit Rückübertragungen von auf *Nicotiana occidentalis* isoliertem ASPV und PVYV auf Apfel und Birne und anschließender Indikatorrestung belegten Leone *et al.* (1995, 1998) die Identität der Erreger. Untersuchungen von Paunovic *et al.* (1999) zeigten, daß die Steinfrüchtigkeit der Birne ebenfalls durch ein Isolat des ASPV hervorgerufen wird. Sie verwendeten dafür monoklonale ASPV Antikörper, ASPV spezifische Primerpaare für Abschnitte des Hüllprotein- und des Polymerasegens und verglichen zudem die dsRNA Bandenmuster. Die Primer konnten zudem auch Fragmente erwarteter Größe von einem Isolat der Rußfleckigkeit der Quitte amplifizieren. Auch die Fruchtdeformation der Quitte ('quince fruit deformation' QFD) steht nach Untersuchungen von Paunovic und Rankovic (1998) mit dem ASPV in Verbindung. Sie zeigten auch für diese Krankheit anhand von dsRNA Profilen und Indikatorrests Übereinstimmungen.

#### Nachweisverfahren

Neben der heute noch üblicherweise eingesetzten Indikatorrestung von Apfel mit holzigen Indikatoren (Kap. 2.2.1) können auch krautige Pflanzen verwendet werden. Eine erfolgreiche Übertragung war auf *Nicotiana occidentalis* '37B' (van der Meer, 1986) und *Nicotiana occidentalis* subsp. *obliqua* (Koganezawa und Yanase, 1990) möglich. Von mehreren Autoren wurden Antiseren für serologische Verfahren verwendet (Koganezawa und Yanase, 1990; Jelkmann *et al.*, 1992; Jelkmann, 1994; Pilotti *et al.*, 1995; James *et al.*, 1996), sind aber nicht kommerziell erhältlich (Nemchinov *et al.*, 1998). Neben einem ELISA Nachweis für ASPV wurde von Jelkmann und Keim-Konrad (1997) eine immunocapture RT-PCR veröffentlicht. Desweiteren untersuchten Schwarz und Jelkmann (1998) mittels immunocapture RT-PCR den Zusammenhang von ASPV mit anderen Krankheiten an Kernobst (RM, PVYV, PSP, QSR, QFD) und stellten leichte Fragmentgrößenunterschiede bei der Gelelektrophorese fest. Sequenzierungen von Amplifikaten ergaben, daß einzelne Isolate Deletionen im N-Terminalen Bereich des Hüllproteins aufwiesen. Die Sequenzidentitäten der 6 ca. 1,3 kbp großen sequenzierten Amplifikate und dem entsprechenden Abschnitt des bereits vollständig sequenzierten ASPV Isolats (Jelkmann, 1994) lagen zwischen 81,7 und 99,3%. Sie beobachteten außerdem, daß 9 von 33 ASPV Isolaten keine Symptome an der Indikatortorte

'Spy 227' hervorriefen. Mittels immunocapture RT-PCR ließen sich auch die Isolate von RM, PVYV, PSP, QSR und QFD eindeutig nachweisen, was ein erneuter Hinweis auf die Assoziation der Krankheiten mit dem ASPV war, auch wenn bisher nur für das PVYV die Identität bewiesen wurde (Leone *et al.*, 1995, 1998). Weiter RT-PCR basierte Nachweisverfahren wurden von MacKenzie *et al.* (1997), Malinowski *et al.* (1998), Nemchinov *et al.* (1998), Kummert *et al.* (1998) und Kundu (2001) entwickelt. MacKenzie *et al.* (1997) verwendeten einen RT-PCR Nachweis von ASPV aus Gesamtnukleinsäureextrakten und beschrieben eine den immunocapture Verfahren vergleichbare Sensitivität. Im Gegensatz zu Nemchinov *et al.* (1998), die das ASPV zuverlässig aus Blattmaterial nachwiesen, wurde von ihnen Blüten- und Knospenmaterial für einen zuverlässigen Nachweis empfohlen. Malinowski *et al.* (1998) verwendeten ebenso wie MacKenzie *et al.* (1997) eine nach Boom *et al.* (1990) modifizierte Silica-Extraktion (siehe Kap. 2.2.5). Kummert *et al.* (2001) waren die ersten, die für ASPV eine RT-PCR-ELISA entwickelten und von Klerks *et al.* (2001) wurde ein Nachweis mit dem AmpliDet RNA System, das auf der NASBA Technik beruht (nucleic acid sequence-based amplification) entwickelt. Dabei wird RNA mit spezifischen Oligonukleotiden und AMV Reverser Transcriptase, RNase H und T7 RNA Polymerase isothermal amplifiziert (Compton, 1991; Kievits *et al.*, 1991). Unter Verwendung von Molecular Beacons, das sind Oligonukleotide, die ein Fluorophor und ein Unterdrückermolekül tragen, die durch interne Komplementarität des Oligonukleotids und daraus resultierender Stammschleifenbildung dicht beieinander liegen und erst nach Hybridisierung an die Zielsequenz räumlich getrennt werden und so das Fluorophor bei entsprechender Anregung fluoreszieren lassen (Tyagi und Kramer, 1996), kann dabei auf die Gelelektrophorese verzichtet werden. Nachteilig sind die hohen Kosten dieser Technik im Vergleich zur RT-PCR. Sequenzvergleiche von verschiedenen verwendeten Isolaten, die unterschiedlich starke Signale nach der Amplifikation zeigten, führten zu Sequenzidentitäten von über 82%. Von Klerks *et al.* (2001) wurde aufgrund der festgestellten Heterogenität vorgeschlagen, einen anderen Genomabschnitt für den ASPV Nachweis zu verwenden. In einem ganzjährigen Vergleichstests mit einer krautigen Indikatorpflanze, *Nicotiana occidentalis* '37B', konnten sie zeigen, daß ein zuverlässiger Nachweis nur mit dem AmpliDet RNA System möglich war. Im Gegensatz zu Rindenmaterial erwies sich Blattmaterial, wie auch von MacKenzie *et al.* (1997) beobachtet, als ungeeignet. Untersuchungen von Yoshikawa *et al.* (2001) über die Genom-Heterogenität des ASPV ergaben, daß einzelnen ASPV Isolate aus bis zu 3 verschiedenen Sequenzvarianten bestehen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Magome *et al.* (1997) bei der Untersuchung der



Variabilität des ASGV. Die hohe Variabilität im Bereich des Hüllproteingens war beim ASPV auf das 5' Ende beschränkt, am 3'-Ende traten nur geringere Unterschiede auf. Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch Schwarz und Jelkmann (1998) für ASPV.

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung eines PCR-basierten Nachweisverfahrens bis zur Praxisreife, 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" (Anonymus, 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') (Desvignes, 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 (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 *et al.*, 1998). Aus diesen Gründen konnte sich die ELISA-Testung, die zum Beispiel in der

Kartoffelvirustestung etabliert ist, in der Apfelmurustestung nicht durchsetzen. Nachdem in den neunziger Jahren von allen vier Viren Nukleinsäuresequenzen vorlagen, wurden auch zahlreiche RT-PCR basierte Nachweisverfahren entwickelt (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 unterschieden (verwendetes Pflanzenmaterial, Extraktionsverfahren, Ein- oder Zweischritt RT-PCR). Zudem lagen zu Beginn der Arbeit Sequenzen weiterer Isolate vor, was eine Optimierung der verwendeten Primer notwendig machte, um alle bekannten Isolate zu erfassen. Aus diesen Gründen sollte eine neues Nachweisverfahren entwickelt werden, das 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 Apfelmurustestungen 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 dieser Arbeit 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 Substanzen/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 markierten 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, 2000a) oder Biotin modifizierte Primer und Digoxigenin-dUTPs (Luk *et al.*, 1997), wobei bei den beiden letztgenannten Varianten durch den Einbau zweier 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 dieser Arbeit 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 Viroide an Apfel und Birne**

#### Allgemeines

An Apfel und Birne sind verschiedene Viroide bekannt. An Apfel treten *Apple scar skin viroid*, *Apple dimple fruit viroid* und *Apple fruit crinkle viroid* auf, an Birne sind *Apple scar skin viroid* und *Pear blister cancer viroid* beschrieben. Bis auf das AFCVd, welches noch nicht in die Klassifikation aufgenommen wurde, gehören alle zur Gattung *Apscaviroid* der Familie *Pospoviroidae* (Flores *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2001). Die Viroide sind wie die Apfelviren nur durch vegetative Vermehrung/Veredelung, nicht aber durch Vektoren, Samen oder Pollen übertragbar. Übliche Nachweisverfahren sind die Indikatorrestung mit sensitiven Apfel- oder Birnensorten, Hybridisierung (Hurt *et al.*, 1996; Desvignes *et al.*, 1999a; di Serio *et al.*, 1996; Ambroso *et al.*, 1995; Loreti *et al.*, 1995), RT-PCR (di Serio *et al.*, 1998; Shamloul und Hadidi, 1999; Nakahara *et al.*, 1999; Faggioli *et al.*, 2001) und RT-PCR-ELISA (Shamloul *et al.*, 2002), wobei hier auch die bereits für die Apfelviren diskutierte Problematik zu Beginn der Arbeiten galt und somit auch für die Viroide neue Verfahren entwickelt wurden. Ein ELISA-Nachweis ist aufgrund der fehlenden spezifischen Erreger-Proteine bei Viroiden nicht möglich. Eine Eliminierung der Viroide mittels Thermoerapie gilt als schwierig bis nicht möglich (Flores *et al.*, 1991; Desvignes, 1999).

#### *Apple scar skin viroid* (ASSVd)

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 China beschrieben (Ohtsuka, 1938). Etwa 20 Jahre später wurden in den USA zwei verschiedene Krankheiten beschrieben. Die Fruchtscheckung (dapple apple) an der Sorte 'Cortland' von Smith *et al.* (1956) und die Korkschaligkeit (apple scar skin) an der Sorte 'Red

'Delicious' von Millikan und Martin (1956). Später wurden Fruchtscheckungen in Italien (Giunchedi, 1976) und England (Campbell und Sparks, 1976) entdeckt. Vermutungen, es handele sich bei der Fruchtscheckung und Korkschaligkeit um den gleichen Erreger, wurden von mehreren Autoren geäußert (Yamaguchi und Yanase, 1976; Stouffer, 1983; Koganezawa, 1986). Die Symptomausprägung ist sorten- und isolatabhängig. Eine Übersicht wird von Desvigne (1999) gegeben. Deutliche scar skin Symptome zeigen u.a. 'Braeburn' und 'Indo', teilweise auch kombiniert mit dapple apple Symptomen. Reine dapple apple Symptome werden von den Sorten 'Elstar' und 'Sunrise' gezeigt, wogegen z.B. die Sorten 'Granny Smith', 'Golden Delicious' und 'Jonagold' keine oder nur sehr schwache Symptome zeigen. Bereits 1983 wiesen Koganezawa *et al.* den Viroidcharakter der Erreger der Fruchtscheckung und Korkschaligkeit nach. Die erste Sequenz des ASSVd wurde von Hashimoto und Koganezawa (1987) veröffentlicht. Die bis heute bekannten Sequenzen variieren geringfügig in der Anzahl Nukleotide (329-334) (Sänger, 1998). Später wurden auch Symptome an Birnen (Fruchtberostung, rusty skin) 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.

#### *Pear blister cancer viroid* (PBCVd)

Die Symptome des blasigen Rindenkrebsses wurden erstmals 1960 von Crolepy in England u.a. an den Birnensorten 'Comice' und 'Williams' beschrieben. Teilweise sehr ähnliche

Symptome wurden an Birne von Kristensen und Jorgensen (1957), Thomsen (1961), Cordy und MacSwan (1961) und Kegler (1965, 1967b) an verschiedenen Sorten beschrieben. Der Zusammenhang mit dem PBCVd ist bis heute nicht geklärt. Im Gegensatz zu den anderen hier behandelten Viroiden, die in anfälligen Apfelsorten Fruchtsymptome hervorrufen, verursacht es in Sortenabhängigkeit Rindensymptome (blasiges Aufplatzen der Rinde, Rindenschuppigkeit). Der Erreger der Rindenkrebs Symptome an der Sorte 'A20' (Desvignes, 1970) wurde als *Pear blister cancer viroid* (PBCVd) von Flores *et al.* (1991) charakterisiert, die RNA besteht aus 315 b. Allerdings ruft dieses Isolat des Erregers nicht die von Cropley (1960) beobachteten Symptome an den Sorten 'Comice' und 'Williams' hervor (Desvignes, 1999). Nach Untersuchungen von Ambros *et al.*, (1995) sind noch mindestens zwei weitere bisher nicht identifizierte Erreger oder Varianten des PBCVd für die an Birne beschriebenen Rindensymptome verantwortlich. Versuche mittels Thermotherapie und Gewebekultur PBCVd freie Pflanzen zu erhalten, schlugen fehl (Flores *et al.*, 1991, Desvignes, 1999). Übertragungsversuche auf Arten der Gattungen *Cydonia*, *Pyronia* und *Sorbus* waren erfolgreich, blieben aber symptomlos, wie auch bei den meisten kultivierten Birnensorten (Desvignes *et al.*, 1999b).

Obwohl es experimentell auf verschiedene Apfelarten (*Malus baccata* L., *Malus ioensis* Britt., *Malus x robusta* Rehd.) 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.

#### *Apple dimple fruit viroid* (ADFVd)

Das *Apple dimple fruit viroid* (ADFVd) ist Mitte der neunziger Jahre in Süditalien an der Apfelsorte 'Starking Delicious' aufgetreten, deren Früchte Einbuchtungen der Oberfläche und nekrotische Bereiche im Fruchtfleisch aufwiesen. Diese Symptome ähnelten denen von Giunchedi (1976) beschriebenen. Der Erreger wurde von di Serio *et al.* (1996) molekular charakterisiert und durch erfolgreiche Rückübertragung von isolierter Viroid RNA wurden die Koch'schen Postulate erfüllt (di Serio *et al.*, 2001). An sensitiven Sorten ('Starkrimson', 'Gala', 'Sunrise') zeigen sich entfärbte gelbliche Flecken in den Bereichen roter Fruchtschale, die ursprünglich beschriebenen Symptome der Sorte 'Starking Delicious' treten an diesen Sorten nicht auf (Desvignes, 1999). Die Symptome (entfärbte Flecken) ähneln teilweise denen der als DAVd bekannten ASSVd Isolate. Derartige Symptome wurden bereits 1956 von Mezzetti in Italien beschrieben. Sequenzvergleiche mit dem ASSVd zeigten, daß eine Sequenzidentität von 63% besteht und das ADFVd mit 306 b bis 307 b deutlich kleiner ist als das ASSVd (329

b bis 334 b) (di Serio *et al.*, 1996). 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.

#### Apple fruit crinkle viroid (AFCVd)

Die erstmals in Japan 1976 beobachtete pflanzübertragbare Buckelfrüchtigkeit verschiedener Apfelsorten (Koganezawa *et al.*, 1989; Iijima, 1990) 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 (Fruchtdeformationen und Nekrosen im Fruchtfleisch) an der in Asien populären Apfelsorte 'Ohrin' und der Sorte 'Jonathan' führte. Die Sorte 'Starking Delicious' bildete dagegen keine Frucht-, sondern Rindensymptome aus, die denen von Parish (1981) und Cheney *et al.* (1970) an anderen 'Delicious' Sorten/Sports in den USA beschriebenen ähneln (blasige, schuppige Rinde). Die Erregerätiologie der in den USA beschriebenen Krankheiten ist bis heute nicht geklärt. Da erst im späteren Verlauf dieser Arbeit im Jahr 2001 die für einen RT-PCR Nachweis notwendigen Sequenzinformationen des AFCVd bekannt wurden, die RNA des AFCVd ist 371 b groß, 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 dieser Arbeit war es, Informationen über die Verbreitung dieser Viroide zu gewinnen und einen möglichen Zusammenhang mit in Deutschland auftretenden Fruchtviren zu überprüfen.

#### **1.2.4 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'). Vereinzelt ist in der Literatur von Viroiden als Erreger die Rede (z.B. für die Sternrissigkeit Jongedijk, 2000), dies wurde aber nie begründet oder experimentell bestätigt. Die Identität des Erregers der Rauhschaligkeit mit dem der Sternrissigkeit ist bis heute nicht belegt worden, wird aber von einzelnen Autoren vermutet (Schmid, 1963). In Versuchen mit dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI, der zum Nachweis von Phytoplasmen verwendet wird, gelang es Davies *et al.* (1984) nicht, mit der Sternrissigkeit assoziierte Phytoplasmen nachzuweisen. Auch für die Fruchtvirose ist eine Übertragung über vegetative Vermehrung/Veredelung bekannt. Zudem konnte auch eine langsame Ausbreitung innerhalb befallener Anlagen beobachtet werden (Nemeth, 1986; Baumann, 1958). Ein Vektor konnte jedoch bis heute nicht identifiziert werden, so daß, wie von oben genannten Autoren vermutet, wahrscheinlich auch hierbei natürliche Wurzelverwachsungen die Ursache für eine Übertragung sind. Eine Übertragung beider Erreger auf Arten anderer Gattungen als der Gattung *Malus* ist bisher nicht beschrieben. Ein zuverlässiger Nachweis ist, ähnlich wie bei Gummiholz, nur mittels Indikatorrestung möglich. Als Indikator wird die Apfelsorte 'Golden Delicious' im Routinetest eingesetzt (Anonymus, 1998). Ziel ist es, den möglichen Zusammenhang der Fruchtvirose mit den bekannten Viren und Viroiden an Apfel zu überprüfen.

### **Rauhschaligkeit ('Apple rough skin')**

Die Krankheit wurde erstmals 1955 von van Katwijk in den Niederlanden beschrieben. Sie ist hauptsächlich in Europa verbreitet, wurde aber auch in Asien und Nordamerika nachgewiesen. Der Erreger führt bei anfälligen Sorten ('Golden Delicious', 'Boskoop', 'Ontario') zu rauhen, korkigen Flecken auf der Fruchtschale, die unregelmäßig geformt sind. Außerdem sind die Früchte häufig durch partielle Wachstumsunterschiede deformiert (Schuch, 1957). In trockenen, warmen Jahren wurde eine deutlich geringere Symptomausprägung gegenüber feucht-kalten Jahren beobachtet, zudem sollen nasse Böden zu schwereren Symptomen führen (van Katwijk und Meijnke, 1963). Verwechselt werden können die Symptome mit denen von Apfelschorf-, Spritz- oder Spätfrostschäden (Baumann, 1958), wobei diese häufig nur an den Früchten der äußeren Bereiche der Baumkrone auftreten, die der Fruchtvirose aber über die gesamte Baumkrone verteilt sind (Bidabe, 1989). Nach Beobachtungen von Meijnkes *et al.* (1965) sind durch den Erreger Wachstum und Kronenumfang der infizierten Bäume zwar nicht verringert, aber die Fruchtqualität ist stark beeinträchtigt, so daß bei starkem Befall die Früchte nicht mehr vermarktbar sind.



### **Sternrissigkeit ('Apple star crack')**

Die Sternrissigkeit wurde von Jenkins und Storey (1955) in England erstmals beschrieben und wurde auch als Stiletttschaden bezeichnet (Mallach, 1956). Im Gegensatz zur Rauhschaligkeit verursacht sie nicht nur Fruchtsymptome, sondern vereinzelt auch Rindennekrosen im Frühjahr um die Knospen einjähriger Triebe (Campbell und Hughes, 1975). Anfällige Sorten wie z.B. 'Golden Delicious', 'Boskoop' oder 'James Grieve' bilden kleine sternförmige Risse in der Fruchtschale aus, die über die ganze Frucht verteilt sind und sie unvermarktbar werden lassen. Meijnkes *et al.* (1965) beobachteten neben erheblichen Ertragseinbußen auch eine Reduzierung des Wachstums und Kronenumfangs von 25% bzw. 20%. Auch bei der Sternrissigkeit treten Fruchtdeformationen auf und die Früchte sind insgesamt kleiner als die von gesunden Bäumen. An einzelnen Sorten ('Lord Lambourne', 'Jonared') wurden dagegen nur Rindensymptome beobachtet (Nemeth, 1986). Das Verbreitungsgebiet der Sternrissigkeit entspricht dem des Erregers der Rauhschaligkeit (Europa, Nordamerika, Asien).

### **1.2.5 Gummiholzkrankheit ('Apple rubbery wood', ARW)**

#### Wirtspflanzen und Schadsymptome

Die Gummiholzkrankheit wurde 1944 erstmals von Wallace *et al.* beschrieben. Sie beobachteten eine verminderte Lignifizierung im Holz, die zu einer deutlich erhöhten Flexibilität der Zweige bei einigen Apfelsorten (u.a. 'Lord Lambourn', 'Stahls Prinz', 'James Grieve', 'Starkrimson') führt. Nach Nelmes *et al.* (1973) sind die Zellwände vom Holz ARW infizierter Bäume abnormal dick und von loser Textur. Filova *et al.* (2001) beobachteten, daß in Stammquerschnitten Gummiholz zeigender Bäume ein höherer Anteil parenchymatischer Zellen vorliegt. Nach Baumann (1958) sind die Symptome an Sorten auf schwach wachsenden Unterlagen besonders deutlich. Von Canova (1963) wurden schwere Gummiholzsymptome an einzelnen Birnensorten ('Dr. Jules Guyot', 'Arämiu de Somes') beobachtet. Durch die mangelnde Lignifizierung hängen die Zweige, zumindest bei entsprechendem Fruchtbesatz, bis auf den Boden herunter und die Früchte werden somit unvermarktbar. Die Übertragbarkeit des Erregers mittels Veredelung wurde von Prentice (1950) beschrieben. Posnette und Cropley (1958) konnten zeigen, daß der Erreger Rindennekrosen und Gummiholzsymptome an Quitte verursacht und Cropley (1963b) beobachtete, daß Birne latent infiziert wird. Bovey (1961) zeigte die Übertragbarkeit von Isolaten aus Apfel auf Birne und umgekehrt. Von einzelnen Autoren wird die Identität mit dem Erreger der Flachästigkeit des Apfels (Apple flat limb, FL) vermutet (Anonymus, 1963;

Cropley, 1963b), konnte bis heute aber nicht nachgewiesen werden. Versuche, den Erreger mittels Veredelung auf *Prunus avium* L. zu übertragen, gelangen nicht. Um die Veredelungsstelle bildete sich nekrotisches Gewebe aus, Rückübertragungsversuche waren nicht erfolgreich (Desvignes, 1999). Die Süßkirschsorte 'F12-1' wird aufgrund dieser deutlichen Reaktion auch als Indikator eingesetzt (Desvignes *et al.*, 1992). Die Auswirkungen einer ARW Infektion sind bei anfälligen Sorten gravierend, wobei aber Unterschiede zwischen einzelnen Isolaten festgestellt werden konnten. So beobachteten Campbell (1961) und Kegler (1967a) einen Ertragsrückgang bei den Sorten 'James Grieve' und 'Lord Lambourne' von ca. 35% und ca. 70%. Eine Eliminierbarkeit mittels Thermotherapie wurde von Posnette *et al.* (1962), Welsh und Nyland (1965), Campbell (1968) und Refatti *et al.* (1999) beschrieben, wogegen die Thermotherapie nach Guerra und Kirkpatrick (2001) für ARW nicht effizient einsetzbar ist. Nach Minoiu und Craciun (1982), die ein Bakterium als Erreger beschreiben, ist es möglich, pathogenfreies Pflanzenmaterial durch Bestrahlung mit radioaktivem Kobalt zu erhalten. Vergleiche von mittels Thermotherapie von Gummiholz frei gemachten Bäumen der Sorten 'Golden Delicious' und 'Starkrimson' mit ARW infizierten Bäumen zeigten, daß die Bäume bis zu 1/3 größer und der Stamm bis zu 1/3 dicker war. Die Früchte der Sorte 'Golden Delicious' waren durchschnittlich 18% größer. Nach Baumann (1972) sind in Mischinfektion mit ApMV die Ertragseinbußen in einzelnen Sorten besonders hoch (bis 30%). Meijnkes *et al.* (1965) beobachteten auch teils erhebliche Ertragseinbußen, konnten aber keine Beeinträchtigung der Fruchtqualität feststellen. Die Krankheit ist weltweit verbreitet und in Ländern mit heißen Sommermonaten wurden deutlich schwächere Symptomausprägungen beobachtet (Nemeth, 1986). Eine Übertragung ist nur durch vegetative Vermehrung/Veredelung möglich, ein spontanes Auftreten im Bestand wurde bisher nicht beschrieben, was eine vektorielle Übertragbarkeit unwahrscheinlich macht.

#### Ätiologie und Nachweis der Gummiholzkrankheit

Die Frage nach der Ätiologie der Gummiholzkrankheit kann nicht eindeutig beantwortet werden. In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse dazu. So vermutete Crane (1945) bereits ein Jahr nach der Erstbeschreibung der Krankheit 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 Craciun 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 zweiten 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 wurden die nachgewiesenen Phytoplasmen in die Aster yellows-Gruppe eingeordnet. Ein zuverlässiger Nachweis ist bis heute nur mittels Indikatorrestung möglich. Im Routinetest wird als Indikator meist die Apfelsorte 'Lord Lambourne' eingesetzt (Anonymus, 1998).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Informationen, die zur Klärung der Ätiologie der Gummiholzkrankheit beitragen, zu gewinnen.

## **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 dieser Arbeit nicht logisch möglich und würde dem Leser die Nachvollziehbarkeit erschweren. Aus diesem Grund ist u.a. das neu entwickelte multiplex RT-PCR-ELISA Verfahren mit interner Kontrolle, das eines der Hauptergebnisse ist, im Methodenteil eingegliedert. Desweiteren ist durch diese Form der Eingliederung und zum besseren Verständnis der Entwicklung der Methoden und Ergebnisse stellenweise eine Vorwegnahme von Teilen der Diskussion notwendig.

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 auf Umdrehungen pro Minute, wenn nicht anders spezifiziert, auf handelsübliche Tischzentrifugen.

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

**Tabelle 1: Feste Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Verwendete Abkürzung</b>	<b>Hersteller</b>
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -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 <sub>2</sub>	Merck
Celite		Serva
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	Fluka

**Tabelle 1: (Fortsetzung)**

CF11 Cellulose		Whatman
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Dithiotreithol	DTT	ICN
Ethidiumbromid		Sigma
Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid	EDC	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz	EDTA	Merck
Glucose		Sigma
Guanidin Hydrochlorid	GHCl	Sigma
Guanidin Thiocyanat	GSCN	Sigma
Hexamincobalttrichlorid	HaCoCl <sub>3</sub>	Sigma
Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase	IPTG	BioTech
Kaliumacetat	KAc	Merck
Kaliumhydroxyd	KOH	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kaliumhydroxyd	KOH	Merck
Morpholinethansulfonsäure	MES	Roth
LM-Agarose		Biozym
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub>	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO <sub>4</sub>	Merck
Maleinsäure		Merck
Manganchlorid-Dihydrat	MnCl <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Sigma
Natriumcarbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Roth
Oxalsäure		Fluka
para-Nitrophenylphosphat		Serva
Polyvinyl Polypyrrolidon 40	PVP-40	Sigma
Polyvinyl Polypyrrolidon 400	PVP-400	Sigma

**Tabelle 1: (Fortsetzung)**

Rubidiumchlorid	RbCl	Sigma
Select Peptone 140		Gibco BRL
Silica Partikel		Roth
Soy Broth		Gibco BRL
Sucrose		Merck
Tetramethylammoniumchlorid		Fluka
Tetramethylammoniumhydroxyd		Fluka
Trinatriumphosphat	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Tris Acetat		Roth
Trishydrochlorid	Tris HCl	Roth
Uranylacetat		Merck
Yeast Extract		Gibco BRL

**Tabelle 2: Flüssige Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Verwendete Abkürzung</b>	<b>Hersteller</b>
1-Methyl-Imidazol		Sigma
2-Mercaptoethanol	2-MeEtOH	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 <sub>abs.</sub>	Roth
Fixierer Roentogen Superfix		Tetenal
Formamid		Fluka
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 <sup>+</sup>
<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<sup>+</sup> (pH 7,5):

- 10 mM Tris HCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,1 mg/ml BSA

#### NEB 1 (pH 7):

- 10 mM Bis-Tris-Propan HCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 mM DTT

#### NEB 3 (pH 7,9):

- 0,1 M NaCl
- 50 mM Tris HCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 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 (laut Herstellerangabe, soweit vorhanden):

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

- 0,4 M Tricin KOH
- 0,15 M KAc
- 35 mM MgAc<sub>2</sub>
- 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 MgAc<sub>2</sub>
- 37,5 mg/ml BSA

10x Ligationspuffer (pH 7,8):

- 0,4 M Tris HCl
- 0,1 M MgCl<sub>2</sub>
- 0,1 M DTT
- 5 mM ATP

5x Erststrang Puffer (pH 8,3):

- 0,25 M Tris HCl
- 0,375 M KCl
- 30 mM MgCl<sub>2</sub>

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 MgSO<sub>4</sub>
- 10 mM CaCl<sub>2</sub>

5x RT Puffer (pH 8,3):

- 0,25 M Tris HCl
- 0,25 M KCl

- 50 mM DTT
- 50 mM Spermidin
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>

### 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 Select 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 MgCl<sub>2</sub>

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 <sup>-</sup>	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

**Tabelle 7: (Fortsetzung)**

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
Vakuumkonzentrator	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**

<b>Programm</b>	<b>Version</b>	<b>Rechte bei</b>
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; Demoversion	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 <sup>a</sup>	Pflanzenart	Geographische Herkunft	Erhalten durch <sup>b</sup>	Infiziert mit <sup>c</sup>
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
<b>4/94</b>	<i>Malus x domestica</i>	Frankreich	B	ASPV, <u>ASGV</u> , <u>ACLSV</u>
<b>33/94</b>	<i>Malus x domestica</i>	Großbritannien	B	ASPV, <u>ApMV</u> , <u>ACLSV</u>

**Tabelle 10: (Fortsetzung)**

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

(<sup>a</sup>Fett gedruckte Probennummern waren nur auf ASPV vorgetestet. <sup>b</sup>A: Pflanzenschutzamt Hannover; B: Biologische Bundesanstalt Dossenheim; C: Proben die selbst gesammelt wurden. <sup>c</sup>Mit 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 Ausprägung der Symptome stark von den Umweltbedingungen und dem jeweiligen Virusisolat abhängt. Bei Mischinfektionen von ASPV mit ACLSV an *Malus x platycarpa* Rehd. 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 x platycarpa</i>	ASPV (APScb)	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 (ASpd)	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

**Tabelle 11: (Fortsetzung)**

	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 Fruchtvirosen 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<sub>abs</sub> (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. In dieser Arbeit wurde das Verfahren weiter verändert, um es für den Gebrauch als Extraktionsmethode im Routinelabor einsetzen zu können. 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 Nukleinsäuren 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<sub>abs</sub> 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              Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

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%                  EtOH<sub>abs</sub>

### 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, 2000a) 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 abgossen. 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 Beginn der Arbeit sequenzierten Virus-Isolate abgedeckt werden. Diese Tatsache und die fehlende Kompatibilität (siehe unten) 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.

Zu Beginn der Arbeit wurden Sequenzvergleiche mit allen in der Genbank und in der vorhandenen Literatur verfügbaren Nukleinsäuresequenzen für die einzelnen Viren durchgeführt, um Bereiche möglichst hoher Sequenzidentität zu identifizieren. Desweiteren wurden, wenn vorhanden, Veröffentlichungen über Aminosäuresequenzen mit hinzugezogen. Die Entwicklung der Primer folgt weitgehend den Empfehlungen von Henegariu *et al.* (1997),

Beasley *et al.* (1999), Innis und Gelfand (1999) und Zangenberg *et al.* (1999), die umfangreiche Untersuchungen dazu angestellt haben. Generell sollten Primer ca. 20-30 bp lang sein, keine stabile Sekundärstrukturen innerhalb der Primersequenz ausbilden können und keine langen Sequenzfolgen von mehreren G und C enthalten, da dies unspezifische Anlagerungen begünstigt. Desweiteren sollte als 3'-terminales Nukleotid kein T gewählt werden, da dies, insbesondere mit G, stabile Fehlpaarungen ausbilden kann. Kwok *et al.* (1990) konnten zeigen, daß sogar bei zwei T Fehlpaarungen am 3'-Ende unter sonst spezifischen Bedingungen noch eine erfolgreiche Amplifikation möglich war. Mit Ausnahme des Intron überlappenden Primers, bei dem die Auswahl der Position aufgrund seiner Funktion eingeschränkt war, wurden alle in der multiplex RT-PCR eingesetzten Primer mit einem doppel-A am 3'-Ende ausgewählt, da dies nach Innis und Gelfand (1999) zur Minimierung der Dimerbildung bei Primern insbesondere in multiplex Applikationen führt. Desweiteren sollten Primer keine GC Gehalte von mehr als 50% und speziell in der Hälfte am 3'-Ende von mehr als 40% besitzen (Beasley *et al.*, 1999). Fehlpaarungen sollten am 3'-Ende (letzte 2 Nukleotide) vermieden werden, wohingegen auf den restlichen Positionen und am 5'-Ende einzelne Fehlpaarungen in der PCR problemlos toleriert werden. Kwok *et al.* (1990) konnten zeigen, daß perfekte Paarungen gegenüber Fehlpaarungen (A:G, C:C, A:A) am absoluten 3'-Ende die Ausbeute der Amplifikation um Faktor 20 bis 100 erhöhen. Bei degenerierten Positionen sollten für einfach degenerierte Positionen (2 verschiedene Nukleotide an einer Position) Primermischungen verwendet werden, bei höheren Graden (3-4 verschiedene Nukleotide an einer Position) inerte Basen wie z.B. Inosin, die mit allen 4 Nukleotiden gepaart nur minimal destabilisierend wirken (Ohtsuka *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1985). Die Ausnahme sind Positionen mit A und G, hier sollte G statt einer Primermischung verwendet werden, und T und C, hier sollte T verwendet werden, da G:T Paarungen als stabile Fehlpaarungen beschrieben sind (Kitt *et al.*, 1983; Ikuta *et al.*, 1987, Kwok *et al.*, 1990). Die Schmelztemperaturen der Primer eines Paares, für die multiplex RT-PCR der Primer aller Paare, sollten zum Erreichen einer maximalen Spezifität gleich sein oder sehr nahe beieinander liegen. Zur Berechnung stehen mehrere verschiedene Formeln zur Verfügung. Für die Primerentwicklung wurde die 'nearest-neighbour' Formel (Breslauer *et al.*, 1986) ausgewählt, da diese nach den Autoren des verwendeten Primerdesign-Programms OLIGO (Rychlik und Rhoads, 1989) die exakteste Annäherung ermöglicht. Außerdem dürfen die Primer eines Paares, und zur Gewährleistung der Kompatibilität die Primer aller Paare einer multiplex RT-PCR, keine stabilen Dimere bilden oder komplementäre 3'-Enden besitzen, da diese eventuell effizient aufsynthetisiert werden können (Chou *et al.*, 1992). Für

multiplex RT-PCR Applikationen ist desweiteren zu berücksichtigen, daß bei Verwendung der Gelelektrophorese die Fragmentgrößen gut zu trennen sind, was allerdings bei der Weiterentwicklung der Nachweise zu multiplex RT-PCR-ELISA Verfahren, um die Gelelektrophorese zu ersetzen, unbedeutend ist. Andererseits sollten die Fragmentgrößen so nah wie möglich beieinander liegen, da kürzere Fragmente gegenüber längeren bevorzugt amplifiziert werden (Zangenberg *et al.*, 1999). Außerdem zeigten Singh und Singh (1997) beim Einzelnachweis von *Potato virus Y*, daß die von ihnen verwendeten Primerpaare die kurze Fragmente amplifizieren (217 bp und 249 bp) 1 fg reiner viraler RNA nachweisen können, wogegen Primerpaare die längere Zielsequenzen haben (1016 bp und 1040 bp) als kleinste Menge 1 pg erfolgreich amplifizieren konnten. Durch Erhöhung der Primerkonzentration des schwächer amplifizierten Fragments in einer multiplex RT-PCR und/oder Variation der Pufferkonzentration kann dies in der Regel ausgeglichen werden (siehe hierzu auch Kap. 2.2.13), was aber wiederum zu einer Verminderung der Polymeraseleistung führen kann (Henegariu *et al.*, 1997).

Bei geplanter Weiterentwicklung der multiplex RT-PCR zu einem PCR-ELISA Verfahren ist 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. Bis auf die antisense Primer des ACLSV und ASPV, die in der nicht translatierten Region am 3'-Ende lokalisiert sind, sind sämtliche virusspezifischen Primer in den Hüllproteingenen lokalisiert. Die Alignments der relevanten Bereiche der zur Primerauswahl verwendeten Virussequenzen, die mit dem Programm ClustalX durchgeführt wurden, sind im Anhang (Kap. 9.1) wiedergegeben.

**Tabelle 12: Primersequenzen und erwartete Produktgrößen**

Primer	Primersequenz in 5'-3' Orientierung	Primerposition <sup>a</sup>	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

(<sup>a</sup>Die 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.)

Um die Identität der amplifizierten Fragmente zu überprüfen, wurden jeweils eines kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalX mit anderen Sequenzen des Virus bzw. der internen Kontrolle, die in der Genbank (NCBI) verfügbar sind, verglichen.

### 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 MgCl<sub>2</sub> (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)
- 1 µl Nukleinsäureextrakt
- 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)

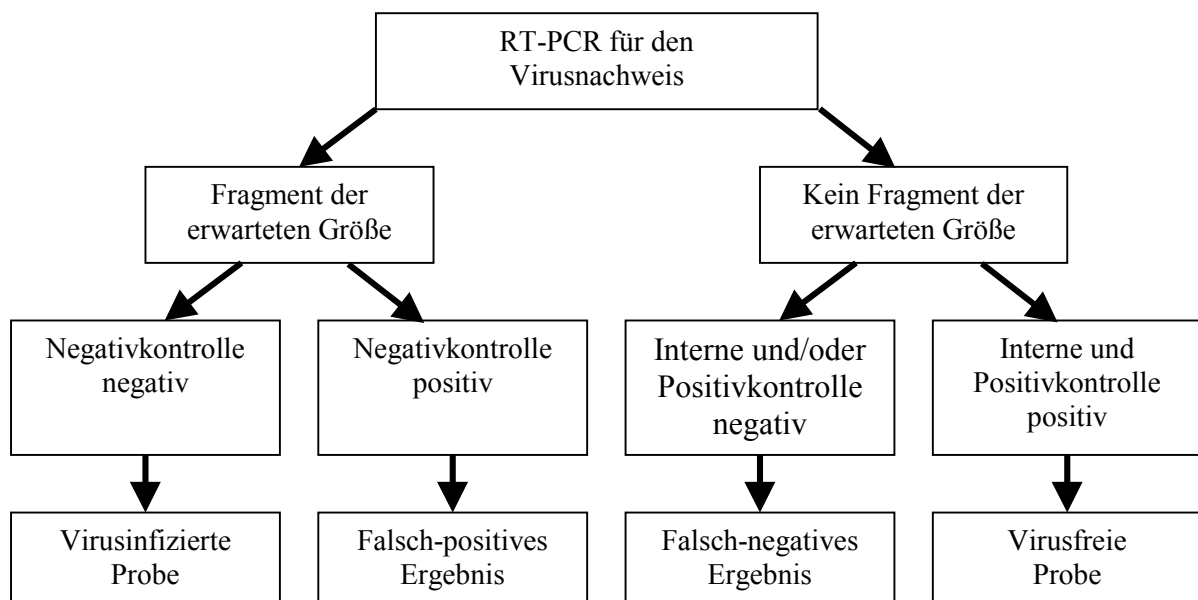
Abschlußsynthese 10 min 72°C

### **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 die Amplifizierbarkeit der einzelnen extrahierten Nukleinsäuren nicht 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 (Edwards und Gibbs, 1994). 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 Abb. 1 zusammenfassend dargestellt.



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

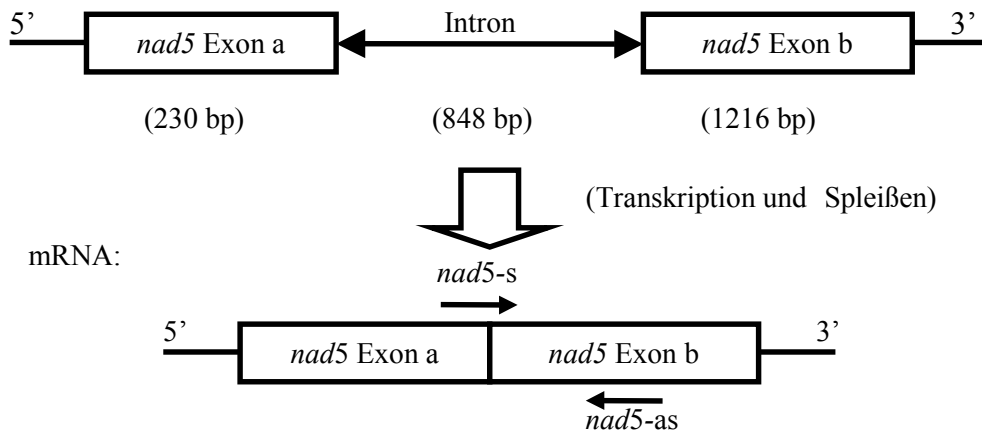
Ein Ziel dieser Arbeit war es, zur Verbesserung der Testsicherheit eine interne Kontrolle zu entwickeln, mit der spezifisch mRNA aus Gesamtnukleinsäureextrakten amplifiziert wird.

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 und Gelfand, 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).

mitochondriale DNA:



**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  $\mu$ M statt 0,04  $\mu$ 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 dieser Arten) 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 dieser Arbeit war es, neue Informationen über die Verbreitung dieser Viroide zu gewinnen. Da erst gegen Ende der Arbeit 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 (BBA Dossenheim) 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 <sup>a</sup>	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	CTGTCCCCTAGTCGAGCGGACAA	193 – 216	
antisense	AAGACGAGGCTCAGGCGGGAAGCAA	168 – 192	315 bp

(<sup>a</sup>Die 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 1 µl 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 (Lopez-Moya *et al.*, 2000), wurden andere Verfahren nicht in Betracht gezogen. Da von Anfang an zur Reduzierung des Probenumfangs das Ziel verfolgt wurde, eine multiplex RT-PCR zu entwickeln, wurde der Einsatz einer 'Hot Start' Technik notwendig. Als 'Hot Start' Techniken bezeichnet man alle Möglichkeiten, die gewährleisten,

daß die DNA Amplifikation erst nach Erreichen der gewünschten Anlagerungstemperatur der Primer beginnen kann, um Amplifikation bei niedrigeren Temperaturen durch unspezifische Anlagerung der Primer, z.B. bereits bei Raumtemperatur beim Ansetzen des Reaktionsmix, zu vermeiden. Generell unterscheidet man zwei Möglichkeiten. Zum einen kann man bei Erreichen der gewünschten Anlagerungstemperatur im ersten Zyklus einen essentiellen Bestandteil wie z.B. die *Taq* Polymerase, Primer, dNTPs oder das Template zugeben, was allerdings bei einer RT-PCR bis auf die Polymerase nicht möglich ist, da die anderen Bestandteile bereits im Schritt der Reversen Transkription benötigt werden. Werden die Reaktionsgefäße geöffnet, erhöht sich das Risiko von Kontaminationen und für große Probenzahlen ist es auch äußerst unpraktisch. Das Öffnen bei hohen Temperaturen (normalerweise zwischen 60°C und 80°C) kann zudem zu Verbrennungen der Finger führen. Zum anderen kann die *Taq* Polymerase durch Wachs separiert (Chou *et al.*, 1992) oder in inaktiver Form von Anfang an zugesetzt werden. In der Literatur sind die Verwendung von reversibel gebundenen spezifischen Antikörpern gegen die *Taq* Polymerase (Kellogg *et al.*, 1994) und ebenfalls reversible chemische Modifikationen der *Taq* Polymerase (Birch *et al.*, 1996; Kebelmann-Betzing *et al.*, 1998) beschrieben. Durch Inkubation bei höheren Temperaturen werden die so blockierten Enzyme aktiviert. Nach Innis und Gelfand (1999) führt die Methode der Separierung mittels Wax nicht immer zu reproduzierbaren Ergebnissen. Eine andere Möglichkeit zur Inaktivierung der *Taq* Polymerase bei niedrigen Temperaturen wird von Kainz *et al.* (2000) beschrieben. Sie verwendeten kurze dsDNA Fragmente, die die *Taq* Polymerase bei niedrigen Temperaturen binden und erst bei höheren Temperaturen, die zur Denaturierung der dsDNA Fragmente führen, wieder freigeben. Allerdings müssen für diese Technik die Schmelztemperatur der dsDNA Fragmente und die Anlagerungstemperaturen der Primer immer aufeinander abgestimmt sein. Für die hier entwickelte multiplex RT-PCR wurde als 'Hot Start' Enzym die HotStar *Taq* Polymerase der Firma QIAGEN ausgewählt, ein chemisch modifiziertes Enzym.

Die multiplex RT-PCR Verfahren wurden weitgehend nach den Empfehlungen von Edwards und Gibbs (1994), Henegariu *et al.* (1997) und Zangenberg *et al.*, (1999) optimiert. Dabei wurden u.a. die Konzentrationen der Bestandteile des Reaktionsansatzes (u.a. MgCl<sub>2</sub>-, Puffer-, HotStar *Taq* Polymerase- und Primerkonzentration für die einzelnen Templates) und die einzelnen Schritte des RT-PCR Programms (u.a. Anlagerungstemperatur der Primer, Extensionszeit) variiert. Einzelne Optimierungsschritte sind im Ergebnisteil exemplarisch wiedergegeben. Eine besondere Stellung haben dabei die Pufferkonzentration und Primerkonzentrationen der einzelnen Templates. Beginnend unter Standardbedingungen (1x

PCR Puffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>) mit equimolaren Primerkonzentrationen für alle Templates kann z.B. durch Erhöhen der Konzentration und/oder Reduzieren der Konzentration der Primer der stärker amplifizierten Fragmente eine annähernd gleichmäßige Amplifikation erreicht werden. Durch Variation der Pufferkonzentration, Anlagerungsdauer und Extensionsdauer ist ebenfalls eine Verschiebung der Amplifikationsverhältnisse der Fragmente möglich (Henegariu *et al.*, 1997). Unspezifische Amplifikationen können durch Variation der MgCl<sub>2</sub>-, Pufferkonzentration und Zugabe von Spezifitätsverstärkenden Substanzen (siehe hierzu auch Kap. 2.2.14) reduziert werden. Auch die Zugabe von Detergentien wie z.B. Tween-20 oder Triton X-100, die beschleunigend auf den Nukleotideinbau wirken können, kann die Spezifität erhöhen (Edwards und Gibbs, 1994). Bei Verwendung einer 'Hot Start' Technik in Kombination mit entsprechend spezifischen Primern sind nach Zangenberg *et al.* (1999) unspezifische Amplifikationen leicht zu verhindern. Da in den infizierten Proben nicht immer von einheitlichen Konzentrationsverhältnissen der Viren/Templates zueinander ausgegangen werden kann, ist generell mit schwankenden Amplifikationsergebnissen der einzelnen Fragmente zu rechnen, da jede multiplex PCR eine Konkurrenzamplifikation der einzelnen Fragmente untereinander darstellt. Desweiteren können Primer-Template Fehlpaarungen die Amplifikation beeinflussen. Die optimale Anlagerungstemperatur, die für eine maximale Spezifität und optimale Amplifikation notwendig ist, wird mit einer Gradienten RT-PCR ermittelt. Dabei werden identische Reaktionsansätze bei verschiedenen Anlagerungstemperaturen amplifiziert und die Ergebnisse gelelektrophoretisch ausgewertet. Bei der Ermittlung der optimalen Temperatur ist zwischen maximaler Bandenintensität und minimaler Hintergrundamplifikation (unspezifische Amplifikation) abzuwägen.

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 MgCl<sub>2</sub> (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)
- 1 µl Nukleinsäureextrakt
- 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)

Abschlußsynthese 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 Template 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 Spezifitätsverstärkende Zusätze zum Reaktionsansatz**

Desweiteren wurden in der Literatur beschriebene spezifitäts- und sensitivitätsverstärkende Substanzen getestet. Diese Substanzen beeinflussen das Schmelzverhalten der DNA und können dadurch dazu führen, daß unspezifische Amplifikationen unterdrückt und die spezifischen Amplifikationen gefördert werden. Nach Chakrabarti und Schutt (2001) ist über die exakte Wirkungsweise der Substanzen bis heute sehr wenig bekannt und die tatsächliche Effizienz je nach Primer/Template Kombination sehr unterschiedlich. Daß die Anwendbarkeit im Einzelfall überprüft werden muß, wird auch von anderen Autoren beschrieben (Sakar *et al.*, 1990; QIAGEN, 1999). Eingesetzt wurden der vom Hersteller der HotStar *Taq* Polymerase mitgelieferte Spezifitätsverstärker Q-Solution (QIAGEN, 1999), Tetramethylammoniumchlorid, dessen spezifitätsverstärkende Wirkung von Chevet *et al.* (1995) beschrieben wurde sowie Formamid nach den Empfehlungen von Sakar *et al.* (1990) und das von Kovarova und Draber (2000) verwendete Tetramethylammoniumoxalat, welches durch Neutralisation von Tetramethylammoniumhydroxyd mit Oxalsäure bis zu einem pH Wert von 8,3 hergestellt wird.

#### **2.2.15 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 verschiedene 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  $\lambda$ -*PstI* 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  $\mu$ g/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

### **2.2.16 Herstellung des $\lambda$ -*PstI* DNA Standards**

Es werden 140  $\mu$ l  $\lambda$ -Phagen-DNA (0,4 mg/ml), 4  $\mu$ l *PstI* (10 U/ $\mu$ l) und 30  $\mu$ l 10x NEB-Puffer 3 mit A. bidest. auf 300  $\mu$ 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  $\mu$ l Stopplösung zugegeben, die Lagerung erfolgt bei -20°C.

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

#### Fragmentlängen der *Pst*I verdauten $\lambda$ -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	

#### **2.2.17 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  $\mu$ l QX 1-Puffer bis zum vollständigen Lösen des Gelstücks geschüttelt. Nach der Zugabe von 10  $\mu$ l Glasmilch, an die sich 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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.

#### **2.2.18 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. 2.2.17 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. 2.2.17 beschriebenen Methode aufgereinigt.

#### Spaltungsansatz für Vektoren:

- 6 µg pBluescript II SK<sup>-</sup>
- 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 µl 10x Restriktionsenzym-Puffer
- auf 30 µl A. bidest.

#### Thymidierungsansatzes:

- 3 µl *Taq* DNA-Polymerase (1 U/µl)
- 9 µl 10x PCR Puffer
- 9 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 2 µl 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. 2.2.19) eingesetzt.

### Ligationsansatz:

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

### **2.2.19 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. 2.2.24), 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 µl Magnesiumlösung überführt. Die Bakterien werden bei 180 upm und 37°C im Schüttler bis zu einer OD<sub>550nm</sub> 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. 2.2.18) 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. 2.2.20) eingesetzt.

Magnesiumlösung:

- 1 M MgCl<sub>2</sub>
- 1 M MgSO<sub>4</sub>

Transformationspuffer (pH 6,2):

- 0,1 M RbCl
- 45 mM MnCl<sub>2</sub>
- 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 10 mM MES (mit 10 M KOH auf pH 6,3 eingestellt)
- 3 mM HaCoCl<sub>3</sub>

DND-Lösung (pH 7,5):

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

### **2.2.20 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  $\alpha$ -Komplementation bezeichnet.

Aliquote von 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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. 2.2.21) und anschließenden Restriktionsverdau (Kap. 2.2.22) zu überprüfen, bevor die Aufreinigung für die Auftragssequenzierung vorgenommen wird (Kap. 2.2.23).

### **2.2.21 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  $\mu$ l Lösung A resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 400  $\mu$ l Lösung B dazugegeben, kurz gemischt und mit 300  $\mu$ l 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  $\mu$ l EtOH<sub>abs.</sub> (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  $\mu$ l 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

#### RNase-Lösung:

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

### **2.2.22 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  $\lambda$ -*Pst*I DNA Standard eine Kontrolle der Plasmid-DNA erfolgen.

#### Reaktionsansatz:

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

### **2.2.23 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 µl Puffer PE gewaschen (30 sek, 13000 upm) und für 1 min trocken zentrifugiert (13000 upm). Die DNA wird abschließend mit 50 µl Puffer EB 1 min eluiert und dann abzentrifugiert. Die Zusammensetzungen der Puffer sind vom Hersteller nicht angegeben.

### **2.2.24 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 µl der Bakterienlösung mit 675 µl 87%-igem Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert. Die Bakterien können nach dem Auftauen sofort in den entsprechenden Medien weiterkultiviert werden.

### **2.2.25 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. Es 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.

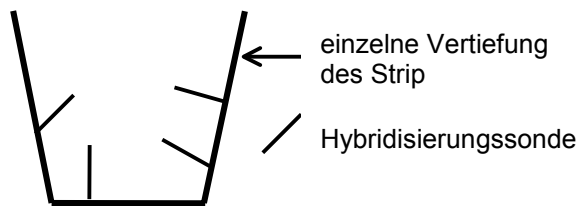
Zur Beschichtung der Oberflächen der Vertiefungen mit den Capture-Oligonukleotiden werden 100 µl Kopplungslösung in den einzelnen Vertiefungen für 5 h oder über Nacht bei 50° C inkubiert. Die Nukleinsäuresequenzen der Capture-Oligonukleotide sind in Tab. 15 und die Alignments der relevanten Bereiche der zur Oligonukleotidwahl verwendeten Virussequenzen sind im Anhang (Kap. 9.1) wiedergegeben. Im Anschluß an die Kopplung 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 Absorptionswerte 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.

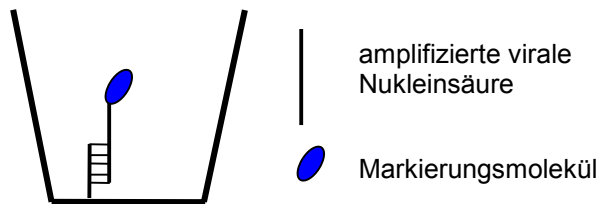
**Tabelle 15: Capture-Oligonukleotid Sequenzen und Position**

Capture Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3' Orientierung <sup>a</sup>	Position <sup>b</sup>
<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>	CAAAGAAGAAGTCAAAGCTGCATACCT	8947-8974
<i>Apple mosaic virus</i>	AGTAATCCGAAAGGTCCGAATCCGAT	1534-1559
<i>nad5</i>	CTATGCGGATCCTCGGACATATATG	1910-1934

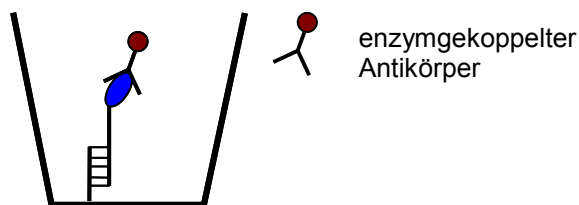
(<sup>a</sup>Die Capture-Oligonukleotide tragen eine freie Phosphatgruppe am 5'-Ende. <sup>b</sup>Die Referenz Accession-Nummern (NCBI Genbank, National Center for Biotechnology Information) für die Bestimmung der Positionen sind D14996 für *Apple chlorotic leaf spot virus*, D21829 für *Apple stem pitting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



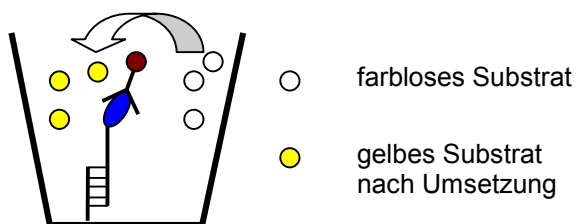
- Kopplung der Hybridisierungssonden an die Oberfläche der Vertiefungen des NucleoLink-Strips (parallel dazu RT-PCR)



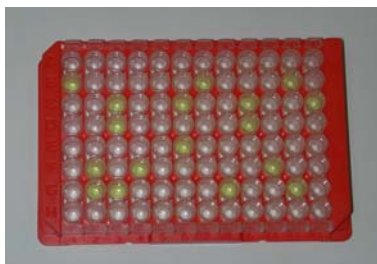
- Hybridisierung der amplifizierten viralen Nukleinsäuren in den einzelnen Vertiefungen



- Detektion der hybridisierten Nukleinsäuren über die Markierungen mit enzymgekoppelten Antikörpern



- Zugabe des farblosen Substrates, welches durch das Enzym umgesetzt werden kann



- Identifizierung der infizierten Proben anhand der Gelbfärbung der zugehörigen Vertiefungen

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

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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 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

### **2.2.26 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. 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### **2.2.27 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.

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.

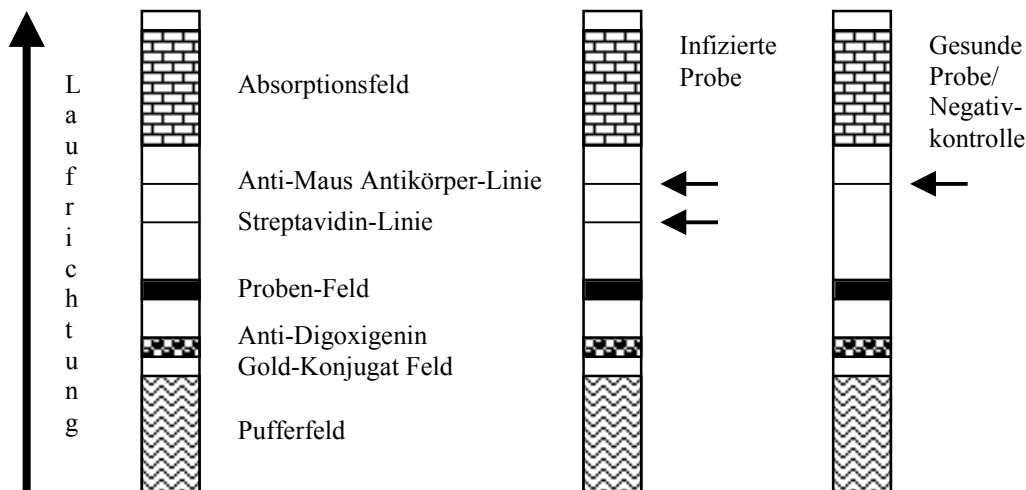


Abbildung 4: Schematische Darstellung der DIG-Detection Test-Strips (Roche)

## 2.2.28 Untersuchungen zur Ätiologie der Gummiholzkrankheit (ARW)

### 2.2.28.1 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 (Ahrens und Seemüller, 1992; Schaff *et al.*, 1992; Smart *et al.*, 1996). Eine Übersicht über die Nachweismöglichkeiten von Phytoplasmen wird von Adams *et al.* (2001) gegeben. Bei den PCR basierten Techniken wurden die Primer meist 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. In neueren Veröffentlichungen werden immer häufiger nested PCR Verfahren eingesetzt, da diese eine deutlich höhere Sensitivität besitzen (Lee *et al.*, 1994; Bertaccini *et al.*, 1998; Heinrich *et al.*, 2001). 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 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.*, 2001). Die 3 Verfahren unterscheiden sich wesentlich in der Nukleinsäureextraktionsmethode und den verwendeten Primerpaaren, sollen aber alle spezifisch und universell für Phytoplasmen einsetzbar sein.

### 2.2.28.1.1 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                    MgCl<sub>2</sub> (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)

Abschlußsynthese 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



### **2.2.28.1.2 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 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- 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 2.2.28.1.1 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)

Abschlußsynthese 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

### **2.2.28.1.3 Nested PCR nach Heinrich *et al.* (2001)**

#### 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 2.2.28.1.1 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)

Abschlußsynthese 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)

Abschlußsynthese 10 min 72°C

**Tabelle 18: Primer nach Heinrich *et al.* (2001)**

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

### **2.2.28.2 Nachweistechiken für nicht charakterisierte Viren**

Aufgrund der selbst gewonnen Ergebnisse mittels drei verschiedener nested PCR Verfahren, bei denen keine eindeutige Assoziation von Phytoplasmen mit ARW gezeigt werden konnte, 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, so daß mehrere, im folgenden beschriebene Techniken parallel eingesetzt wurden.

### **2.2.28.2.1 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 Pyoloform 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                     $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 M)
- 61,2 ml                     $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,5 M)
- auf 500 ml                A. bidest.

### **2.2.28.2.2 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 gleichen 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.

### **2.2.28.2.3 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.



#### **2.2.28.2.4 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 jeweils 24 h wurde die Bakteriensuspension 3 mal wieder aufgefüllt. Bei den Kontrollbäumen wurde mit Wasser inokuliert.

#### **2.2.28.2.5 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<sub>abs</sub> 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 (1 U/µl) 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin werden 0,2 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> 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

#### **2.2.28.2.6 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 Nukleinsäuren im Filtrat enzymatisch zu verdauen. Die viralen Nukleinsäuren bleiben durch ihre Proteinhülle geschützt unverdaut. Im Anschluß daran werden die viralen Nukleinsäuren extrahiert und stehen ohne Verunreinigungen mit Wirtsnukleinsäuren zur Verfügung. Anschließend werden die Nukleinsäuren 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 Nukleinsäuren-enthaltende 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 Nukleinsäuren 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 4 µl 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**

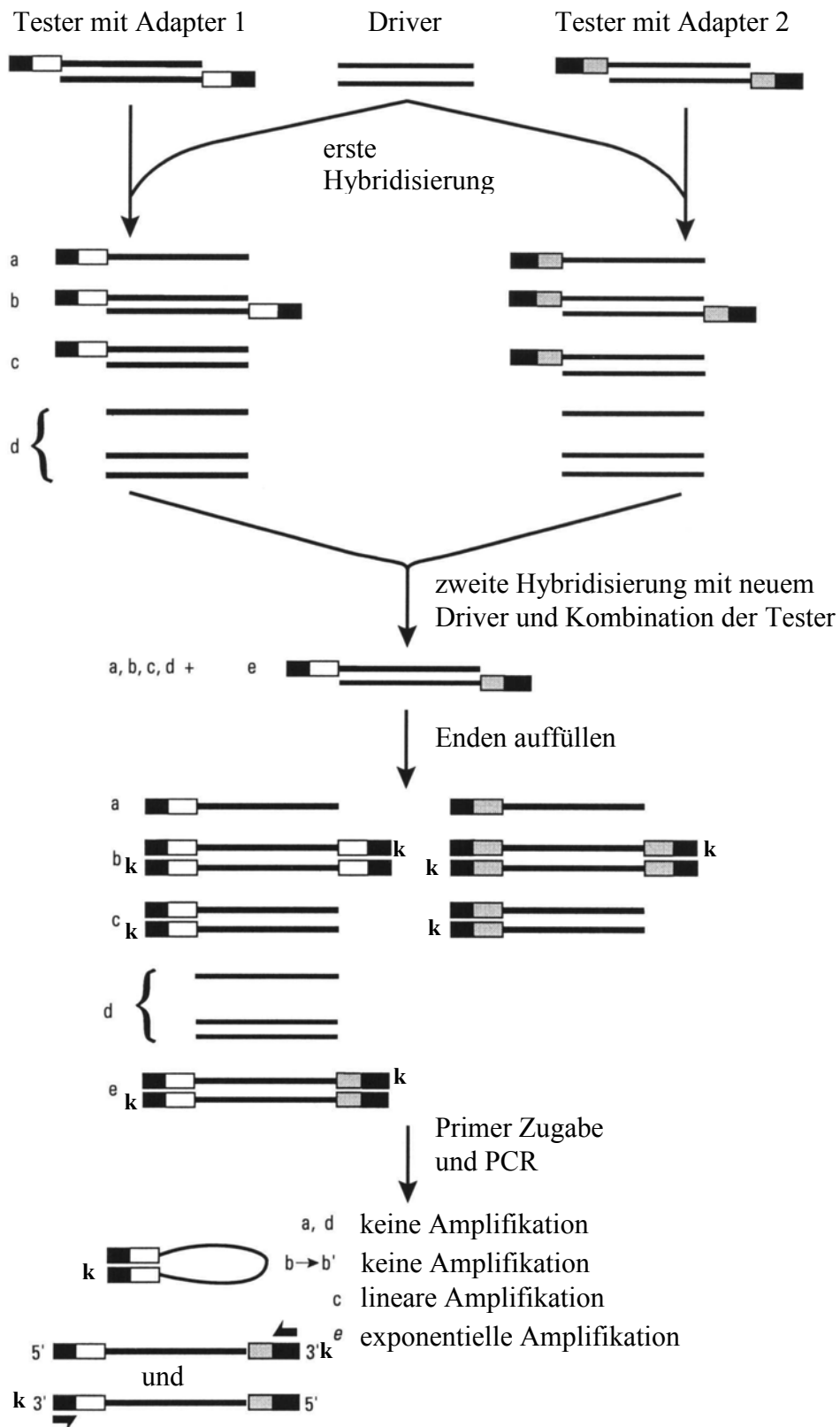
Bezeichnung	Nukleinsäuresequenz
NBam24	AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG
NCsp	TACTCCCTCGG

#### **2.2.28.2.7 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).

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 Subtraction 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 Klone 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.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der cDNA-Subtraktion**

(Die Abbildung wurde dem Handbuch entnommen [Clontech, 2000] und übersetzt. Die komplementären Bereiche nach dem Auffüllen der überstehenden Enden sind mit einem "k" gekennzeichnet.)

### 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 <sub>(30)</sub> N <sub>(-1)</sub> N
5' PCR Primer II A	AAGCAGTGGTATAACGCAGAGT

(N: A, C, G, T; N<sub>(-1)</sub>: 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	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT
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	TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT
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 2.2.18 beschrieben). Die Transformation erfolgte mit XL1-Blue MRF<sup>+</sup> 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 MgCl<sub>2</sub> (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 Hybridisierungsofen 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 weitere 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 Fixierbad 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

### **2.2.28.2.8 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 gleichlanger linearer RNA separiert wird.

Die Umkehrgelelektrophorese wurde mangels eigener Ausstattung und Erfahrung für diese Technik von Herrn Dr. Kruse am Landespflanzenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern in Rostock durchgeführt. Dabei wurde 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 Apfelvirusnachweis**

Die Primer für den Apfelvirusnachweis wurden anhand der in Kap. 2.2.9 dargestellten Kriterien ausgewählt. Für alle Viren wurden zu Beginn der Arbeit mehrere Primerpaare/Primerkombinationen erprobt, bis jeweils ein in der RT-PCR optimal einsetzbares Paar gefunden wurde. Die Sequenzen der ausgewählten Primerpaare sind in Tab. 12 (Kap. 2.2.9) angegeben.

#### **3.1.1 Optimiertes Extraktionsverfahren**

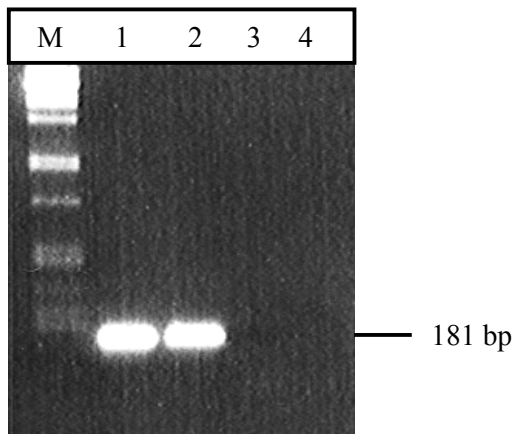
Zu Beginn der Arbeit wurde nach einem geeigneten Extraktionsverfahren gesucht, was einen schnellen, zuverlässigen RT-PCR basierten Nachweis der Viren und Viroide aus Apfel ermöglicht. Zudem sollte es bezüglich des verwendeten Pflanzenmaterials unabhängig von der Jahreszeit einsetzbar sein, um die Nachweise ganzjährig durchführen zu können. Ausgewählt wurde eine Silica-Extraktion, die sich nach wenigen Modifikationen (Ersatz von GSCN durch GHCl, Ausschluß von 2-MeEtOH) für einen Routinenachweis als geeignet erwiesen hat. 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) war durchweg erfolgreich, d.h. die erwarteten Fragmente konnten zuverlässig 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 gehandelte Reiser ohne vorheriges Antreiben zu testen. Während des Zeitraums der Arbeit 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. Die Nukleinsäureextrakte wurden

teilweise über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren (Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) wiederholt in der RT-PCR eingesetzt, ohne daß ein negativer Einfluß der langen Lagerzeit und wiederholter Auftauzyklen auf die Amplifikation beobachtet wurde. Einzelne Extrakte wurden als Kontrollen in der RT-PCR vollständig aufgebraucht, was bis zu 100 Auftauzyklen entspricht. Die Erprobung der Schnellextraktionsmethode (Kap. 2.2.6), 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).

### 3.1.2 Interne Kontrolle

Auf die Notwendigkeit von Kontrollen in der RT-PCR wurde in Kap. 2.2.11 hingewiesen.

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 (Tab. 13). 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:  $\lambda$ -*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. Um die Amplifikation des endogenen Templates zu begrenzen, wurde die Primerkonzentration für die multiplex RT-PCR auf 0,04  $\mu$ 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.

### **3.1.3 Multiplex RT-PCR**

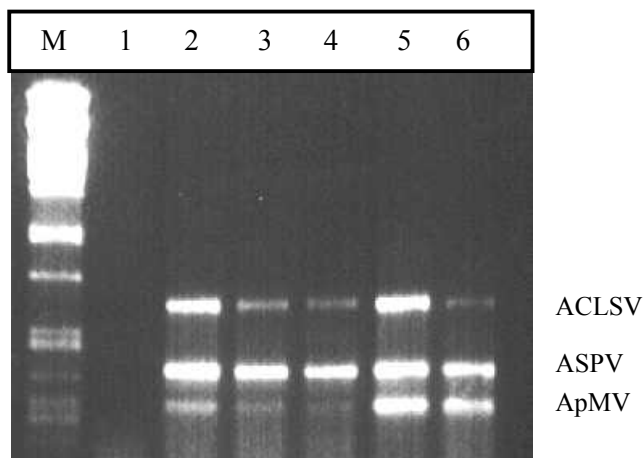
Zu Beginn wurden für jedes Virus anhand der verfügbaren Sequenzinformationen Alignments durchgeführt, um möglichst stark konservierte Bereiche zu ermitteln, in welche dann die Primersequenzen gelegt wurden. Die Notwendigkeit des Nachweises mehrerer Viren aus einer Pflanze/einem Nukleinsäureextrakt eröffnet die Möglichkeit der Anwendung der multiplex RT-PCR. Dabei wird beim spezifischen Nachweis pro Template ein virusspezifisches Primerpaar verwendet. Während der Durchführung dieser Arbeit sind für alle vier Viren viele neue Sequenzen in der Genbank (NCBI) verfügbar geworden. Im Anhang sind sämtliche Fehlpaarungen der Primer und Capture Oligonukleotide mit den Sequenzen der Genbank wiedergegeben (Kap. 9.1). Die Anzahl der Fehlpaarungen ist insgesamt niedrig und es treten überhaupt keine Fehlpaarungen auf den Positionen der letzten beiden Nukleotide der Primer am 3'-Ende auf. Nur in einem Fall, nämlich für den antisense Primer für ASPV mit dem Isolat mit der Accession Nummer AB045371, sind drei Fehlpaarungen für einen Primer vorhanden. Auch für die Capture Oligonukleotide treten nur in einem Fall mehr als 2 Fehlpaarungen auf. Auch in diesem Fall für ASPV, aber diesmal im Vergleich zur Sequenz eines selbst amplifizierten und klonierten Isolates. Trotz der 3 Fehlpaarungen war ein eindeutiger Nachweis dieses Isolats im multiplex RT-PCR-ELISA möglich.

#### **3.1.3.1 Ergebnisse aus der Entwicklung der multiplex RT-PCR**

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. Wie bei den PCR Produkten in Abb. 7 zu erkennen ist, ist nur bei der Amplifikation der Proben aus Spur 2 und 5 eine annähernd gleichmäßige Bandenintensität erreicht worden.

Die Proben von Spur 3 und 4 zeigen nur ein deutliches ASPV Fragment, das ACLSV Fragment ist sehr schwach und das ApMV Fragment nur schwer zu identifizieren. Gleiches gilt für das ACLSV Fragment aus Spur 7, hier sind aber ApMV und ASPV annähernd gleich stark amplifiziert worden.

In Abb. 8 sind die Amplifikate beim Einsatz verschiedener Pufferkonzentrationen und in Abb. 9 bei der Variation der MgCl<sub>2</sub> Konzentration am Reaktionsansatz jeweils beim parallelen Nachweis der Viren ACLSV, ASPV, und ApMV aus Extrakten 3-fach infizierter Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt dargestellt.

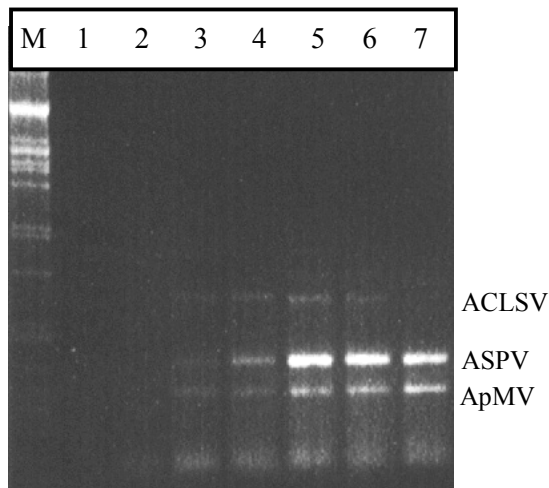


**Abbildung 7: Paralleler Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben** (M:  $\lambda$ -*Pst*I DNA Standard; Spur 1: Negativkontrolle; Spuren 2-6: RT-PCR Produkte von verschiedenen 3-fach infizierten Proben)

Entsprechend den Empfehlungen verschiedener Autoren (siehe hierzu Kap. 2.2.13) wurde versucht, das Verfahren dahingehend zu optimieren, daß alle Fragmente in eindeutig identifizierbarer Intensität amplifiziert werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse einzelner Optimierungsschritte exemplarisch zur Veranschaulichung wiedergegeben.

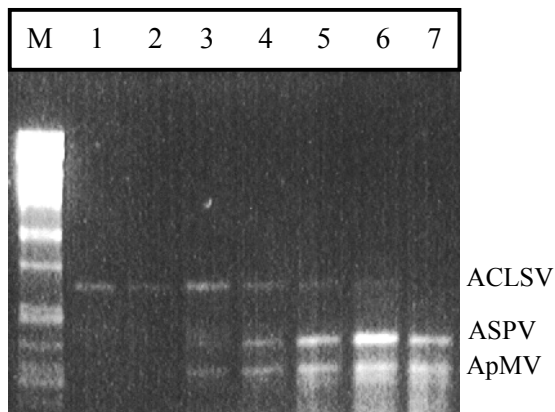
Abb. 8 zeigt, daß bei einer Pufferkonzentration von 0,5x und 0,75x keine virusspezifischen Banden auf dem Gel zu erkennen sind. Von 1,0x bis 1,5x nehmen die Intensitäten aller virusspezifischen Banden zu, allerdings auch die unspezifischen Amplifikationen, die als Schmier zwischen den Banden und im kurzketigen Bereich erkennbar sind. Bei einer Pufferkonzentration von 1,75x ist die Bande des ACLSV Fragments deutlich abgeschwächt, bei 2x nicht mehr erkennbar. Die Banden der Fragmente von ASPV und ApMV sind bei 1,75x und 2x demgegenüber von unveränderter Intensität. Für den Standardreaktionsansatz wurde eine Pufferkonzentration von 1,5x ausgewählt.





**Abbildung 8: Einsatz verschiedener Pufferkonzentrationen beim parallelen Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben**

(M:  $\lambda$ -*Pst*I DNA Standard; eingesetzte Pufferkonzentrationen in Spuren 1-7: 0,5x, 0,75x, 1x, 1,25x, 1,5x, 1,75x, 2x)



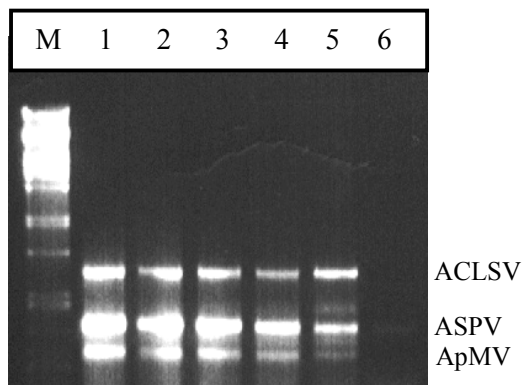
**Abbildung 9: Einsatz verschiedener  $MgCl_2$  Konzentrationen beim parallelen Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben**

(M:  $\lambda$ -*Pst*I DNA Standard; Spur 1: Negativkontrolle; eingesetzte  $MgCl_2$  Konzentrationen in Spuren 1-7: 1,5 mM, 1,75 mM, 2,0 mM, 2,25 mM, 2,5 mM, 2,75 mM, 3,0 mM; Pufferkonzentration 1x)

Wie in Abb. 9 gezeigt, wurde bei niedrigen  $MgCl_2$  Konzentrationen von 1,5 mM und 1,75 mM nur das größte der drei Fragmente (ACLSV) amplifiziert, die Banden von ASPV und ApMV waren auf dem Gel dagegen nicht erkennbar. Im Konzentrationsbereich von 2,0 mM bis 2,75 mM sind alle Fragmente in unterschiedlicher Intensität amplifiziert worden und bei 3 mM  $MgCl_2$  war dagegen die Bande des ACLSV Fragments nicht mehr auf dem Gel identifizierbar. Die Bandenintensitäten nehmen von 2,0 mM bis 2,75 mM zwar zu, allerdings

werden auch die unspezifischen Amplifikationen deutlich stärker. Für den Standardreaktionsansatz wurde eine  $MgCl_2$  Konzentration von 2,5 mM gewählt.

Desweiteren wurden aus der Literatur als spezifitäts- und sensitivitätsverstärkend wirkende Substanzen, die das Schmelzverhalten der DNA beeinflussen, entsprechend den Autorenangaben getestet (siehe Kap. 2.2.14). In Abb. 10 ist exemplarisch die Wirkung unterschiedlicher Mengen Q-Solution (QIAGEN, 1999) im Reaktionsansatz beim Nachweis 3-fach infizierter Proben getestet worden.



**Abbildung 10: Einsatz verschiedener Mengen Q-Solution beim parallelen Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben**

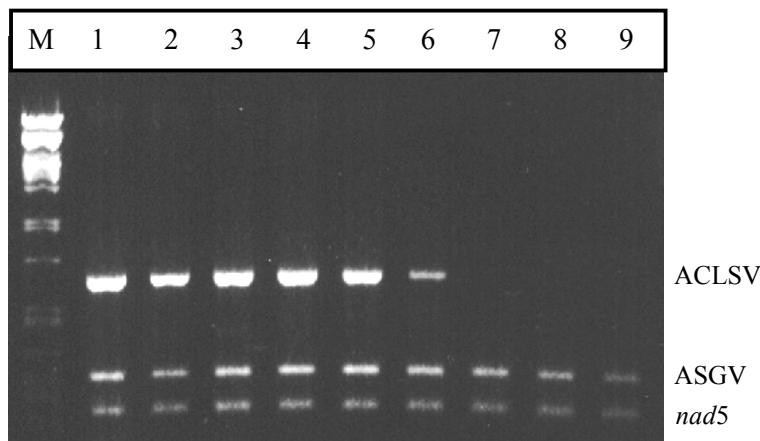
(M:  $\lambda$ -PstI DNA Standard; Spur 1: Kontrolle ohne Zusatz; eingesetzte Mengen Q-Solution in Spuren 2-5: 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l, 5  $\mu$ l; Spur 6: Negativkontrolle ohne Zusatz von Q-Solution)

Für keine der verwendeten Substanzen konnte im Laufe der Entwicklung der multiplex RT-PCR für die von den Autoren beschriebenen Konzentrationen der Substanzen im Reaktionsansatz eine spezifitäts- oder sensitivitätsverstärkende Wirkung festgestellt werden, in allen Fällen wurden die Bandenintensitäten im Vergleich zu den Kontrollen ohne Zugabe abgeschwächt, teilweise die Amplifikation unspezifischer Banden sogar gefördert.

Die Ergebnisse der einzelnen Optimierungsschritte beim parallelen Nachweis von 3 Viren haben gezeigt, daß ein zuverlässiger Nachweis aus Mischinfektionen nicht immer möglich ist. Da zusätzlich ASGV und 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 identische multiplex Nachweise (nur die virusspezifischen Primer müssen ausgetauscht werden) für je 2 Viren plus interne Kontrolle entwickelt, um die notwendige Zuverlässigkeit zu gewährleisten.

### 3.1.3.2 Gradienten multiplex RT-PCR

Zur Ermittlung der maximalen Anlagerungstemperatur der entwickelten multiplex RT-PCR I (zum Nachweis von ACLSV, ASGV und der internen Kontrolle *nad5*) und II (zum Nachweis von ASPV, ApMV und der internen Kontrolle *nad5*) wurde ein Temperaturgradient für den Anlagerungsschritt der Primer verwendet. Dazu wurde das Nukleinsäureextrakt einer mit allen 4 Viren infizierten Probe eingesetzt. In Abb. 11 und 12 sind die PCR Produkte der beiden multiplex RT-PCR Verfahren gelelektrophoretisch aufgetrennt wiedergegeben.

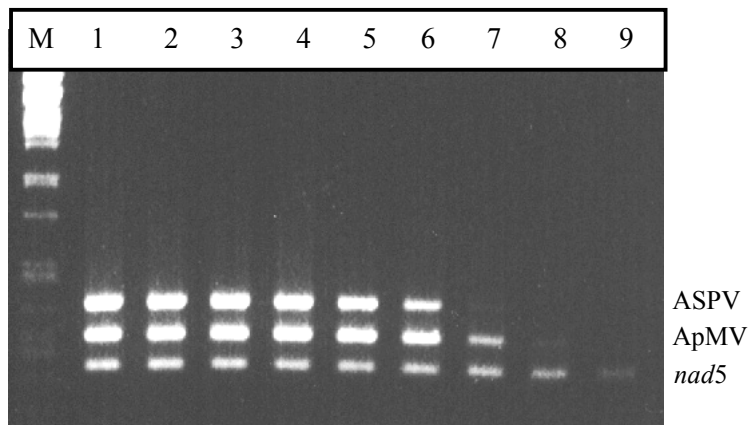


**Abbildung 11: Einsatz verschiedener Anlagerungstemperaturen für multiplex RT-PCR I**

(M:  $\lambda$ -PstI DNA Standard; Anlagerungstemperaturen von Spur 1-9: 56,2°C, 57,5°C, 59,2°C, 61,4°C, 63,9°C, 66,1°C, 67,7°C, 68,9°C, 70°C)

In Abb. 11 ist zu erkennen, daß für ACLSV ab einer Anlagerungstemperatur von 66,1°C die Intensität der Bande und somit die Effizienz der Amplifikation reduziert ist, ab einer Temperatur von 67,7°C ist keine ACLSV spezifische Bande mehr auf dem Gel erkennbar. Die Bande der spezifischen Fragmente von ASGV und der internen Kontrolle *nad5* sind ab 67,7°C zwar abgeschwächt, aber auch bei 70°C noch erkennbar.

Abb. 12 zeigt, daß die Amplifikation der spezifischen Fragmente von ASPV ab 66,1°C und ApMV ab 67,7°C abgeschwächt ist und für ASPV ab 68,9°C und ApMV bei 70°C nicht mehr auf dem Gel als Bande identifizierbar sind. Wie in Abb. 12 dargestellt, ist auch in multiplex RT-PCR II für die interne Kontrolle bei 70°C noch eine gegenüber niedrigeren Temperaturen abgeschwächte spezifische Bande im Gel identifizierbar.

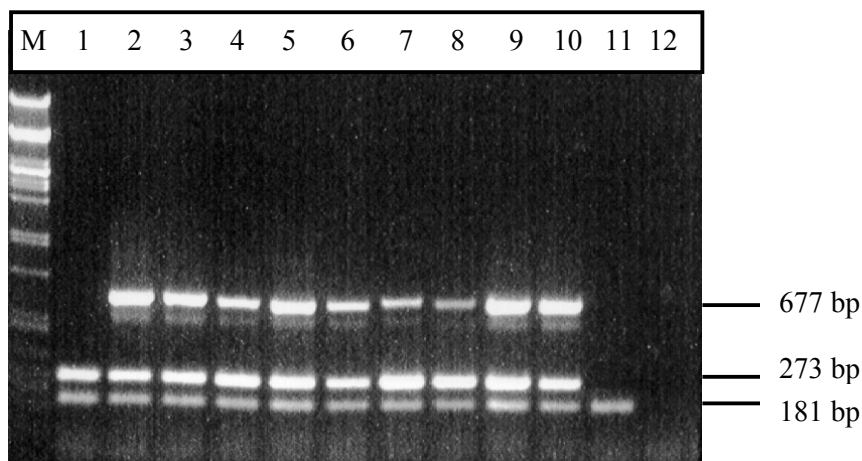


**Abbildung 12: Einsatz verschiedener Anlagerungstemperaturen für multiplex RT-PCR II**

(M:  $\lambda$ -*Pst*I DNA Standard; Anlagerungstemperaturen von Spur 1-9: 56,2°C, 57,5°C, 59,2°C, 61,4°C, 63,9°C, 66,1°C, 67,7°C, 68,9°C, 70°C)

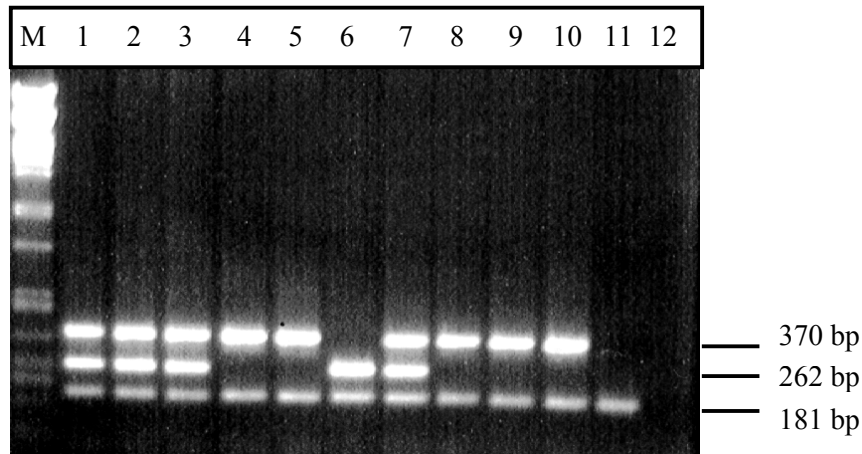
### 3.1.3.3 Erprobung mit verschiedenen Virusherkünften

Die entwickelten multiplex RT-PCR I und II wurden erfolgreich an einem größeren Probenumfang unterschiedlicher geographischer Herkunft (u.a. Deutschland, Großbritannien, Frankreich, Schweiz, Italien) und zusätzlich unterschiedlichen Wirtspflanzen der Viren (*Prunus*, *Pyrus*, *x Pyronia*) getestet und optimiert. In Abbildung 13 (multiplex RT-PCR I für ACLSV und ASGV) und 14 (multiplex RT-PCR II für ASPV und ApMV) ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate von verschiedenen mischinfizierten Proben dargestellt.



**Abbildung 13: Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von ACLSV und ASGV mittels multiplex RT-PCR I**

(Spur M:  $\lambda$ -*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)



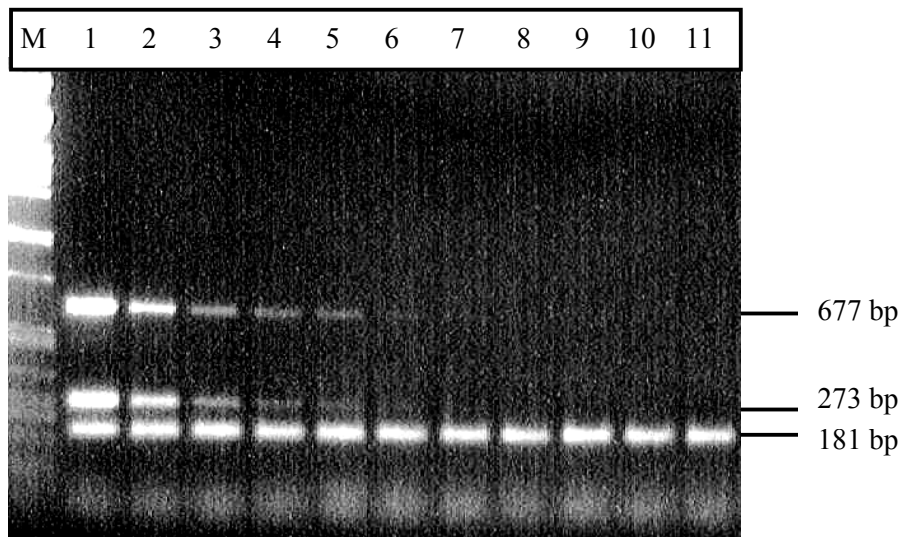
**Abbildung 14: Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von ASPV und ApMV mittels multiplex RT-PCR II**

(Spur M:  $\lambda$ -*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. Alle mittels holziger Indikatoren festgestellten Infektionen konnten bestätigt werden.

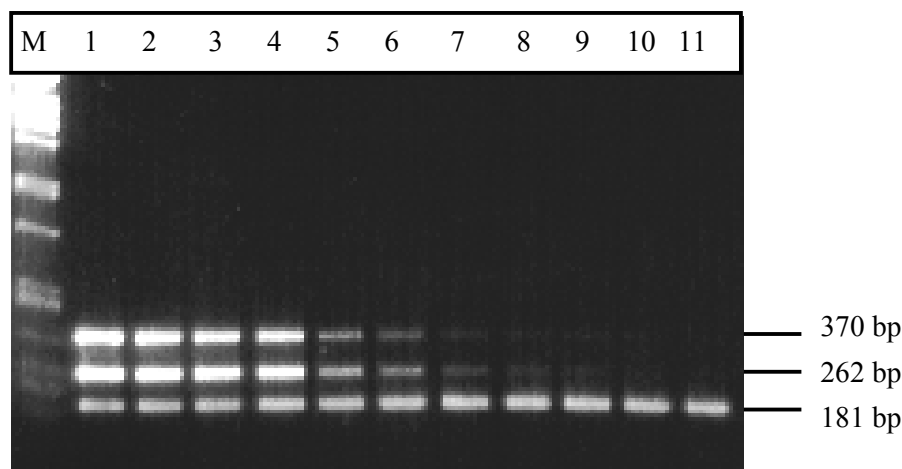
#### 3.1.3.4 Ermittlung der Detektionsgrenzen

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. Da hierbei die Bestimmung der relativen Sensitivität für den Einsatz von Mischproben in der Praxis im Vordergrund stand, wurde auf den Einsatz definierter Mengen viraler RNA verzichtet. Die Abbildungen 15 und 16 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 15: Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR I für ACLSV und ASGV**

(Spur M:  $\lambda$ -*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)



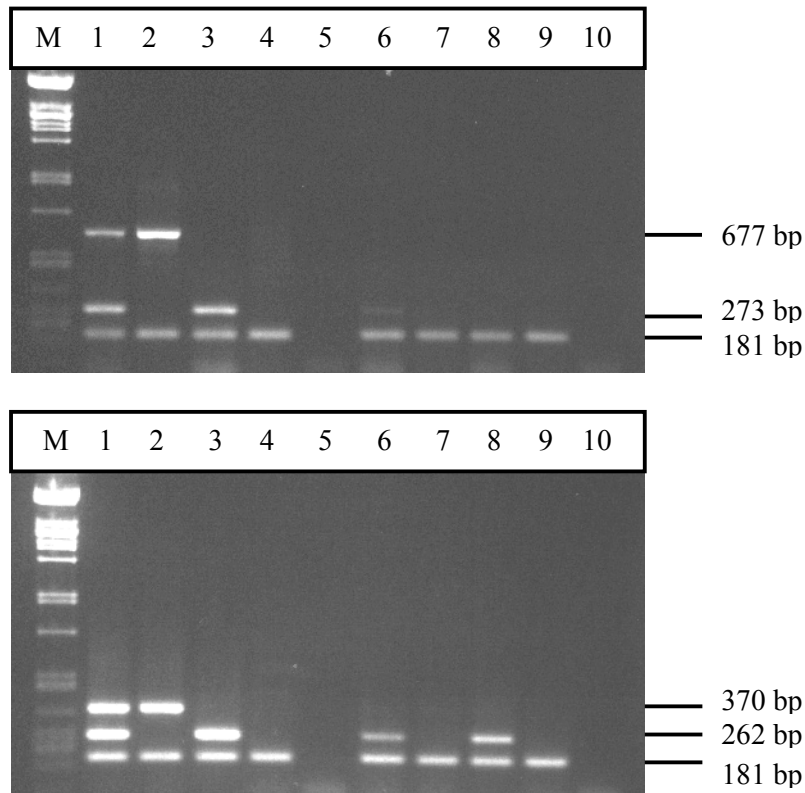
**Abbildung 16: Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR II für ASPV und ApMV**

(Spur M:  $\lambda$ -*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, so daß eine Mischung von maximal 40 Proben zum Nachweis einer infizierten Probe daraus möglich wäre.

### 3.1.3.5 Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen

Um eine Ersetzbarkeit der verwendeten HotStar *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN) zu überprüfen, 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. 17 wiedergegeben.



**Abbildung 17: Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen für multiplex RT-PCR I (oberes Gel) und II (unteres Gel)**

(Spuren M:  $\lambda$ -*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.)

Bei Verwendung der Hot Prime *Taq* sind die Bandenintensitäten der virusspezifischen Banden 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.

### 3.1.3.6 Sequenzvergleiche der sequenzierten amplifizierten Fragmente mit Sequenzen der Genbank (NCBI)

Zur Überprüfung der tatsächlichen Identität der amplifizierten Fragmente wurden alle 5 verschiedenen PCR-Produkte der multiplex RT-PCR I und II mittels T/A-Klonierung kloniert und anschließend sequenziert (Auftragssequenzierung MWG Biotech). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit in der Genbank (NCBI) verfügbaren Sequenzen der entsprechenden Viren/internen Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse der Vergleiche sind in Tab. 25 wiedergegeben, die erhaltenen Sequenzen sind im Anhang zu finden (Kap. 9.2).

**Tabelle 25: Ergebnisse der Sequenzvergleiche mit Sequenzen der Genbank (NCBI)**

	ACLSV	ASGV	ASPV	ApMV	<i>nad5</i>
Sequenzidentitäten	78%-93%	82%-97%	86%-88%	93%-95%	98%

(Die Accession-Nummern [NCBI] der für die Vergleiche verwendeten Sequenzen sind für ACLSV D14996, M58152, AJ243438 und X99752, für ASGV AF438409, D16368, D14995 und AF465354, für ASPV AF345892, AF345893, D21828 und D21829, für ApMV U15608, AY125977, S78319 und AF473596 und für *nad5* D37958.)

Die Sequenzvergleiche zeigen, daß für die amplifizierten Bereiche sehr unterschiedliche Identitäten (78% bis 98%) mit den Sequenzen der Genbank vorliegen. Die teilweise niedrigen Sequenzidentitäten ergeben sich auch für die entsprechenden Bereiche der in der Genbank (NCBI) verfügbaren Sequenzen untereinander.

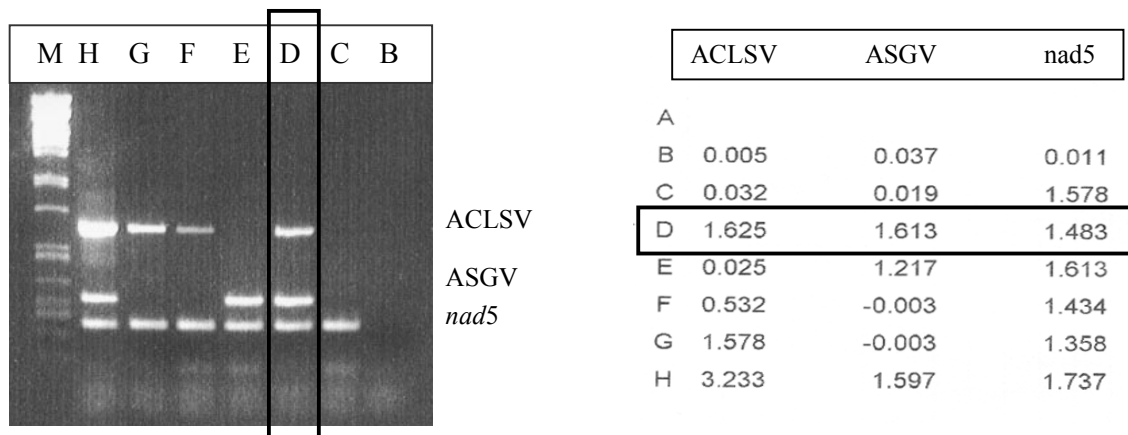
### 3.1.4 Multiplex RT-PCR-ELISA

Die entwickelten multiplex RT-PCR-ELISA Nachweise I und II (Kap. 2.2.25) sind an einer Vielzahl von Isolaten getestet worden. Dabei wurden die Amplifikate jeweils zum Vergleich gelelektrophoretisch aufgetrennt und im ELISA eingesetzt.

In Abb. 18 und 19 ist exemplarisch an Proben mit verschiedenem Infektionsstatus und Negativkontrollen die Auswertung von Gelelektrophorese und ELISA für multiplex RT-PCR

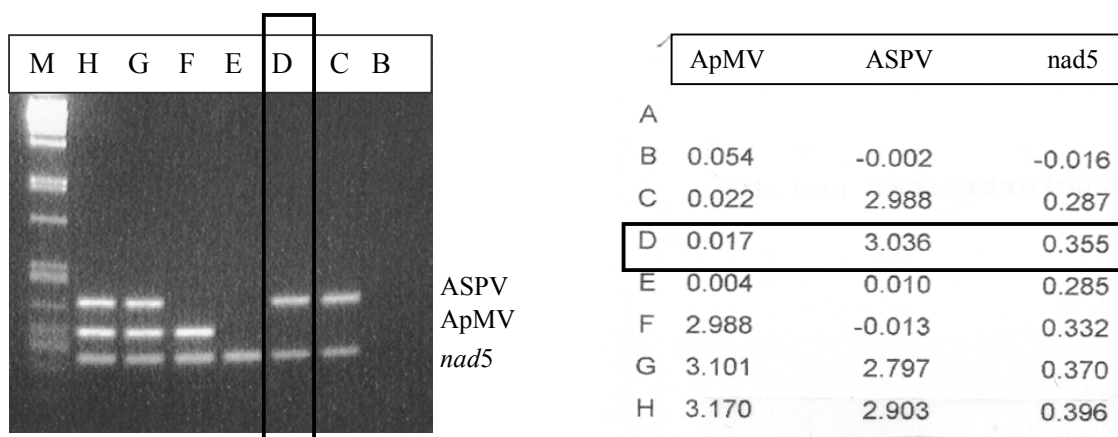


I und II gegenübergestellt. Die negativen Meßwerte ergeben sich durch den Abzug des Mittelwertes der Substratkontrollen von allen Meßwerten.



**Abbildung 18: Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR I mittels Gelelektrophorese und ELISA**

(Dargestellt sind ein Gelphoto und der Ausdruck der Absorptionsmeßwerte der gleichen 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:  $\lambda$ -*PstI* DNA Standard)

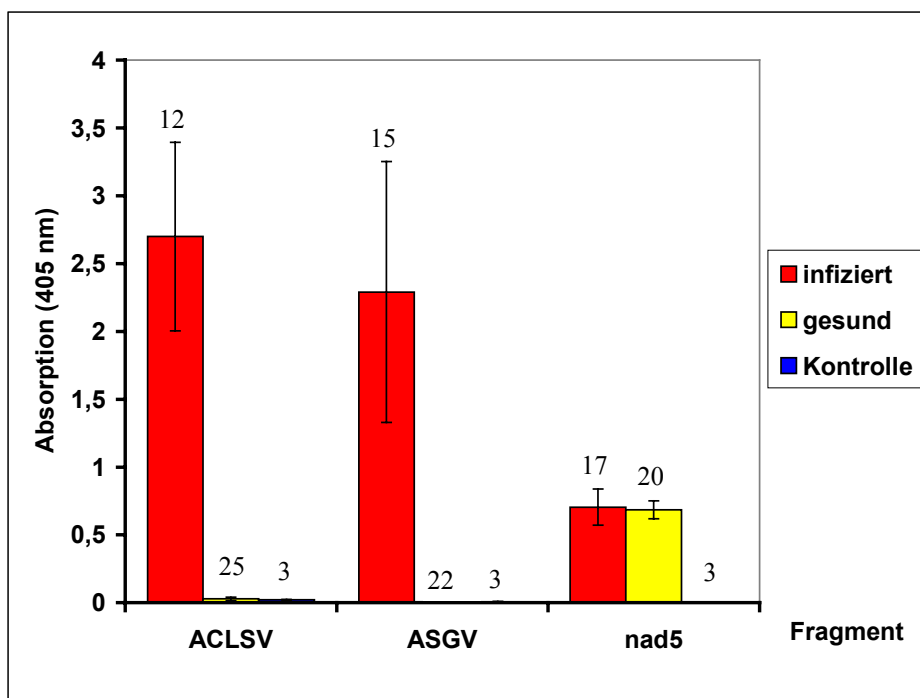


**Abbildung 19: Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR II mittels Gelelektrophorese und ELISA**

(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:  $\lambda$ -*PstI* DNA Standard)

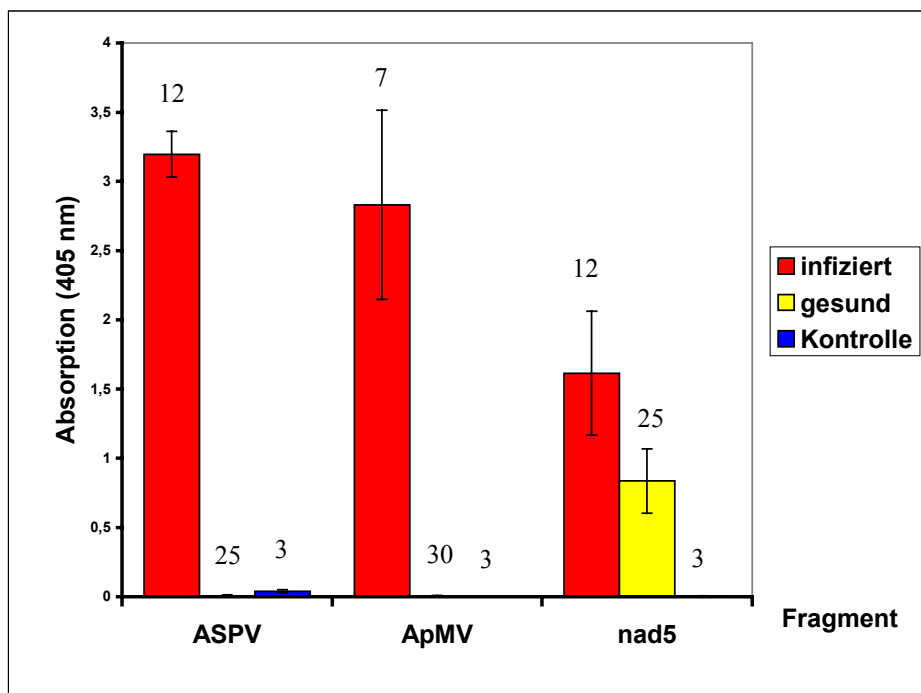
Die Ergebnisse haben gezeigt, daß sich für alle Proben, bei denen entsprechende Banden im Gel zu identifizieren waren, auch als positiv ( $> 0,1$ ) einzustufende Meßwerte ergeben haben. Die unterschiedlichen Bandenintensitäten und Meßwerte für ACLSV in Abb. 18 zeigen, daß, wie erwartet, ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Intensität der Bande und der Höhe des Meßwertes besteht.

In Abb. 20 und 21 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 37 verschiedenen Proben und 3 Negativkontrollen für multiplex RT-PCR-ELISA I und II wiedergegeben. Die Absorptionsmeßwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Anhang (Kap. 9.3) aufgeführt.



**Abbildung 20: Mittelwert und Standardabweichung von multiplex RT-PCR-ELISA I für 37 infizierte oder gesunde Proben sowie 3 Negativkontrollen**

(Dargestellt sind jeweils die Absorptionsmittelwerte und Standardabweichung. Die Anzahl der Meßwerte ist über den Säulen angegeben.)



**Abbildung 21: Mittelwert und Standardabweichung von multiplex RT-PCR-ELISA II für 37 infizierte oder gesunde Proben sowie 3 Negativkontrollen**

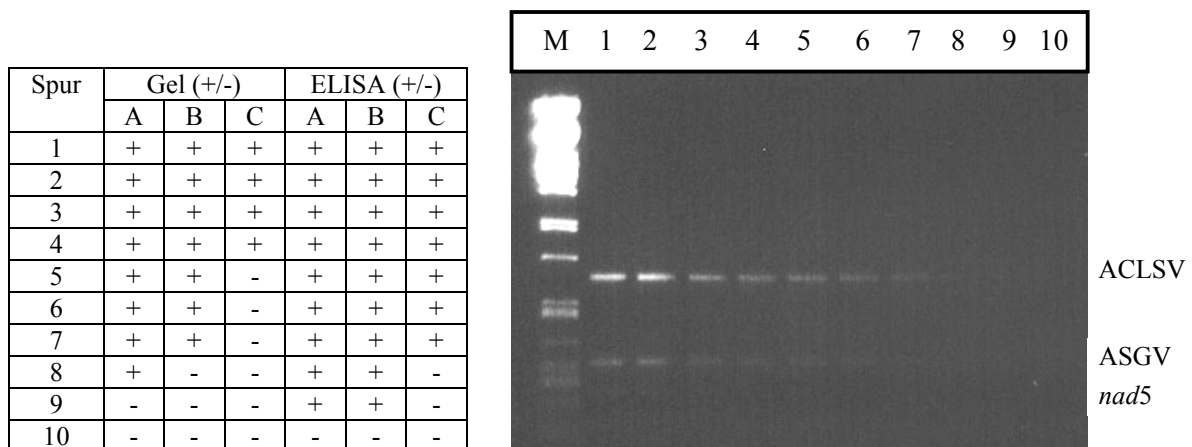
(Dargestellt sind jeweils die Absorptionsmittelwerte und Standardabweichung. Die Anzahl der Meßwerte ist über den Säulen angegeben.)

Die Werte verdeutlichen, daß bei einem angenommenen Grenzwert von 0,1 eine eindeutige Trennung von infizierten und nicht infizierten (bezüglich der Viren) bzw. die Anwesenheit/Abwesenheit amplifizierbarer RNA (bezüglich der internen Kontrolle) festgestellt werden kann. Die Hintergrundreaktionen bei den gesunden Proben und Negativkontrollen sind jeweils minimal. Es wurden keine falsch positiven oder falsch negativen Meßwerte festgestellt. 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 Nukleinsäureextraktenthaltenden Proben und Negativkontrollen möglich. Es sind keine falsch-negativen oder falsch-positiven Meßwerte aufgetreten. Die in Abb. 21 für multiplex RT-PCR-ELISA II dargestellten Werte für die interne Kontrolle zeigen bei den infizierten Proben durchschnittlich höhere Werte als für die nicht infizierten Proben. Dies ist vereinzelt zu beobachten gewesen. Einzeluntersuchungen zu möglichen Kreuzhybridisierungen (Daten

nicht gezeigt) ergaben keine Anhaltspunkte dafür. Im Vergleich von Gelelektrophorese und ELISA-Meßwerten war in infizierten Proben auch oftmals zu erkennen, daß die Bandenintensitäten der internen Kontrolle von infizierten Proben stärker waren als in nicht infizierten Proben. Dies beschränkte sich nicht nur auf die multiplex RT-PCR II, sondern konnte auch vereinzelt für multiplex RT-PCR I beobachtet werden.

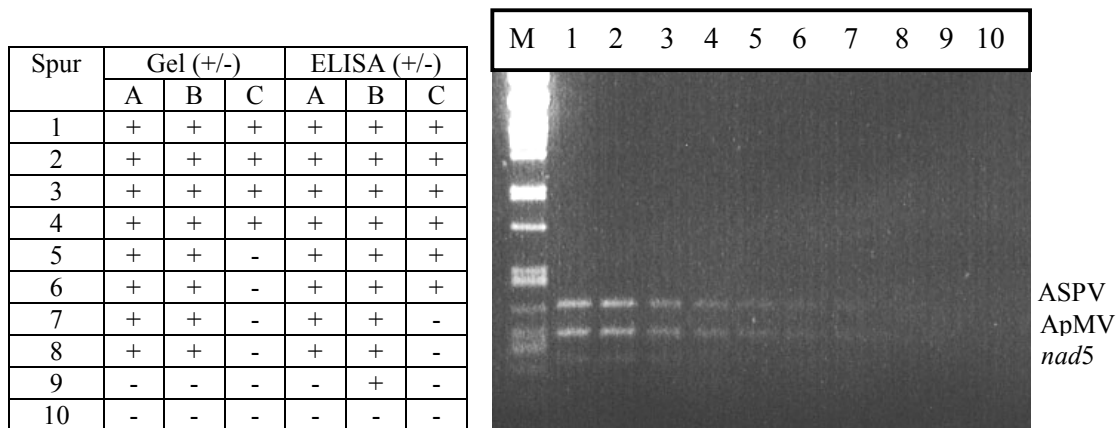
### 3.1.4.1 Vergleich der Detektionsgrenzen von Gelelektrophorese und ELISA

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 einer vierfach infizierten Probe parallel analysiert (Abb. 22 und 23). Die Absorptionsmeßwerte sind im Anhang (Kap. 9.3) aufgeführt. Auch für den Sensitivitätsvergleich wurde als Grenzwert 0,1 verwendet.



**Abbildung 22: Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR I**

(Gelphoto: Spuren M:  $\lambda$ -*Pst*I DNA Standard; Spuren 1-10: unterschiedliche eingesetzte Mengen 1:20 verdünnter RT-PCR Produkt [20  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 7,5  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 3,75  $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l, 1,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 0,5  $\mu$ 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*)



**Abbildung 23: Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR II**  
 (Siehe Abb. 22; A: ASPV; B: ApMV; C: *nad5*)

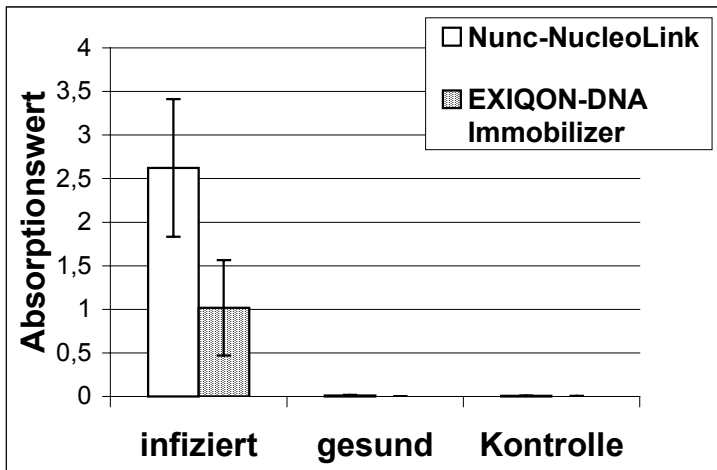
Für alle vier Viren und die interne Kontrolle besitzt die ELISA-ähnliche Technik zum Nachweis der PCR-Produkte in Bezug auf die Gelelektrophorese eine vergleichbare bzw. sogar geringfügig höhere Sensitivität.

### 3.1.4.2 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 (Kap. 2.2.26), um deren Einsetzbarkeit für das entwickelte Nachweisverfahren zu überprüfen.

In Abb. 24 sind die Absorptionsmittelwerte mit Standardabweichung für jeweils 12 infizierte und 12 gesunde Proben sowie 4 Negativkontrollen nach 30 minütiger Substratumsetzung dargestellt. Die einzelnen Absorptionsmeßwerte sind im Anhang (Kap. 9.3) aufgeführt.

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.



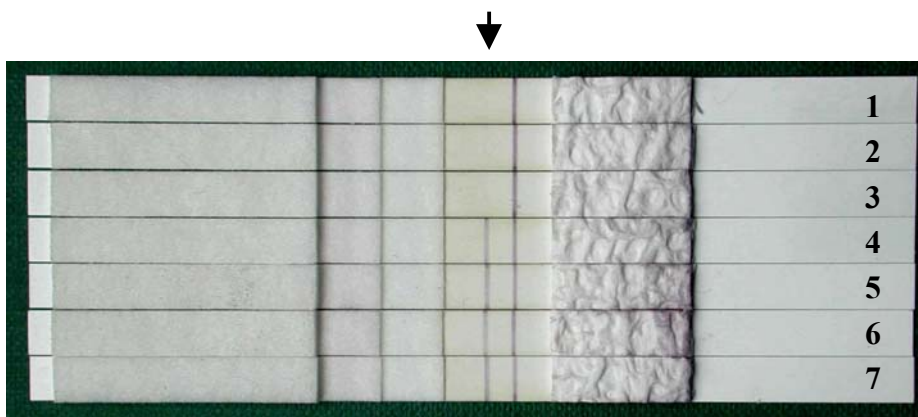
**Abbildung 24: Vergleich Nunc/Exiqon Strips im RT-PCR-ELISA für ASPV**

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

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.

### 3.1.5 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 (Kap. 2.2.27) exemplarisch für den Nachweis von RT-PCR Produkten von verschiedenen ASPV-Isolaten getestet. In Abb. 25 sind verschiedene Test-Strips nach Ablauf der Chromatographie dargestellt.



**Abbildung 25: Nachweis von RT-PCR Produkten von ASPV mittels DIG-Detection Test-Strips**

(1: Negativkontrolle; 2-3: nicht infizierte Proben; 4-7: ASPV infizierte Proben [22/85, 94/87, 33/88, 10/94]; der Pfeil weist auf die virusspezifische Bande hin)

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

### 3.1.6 Paralleltestung Apfelvirus 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. 26 wiedergegeben.

**Tabelle 26: Ergebnisse der Paralleltestung mit dem Pflanzenschutzamt Hannover**

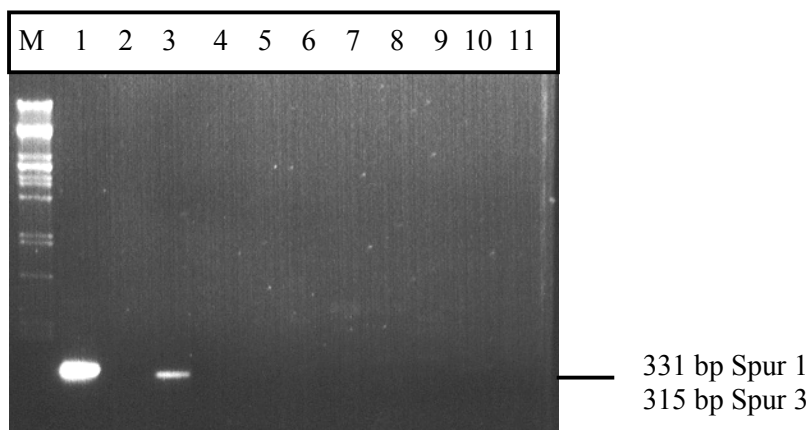
(Indikatorrestung [A] und multiplex RT-PCR-ELISA [B])

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

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. 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 eindeutig infiziert.

### 3.2 Viroidnachweis

Zu Beginn der Arbeit wurden Oligonukleotid-Primer (Kap. 2.2.12) 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 Positivkontrollen war eine erfolgreiche Amplifikation eines Fragments der erwarteten Größe möglich, unspezifische Amplifikationen konnten nicht beobachtet werden (Abb. 26).



**Abbildung 26: Nachweis von ASSVd, PBCVd und ADFVd mittels RT-PCR**

(Spur M:  $\lambda$ -*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, 2000b), uns bei entsprechenden Beobachtungen zu



informieren. Außerdem wurde von Herrn Dr. Jelkmann 2001 auf der Tagung der Muttergärten an der BBA Dossenheim ein Streckbrief für die Viroide verteilt. Beide Initiativen sind ohne Resonanz geblieben.

### **3.3 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 Landespflanzenschutzamt 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.

### **3.4 Gummiholz (ARW)**

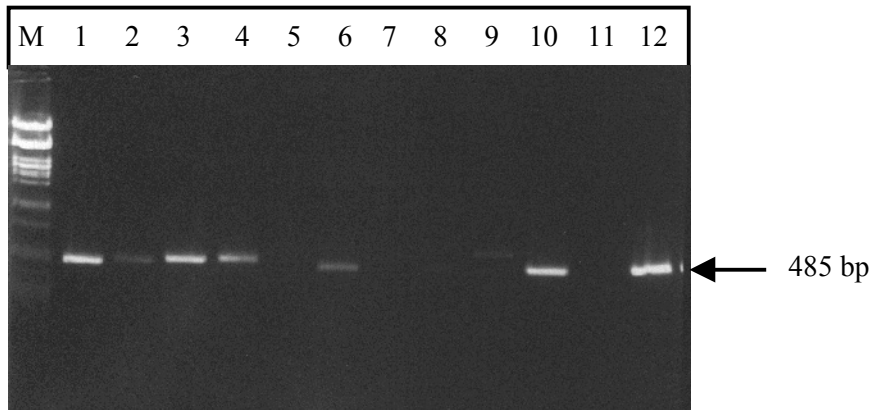
#### **3.4.1 Nachweis von Phytoplasmen**

Zu Beginn der Untersuchungen zur Ätiologie der Gummiholzkrankheit wurde versucht, die Ergebnisse von Bertaccini *et al.* (1998) zu reproduzieren (Kap. 2.2.28.1.1), 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.

Mit der von Seemüller (pers. Mitteilung) empfohlenen nested PCR (Kap. 2.2.28.1.2) 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.* (2001) beschriebene nested PCR (Kap. 2.2.28.1.3) 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.

3.4.2) und *Escherichia coli* eingesetzt. Auch hier gelang die Amplifikation eines entsprechenden Fragments (Abb. 27).



**Abbildung 27: Nachweis von Phytoplasmen mittels nested RT-PCR nach Heinrich *et al.* (2001)**

(Spur M:  $\lambda$ -*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)

Da mit den Protokollen von Bertaccini *et al.* (1998) und Heinrich *et al.* (2001) 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, konnte eine eindeutige Assoziation eines Phytoplasmas mit ARW nicht nachgewiesen werden. Das Verfahren nach Seemüller erlaubte nur den Nachweis der Positivkontrolle, und hat somit keine Assoziation eines Phytoplasmas mit ARW nachgewiesen. Auch in den gesunden Proben konnten keine Phytoplasmen detektiert werden.

### 3.4.2 Übertragungsversuche

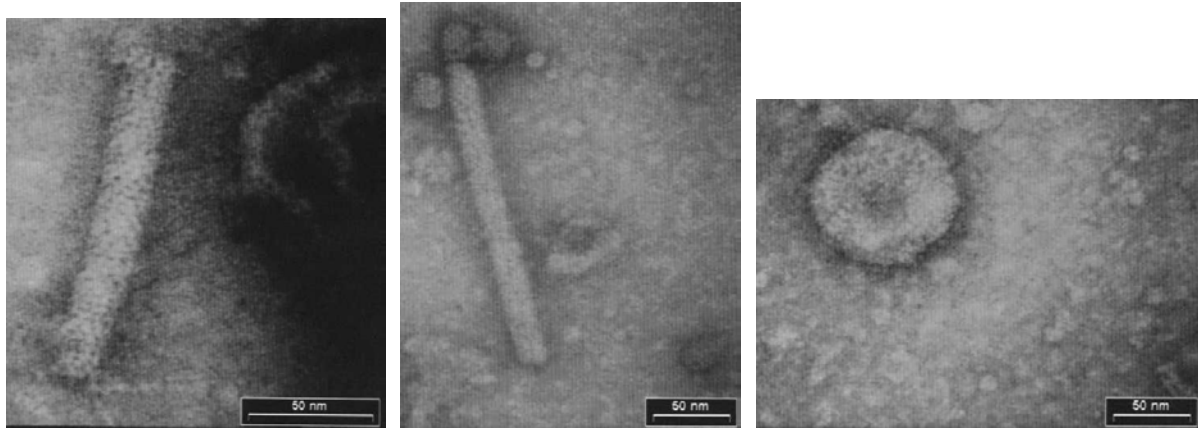
Unter Verwendung verschiedener Gummiholz-Isolate (Herkunft BBA Dossenheim [31/86, 38/88] und Pflanzenschutzamt Hannover [F1, F2]) und Gewebe (Rinde, Blätter, teilweise Blütenblätter) wurde versucht ein möglicherweise assoziiertes Virus auf verschiedene Pflanzen zu übertragen (Kap. 2.2.28.2.3). Es wurden je Isolat und Gewebe 3 Pflanzen inokuliert und alle 3 Tage bis zu 4 Wochen bonitiert. Mit Ausnahme von drei Pflanzenarten, die nekrotische Lokalläsionen entwickelten (*Chenopodium quinoa* L., *Nicotiana benthamiana* Domin., *Gomphrena globosa* L.), 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. Abb. 28 zeigt die nekrotischen Lokalläsionen auf einem Blatt von *Chenopodium quinoa* L..



**Abbildung 28: Nekrotische Lokalläsionen auf einem Blatt von *Chenopodium quinoa* L.**  
(Das kleines Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt.)

Alle symptomlos gebliebenen Pflanzenarten wurden auf *Nicotiana benthamiana* Domin. und *Chenopodium quinoa* L. 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 (Kap. 2.2.28.2.1) 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 Tospoviren ähneln, beobachtet werden (Abb. 29). Auch die anderen Pflanzenarten wurden auf mögliche latente Virusinfektion im Elektronenmikroskop ergebnislos untersucht.



**Abbildung 29: Mittels Elektronenmikroskopie identifizierte virusähnliche Partikel**

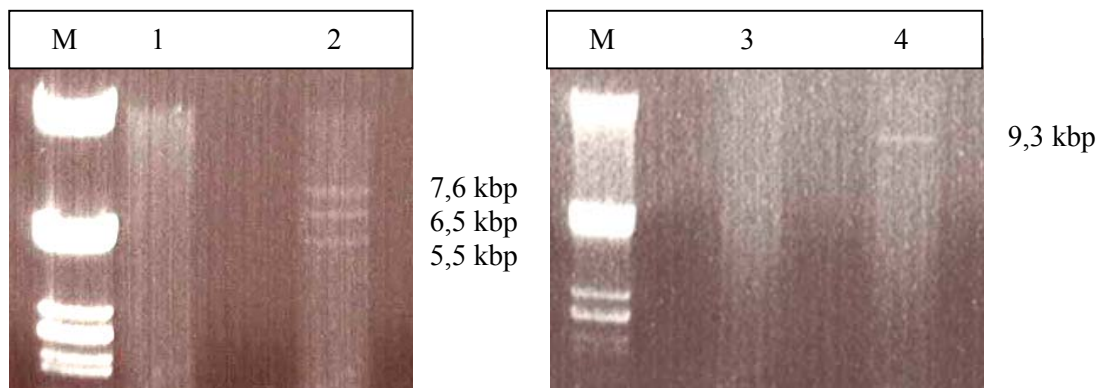
(Von links nach rechts: *Rhabdovirus* ähnliche Partikel, stäbchenförmige Struktur, *Tospovirus* ähnliches Partikel)

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* L., *Nicotiana benthamiana* Domin. und *Gomphrena globosa* L. verursachten den ursprünglichen vergleichbare nekrotische Lokalläsionen. Eine erneute Isolierung des Bakteriums aus den Lokalläsionen war ebenfalls möglich. Um den 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. 2.2.28.2.4) und die Bäume 8 Monate lang bonitiert. Der neue Austrieb entwickelte sich normal, eine verminderte Verholzung oder andere Symptome konnten nicht festgestellt werden.

### 3.4.3 Extraktion von dsRNA

Unter Verwendung der in Kap. 2.2.28.2.5 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. 30 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 30: Gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener dsRNA Extrakte**

(Spuren M:  $\lambda$ -*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.

### 3.4.4 SISPA-Technik

Mit Hilfe der modifizierten SISPA-Technik (Kap. 2.2.28.2.6) 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  $\mu$ l

Pipettespitze ein winziges Gelstück aus der Bande ausgestochen und anstatt Nukleinsäureextrakt in einen neuen Reaktionsansatz überführt. 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 differentielle Fragmente (SISPA 1-3), bei der RNA SISPA ein differentielles 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. Das Fragment der RNA SISPA hatte dabei eine sehr hohe Sequenzidentität (95%) mit einem pflanzlichen Gen aus Erbse. Für alle Fragmente der DNA SISPA ergaben die Sequenzvergleiche zwar keine hohen Homologien zu pflanzlichen Genen, woraufhin Primer entwickelt wurden, um gesunde und Gummiholz infizierte Pflanzen (Standardreaktionsansatz und -programm) zu testen, aber in unterschiedlicher Höhe zu bakteriellen Genen. In allen Fällen konnte sowohl von infizierten, als auch von gesunden Proben aus RNA und DNA Extrakten ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden. Eine Zusammenfassung der Sequenzvergleiche ist in Tab. 27, die Sequenzen selbst sind im Anhang wiedergegeben. 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.

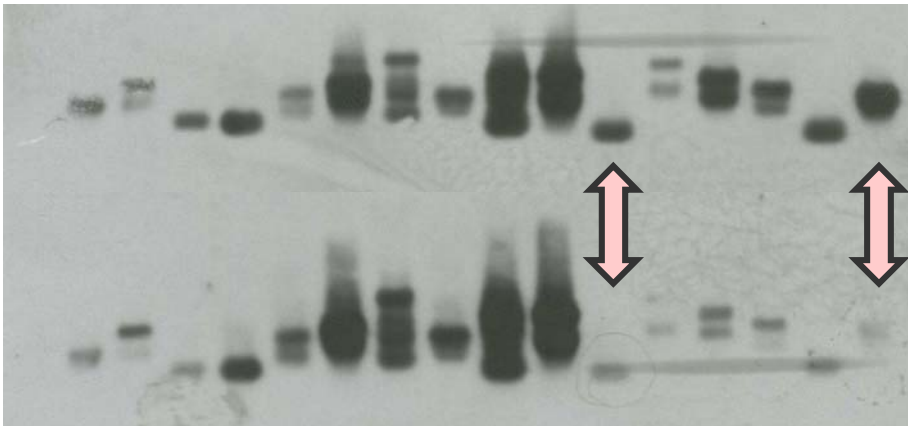
**Tabelle 27: Sequenzvergleiche mit den Fragmenten der SISPA-Technik**

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 AS (54%)
SISPA 2	357	ZP_00016326, hypothetisches Protein, <i>Rhodospirillum rubrum</i>	+1	A 1 – 96, Z 473 – 503 25/32 AS (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 Nukleotide; A: Ausgangssequenz; Z: Zielsequenz; AS: Aminosäuren)

### 3.4.5 cDNA Subtraktion

Ziel der Durchführung der cDNA Subtraktion (Kap. 2.2.28.2.7) 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. 31 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 31: 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. 28 zusammengefasst, die Sequenzen selbst sind im Anhang aufgeführt.

**Tabelle 28: Sequenzvergleiche mit den Fragmenten 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 AS (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 AS (78%)
SH 15/1	183	AF349963, Endoxyloglucan Transferase, <i>Daucus carota</i>	+3	A 43 - 167, Z 643 – 768 49/60 AS (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 NS (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. Bei cDNA Klon SH 11/1 sind keine Informationen über das vermeintliche Protein verfügbar. 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.

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.

### 3.4.6 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 R-PAGE (Kap. 2.2.28.2.8), die am Landespflanzenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern in Rostock



(Dr. Kruse) durchgeführt wurde, auf Viroide untersucht. Die Ergebnisse ergaben keinen Hinweis auf Assoziation von ARW mit einem Viroid.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Entwicklung der Nachweisverfahren für die vier Apfelviren**

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung von nukleinsäuregestützten Routinenachweisverfahren für den Nachweis von vier 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 bis zur Praxisreife. Die wirtschaftliche Bedeutung der Viren wurde in Kap. 1.2.1 dargestellt. Die zu entwickelnden Verfahren sollten zuverlässig, schnell, einfach in der Handhabung und kostengünstig sein. Desweiteren wurde berücksichtigt, daß das Verfahren weitgehend ohne mutagene oder hochgiftige Substanzen und Lösungsmittel auskommt, was aus Gründen der Sicherheit des Laborpersonals und des Umweltschutzes sinnvoll und notwendig ist.

#### **4.1.1 Entwicklung der multiplex-RT-PCR Nachweise**

Zu Beginn wurde eine möglichst schnelle und einfache Methode zur Nukleinsäureextraktion gesucht, die für einen Routinenachweis geeignet ist. Zudem sollte sie so weit wie möglich ohne giftige Substanzen und Lösungsmittel durchführbar sein. Die ausgewählte modifizierte Silica-Extraktion hat sich im Laufe der Entwicklung und Erprobung des multiplex RT-PCR Verfahrens als geeignet erwiesen (siehe auch Kap. 2.2.5 und 3.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hunderte Nukleinsäureextrakte nach dieser Methode aus Rindenschildchen hergestellt, von denen nur sehr wenige nicht erfolgreich in der RT-PCR einsetzbar waren. Auch diese sehr geringen Ausfallquoten zeigen jedoch, wie wichtig die Implementierung einer internen Kontrolle zum Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse ist. Im Vergleich zum Nachweis aus Rindenschildchen war die Intensität der virusspezifischen Banden im Gel beim Nachweis aus Blattmaterial häufig deutlich schwächer. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen MacKenzie *et al.* (1997) und Klerks *et al.* (2001) beim Nachweis von ASPV aus Apfel und Singh *et al.* (2002) beim Nachweis von PNRSV aus Süßkirschen. Ursache hierfür können eine niedrigere Viruskonzentration in den Blättern und/oder eine höhere Konzentration an Hemmstoffen sein, die in der Extraktion nicht vollständig entfernt werden und somit über das Nukleinsäureextrakt in die RT-PCR gelangen. Zu solchen Hemmstoffen, die in Abhängigkeit ihrer Konzentration die Syntheseleistung der Reversen Transkriptase und *Taq* Polymerase vermindern oder vollständig unterbinden können, zählen Polysaccharide und phenolische Substanzen (Demeke und Adams, 1992; Staub *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 1996) die zum Teil in Apfelblättern in hohen Konzentrationen vorkommen (Schmitz und Noga, 2000). Die

erprobte Schnellextraktion nach Edwards *et al.* (1991) konnte nicht erfolgreich eingesetzt werden. Auch bei dieser Methode ist vermutlich eine Kontamination der Nukleinsäureextrakte mit Hemmstoffen die Ursache, da bei dieser Technik nur eine Präzipitation der Nukleinsäuren mit Isopropanol durchgeführt wird und Polysaccharide sich damit nicht ausreichend entfernen lassen, da sie ebenfalls präzipitieren. Nach Nakahara *et al.* (1999) ist eine Entfernung von Polysacchariden und Phenolen aus Nukleinsäureextrakten nachträglich möglich und wurde von Menzel (1999) aus Nukleinsäureextrakten der Schnellextraktion aus Chrysanthemen erfolgreich durchgeführt, allerdings werden dafür ein hochgiftiges organisches Lösungsmittel und zusätzlich ca. 1,5 h für die Durchführung benötigt, wodurch das Verfahren wiederum keine Vorteile gegenüber der Silica-Extraktion hätte.

Die entwickelte interne Kontrolle zum Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse, die sich die Präsenz eines Introns im Zielgen zunutze macht, indem ein Primer dieses Intron überspannt, konnte in die multiplex RT-PCR Nachweise erfolgreich integriert werden (siehe Kap. 2.2.11). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Spezifität (Kap. 3.1.2) haben gezeigt, daß auch in Gegenwart von pflanzlicher DNA ausschließlich RNA amplifiziert wird. Somit kann die Existenz von sequenzidentischen, Intron freien Kopien im Genom (Pseudogenen) ausgeschlossen werden. Durch die Funktionsweise der internen Kontrolle ist es möglich, eine Gesamtnukleinsäureextraktion ohne Verdau der DNA einzusetzen um nur ein spezifisches Kontrollfragment von pflanzlicher mRNA zu erhalten. Eine derartige Kontrolle für RT-PCR Nachweisverfahren ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die über das ganze Jahr verteilt durchgeführten RT-PCR Nachweise haben ergeben, daß die interne Kontrolle unabhängig von der Jahreszeit einsetzbar ist. Die Überprüfung von weiteren holzigen und krautigen Pflanzenarten unterschiedlicher Gattungen und auch von einer monokotylen Pflanze (Gerste) haben gezeigt, daß das Zielgen der internen Kontrolle vermutlich aufgrund seiner Funktion im Basisstoffwechsel der Pflanzen (Heldt, 1997) und der Lage auf der mitochondrialen DNA im Pflanzenreich weitgehend konserviert ist (Kato *et al.*, 1995). Eine Überprüfung an weiteren Pflanzenarten und Implementierung in andere RT-PCR basierte Nachweisverfahren wäre wünschenswert und zum Ausschluß falsch negativer Ergebnisse sinnvoll. Die Kosten für das zusätzliche Primerpaar liegen für die hier entwickelten Nachweise bei ca. 1 Cent/Nachweis. Bei einer Verwendung in anderen Nachweisverfahren muß allerdings die Kompatibilität mit den dort eingesetzten Primern überprüft werden und

kann unter Umständen Erhöhungen der Spezifität durch z.B. optimierte Annealingtemperaturen oder den Einsatz von Hot Start Enzymen notwendig machen.

Während der Entwicklung der multiplex RT-PCR Nachweise wurden Einzelversuche zur Optimierung durchgeführt (siehe Kap. 2.2.13). Dabei wurden z.B. die Konzentrationen der Bestandteile des Reaktionsansatzes und die einzelnen Schritte des RT-PCR Programms variiert, um eine maximale Spezifität und möglichst gleichmäßige, zuverlässige Amplifikation aller Fragmente zu erreichen. Dies erschien für einen parallelen Nachweis aller 4 Viren plus interner Kontrolle im Laufe der Entwicklung als unrealistisch, da bereits beim parallelen Nachweis von 3 Viren erhebliche Unterschiede in den Bandenintensitäten bei der Gelelektrophorese beobachtet werden konnten (Kap. 3.1.3.1). Ähnliche Beobachtungen wurden von Nie und Singh (2000) beim Versuch des parallelen Nachweises von 5 Viren aus Kartoffel gemacht. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden zwei multiplex RT-PCR Verfahren entwickelt, jeweils für den Nachweis von 2 Viren und der internen Kontrolle. Die Schwankungen der Bandenintensitäten können auf unterschiedliche Virus- bzw. Templatekonzentrationen und/oder Fehlpaarungen der Primer zurückzuführen sein. Durch die Fehlpaarungen wird die Schmelztemperatur der Primer, bei der 50% der Primer anlagern können, gesenkt. Somit ist bei gleichbleibender Annealingtemperatur in der PCR in den ersten Zyklen die Amplifikation weniger effizient und erreicht erst später die exponentielle Phase. Durch die Konkurrenz in multiplex Verfahren sind somit die Fragmente, bei denen keine Primer/Template Fehlpaarungen auftreten und Templates, die in höheren Konzentrationen vorliegen, in der Amplifikation begünstigt. Zudem sind auch unterschiedliche Viruskonzentrationen eines Virus innerhalb eines Baumes beschrieben worden (für ApMV Grüntzig *et al.*, 1994; für ACLSV Knapp *et al.*, 1995c), wodurch sich auch bei verschiedenen Proben eines Baumes unterschiedliche Amplifikationsverhältnisse ergeben können.

Bei der Entwicklung der multiplex RT-PCR Verfahren wurde eine Vielzahl von Virusisolaten in Einzel- und Mischinfektionen unterschiedlicher Wirtspflanzen und geographischer Herkünfte getestet (siehe Kap. 2.1.9, Tab. 10 und Kap. 3.1.3.1). Dabei konnten alle bei Vortests mittels holziger Indikatoren nachgewiesenen Infektionen bestätigt werden. Die zum Teil beobachteten Schwankungen in den Bandenintensitäten bei der Gelelektrophorese der einzelnen Fragmente können dabei durch unterschiedliche Templatekonzentrationen und/oder Primer/Template Fehlpaarungen (siehe oben) bedingt sein, falsch-negative oder falsch-positive Nachweise traten nicht auf. Die zur Überprüfung der Identität der Fragmente sequenzierten Amplifikate haben Sequenzidentitäten zwischen 78% und 98% mit in der

Genbank (NCBI) veröffentlichten Sequenzen ergeben (Kap. 3.1.3.6). Sie bestätigen auch trotz der teilweise relativ niedrigen Übereinstimmungen die spezifische Amplifikation der gewünschten Bereiche im Genom der Viren bzw. der mRNA der mitochondrialen pflanzlichen DNA, da sich vergleichbare Werte auch für die entsprechenden Bereiche der in der Genbank (NCBI) verfügbaren Sequenzen untereinander ergeben.

Die Ermittlung der Detektionsgrenzen durch seriell Verdünnen eines Nukleinsäureextrakts einer vierfach infizierten Probe mit Nukleinsäureextrakt einer gesunden Probe hat ergeben, daß alle Fragmente bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:40 noch erfolgreich amplifiziert werden konnten. Dies ließe unter Berücksichtigung eines Sicherheitspuffers, der notwendig ist, da generell schon Schwankungen in den Bandenintensitäten zu beobachten sind und bei der maximal möglichen Verdünnung die Banden zum Teil nur sehr schwach im Gel erkennbar waren, z.B. Mischproben von 10 Extrakten theoretisch zu. Dadurch könnte die Anzahl der Proben in der RT-PCR und somit auch die Kosten deutlich reduziert werden. Die Verwendung von Mischproben hat aber 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 eindeutigen Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse nicht möglich.

Die für die Nachweise ausgewählten spezifischen Primer und Capture Oligonukleotide sind in hoch konservierten Bereichen (für die Viren im Hüllproteingen oder nicht translatierten Bereich am 3'-Ende) positioniert worden. Für diese Genomabschnitte lagen zu Beginn der Arbeiten für die Viren die meisten Nukleinsäuresequenzen und höchsten Identitäten vor. Während der Bearbeitungszeit dieser Arbeit ist eine Vielzahl von Sequenzen hinzugekommen. Die Vergleiche mit den in der Genbank (NCBI) verfügbaren Sequenzen (Kap. 9.1) haben ergeben, daß für diese Sequenzen nur sehr wenige Fehlpaarungen auftreten. Der durchgeführte Gradient für die Anlagerungstemperatur der multiplex RT-PCR (3.1.3.2) hat gezeigt, daß mit den verwendeten Primern eine erfolgreiche Amplifikation bis ca. 67°C möglich ist. Dies liegt 5°C über der verwendeten Anlagerungstemperatur und sollte eine erfolgreiche Anlagerung und Elongation durch die *Taq* Polymerase auch bei einzelnen Fehlpaarungen ermöglichen, so daß eine Beibehaltung der Primer erfolgen kann. Dies gilt insbesondere für die antisense Primer, da diese bereits bei einer im Vergleich zur verwendeten Annealingtemperatur von 62°C deutlich niedrigeren Temperatur im Schritt der reversen

Transkription bei 42°C anlagern und in die cDNA eingebaut werden können. Dies trifft für den einzigen Fall mit drei Fehlpaarungen, für den antisense Primer von ASPV, zu. Einige der Fehlpaarungen führen zudem zu G:T Paarungen, die als nicht destabilisierend anzusehen sind (Kitt *et al.*, 1983; Ikuta *et al.*, 1987; Kwok *et al.*, 1990). Für den Start der Elongation von angelagerten Primern durch die Polymerasen sind die letzten beiden Nukleotide am 3'-Ende von entscheidender Bedeutung (Kwok *et al.*, 1990; Innis und Gelfand, 1999), auf denen für alle Primer keine Fehlpaarungen auftreten. Die nach Innis und Gelfand (1999) empfohlene Endung der Primer mit AA hat sich als erfolgreich erwiesen. Bezüglich der Capture Oligonukleotide treten ebenfalls nur in einem Fall drei Fehlpaarungen auf. Hierbei handelt es sich um ein direkt im Nachweisverfahren überprüfbares Isolat, welches trotz der 3 Fehlpaarungen eindeutig im RT-PCR-ELISA nachgewiesen werden konnte.

Inwieweit die Fehlpaarungen auf tatsächliche Heterogenitäten der viralen RNA zurückzuführen sind, oder ob sie durch die Fehlerraten der bei der Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung verwendeten Enzyme entstanden sind, kann im Nachhinein nicht bestimmt werden. Die Fehlerraten, die durch viele Faktoren beeinflusst werden, liegen zwischen  $1,6 \times 10^{-3}$  für die AMV Reverse Transkriptase (Battula und Loeb, 1975),  $10^{-5}$  für die *Taq* Polymerase (Eckert und Kunkel, 1990) und  $10^{-8}$  für die DNA Polymerase III, die an der Replikation der Plasmid DNA in *Escherichia coli* beteiligt ist (Brock *et al.*, 1994). Da einzelne Virusisolate aus mehreren Sequenzvarianten bestehen können, was von Magome *et al.* (1997) für ASGV und Yoshikawa *et al.* (2001) für ASPV nachgewiesen wurde, ist selbst bei Bekanntwerden einer Sequenz, die mit den ausgewählten Primern nicht mehr amplifizierbar erscheint, der Nachweis des Isolates insgesamt nicht automatisch ausgeschlossen, da eventuell die anderen Sequenzvarianten als Template dienen können. Aus diesen Gründen wäre eine direkte Überprüfung des entsprechenden Isolates notwendig. Ist ein Isolat mit den entwickelten multiplex RT-PCR-ELISA Verfahren nicht nachweisbar, bleibt abzuschätzen, ob ein solcher Fall hinnehmbar ist, oder ob die Primer/Capture Oligonukleotide zu modifizieren oder zu ersetzen sind, was eventuell weitere Optimierungsschritte nach sich zieht. Das Auftreten von Isolaten, die nicht nachweisbar sind, ist generell nicht unwahrscheinlich, da aufgrund der fehlenden Korrekturlesemechanismen bei der Replikation der RNA Viren (Hull, 2002) eine hohe Variabilität möglich ist.

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 der Reaktionsbedingungen und Unterschiede in der Leistungsfähigkeit in der RT-PCR unterschiedlich verhalten können. Die Ergebnisse (3.1.3.5) des Vergleichs zeigen, daß bei der *Taq* Polymerase, zumindest mit Hot Prime *Taq* (Q-Biogene), ein Ersatz nicht ohne weiteres möglich ist. Da die Intensitäten der Virus spezifischen Banden zum Teil extrem abgeschwächt waren, würde dies Optimierungen am Reaktionsansatz der RT-PCR notwendig machen, um das Risiko von falsch-negativen Nachweisen nicht zu erhöhen. Dies wird insbesondere dadurch deutlich, da die Bande der internen Kontrolle in unveränderter Intensität aufgetreten ist. Aus diesen Ergebnissen läßt sich die Notwendigkeit des Mitführens von Positivkontrollen für die einzelnen Viren ableiten, insbesondere wenn Änderungen vorgenommen werden.

#### **4.1.2 ELISA-ähnlichen Detektion der Amplifikate der multiplex RT-PCR**

Ziel bei der Entwicklung dieses Nachweises war 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. Somit kann auf den damit verbundenen Einsatz von toxischen oder mutagenen Nukleinsäurefarbstoffen verzichtet werden. Für das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren wurden die Vor- und Nachteile der in der Literatur zu findenden Varianten (siehe hierzu Kap. 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 (Kummert *et al.*, 2001) 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, 2000a). 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 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 (Rasmussen *et al.*, 1994; Nicolaisen *et al.*, 2001) 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.

Die entwickelte ELISA-ähnlichen Detektion der Amplifikate wurde an einem breiten Isolatspektrum, welches mittels holzigen Indikatoren vorgetestet war, erprobt. In keinem der Fälle wurden falsch-negative oder falsch-positive Meßwerte erhalten. In Einzelversuchen wurde die Spezifität der Capture-Oligonukleotide überprüft. In keinem der Fälle wurden Kreuzreaktionen mit einem anderen Fragment beobachtet und auch bei den gesunden Proben und Negativkontrollen waren die Hintergrundwerte minimal. Somit zeigt die hier gewählte Technik, daß sie im Vergleich zur von Menzel und Maiß (2000a) gewählten Technik ohne Hybridisierung, bei der hohe Hintergrundwerte gemessen wurden, sensitiver ist. Für die in Kap. 3.1.4 beschriebene Beobachtung, daß für einzelne infizierte Proben die Bandenintensität der internen Kontrolle oder der zugehörige ELISA Absorptionswert stärker bzw. höher waren, gibt es keine direkt nachvollziehbare Erklärung. Auch in der Literatur sind keine Anhaltspunkte zu finden, warum die Amplifikation eines Fragments die Amplifikation eines anderen begünstigt, obwohl eigentlich eine Konkurrenz der Fragmente um begrenzte Faktoren wie z.B. die *Taq* Polymerase vorliegt, und die Amplifikation der internen Kontrolle durch die niedrige Primerkonzentration auf ein Minimum beschränkt ist. Da dieses Phänomen nicht immer und bei multiplex RT-PCR I und II zu beobachten war, kann eine Amplifikation durch ein falsches Anlagern von virusspezifischen Primern zur Amplifikation der internen Kontrolle ausgeschlossen werden. Zudem sollte dann die Amplifikation der internen Kontrolle in gesunden Proben eher verstärkt werden.

Der Trennung von infizierten und gesunden Proben und der Ermittlung der relativen Sensitivität der ELISA-ähnlichen Technik im Vergleich zur Gelelektrophorese liegt der subjektiv gewählte, aber für die entwickelten Nachweise als brauchbar erwiesene Grenzwert von 0,1 zugrunde. Generell stehen für die Trennung verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

So ist z.B. eine Trennung mit der Grenzwertmethode nach Rek (1987) möglich, bei der alle Meßwerte aufsteigend sortiert werden, um dann aus 3er Gruppen Mittelwerte zu bilden. Diese werden graphisch gegen die Gruppennummer aufgetragen. Sind gesunde und infizierte Proben vorhanden, sollte der Graph einen deutlichen Sprung zwischen zwei Mittelwerten aufweisen. Der letzte Mittelwert vor dem Sprung wird mit einem Faktor multipliziert und der erhaltene Wert dient als Grenzwert. Eine andere Möglichkeit ist die Clusteranalyse, die von Menzel (1999) zur Auswertung von ELISA Meßwerten beschrieben wurde. Dabei werden



unter Verwendung von bestimmten Rechenroutinen nahe beieinander liegende Meßwerte zu Clustern immer weiter zusammengefaßt, bis nur noch zwei Cluster übrig geblieben sind. In einem Cluster befinden sich die Meßwerte der infizierten Proben, im anderen Cluster die der nicht infizierten Proben und Negativkontrollen. Die Clusteranalyse arbeitet somit ohne Grenzwert und kann auch nahe beieinander liegende Werte noch trennen, ist aber ohne entsprechende Software/Programmierfähigkeiten nicht praktikabel. Gleiches gilt für die Grenzwertmethode nach Rek (1987) für große Probenzahlen. In der Literatur ist eine Vielzahl von weiteren Methoden zur Grenzwertermittlung beschrieben. So ergibt sich der Grenzwert nach Ritzler und Altwegg (1996) aus dem zweifachen Wert des Mittelwertes der Negativkontrollen, nach Soumet *et al.* (1997) aus dem Mittelwert der Negativkontrollen und dem dreifachen der Standardabweichung der Negativkontrollen, nach Costa *et al.* (1996) aus dem fünffachen Mittelwert der Substratkontrollen oder nach Sharman *et al.* (2000) aus dem zweifachen des Mittelwertes der nicht infizierten Kontrollpflanzen. Die Auflistung ließe sich noch lange so weiterführen. Andere Autoren verwenden dagegen feststehende Grenzwerte (Rowhani *et al.*, 1998, Shamloul *et al.*, 2001). In der Routinetestung wird auch häufig rein visuell ausgewertet (Zahn, pers. Mitteilung) und auf die Photometermessung vollständig verzichtet. Dies ist zwar die schnellste Möglichkeit der Auswertung, führt aber aus eigenen Erfahrungen in einzelnen Fällen auch zu falschen Auswertungsergebnissen. Da, die Clusteranalyse ausgenommen, alle Techniken einen subjektiv gewählten Grenzwert oder Faktor verwenden, der aber auf Erfahrungswerten basiert und sich somit für das jeweilige Testverfahren als brauchbar erwiesen haben sollte, ist die Art der Grenzwertermittlung letztlich unbedeutend, solange eine eindeutige Trennung möglich ist und keine falsch-negativen oder falsch-positiven Meßwerte entstehen. Um die Auswertung für die Routinetestung so einfach und schnell wie möglich zu gestalten, wurde ein fester Grenzwert von 0,1 gewählt.

Die Ermittlung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-ähnlicher Detektion der Amplifikate hat ergeben, daß die ELISA Technik eine vergleichbare oder geringfügig höhere Sensitivität besitzt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Luk *et al.* (1997) und Sharman *et al.* (2000). Deutlich höhere relative Sensitivitäten im Vergleich zur Gelelektrophorese beschrieben dagegen Rowhani *et al.* (1998) und Ritzler und Altwegg (1996) für ihre PCR-ELISA Techniken. Die Höhe des festgelegten Grenzwertes hat für derartige Vergleiche allerdings einen nicht unerheblichen Einfluß. Je niedriger der Grenzwert, desto höher ist die Sensitivität der ELISA Technik.

Aufgrund der ausreichend hohen Sensitivität der multiplex RT-PCR-ELISA Nachweise sind Veränderungen wie die von Shamloul *et al.* (2001) beschriebene Verwendung von längeren cRNA oder cDNA Sonden zur Erhöhung der Sensitivität, die erheblich teurer als Capture-Oligonukleotide sind, nicht notwendig.

Um die Ersetzbarkeit der NucleoLink-Strips (Nunc) durch Produkte anderer Hersteller zu überprüfen, wurde exemplarisch für ASPV die Einsetzbarkeit der DNA-Immobilizer (EXIQON) getestet. Die Ergebnisse waren vergleichbar, auch wenn die Meßwerte für die DNA-Immobilizer insgesamt deutlich unter denen der NucleoLink Strips lagen (Kap. 3.1.4.2). 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.

Außer der oben diskutierten ELISA ähnlichen Technik zur Detektion der Amplifikate konnten die DIG-Detection Test- Strips der Firma Roche exemplarisch für den Nachweis von RT-PCR Produkten von verschiedenen ASPV-Isolaten eingesetzt werden. 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 bei dieser sehr schnellen Technik, die im Anschluß an die RT-PCR nur ca. 25-30 min dauert, ist der hohe Preis mit ca. 2,50 Euro pro Test-Strip. Deshalb ist eine Anwendung als Routinenachweis aus Kostengründen weniger zu empfehlen.

#### **4.1.3 Vergleich des neu entwickelten Verfahrens mit der Indikatorrestung**

Damit ein neu entwickeltes Verfahren von den entsprechenden Stellen, z.B. den Pflanzenschutzämtern, angenommen werden kann, muß es u.a. zuverlässig, schnell, einfach in der Handhabung und kostengünstig sein. Entscheidend ist hierbei besonders der Vergleich mit den bisher verwendeten Nachweisverfahren für die Erreger. Ein neu entwickeltes Verfahren muß sich in einem solchen Vergleich insgesamt als überlegen erweisen, da bei einer bloßen Gleichwertigkeit für die durchführenden Stellen keine Vorteile zu erwarten sind, aber durch den Umstellungsprozeß bereits Kosten entstehen würden und notwendige Erfahrungen mit

dem neuen Verfahrens erst gesammelt werden müssen. 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 entwickelten RT-PCR-ELISA Nachweise für die vier Apfelviren haben in der Paralleltestung von 138 Proben mit dem Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover gezeigt, daß ein zuverlässiger und außerdem in einzelnen Fällen im Vergleich zur Indikatorrestung ein sichererer Nachweis möglich ist (Kap. 3.1.6). Über die Bestätigung der 47 an den Indikatoren bonitierten Infektionen hinaus konnten 8 weitere Infektionen nachgewiesen werden. In einer Probe, die nach den Ergebnissen der Indikatorrestung als virusfrei eingestuft wurde, konnte eindeutig ACLSV als Einzelinfektion wiederholt nachgewiesen werden. Die zusätzlich nachgewiesenen ASPV und ASGV Infektionen lagen in Mischinfektionen mit dem jeweils anderen Virus vor, so daß in diesen Fällen eine Überlagerung der Symptome an den verwendeten Indikatortypen durch das jeweils andere Virus als mögliche Ursache in Frage kommt. In diesen Fällen war mittels RT-PCR-ELISA im Gegensatz zur Indikatorrestung eine eindeutige Differenzierung möglich. Überraschend sind die Unterschiede bezüglich der Infektionen mit ApMV. Das früher als verbreitet und häufig auftretend geltende Virus (Nemeth, 1986) ist nach neueren Untersuchungen, die auf Indikatorrestung beruhen, in den jüngeren Apfelbeständen praktisch nicht mehr vorhanden (Zahn, 1999), was durch die Ergebnisse der Indikatorrestung des Paralleltests durchaus bestätigt wird (eine ApMV infizierte Probe von 138). Mittels RT-PCR-ELISA konnten dagegen 4 Infektionen mit ApMV nachgewiesen werden. Dies läßt vermuten, daß in der Vergangenheit die symptomausbildenden ApMV Isolate durch die Testung weitgehend eliminiert werden konnten und überwiegend die Isolate übrig geblieben sind, die an den Indikatorpflanzen keine Symptome mehr hervorrufen. Somit ist der zur Zeit empfohlene und verwendete Indikator 'Golden Delicious' (Anonymus, 1998) für die ApMV Testung als ungeeignet zu bezeichnen, da er keinen zuverlässigen Nachweis ermöglicht. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Kirby *et al.* (2001) beim Vergleich von RT-PCR und Indikatorrestung zum Nachweis von ASGV. Auch bei ihrem Verfahren konnten einzelne ASGV Infektionen nachgewiesen werden, die an den Indikatoren für ASGV nicht bonitiert werden konnten. Bei dem Komplex der Erreger ASPV, ASpD und APScb, die nach Zahn (1995, 1996) eventuell als Varianten eines Virus angesehen werden können (siehe Kap. 1.2.1), die in den unterschiedlichen Indikatorpflanzen verschiedene Symptome hervorrufen, könnten die

Unterschiede auf das Fehlen der entsprechenden Variante in den Proben zurückzuführen sein. Eine Differenzierung der Varianten des ASPV mittels RT-PCR ist bis heute nicht beschrieben worden.

Auf die Ermittlung der tatsächlich anfallenden Gesamtkosten des neu entwickelten Verfahrens wurde aus mehreren Gründen verzichtet. Zum einen liegen für einen Vergleich mit der Indikatorrestung bei Apfel keine aktuellen exakten Kalkulationen der durchführenden Stellen für dieses Verfahren vor, zum anderen sind viele entscheidende Faktoren zur Ermittlung der Gesamtkosten des neu entwickelten Verfahrens nicht vorhersehbar, sondern von Fall zu Fall zu entscheiden. Die Ermittlung der Kosten des Verbrauchsmaterials ist zwar problemlos möglich, aber ein erheblicher Kostenanteil entfällt auf die Lohnkosten. Um diese zu ermitteln, müßte feststehen, wer letztendlich ein solches Verfahren im Pflanzenschutzamt durchführt. Die Stundenlöhne für einen Wissenschaftler mit Hochschulabschluß, einen Technischen Assistenten oder eine angelernte Aushilfe, die mit der Durchführung beauftragt wird, unterscheiden sich erheblich. Zusätzlich hängen die auf den einzelnen Nachweis entfallenden Kosten (Lohnkosten und Fixkosten) stark von der Anzahl der parallel bearbeiteten Proben ab, da z.B. die Lohnkosten für Arbeitsschritte wie die Nukleinsäureextraktion mit steigender Probenzahl anteilig abnehmen. Außerdem führt eine hohe Auslastung der benötigten Laborgeräte (z.B. Zentrifugen, Thermocycler, ELISA-Photometer) zu einer deutlichen Senkung der fixen Spezialkosten, werden die Geräte dagegen nur für wenige Nachweise eingesetzt oder speziell für die Testung weniger Apfelproben im Jahr neu angeschafft, ergeben sich unverhältnismäßig hohe Kosten für den einzelnen Nachweis. Zu den oben genannten kommen weitere Faktoren wie der Prestigegewinn durch den Einsatz modernster Technik im Labor, der als Nutzenwert ermittelt werden kann, oder andererseits auch Akzeptanz und Vertrauen der Entscheidungsträger der Ämter in neue, unbekannte Verfahren hinzu. Aufgrund der Komplexität einer exakten ökonomischen Bewertung von Nachweisverfahren wurden die oben genannten Faktoren nur grundsätzlich berücksichtigt. Zur Verdeutlichung der Größenordnungen können die Angaben von Lopez-Moya *et al.* (2000) herangezogen werden. Sie haben für den Nachweis des *Plum pox virus* aus Pflaume für die Indikatorrestung 45-90 €, für eine RT-PCR 1,30 € und für einen RT-PCR-ELISA 2,60 € angegeben. Das neu entwickelte Verfahren kann die Indikatorrestung für Apfel zwar noch nicht vollständig ersetzen, da außer den erfaßten Apfelviren noch weitere Erreger (Fruchtvirosen, Gummiholz, Flachästigkeit) gemäß AGOZ (Anonymus, 1998) 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 der relativ niedrigen Kosten für einen RT-PCR basierten Nachweis, mit einer deutlichen Reduzierung der Gesamtkosten verbunden.

Beim Einsatz des multiplex RT-PCR-ELISA haben die Baumschulen und Züchter, die Ihre Sorten zur Zertifizierung geben, aufgrund der Schnelligkeit des Tests (1-2 Tage) bereits nach wenigen Tagen die Möglichkeit, die mit Viren infizierten Bäume aus ihren Beständen zu entfernen, ohne die langwierige Indikatorrestung (2-3 Jahre) abwarten zu müssen. Aufgrund der Seltenheit der anderen Erreger (Fruchtvirose, Gummiholz, Flachästigkeit), die nur vereinzelt nicht in Mischinfektionen mit mindestens einem der 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, wodurch auch hier Kosten eingespart werden können.

Ein Vergleich der beiden Verfahren bezüglich der Handhabbarkeit ist kaum möglich. Beide Verfahren setzen völlig unterschiedliche Ausstattungen, Kenntnisse, Fähigkeiten und Erfahrungen voraus. So müssen für einen RT-PCR-ELISA Nachweis geeignete Laborräume vorhanden sein und das Personal muß mit sterilem, exaktem Arbeiten und den notwendigen technischen Geräten (z.B. Thermocycler, ELISA-Photometer) vertraut sein. Andererseits sind für erfolgreiche Veredelungen und 2 jährige Kultur der Pflanzen im Container bei der Indikatorrestung Gewächshäuser und spezielle Kenntnisse notwendig. Zudem erfordert die Interpretation der Symptome an den Indikatorpflanzen eine gewisse Erfahrung, da diese nicht immer eindeutig sind (Zahn, pers. Mitteilung). Als Beispiel verfügt das Pflanzenschutzamt Hannover über entsprechendes Personal und sonstige Einrichtungen und technische Geräte, um beide Verfahren gleichermaßen durchführen zu können.

Die Ergebnisse des Vergleichs (Kap. 3.1.6) zeigen, daß das neu entwickelte Nachweisverfahren bezüglich der Zuverlässigkeit der Ergebnisse eine eindeutige Alternative

zur Indikatorrestung darstellt und in komplexen Fällen einen sichereren und genaueren Aufschluß über die vorliegenden Infektionen, insbesondere bei Mischinfektionen, gibt. Zudem ist eine deutliche Reduzierung der Kosten für die gesamte Testung der Apfelproben und eine extreme Verkürzung der Testdauer für die 4 Apfelviren speziell möglich. Ein vollständiger Verzicht auf die Indikatorrestung ist aufgrund der weiteren für die Zertifizierung von Apfel relevanten Erreger noch nicht möglich. Ein weiterer Vorteil des multiplex RT-PCR-ELISA Verfahrens gegenüber der Indikatorrestung ist, daß unabhängig von der Jahreszeit getestet werden kann.

#### **4.2 Viroide und Fruchtvirosen**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über das mögliche Auftreten und die Verbreitung der an Apfel und Birne vorkommenden Viroide ASSVd, ADFVd und PBCVd zu gewinnen. Es wurden ca. 40 Proben, die den Viroidsymptomen ähnliche Symptome zeigten, auf eine Infektion mit den Viroiden überprüft. In keinem der Fälle konnte ein Viroid nachgewiesen werden und auch die Aufrufe zur Meldung verdächtiger Bäume blieben ohne Resonanz (Kap. 3.2). Da bisher in Deutschland kein Fall einer Viroidinfektion im Obstbau mit ASSVd, ADFVd oder PBCVd dokumentiert ist und auch die in dieser Arbeit 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 (Polen: Paduch-Cichal *et al.*, 1996; Frankreich: Desvignes *et al.*, 1998), Asien oder Nordamerika einzuschleppen, wo eine teilweise starke Verbreitung besteht, darf allerdings aufgrund des internationalen Obstsortenhandels nicht unterschätzt werden. Eine Implementierung eines Viroidnachweises in die Zertifizierung unter Verwendung von RT-PCR basierten Verfahren wäre ohne weiteres möglich. Die Primer sind alle in Kombination mit der internen Kontrolle einsetzbar (Ergebnisse nicht gezeigt) und für den Nachweis kann das selbe Nukleinsäureextrakt, welches für den Virusnachweis verwendet wird, eingesetzt werden. Zudem wären weiterführende Untersuchungen von Wildgehölzen in Deutschland (insbesondere Wildapfel- und Wildbirnenarten) als mögliche natürliche Viroidquellen sinnvoll, da z.B. das Vorkommen des ASSVd in Wildbirnenpopulationen in Griechenland bekannt ist (Kyriakopoulou und Hadidi, 1998).

Ein Zusammenhang der Viroide mit den Fruchtvirosen konnte nicht gezeigt werden. Weder durch den Einsatz der viroidspezifischen Primer in der RT-PCR, noch bei der Untersuchung

eines Apple rough skin Isolats (83/82) mittels R-PAGE ergab sich ein Hinweis auf Assoziation mit einem Viroid (Kap. 3.3). Der vereinzelt in der Literatur beschriebene Zusammenhang der Fruchtvirose mit einem Viroid (Jongedijk, 2000), der nicht experimentell begründet wurde, ist demnach als unwahrscheinlich anzusehen. Da alle in dieser Arbeit untersuchten Isolate mit anderen Apfelviren mischinfiziert waren, und es in der Literatur auch keinen gesicherten Hinweis auf ein alleiniges Auftreten der Fruchtvirose gibt, hat die Theorie, daß die Viren ACLSV und ASPV mit den Fruchtvirose in Verbindung stehen könnten (Leone *et al.*, 1998; Desvignes, 1999), weiterhin Bestand. Ein weiteres Indiz dafür ist, daß von einzelnen ACLSV Isolaten bekannt ist, daß sie Fruchtsymptome an Apfel verursachen können (Posnette und Cropley, 1963; Nemeth, 1986). 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. Dabei könnten auch infektiöse voll-längen Klone der Viren verwendet werden. Dies stellt einen nicht geringen Arbeits- und Zeitaufwand dar, der im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden konnte. Allein die Rücktestung würde mehrere Jahre in Anspruch nehmen, da die Fruchtvirose ausschließlich an den Früchten spezifische Symptome zeigen. Weiterführende Untersuchungen zu den Fruchtvirose wären sinnvoll, insbesondere im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen zu den Erregern der Gummiholzkrankheit und Flachhästigkeit, um in der Zukunft vollständig auf die Indikatorrestung bei der Zertifizierung verzichten zu können.

#### **4.3 Untersuchungen zur Ätiologie der Gummiholzkrankheit**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Ätiologie der Gummiholzkrankheit (ARW) zu gewinnen, unter dem Aspekt, auch für diesen Erreger auf die Indikatorrestung zukünftig verzichten zu können. Zu Beginn wurde das Ziel verfolgt, die von einzelnen Autoren beschriebene Theorie, es handle sich bei dem Erreger um ein Phytoplasma, zu bestätigen (Kap. 3.4.1). Dabei wurde versucht, die Ergebnisse von Bertaccini *et al.* (1998) zu reproduzieren, die eine Assoziation mit Phytoplasmen nachweisen konnten. Da sich sowohl für ARW infizierte als auch für ARW freie Proben ein Fragment der erwarteten Größe amplifizieren lies und die Bandenmuster nach erfolgtem Restriktionsverdau nicht mit den von Bertaccini *et al.* (1998) beschriebenem übereinstimmen, lassen diese Ergebnisse keinen eindeutigen Schluß zu. 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 unbekannte Phytoplasmen aus verschiedenen Gruppen in symptomlosen Kontrollbäumen, die ARW-frei sind, nachgewiesen werden können. Die von Heinrich *et al.* (2001) beschriebene nested PCR zum unspezifischen Nachweis von Phytoplasmen wurde ebenfalls eingesetzt. Auch hier konnten Fragmente der erwarteten Größe aus infizierten und nicht infizierten Proben amplifiziert werden. Desweiteren auch von in Reinkultur befindlichen Bakterien. Einzig bei der nach Seemüller (pers. Mitteilung) verwendeten nested PCR wurden ausschließlich von der Phytoplasma-Positivkontrolle entsprechende Fragmente amplifiziert. Folgt man diesen Ergebnissen und geht bei diesem Verfahren von einer Spezifität für Phytoplasmen aus, so ist eine Assoziation eines Phytoplasmas mit den getesteten ARW Isolaten nicht nachweisbar. Beobachtungen von Skrzeczkowski *et al.* (2001) bestätigen die Ergebnisse bezüglich der Spezifität des von Seemüller vorgeschlagenen Primerpaares U3f/U5r. Ihnen gelang es in Kontrollexperimenten nicht, mit diesen Primern DNA von verschiedenen Bakterien, wohl aber von Phytoplasmen, zu amplifizieren. Gummiholz Isolate wurden nicht einbezogen. Allerdings wurde von ihnen keine nested PCR verwendet. Untersuchungen zur Konzentration von Phytoplasmen in verschiedenen Wirtspflanzen wurden von Berges *et al.* (2000) mittels kompetitiver PCR ebenfalls unter Verwendung von universellen Primerpaaren durchgeführt. Sie konnten zeigen, daß die Phytoplasmen in Gehölzen teilweise sehr niedrig konzentriert (370 Zellen/g Gewebe) und deshalb teilweise nur mittels nested PCR nachweisbar sind. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung dafür sein, daß Poggi Polini *et al.* (1995) und Smart *et al.* (1996), die ohne nested PCR gearbeitet haben, keine Fragmente aus gesunden und ARW infizierten Bäumen mit den von ihnen verwendeten Primern amplifizieren konnten.

Die Ergebnisse der nested PCR Protokolle lassen schlußfolgern, daß nicht alle der als spezifisch für Phytoplasmen beschriebenen Primer auch tatsächlich spezifisch sind und ein sicherer Nachweis, wenn überhaupt möglich, nur mittels nested PCR zu erzielen ist. Vermutlich läßt sich mit den meisten Primern auch DNA von Bakterien, die z.B. als Saprophyten auf den Pflanzen existieren könnten, amplifizieren. Zu ähnlichen Ergebnissen und Schlussfolgerungen kamen auch Skrzeczkowski *et al.* (2001) für ein anderes Phytoplasma-spezifisches Primerpaar. Sie konnten bakterielle DNA von aus Rinde verschiedener Obstbäume isolierten Bakterien der Gattungen *Staphylococcus* und *Pseudomonas* erfolgreich amplifizieren.

Aufgrund der selbst gewonnen Ergebnisse mittels drei verschiedener nested PCR Verfahren (Kap. 3.4.1) 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 in der Literatur nicht beschrieben ist), wurde nun versucht, ein möglicherweise mit ARW assoziiertes Virus nachzuweisen. Für den Nachweis von unbekanntem Viren/Viroiden gibt es im Gegensatz zu den Phytoplasmen keine als universell einsetzbar beschriebene Technik. Z.B. ist die Elektronenmikroskopie 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 oftmals 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). Auch die Extrahierbarkeit aus holzigen Pflanzen wurde bereits in den 80er Jahre beschrieben (Dodds *et al.*, 1985; Monette *et al.*, 1989). 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, Übertragungsversuchen 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.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte in Proben ARW infizierter Bäume keine eindeutige Assoziation mit Viruspartikeln nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die Pflanzen aus den Übertragungsversuchen und die durch zwei ARW Isolate hervorgerufenen Lokalläsionen verschiedener krautiger Pflanzen (Kap. 3.4.2). Die vereinzelt identifizierten viralen Strukturen sind auch gelegentlich in nicht infizierten Proben identifizierbar (Lesemann, pers. Mitteilung) und kein eindeutiger Anhaltspunkt für einen viralen Ursprung. Es kommen eher pflanzliche Strukturen in Frage, die zufällig denen der Viren im Elektronenmikroskop ähneln. Da aus den Lokalläsionen ein als *Pseudomonas syringae* pv.

bestimmtes Bakterium isoliert werden konnte, was nach Erfüllung der Koch'schen Postulate der Verursacher der Lokalläsionen ist aber nach Rückübertragungsversuchen nicht zu Gummiholz Symptomen an den Indikatorpflanzen geführt hat, scheint es lediglich als Kontamination in den Blüten der Birnen (beide Isolate stammen aus Dossenheim 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, auch wenn die Dauer der Beobachtung der inokulierten Bäume nur kurz war. Daß auch in den symptomlosen krautigen Pflanzen der Übertragungsversuche, die eventuell latent infiziert gewesen sein können, keine Assoziation mit einem Virus festgestellt werden konnte, läßt nicht den Umkehrschluß zu, daß kein Virus übertragen oder ARW nicht mit einem Virus assoziiert ist. Mißlungene Übertragung aufgrund einer ungeeigneten Technik oder der Auswahl ungeeigneter Pflanzen können genauso die Ursache dafür sein wie die Instabilität der Viruspartikel, die eine erfolgreiche Elektronenmikroskopie mit der verwendeten Methode verhindert.

Die Versuche, mit einem möglichen viralen Erreger assoziierte dsRNA aus mit Gummiholz infizierten Pflanzen zu extrahieren, waren nicht erfolgreich (Kap. 3.4.3). Aus Isolaten ohne Mischinfektion mit den anderen vier Apfelviren konnten keine, aus Mischinfektionen nur dsRNA, die den anderen Viren zuzuordnen war, extrahiert werden. Die Identität der dsRNA Fragmente wurde mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer bestätigt. Da aus den reinen Gummiholzisolaten keine dsRNA extrahiert werden konnte, kann eine Überlagerung der Banden im Gel durch zufällig gleiche Laufeigenschaften der dsRNA in den Mischinfizierten Proben ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß, wenn es sich bei Gummiholz um einen viralen Erreger handelt, dieser keine extrahierbaren Mengen dsRNA bildet. Dies kann daran liegen, daß er zu den Gruppen von Viren gehört, von denen bis heute keine erfolgreiche Extraktion beschrieben ist (u.a. DNA Viren, *Rhabdoviridae*, *Ophioviridae*, *Tenuiviridae*, siehe oben), oder daß er so niedrig konzentriert ist, daß die Sensitivität der verwendeten Technik nicht ausreicht. Ein eindeutiger Ausschluß einzelner Virusgruppen ist deshalb mit der verwendeten Technik und den erzielten Ergebnissen nicht möglich.

Mit Hilfe der modifizierten SISPA-Technik wurde versucht, virale Nukleinsäuren aus ausschließlich mit Gummiholz infizierten Proben spezifisch zu amplifizieren. Das erhaltene Fragment der RNA SISPA konnte mit einer Sequenzidentität von 95% direkt einem

pflanzlichen Ursprung zugeordnet werden, für alle Fragmente der DNA SISPA ergaben die Sequenzvergleiche keine hohen Homologien zu pflanzlichen Genen, wohl aber unterschiedlich hohe zu bakteriellen Genen (Kap. 3.4.4). Da mit den für eine spezifische Amplifikation entwickelten Primern aus gesunden und Gummiholz infizierten Pflanzen sowohl aus RNA und DNA Extrakten ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden konnte, handelt es sich entweder um Sequenzen von kontaminierenden Bakterien in den Proben oder pflanzliche Sequenzen. Somit kann der Ursprung von einem mit Gummiholz assoziierten Erreger ausgeschlossen werden. Daß Nukleinsäuren kontaminierender Bakterien in den Nukleinsäureextrakten vorhanden sein können, haben die Ergebnisse und Diskussion zum Nachweis von Phytoplasmen gezeigt. Die Nukleinsäuren könnten während der Behandlung der Filtrate mit den Nukleasen nicht erfolgreich verdaut worden sein, bei einzelnen Bakteriengruppen (Spiroplasma, Mykoplasmen, Phytoplasmen) ist dagegen auch ein Passieren der bakteriendichten Filter aufgrund ihrer Abmessungen theoretisch möglich. Eine Verschleppung von pflanzlichen Zellbestandteilen sollte ausgeschlossen werden können, da Nukleinsäuren-enthaltende pflanzliche Zellbestandteile wie Mitochondrien, Plastiden und Zellkerne einen größeren Durchmesser als die Poren der verwendeten Filter (Porenweite 0,2 µm) haben (Nultsch, 1991).

Mit der eingesetzten cDNA Subtraktion wurden die mRNA Populationen von einer ausschließlich mit ARW infizierten Probe und einer gesunden Kontrollpflanze verglichen. Dies ermöglicht die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen bzw. theoretisch auch von aufgrund einer Infektion mit einem Pathogen differentiell vorhandener mRNA. Es konnten 6 differentielle Klone ermittelt werden (Kap. 3.4.5), von denen 4 im Sequenzvergleich mit den in der Genbank (NCBI) enthaltenen Sequenzen zu hohen Identitäten geführt haben. Bei allen 4 Sequenzen handelt es sich um pflanzliche Gene. Für die zwei Sequenzen, für die keine signifikanten Treffer erhalten wurden, wurden Rücktestungen mit Hilfe spezifischer Primer an gesunden und ARW infizierten Pflanzen durchgeführt. In allen Fällen war eine erfolgreiche Amplifikation von RNA und DNA aus infizierten und gesunden Proben möglich. Daraus läßt sich schließen, daß auch hier Fragmente von pflanzlichen Nukleinsäuren amplifiziert wurden. Da alle differentiellen Klone pflanzlichen Ursprungs deutliche quantitative Unterschiede in der Hybridisierung gezeigt haben, bleibt offen, inwieweit die unterschiedlich starke Transkription durch die Infektion mit dem Erreger der Gummiholzkrankheit bedingt ist. Dies gilt auch für die Sequenzen, deren beschriebenen Gene keinen direkten Bezug zu an der Verholzung beteiligten Stoffwechselprozessen und

somit zur Symptomausprägung von ARW haben. Ein mit Gummiholz assoziierter Erreger als Ursprung der differentiellen Klone kann dagegen aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Der Nachweis eines möglichen mit ARW assoziierten Viroids war negativ (Kap. 3.4.6). Aus mehreren ARW infizierten Proben war mittels R-PAGE, einer universell für Viroide einsetzbaren Technik, keine für Viroide charakteristische RNA nachweisbar, woraus ein weitgehender Ausschluß möglich ist. Eine nicht ausreichende Sensitivität könnte theoretisch auch hier zu einem falsch negativen Nachweis geführt haben.

Eine Assoziation von ARW mit einem Viroid oder Virus konnte nicht nachgewiesen werden, wobei aus diesen Ergebnissen kein Ausschluß gefolgert werden kann, da die Ergebnisse der Untersuchungen nur auf einzelnen Proben basieren. Bei allen Techniken kann z.B. die jeweilige Sensitivität des Verfahrens, der Zeitpunkt der Durchführung und das verwendete Gewebe die Ursache für die negativen Nachweisergebnisse sein. Dieses gilt in gleicher Weise auch für die Versuche, Phytoplasmen in ARW infizierten Proben nachzuweisen.

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 dieser Arbeit neben dem Schwerpunkt der Entwicklung der Nachweisverfahren für die vier Apfelviren nicht geleistet werden. 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. Eine genaue Überprüfung der Spezifität für Phytoplasmen ist unbedingt notwendig, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

Da für viele Krankheiten an Kulturpflanzen bis heute kein Erreger gefunden wurde, sollte auch über die mögliche Präsenz von neuen oder bisher in Pflanzen unbekanntem Pathogenen nachgedacht werden (Flores, 2001). Auch wenn dies im Zusammenhang mit ARW ausschließlich als Spekulation anzusehen ist, für die keinerlei Indizien vorliegen, sollte die

Existenz von Prionen Proteinen in Pflanzen nicht ausgeschlossen werden. Verschiedene Prionen Proteine (infektiöse Isoform eines wirtseigenen Proteins ohne Nukleinsäureassoziation) wurden bisher als Auslöser neurodegenerativer Krankheiten in Tieren und Menschen beschrieben (Prusiner *et al.*, 2001). Desweiteren sind 3 Proteine, die Charakteristiken (u.a. Proteinase K Resistenz) von Prionen besitzen, in Pilzen identifiziert worden (Wickner, 2001). Die Möglichkeit, daß Prionen Proteine auch in Pflanzen zu finden sind, kann und sollte nicht ausgeschlossen werden.

## **5 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.

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., 2003. Multiplex RT-PCR-ELISA compared to bioassay for the detection of four apple viruses. Journal of Virological Methods 110, 153-157.

## **6 Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Zusammenhänge der einzelnen Kontrollmechanismen in der RT-PCR.....	<b>50</b>
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Primerposition der internen Kontrolle (Pfeile) im mitochondrialen <i>nad5</i> Gen.....	<b>52</b>
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des RT-PCR-ELISA Verfahrens.....	<b>68</b>
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der DIG-Detection Test-Strips (Roche).....	<b>71</b>
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der cDNA Subtraktion.....	<b>83</b>
<b>Abbildung 6:</b> Überprüfung der mRNA Spezifität der internen Kontrolle.....	<b>95</b>
<b>Abbildung 7:</b> Paralleler Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben.....	<b>97</b>
<b>Abbildung 8:</b> Einsatz verschiedener Pufferkonzentrationen beim parallelen Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben.....	<b>98</b>
<b>Abbildung 9:</b> Einsatz verschiedener MgCl <sub>2</sub> Konzentrationen beim parallelen Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben.....	<b>98</b>
<b>Abbildung 10:</b> Einsatz verschiedener Mengen Q-Solution beim parallelen Nachweis von ACLSV, ASPV und ApMV aus 3-fach infizierten Proben.....	<b>99</b>
<b>Abbildung 11:</b> Einsatz verschiedener Anlagerungstemperaturen für multiplex RT-PCR I.....	<b>100</b>
<b>Abbildung 12:</b> Einsatz verschiedener Anlagerungstemperaturen für multiplex RT-PCR II.....	<b>101</b>
<b>Abbildung 13:</b> Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von ACLSV und ASGV mittels multiplex RT-PCR I.....	<b>101</b>
<b>Abbildung 14:</b> Repräsentative Ergebnisse für den Nachweis von ASPV und ApMV mittels multiplex RT-PCR II.....	<b>102</b>
<b>Abbildung 15:</b> Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR I für ACLSV und ASGV.....	<b>103</b>
<b>Abbildung 16:</b> Ermittlung der Detektionsgrenzen für multiplex RT-PCR II für ASPV und ApMV.....	<b>103</b>
<b>Abbildung 17:</b> Vergleichstest von 2 Hot Start-Enzymen für multiplex RT-PCR I (oberes Gel) und II (unteres Gel).....	<b>104</b>
<b>Abbildung 18:</b> Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR I mittels Gelelektrophorese und ELISA.....	<b>106</b>

<b>Abbildung 19:</b> Veranschaulichung der Auswertung von multiplex RT-PCR II mittels Gelelektrophorese und ELISA.....	<b>106</b>
<b>Abbildung 20:</b> Mittelwert und Standardabweichung von multiplex RT-PCR-ELISA I für 37 infizierte oder gesunde Proben sowie 3 Negativkontrollen.....	<b>107</b>
<b>Abbildung 21:</b> Mittelwert und Standardabweichung von multiplex RT-PCR-ELISA II für 37 infizierte oder gesunde Proben sowie 3 Negativkontrollen.....	<b>108</b>
<b>Abbildung 22:</b> Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR I.....	<b>109</b>
<b>Abbildung 23:</b> Bestimmung der relativen Sensitivität von Gelelektrophorese und ELISA-Detektion der Amplifikate von multiplex RT-PCR II.....	<b>110</b>
<b>Abbildung 24:</b> Vergleich Nunc/Exiqon Strips im RT-PCR-ELISA für ASPV.....	<b>111</b>
<b>Abbildung 25:</b> Nachweis von RT-PCR Produkten von ASPV mittels DIG-Detection Test-Strips.....	<b>111</b>
<b>Abbildung 26:</b> Nachweis von ASSVd, PBCVd und ADFVd mittels RT-PCR.....	<b>113</b>
<b>Abbildung 27:</b> Nachweis von Phytoplasmen mittels nested RT-PCR nach Heinrich <i>et al.</i> (2001).....	<b>115</b>
<b>Abbildung 28:</b> Nekrotische Lokalläsionen auf einem Blatt von <i>Chenopodium quinoa</i> L.....	<b>116</b>
<b>Abbildung 29:</b> Mittels Elektronenmikroskopie identifizierte virusähnliche Partikel.....	<b>117</b>
<b>Abbildung 30:</b> Gelelektrophoretische Auftrennung verschiedener dsRNA Extrakte.....	<b>118</b>
<b>Abbildung 31:</b> Hybridisierung von Tester Klonen mit markierter Tester und Driver cDNA.....	<b>120</b>



## **7 Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Feste Chemikalien.....	<b>29</b>
<b>Tabelle 2:</b> Flüssige Chemikalien.....	<b>31</b>
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer.....	<b>32</b>
<b>Tabelle 4:</b> Sonstige verwendete Enzyme, Nukleotide und zugehörige Reaktionspuffer..	<b>33</b>
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Klonierungsvektoren und Nukleinsäuren.....	<b>36</b>
<b>Tabelle 6:</b> In der Transformation verwendete Bakterienstämme.....	<b>36</b>
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Laborgeräte.....	<b>36</b>
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Software.....	<b>37</b>
<b>Tabelle 9:</b> Sonstiges Material.....	<b>38</b>
<b>Tabelle 10:</b> Liste der verwendeten Proben.....	<b>38</b>
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Indikatoren zum Nachweis der Virusinfektionen und Virussympptome (Zahn, 1995).....	<b>40</b>
<b>Tabelle 12:</b> Primersequenzen und erwartete Produktgrößen.....	<b>48</b>
<b>Tabelle 13:</b> Liste der mit der internen Kontrolle überprüften Pflanzen.....	<b>53</b>
<b>Tabelle 14:</b> Primersequenzen und erwartete Produktgrößen.....	<b>54</b>
<b>Tabelle 15:</b> Capture Oligonukleotid Sequenzen und Position.....	<b>67</b>
<b>Tabelle 16:</b> Primer nach Lee <i>et al.</i> (1995).....	<b>73</b>
<b>Tabelle 17:</b> Primer nach Seemüller (pers. Mitteilung).....	<b>75</b>
<b>Tabelle 18:</b> Primer nach Heinrich <i>et al.</i> (2001).....	<b>76</b>
<b>Tabelle 19:</b> Liste der in den Übertragungsversuchen verwendeten Pflanzenarten und Sorten.....	<b>78</b>
<b>Tabelle 20:</b> Primer und Adapter der SISPA-Technik.....	<b>82</b>
<b>Tabelle 21:</b> Primer für die Erst- und Zweitstrangsynthese.....	<b>84</b>
<b>Tabelle 22:</b> Adaptersequenzen.....	<b>86</b>
<b>Tabelle 23:</b> Primer für die 1. und 2. PCR.....	<b>88</b>
<b>Tabelle 24:</b> Primer der Bakterien PCR.....	<b>89</b>
<b>Tabelle 25:</b> Ergebnisse der Sequenzvergleiche mit Sequenzen der Genbank (NCBI).....	<b>105</b>
<b>Tabelle 26:</b> Ergebnisse der Paralleltestung mit dem Pflanzenschutzamt Hannover.....	<b>112</b>
<b>Tabelle 27:</b> Sequenzvergleiche mit den Fragmenten der SISPA-Technik.....	<b>119</b>
<b>Tabelle 28:</b> Sequenzvergleiche mit den Fragmente der subtraktiven Hybridisierung.....	<b>121</b>
<b>Tabelle 29:</b> Absorptionsmeßwerte, Mittelwert und Standardabweichung des multiplex RT-PCR-ELISA I.....	<b>188</b>

<b>Tabelle 30:</b> Absorptionsmeßwerte, Mittelwert und Standardabweichung des multiplex RT-PCR-ELISA II.....	<b>189</b>
<b>Tabelle 31:</b> Absorptionsmeßwerte des Sensitivitätsvergleichs Gelelektrophorese/ multiplex RT-PCR-ELISA I und II.....	<b>190</b>
<b>Tabelle 32:</b> Absorptionsmeßwerte des Vergleichs Nunc/Exiqon Strips im RT-PCR ELISA für ASPV.....	<b>190</b>

## **8 Literaturverzeichnis**

Adams, A.N., Davies, D.L., Kirby, M.J., 2001. Virus and phytoplasma detection in fruit trees. *Outlook on Agriculture* 30, 45-54.

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* 98, 11609-11614.

Alrefai, R.H., Shiel, P.J., Domier, L.L., D'Acry, C.J., Berger, P.H., Korban, S.S., 1994. The nucleotide sequence of apple mosaic virus coat protein gene has no similarity with other bromoviridae coat protein genes. *Journal of General Virology* 75, 2847-2850.

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.

Ambrožič Turk, B., 1996. Detection of apple mosaic virus, apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus in apple trees by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using different plant tissues. *Research Reports Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana* 67, 151-157.

Anonymus, 1963. Virus diseases of fruit trees. *Annual Report of the East Malling Experimental Station* 46, 27.

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.

Aramburu, J., Rovira, M., 1998. The effects of apple mosaic ilarvirus (ApMV) on hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73, 97-101.

Barbara, D.J., 1980. Detecting prunus necrotic ringspot virus in rosaceous hosts by enzyme linked immunosorbent assay. *Acta Phytopathologica Hungarica* 15, 329-332.

- 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.
- Bar-Joseph, M., Hull, R., Lane, L.C., 1974. Biophysical and biochemical characterization of apple chlorotic leaf spot virus. *Virology* 62, 563-566.
- Battula, N., Loeb, L.A., 1975. On the fidelity of DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 250, 4405-4409.
- Baumann, G., 1972. Wichtige Viruskrankheiten des Kern- und Steinobstes. *Erwerbsobstbau* 14, 177-198.
- Baumann, G., Engel, G., 1988. Einfluß von Apfelmosaik und Gummiholzkrankheit auf die vegetative und generative Leistung von Apfelsorten auf M 9 bis zum 13. Standjahr. *Erwerbsobstbau* 30, 162-165.
- Baumann, G., 1958. *Viruskrankheiten der Obstbäume*. Deutscher Bauernverlag, Berlin.
- 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.
- Beasley, E.M., Myers, R.M., Cox, D.R., Lazzeroni, L.C., 1999. Statistical refinement of primer design parameters. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sinninsky, J.J., Hrsg. *PCR applications: Protocols for functional genomics*. Academic Press, San Diego, 55-72.
- Berges, R., Rott, M., Seemüller, E., 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90, 1145-1152.
- Bernhard, R., Dunez, J., 1971. Chlorotic leaf spot virus. Contaminations of different prunus species. *Populations of Viruses. Annals of Phytopathology* 3, 217-336.
- 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.
- Bidabe, A., 1989. La rugosite des pommes. *Phytoma* 409, 57-60.
- Birch, D.E., Kolmodin, L., Wong, J., Zangenberg, G.A., Zoccoli, M.A., McKinney, N., Young, K.K.Y., Laird, W.J., 1996. Simplified hot start PCR. *Nature* 381, 445-446.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Bol, J.F., 1999. Alfamoviruses and ilarviruses (bromoviridae). In: Granoff, R.G., Webster, R.G., Hrsg. *Encyclopedia of Virology. Zweite Auflage*, Academic Press, San Diego, 38-43.
- 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.
- Bovey, R., 1961. Infection of pear trees with apple rubbery wood virus. *Planteavl* 65, 67-68.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H., Marky, L.A., 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 3746-3750.
- Broadbent, P., Dephoff, C., Gilkeson, C., 1994. Detection of citrus tatter leaf virus in Australia. *Australasian Plant Pathology* 23, 20-24.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1994. *Biology of microorganisms. Siebte Auflage*, Prentice Hall International, Englewood Cliffs.
- Calavan, E.C., Christiansen, D.W., Roistacher, C.N., 1963. Symptoms associated with tatter leaf virus infection to troyer citrange rootstocks. *Plant Disease Reporter* 47, 971-975.

- Cameron, H.R., Thompson, M., 1986. Seed transmission of apple mosaic virus in hazelnut. *Acta Horticulturae* 193, 53-55.
- 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.
- Campbell, A.I., 1961. The effect of rubbery wood virus on the stool bed production of two clonal apple rootstocks. *Journal of Horticultural Sciences* 36, 268-273.
- Campbell, A.I., 1968. Heat sensitivity of some apple viruses. *Tagungsberichte DAL Berlin* 97, 311-316.
- Campbell, A.I., Hughes, L.F., 1975. Symptoms of star crack virus on the fruit and shoot growth of apple cultivars. *Acta Horticulturae* 44, 245-250.
- Campbell, A.I., Sparks, T.R., 1976. Experiments with dapple apple virus. *Acta Horticulturae* 67, 261-264.
- 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.
- Canova, A., 1963. Infection of pear trees with apple rubbery wood virus. *Phytopathologia Mediterranea* 2, 155-157.
- Casper, R., 1973. Serological properties of prunus necrotic ringspot and apple mosaic virus isolates from rose. *Phytopathology* 63, 238-240.
- Cation, D., Carlson, R.F., 1962. Determination of virus entities in apple scion/rootstock test orchards. *Report Bulletin of the Michigan State University* 45, 159-166.
- Chairez, R., Lister, R.M., 1973. A comparison of two strains of apple chlorotic leaf spot virus. *Phytopathology* 63, 1458-1464.

- Chakrabarti, R., Schutt, C.E., 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Research* 29, 2377-2381.
- Cheney, P.W., Lindner, R.C., Parish, C.L., 1970. Two graft-transmissible bark diseases of apple. *Plant Disease Reporter* 54, 44-48.
- Chevet, E., Lemaitre, G., Katinka, M.D., 1995. Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic Acids Research* 16, 3343-3344.
- Chou, Q., Roussel, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W., 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20, 1717-1723.
- Cieslinska, M., Malinowski, T., Zawadzka, B.J., 1995. Studies on several strains of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) isolated from different fruit tree species. *Acta Horticulturae* 386, 63-71.
- Clark, J.M., 1988. Novel non-templated nucleotide reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 16, 9677-9686.
- Clark, M.F., Adams, A.N., Tresh, A.M., Casper, R., 1976. The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Horticulturae* 67, 51-57.
- Clontech, 2000. PCR-select cDNA subtraction kit user manual. Nummer PT1117-1, 6.
- Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91-92.
- Cordy, C.B., MacSwan, I.C., 1961. Some evidence that pear bark measles is seed-borne. *Plant Disease Reporter* 45, 891.
- Corvo, L.M., Barros, M.T.F., 2001. The use of a simplified DAS-ELISA procedure for large scale detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses in apple trees over extended sampling periods. *Acta Horticulturae* 550, 269-274.
- 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.
- Cropley, R., 1960. Pear blister canker: a virus disease. *Annual Report of the East Malling Research Station* 43, 104.
- Cropley, R., 1963a. The association of a sap transmissible virus with apple chlorotic leaf spot. *Plant Disease Reporter* 47, 165-167.
- Cropley, R., 1963b. Apple rubbery wood. *Technical Communication of the Commonwealth Bureau of Horticulture* 30, 69-72.
- Cropley, R., 1968. Comparison of some apple latent viruses. *Annals of Applied Biology* 61, 361-372.
- Crossley, S.J., Jakobi, V., Adams, A.N., 1998. IC-PCR amplification of apple stem grooving virus isolates and comparison of polymerase and coat protein gene sequences. *Acta Horticulturae* 472, 113-117.
- Daniels, J., Marinho, V.L.A., Kummert, J., Lepoivre, P., 1998. Development of colorimetric RT-PCR tests for ASGV detection in apple trees. *Acta Horticulturae* 472, 105-111.
- Davies, D.L., Adams, A.N., Glenister, M., 1984. Mycoplasma-like organisms (MLOs) in pears and apples. *Report of East Malling Research Station* 6, 151.
- De Sequera, O.A., 1967a. Purification and serology of an apple mosaic virus. *Virology* 31, 314-322.
- De Sequera, O.A., 1967b. Studies on a virus causing stem-grooving and graft-union abnormalities in Virginia Crab apple. *Annals of Applied Biology* 60, 59-66.
- De Sequera, O.A., Lister, R.M., 1969a. Purification and relationships of some filamentous viruses from apple. *Phytopathology* 59, 1740-1749.
- De Sequera, O.A., Lister, R.M., 1969b. Applicability of latex flocculation serological testing to apple viruses. *Phytopathology* 59, 572-574.
- Demeke, T., Adams, R.P., 1992. The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques* 12, 332-334.



- Desvignes, J.C. 1999. Virus diseases of fruit trees. Ctifl, Paris.
- Desvignes, J.C., 1970. Les maladies a virus du poisier et leur detection. Ctifl-Documents 26, 12.
- Desvignes, J.C., Boye, R., 1988. Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on fruit trees. *Acta Horticulturae* 235, 31-47.
- Desvignes, J.C., Boye, R., Cornaggia, D., Grasseau, N., 1992. Quick detection of the principal apple and pear virus diseases. *Acta Horticulturae* 309, 377-384.
- 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., Cornaggia, D., Grasseau, N., Ambros, S., Flores, R., 1999b. Pear blister canker viroid: host range and improved bioassay with two new pear indicators, Fieud 37 and Fieud 110. *Plant Disease* 83, 419-422.
- Desvignes, J.C., Grasseau, N., Boye, R., Cornaggia, D., Aparicio, F., di Serio, F., Flores, R., 1999a. Biological properties of apple scar skin viroid: Isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission. *Plant Disease* 83, 768-772.
- Desvignes, J.C., Savio, A., 1975. *Cydonia C 7/1* et *Pyronia veitchii*, deux indicateurs complementaires. *Acta Horticulturae* 44, 139-146.
- Detienne, G., Delbos, R., Dunez, J., 1980. Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of apple chlorotic leaf spot virus. *Acta Phytopathologica Hungarica* 15, 39-45.
- 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.

- Di Serio, F., Malfitano, M., Alioto, D., Ragozzino, A., Desvignes, J.C., Flores, R., 2001. Apple dimple fruit viroid: Fulfillment of Koch's postulates and symptom characteristics. *Plant Disease* 85, 179-182.
- Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K., 1991. The biotin-(strept)avidin system: Principles and application in biotechnology. *Clinical Chemistry* 37, 625-636.
- Dodds, J.A., 1993. DsRNA in diagnosis. In: Matthews R.E.F., Hrsg. *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press, Boca Raton, 273-294.
- Dodds, J.A., Jordan, R.L., Heick, J.A., Tamaki, S.J., 1985. Double-stranded RNA for the diagnosis of citrus and avocado viruses. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virology*, 330.
- Dunez, J., Marenaud, C., Delbos, R., Lansac, M., 1972. Variability of Symptoms induced by the apple chlorotic leaf spot (CLSV) – a type of CLSV probably responsible for bark split disease of prune trees. *Plant Disease Reporter* 56, 293-295.
- Eckert, K.A., Kunkel, T.A., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 18, 3739-3744.
- Edward, M.C., Gibbs, R.A., 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications* 3, 65-75.
- 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.
- Ellinger, W., Görgens, M., 2000. EU-Kernobstschätzung 2000. *Mitteilungen des Obstbauversuchsrings* 55, 314-317.
- EPPO, 1999. Certification schemes, pathogene-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. *EPPO Bulletin* 29, 239-252.
- Erhardt, W., Götz, E., Bödeker, N., Seybold, S., 2000. *Zander – Handwörterbuch der Pflanzennamen*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Faggioli, F., Ragozzino, E., Barba, M., 2001. Simultaneous detection of stone or pome fruit viroids by single tube RT-PCR. *Acta Horticulturae* 550. 59-63.

- Ferree, D.C., Clayton-Greene, K., 1990. Influence of levels of leaf expression of apple mosaic on net photosynthesis and transpiration of leaves of four apple cultivars. *Fruit Varieties Journal* 44, 45-47.
- Fialova, R., Navratil, M., Podsednikova, R., 2001. Histological manifestation of rubbery wood symptoms in apple trees. *Acta Horticulturae* 550, 265-267.
- Flegg, C.L., Clark, M.F., 1979. The detection of apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Annals of Applied Biology* 91, 61-65.
- Flores, R., 2001. Introductory remarks to the session "etiology of virus and viroid diseases of fruit trees". *Acta Horticulturae* 550, 307.
- 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.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T.O., 2001. Viroids. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London, 1009-1024.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Candresse, T., 2001. Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing Primers (PDO-RT-PCR). *Acta Horticulturae* 550, 37-43.
- Fridlund, P.R., 1973. Distribution of chlorotic leaf spot virus in apple budsticks. *Plant Disease Reporter* 57, 865-869.
- Fridlund, P.R., 1982. Distribution of chlorotic leaf spot virus-infected buds on various lengths of apple budsticks in successive years. *Acta Horticulturae* 130, 85-87.
- Fritzsche, R., Kegler, H., 1968. Nematoden als Vektoren von Viruskrankheiten der Obstgehölze. *Tagungsberichte DAL, Berlin* 97, 289-295.

- Fuchs, E., 1980. Serological detection of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. *Acta Phytopathologica Hungarica* 15, 69-73.
- Fuchs, E., Merker, D., 1985a. Partielle Reinigung des Stammfurchungs-Virus des Apfels (apple stem grooving virus) und Antiserumherstellung. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 21, 171-181.
- Fuchs, E., Merker, D., 1985b. Partielle Reinigung des Chlorotischen Blattfleckungs-Virus des Apfels (apple chlorotic leaf spot virus) und Antiserumherstellung. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 21, 101-110.
- Fulton, R.W., 1965. A comparison of two viruses associated with plum line pattern and apple mosaic. *Zastita Bilja* 16, 427-430.
- Fulton, R.W., 1967. Serology of viruses transmitted from cherry, apple, plum and rose. *Phytopathology* 57, 811.
- Fulton, R.W., 1968. Serology of viruses causing cherry necrotic ringspot, plum line pattern, rose mosaic and apple mosaic. *Phytopathology* 58, 635-638.
- Fulton, R.W., 1971. Tulare apple mosaic virus. *CMI descriptions of plant viruses*, Nr. 19.
- Gardner, F.E., Marth, P.C., Magness, J.R., 1946. Lethal effect of certain apple scion on Spy 227 stock. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 48, 195-199.
- German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J.C., Pernollet, J.C., Dunez, J., 1990. Nucleotide sequence and genome organisation of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology* 179, 104-112.
- German, S., Candresse, T., Le Gallo, O., Lanneau, M., Dunez, J., 1992. Analysis of dsRNAs of apple chlorotic leaf spot virus. *Journal of General Virology* 73, 767-773.
- German-Retana, S., Bergey, B., Delbos, R.P., Candresse, T., Dunez, J., 1997. Complete nucleotide sequence of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). *Archives of Virology* 142, 833-841.
- German-Retana, S., Candresse, T., 1999. Trichoviruses. In: Granoff, A., Webster, R.G., Hrsg. *Encyclopedia of virology*. Zweite Auflage, Academic Press, San Diego, 1873-1842.

Gilmer, R.M., 1958a. Two viruses that induce mosaic of apple. *Phytopathology* 48, 432-434.

Gilmer, R.M., 1958b. Probable coidentity of shiro line pattern virus and apple mosaic virus. *Phytopathology* 46, 127-130.

Gilmer, R.M., Mink, G.I., Shay, J.R., Stouffer, R.F., McCrum, R.C., 1971. Latent viruses of apple: I. Detection with woody indicators. *New York Agricultural Experimental Station* 1, 1-9.

Giunchedi, L., 1976. Transmission experiments on the virus disease dapple apple. *Acta Horticulturae* 67, 255-260.

Giunchedi, L., Poggi Pollini, C., 1992. Cytopathological, negative staining and serological electron microscopy of a clostero-like virus associated with pear vein yellows disease. *Journal of Phytopathology* 134, 329-335.

Grüntzig, M., Fuchs, E., Hentsch, T., 1996. Zur Verbreitung und zum serologischen Nachweis des Kirschenblattroll-Virus (cherry leaf roll nepovirus, CLRV) sowie des Apfelmosaik-Virus (apple mosaic ilarvirus, ApMV) in *Betula* spp.. *Journal of Plant Diseases and Protection* 103, 571-581.

Grüntzig, M., Fuchs, E., Pfeilstetter, E., Al Kai, B., Otto, F., 1994. Untersuchungen zur Verteilung mechanisch übertragbarer Viren in Bäumen des Kern- und Steinobstes. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 29, 217-248.

Guengerich, H.W., Millikan, D.F., 1956. Transmission of the stem pitting factor in apple. *Plant Disease Reporter* 40, 934.

Guengerich, H.W., Millikan, D.F., 1959. Reaction of ownrooted trees of Spy 227 and Virginia Crab to infection with the stem pitting virus. *Plant Disease Reporter Supplement* 254, 30-31.

Guerra, L., Kirkpatrick, B., 2001. Attempts to confirm that phytoplasmas are the causal agent of apple rubbery wood disease. <http://nrsp5.prosser.wsu.edu/nrsparwp.html>. Aufgerufen am 11.09.2001.

Guo, D., Maiß, E., Adam, G., Casper, R., 1995. *Prunus* necrotic ringspot ilarvirus: nucleotide sequence of RNA 3 and the relationship to other ilarviruses based on coat protein comparison. *Journal of General Virology* 76, 1073-1079.

- Hailstones, D.L., Bryant, K.L., Broadbent, P., Zhou, C., 2000. Detection of citrus tatter leaf virus with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Australasian Plant Pathology* 29, 240-248.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
- Hansen, A.J., Lane, W.D., 1985. Elimination of apple chlorotic leaf spot virus from apple shoots cultures by ribavarin. *Plant Disease* 69, 134-135.
- 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.
- Heldt, H.W., 1997. *Plant biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, Oxford.
- 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.
- Hentsch, T., Grüntzig, M., Fuchs, E., 1996. Über das Auftreten von Viren in Forstbaumschulen. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt* 321, 310.
- 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.
- Howell, W.E., Mink, G.I., 1995. *Malus micromalus* clone GMAL 273: A new woody plant indicator for rapid detection of apple stem grooving virus. *Acta Horticulturae* 386, 439-443.
- Howell, W.E., Mink, G.I., Hurr, S.S., Foster, J.A., Postman, J.D., 1996. Selected *Malus* clones for rapid detection of apple stem grooving virus. *Plant Disease* 80, 1200-1202.
- Hull, R., 2002. *Matthews' plant virology*. Vierte Auflage, Academic Press, San Diego.
- Hunter, J.A., Chamberlain, E.E., Atkinson, J.D., 1958. Note on transmission of apple mosaic by natural root grafting. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1, 80-82.

- 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.
- Iijima, A., 1990. Occurrence of a viroid-like disease, apple fruit crinkle. *Plant Protection* 44, 130-132.
- Ikuta, S., Takagi, K., Wallace, R.B., Itakura, K., 1987. Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. *Nucleic Acids Research* 15, 797-811.
- Innis, M., Gelfand, D., 1999. Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sinnitsky, J.J., Hrsg. *PCR applications: Protocols for functional genomics*. Academic Press, San Diego, 3-22.
- Inouye, N., Maeda, T., Mitsuhashi, K., 1979. Citrus tatter leaf virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 45, 712-720.
- 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.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K., 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 106, 235-239.
- 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.
- James, D., 2001. Long term assessment of the effects of in vitro chemotherapy as a tool for apple stem grooving virus elimination. *Acta Horticulturae* 550, 459-462.
- James, D., Godkin, S.E., Eastwell, K.C., MacKenzie, D.J., 1996. Identification and differentiation of prunus virus isolates that cross-react with plum pox virus and apple stem pitting virus antisera. *Plant Disease* 80, 536-543.

Jelkmann, W., 1994. Nucleotide sequence of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and the relationship with potex- and carlaviruses. *Journal of General Virology* 75, 1535-1542.

Jelkmann, W., 2001. International working group on fruit tree viruses. Detection of viruses and virus-like diseases of fruit trees. *Acta Horticulturae* 550, 473-493.

Jelkmann, W., Keim-Konrad, R., 1997. Immuno-capture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. *Journal of Phytopathology* 145, 499-503.

Jelkmann, W., Kunze, L., Vetten, H.J., Lesemann, D.E., 1992. CDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus like agents associated with apple stem pitting and pear veine yellows. *Acta Horticulturae* 309, 55-62.

Jenkins, J.E.E., Storey, I.F., 1955. Star cracking of apples in east anglia. *Plant Pathology* 4, 50-52.

Jongedijk, G.P., 2000. Zertifiziertes virusfreies Material gibt Sicherheit. *Deutsche Baumschule* 10, 45-47.

Kainz, P., Schmiedlechner, A., Strack, H.B., 2000. Specificity-enhanced hot-start PCR: Addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature. *BioTechniques* 28, 278-282.

Karesova, R., Paprstein, F., 2001. Apple chlorotic leaf spot virus in germplasm collection of fruit species. *Acta Horticulturae* 550, 259-263.

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.

Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Mörnicke, A., Schild, T.A., Henz, G., Beyermann, B., 1998. Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. *BioTechniques* 24, 154-158.

Kegler, H., 1965. Bark split and decline in Beurre Hardy pear trees. *Zastita Bilja* 16, 311-316.



- Kegler, H., 1967a. Probleme der Virusbereinigung in Baumschulen. *Obstbau* 7, 36-40.
- Kegler, H., 1967b. Der viröse Birnenverfall, die Rindenrissigkeit und die Rindennekrose. *Obstbau* 7, 21-23.
- Kegler, H., 1968. Obstgehölze und Beerenobst. In: Klinkowski, M., Hrsg. *Pflanzliche Virologie*, Band II, Teil 1. Zweite Auflage, Akademie Verlag, Berlin, 208-379.
- Kegler, H., Kleinhempel, H., Verderevskaja, 1976. Investigations on pear stony pit virus. *Acta Horticulturae* 67, 209-218.
- Kegler, H., Verderevskaja, T.D., Fuchs, E., 1979. Untersuchungen über Wechselbeziehungen verschiedener Kern- und Steinobstvirosen. *Archiv für Gartenbau* 27, 325-336.
- Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P.D., Chenchik, A., 1994. TaqStart antibody: "Hot Start" PCR facilitated by neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *BioTechniques* 16, 1134-1137.
- Kerlan, C., Mille, B., Dunez, J., 1981. Immunosorbent electron microscopy for detecting apple chlorotic leaf spot and plum pox viruses. *Phytopathology* 77, 400-404.
- Kievits, T., van Gemen, B., van Strijp, D., Schukkink, R., Dircks, M., Adriaanse, H., Malek, L., Sooknanan, R., Lens, P., 1991. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for HIV-1 diagnosis. *Journal of Virological Methods* 35, 273-286.
- 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.
- Kirby, M.J., Guise, C.M., Adams, A.N., 2001. Comparison of bioassay and laboratory assays for apple stem grooving virus. *Journal of Virological Methods* 93, 167-173.
- Kitt, V.J., Wallace, R.B., Itakura, K., Woo, S.L.C., 1983.  $\alpha$ -Antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. *Nature* 304, 230-234.
- Klerks, M.M., Leone, G., Lindner, J.L., Schoen, C.D., van der Heuvel, J.F.J.M., 2001. Rapid and sensitive detection of apple stem pitting virus in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons. *Phytopathology* 91, 1085-1091.

Knapp, E., da Camara Machado, A., Pühringer, H., Wang, Q., Hanzer, V., Weiss, H., Weiss, B., Katinger, H., Laimer da Camara Machado, M., 1995b. Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp.. *Journal of Virological Methods* 55, 157-173.

Knapp, E., Hanzer, V., Heiss, H., da Camara Machado, A., Weiss, B., Wang, Q., Katinger, H., Laimer da Camara machado, M., 1995a. New aspects of virus elimination in fruit trees. *Acta Horticulturae* 386, 409-418.

Knapp, E., Hanzer, V., Weiss, H., da Camara Machado, A., Wang, Q., Weiss, B., Katinger, H., Laimer da Camara Machado, M., 1995c. Distribution of apple chlorotic leaf spot virus in apple shoots cultivated in vitro. *Acta Horticulturae* 386, 187-194.

Koganezawa, H., 1986. Further evidence for viroid etiology of apple scar skin and dapple apple disease. *Acta Horticulturae* 193, 45-49.

Koganezawa, H., Ohnuma, Y., Sakuma, T., Yanase, H., 1989. 'Apple fruit crinkle', a new graft-transmissible fruit disorder of apple. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station* 16, 57-62.

Koganezawa, H., Yanase, H., 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Disease* 74, 610-614.

Koganezawa, H., Yanase, H., Sakuma, T., 1983. Viroid-like RNA associated with apple scar skin (or dapple apple) disease. *Acta Horticulturae* 130, 193-197.

Kovarova, M., Draber, P., 2000. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research* 28, e70. Elsevier Online-Ausgabe.

Kristensen, H.R., Jorgensen, H.A., 1957. *Plantesygdomme i Danmark 1955*. New attacks of virus diseases fungi and bacteria. Pear bark split. *Tidsskrift for Planteavl* 61, 617.

Kristensen, H.R., Thomsen, A., 1962. Apple mosaic virus host plants and strains. *Proceedings of the Fifth European Symposium on Fruit Tree Virus Diseases*. Bologna, 21-26.

Kummert, J., Marinho, V.L.A., Ruffard, G., Coline, D., Lepoivre, P., 1998. Sensitive detection of apple stem grooving and apple stem pitting viruses from infected apple trees by RT-PCR. *Acta Horticulturae* 472, 97-104.

- 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.
- Kundu, J.K., 2001. To the diagnosis and distribution of the apple stem pitting virus in the Czech Republic. *Acta Horticulturae* 550, 275-280.
- Kunze, L., Jelkmann, W., 1995. Die Pseudoscharka der Hauszwetschen und ihr Zusammenhang mit dem apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 47, 45-50.
- 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.
- Laimer, M., Bertaccini, A., Kummert, J., Candresse, T., Jelkmann, W., 2002. FAIR CT 97-3889: Validierung von diagnostischen Methoden an in vitro Pflanzen zur Zertifizierung von Obstgehölzen. *Erwerbsobstbau* 44, 76-81.
- 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.
- Lee, I.M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W., Davis, R.E., 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84, 559-566.

- Lemoine, J., 1971. Anomalies of styles, anthers and pollen grains connected with the presence of different strains of viruses in the pear tree var. Williams. *Annals of Phytopathology* 3, 305-310.
- Lemoine, J., Desvignes, J.C., 1975. Les maladies a virus et a mycoplasmes du pommier, du pommier, du poirier et du cognassier. Invuflec, Paris, 53.
- Leone, G., Lindner, J.L., Jongedijk, G., 1998. Symptoms on apple and pear indicators after back transmission from *Nicotiana occidentalis* confirm the identity of apple stem pitting virus with Pear vein yellows virus. *Acta Horticulturae* 472, 61-65.
- Leone, G., Lindner, J.L., Jongedijk, G., van der Meer, F.A., 1995. Back-transmission of a virus associated with apple stem pitting and pear vein yellows from *Nicotiana occidentalis* to apple and pear indicators. *Acta Horticulturae* 386, 72-77.
- Lepanje, S., 1971. Denaturation of globular proteins by guanidine thiocyanate. *Biochimica et Biophysica Acta* 243, 349-365.
- Lister, R.M., Bancroft, J.B., Nadakavu-Karen, M.J., 1965. Some sap-transmissible viruses from apple. *Phytopathology* 55, 859-870.
- Lister, R.M., Hadidi, A.F., 1971. Some properties of apple chlorotic leaf spot virus and their relation to purification problems. *Virology* 45, 240-251.
- Lopez-Moya, J.J., Fernandez-Fernandez, M.R., Cambra, M., Garcia, J.A., 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* 76, 121-136.
- 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.
- Loreti, S., Faggioli, F., Barba, M., 1995. 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.

- Luckwill, L.C., Campbell, A.I., 1959. *Malus platycarpa* as an apple virus indicator. *Journal of Horticultural Sciences* 34, 248-252.
- 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.
- Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Miyakawa, T., 1997. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, japanese pear, european pear and citrus trees. *Phytopathology* 87, 389-396.
- Malinowski, T., Komorowska, B., Golis, T., Zawadzka, B., 1998. Detection of apple stem pitting virus and pear veine yellows virus using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae* 472, 87-95.
- Mallach, N., 1956. *Viruskrankheiten und virusähnliche Erkrankungen des Kern- und Steinobstes*. Obst- und Gartenbauverlag, München.
- 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.
- Marenaud, C., Dunez, J., Bernhard, R., 1976. Identification of different strains of apple chlorotic leaf spot virus and possibilities of interactions. *Acta Horticulturae* 67, 219-226.
- Marenaud, C., Germain, E., 1975. La mosaïque du noisetier. *Annals of Phytopathology* 7, 133-145.
- Marinho, V.L.A., Kummert, J., Rufflard, G., Colinet, D., Lepoivre, P., 1998. Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. *Plant Disease* 82, 785-790.

Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Bosiac, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Duffus, J.E., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A., Minafra, A., Murrant, A.F., Namba, S., Niblette, C.L., Vetter, H.J., Yoshikawa, N., 2001b. Genus trichovirus. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London, 956-960.

Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Bosiac, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Duffus, J.E., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A., Minafra, A., Murrant, A.F., Namba, S., Niblette, C.L., Vetter, H.J., Yoshikawa, N., 2001a. Genus capillovirus. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London, 952-956.

Martelli, G.P., Candresse, T., Namba, S., 1994. Trichovirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology* 134, 451-455.

Martelli, G.P., Jelkmann, W., 1998. Foveavirus, a new plant virus genus. *Archives of Virology* 143, 1245-1249.

Martelli, G.P., Jelkmann, W., 2001. Genus foveavirus. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London, 985-989.

Martin, F.H., Castro, M.M., Aboul-ela, F., Tinoco, I., 1985. Base pairing involving deoxyinosine: Implication for probe design. *Nucleic Acids Research* 13, 8927-8938.

McCrum, R.C., 1965. Spread of apple chlorotic leaf spot virus from tree to tree. *Plant Disease Reporter* 49, 958-959.

McMorran, J.P., Cameron, H.R., 1983. Detection of 41 Isolates of necrotic ringspot, apple mosaic and prune dwarf viruses in *Prunus* and *Malus* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease* 67, 536-538.

- Meijnkes, C.A.R., Posnette, A.F., Schuch, K., 1965. The economic importance of virus diseases of apples and pear. In: Posnette, A.F., Hrsg. Virus diseases of apples and pears. CAB Technical Communication 30, 1-4.
- Menzel W., Maiß, E., 2000b. Viroide an Apfel und Birne. Obstbau 9, 525.
- Menzel, W., 1999. Charakterisierung und Nachweis von Chrysanthemum stunt viroid mittels PCR-ELISA. Diplomarbeit, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Universität Hannover.
- Menzel, W., Maiß, E., 2000a. Detection of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) in cultivars of *Argyranthemum frutescens* by RT-PCR-ELISA. Journal of Plant Diseases and Protection 107, 548-552.
- Mezzetti, A., 1956. Una complessa, alterazione delle mele. Frutticoltura 2, 132.
- Millikan, D.F., Martin, J.R.W., 1956. An unusual fruit symptom in apple. Plant Disease Reporter 40, 229-230.
- Mink, G. I., 1989a. Apple chlorotic leafspot. In: Fridlund, P.R., Hrsg. Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University Pullman, Washington, 8-19.
- Mink, G. I., 1989b. Apple mosaic virus. In: Fridlund, P.R. Hrsg. Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University Pullman, Washington, 34-39.
- Mink, G.I., Shay, J.R., 1959. Preliminary evaluation of some russian apple varieties indicators for apple viruses. Plant Disease Reporter Supplement 254, 13-17.
- Mink, G.I., Shay, J.R., 1962. Latent viruses in apple. Bulletin of the Indiana Agricultural Experimental Station 1962, 756.
- 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.

Miyakawa, T., 1978. A bud-union disorder of Japanese citrus on *Poncirus trifoliata* rootstock caused by tatter leaf virus. *Reviews in Plant Protection Research* 11, 1-10.

Monette, P.L., James, D., Godkin, S.E., 1989. Double-stranded RNA from *rupestris* stem pitting-affected grapevine. *Vitis* 28, 137-142.

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.

Morvan, G., Castelein, C., 1967. Une affection virale distincte de L'enroulement chlorotique: la rosette de abricotier var. Luizet. *Annales Epiphyties* 18, 205-216.

Nakahara, K., Hataya, T., Uyeda, I., 1999. A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenisation 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.

Nelmes, B.J., Preston, R.D., Ashworth, D., 1973. A possible function of microtubules suggested by their abnormal distribution in rubbery wood. *Journal of Cell Science* 13, 741-751.

Nemchinov, L., Hadidi, A., Candresse, T., Foster, J.A., Verderevskaya, T., 1995. Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR, or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Horticulturae* 386, 51-61.

Nemchinov, L., Hadidi, A., Faggioli, F., 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.
- Nishio, T., Kawai, A., Takahashi, T., Hamba, S., Yamashita, S., 1989. Purification and properties of citrus tatter leaf virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55, 254-258.
- Noack, B., 1988. Einfluß von Virusstatus und Unterlage auf Ertrag und Fruchtqualität von Apfelanlagen in Schleswig-Holstein. *Erwerbsobstbau* 30, 166-170.
- Nultsch, W., Hrsg, 1991. *Allgemeine Botanik*. Vierte Auflage, Georg Thieme, Stuttgart.
- Ohira, K., Namba, S., Rozanov, M., Kusumi, T., Tsuchizaki, T., 1995. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *Journal of General Virology* 76, 2305-2309.
- Ohki, S., Yoshikawa, N., Inouye, N., Inouye, T., 1989. Comparative electron microscopy of Chenopodium quinoa leaves infected with apple chlorotic leaf spot, apple stem grooving, or citrus tatter leaf virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55, 245-249.
- Ohtsuka, E., Matsuka, S., Ikehara, M., Takahashi, Y., Matsubara, K., 1985. An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridisation probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *Journal of Biological Chemistry* 260, 2605-2608.
- Ohtsuka, Y., 1938. On manshu-sabika-byo in apple, graft transmission and symptom variation in cultivars. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* 9, 282-286.
- 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.
- Otto, F., Fuchs, E., Kegler, H., Grüntzig, M., Meyer, U., 1990. Nachweis quantitativer Resistenz bei Apfel gegen das Apfelmosaik-Virus (apple mosaic virus). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 26, 525-533

- 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.
- Pandey, R.N., Adams, R.P., Flournoy, L.E., 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 14, 17-22.
- Parish, C.L., 1981. Graft-transmission of blister bark and internal bark necrosis in Delicious apples. *Horticultural Science* 16, 52-54.
- 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.
- Paunovic, S., Maksimovic, V., Rankovic, M., Radovic, S., 1999. Characterization of a virus associated with pear stony pit in cv. Württemberg. *Journal of Phytopathology* 147, 695-700.
- Paunovic, S., Rancovic, M., 1998. Relationship between quince fruit deformation virus and some pome fruit viruses. *Acta Horticulturae* 472, 125-133.
- Pena Iglesias, A., Ayuso Gonzales, P., 1975. Preliminary identification of the viruses producing spanish apricot pseudopox (virulea) and apricot mosaic disease. *Acta Horticulturae* 44, 255-266.
- Petrzik, K., Svoboda, P., 1997. Screening of apple mosaic virus in hop cultivars in the Czech Republic by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Virologica* 41, 101-103.
- Pilotti, M., Faggioli, F., Barba, M., 1995. Characterization of italian isolates of pear vein yellows virus. *Acta Horticulturae* 386, 148-154.
- 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., Cropley, 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.
- Posnette, A.F., Cropley, R., 1956. Apple mosaic virus. Host reaction and strain interference. *Journal of Horticultural Sciences* 31, 119-133.

- Posnette, A.F., Cropley, R., 1958. Quince indicators for pear viruses. *Journal of Horticultural Sciences* 34, 126-129.
- Posnette, A.F., Cropley, R., 1961. Indicator plants for latent virus infection. *Journal of Horticultural Sciences* 36, 168.
- Posnette, A.F., Cropley, R., 1963. Russet ring virus disease of apple in England. *The Jubilee Annual Report of East Malling Research Station* 47, 117-118.
- Posnette, A.F., Cropley, R., Wolfswinkel, L.D., 1962. Heat inactivation of some apple and pear viruses. *Annual Report of East Malling Research Station* 45, 94-96.
- Posnette, A.F., Ellenberger, C.E., 1963. A disease resembling plum pox in England. *Plant Pathology* 12, 115-117.
- Prentice, J.W., 1950. Experiments on rubbery wood disease of apple trees. *Annual Report of East Malling Research Station* 33, 122-125.
- Prusiner, S.B., Baron, H., Carlson, G., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Gabizon, R., Gambetti, P., Hope, J., Kitamoto, T., Kretzschmar, H.A., Laplanche, J.L., Tateishi, J., Telling, G., Will, R., 2001. Mammalian prions. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London, 1032-1039.
- Qiagen, 1999. *HotStar Taq PCR handbook* 03/99.
- Rankovic, M., Vuksanovic, S., 1983. The use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of apple viruses. *Zastita Bilja* 34, 257-264.
- 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.
- Refatti, E., Carraro, L., Osler, R., Soligo, S., 1999. Some data on heat treatment to clean pome fruit tree material affected by virus agents. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 61, 91-95.

Rek, J., 1987. Untersuchungen über die Eignung des ELISA-Verfahrens zum serienmäßigen Nachweis von Viren (PLRV und PVY) bei der Kartoffel unter Berücksichtigung des Infektionszeitpunktes der Pflanzen und des physiologischen Zustandes der Knolle. Dissertation Nr. 8285, ETH Zürich.

Rich, A.E., 1967. Natural spread of stem pitting virus of apple. *Plant Disease Reporter* 51, 291-293.

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.

Roistacher, C.N., Nauer, E.M., Wagner, R.L., 1980. Transmissibility of cachexia, sweet mottle, psorosis, tatterleaf and infectious variegation viruses on knife blades and its prevention. Proceedings of the 8<sup>th</sup> Conference of the International Organisation of Citrus Virologists Riverside, USA, 225-229.

Roossinck, M.J., Bujarski, J., Ding, S.W., Hajimorad, R., Hanada, K., Scott, S., Tousignant, M., 2001. Genus ilarvirus. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London, 931-932.

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.

Rychlik, W., Rhoads, R.E., 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 17, 8543-8551.

Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., DiTerlizzi, B., Pallaz, V., 2000. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90, 1330-1336.

Sakar, G., Kapelner, S., Sommer, S.S., 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research* 18, 7465.

Salazar, L.F., 1999. Capilloviruses. In: Granoff, A., Webster, R.G., Hrsg. *Encyclopedia of Virology*. Zweite Auflage, Academic Press, San Diego, 222.

Salmon, M.A., Vendrame, M., Kummert, J., Lepoivre, P., 2002. Detection of apple chlorotic leaf spot virus using a 5' nuclease assay with a fluorescent 3' minor groove binder-DNA probe. *Journal of Virological Methods* 104, 99-106.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sanchez-Navarro, J.A., Pallas, V., 1997. Evolutionary relationships in the ilarviruses: nucleotide sequence of prunus necrotic ringspot virus RNA 3. *Archives of Virology* 142, 749-763.

Sanger, F. (1982): Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA. *Journal of Molecular Biology* 162, 729-773.

Sänger, H.L., 1998. Classification of the small plant pathogenic RNAs. *Acta Horticulturae* 472, 553-554.

Sato, K., Yoshikawa, N., Takahashi, T., 1993. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of apple chlorotic leaf spot virus. *Journal of General Virology* 74, 1927-1931.

Sato, K., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Taira, H., 1995. Expression, subcellular location and modification of the 50 kDa protein encoded by ORF 2 of the apple chlorotic leaf spot trichovirus genome. *Journal of General Virology* 76, 1503-1507.

Schade, C., 1971. Der Nachweis des Virus der nekrotischen und der chlorotischen Ringfleckenkrankheit in Kirsche mit dem Latextest als Schnellmethode. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 7, 207-216.

Schaff, D., Lee, I.M., Davis, R.E., 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms in plants by polymerase chain reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 1503-1509.

Schimaski, H.H., 1993. Comparative experiments for detecting apple chlorotic leaf spot virus in apple cultivars and wild apple varieties by means of biological and serological methods. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 28, 109-114.

Schmelzer, K., 1968. Die Buntblättrigkeit der Eberesche. In: Klinkowski, M., Hrsg. *Pflanzliche Virologie, Band II, Teil 2. Zweite Auflage, Akademie Verlag, Berlin*, 281.

Schmid, G., 1963. Transmission experiments of the virus diseases causing star crack and rough skin on apples. *Phytopathologia Mediterranea* 2, 124-126.

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.

Schmitz, M., Noga, G., 2000. Ausgewählte pflanzliche Inhaltsstoffe und ihr antioxidatives Potential in hydrophilen und lipophilen Extracten von *Phaseolus vulgaris*-, *Malus domestica*- und *Vitis vinifera*-Blättern. *Gartenbauwissenschaft* 65, 65-73.

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.

Schuch, K., 1957. Viruskrankheiten und ähnliche Erscheinungen im Obstbau. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 88, 16-18.

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.

Schwarz, K., Jelkmann, W., 1998. Detection and characterization of european apple stem pitting virus sources from apple and pear by PCR and partial sequence analysis. *Acta Horticulturae* 472, 75-85.

Scott, S.W., Zimmerman, M.T., Ge, X., MacKenzie, D.J., 1998. The coat proteins and putative movement proteins of isolates of prunus necrotic ringspot virus from different host species and geographic origins are extensively conserved. *European Journal of Plant Pathology* 104, 155-161.

Seneviratne, S.N., Posnette, A.F., 1970. Identification of viruses isolated from plum trees affected by decline, line pattern and ringspot diseases. *Annals of Applied Biology* 65, 115-125.

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., Faggioli, F., Keith, J.M., Hadidi, A., 2002. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: Apscaviroid, hostuviroid, pelamoviroid and pospoviroid. *Journal of Virological Methods* 105, 115-121.

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.

Shiel, P.J., Alrefai, R.H., Domier, L.L., Korban, S.S., Berger, P.H., 1995. The complete nucleotide sequence of apple mosaic virus RNA-3. *Archives of Virology* 140, 1247-1256.

Shiel, P.J., Berger, P.H., 2000. The complete nucleotide sequence of apple mosaic virus (ApMV) RNA 1 and RNA 2: ApMV is more closely related to alfalfa mosaic virus than to other ilarviruses. *Journal of General Virology* 81, 273-278.

- Singh, M., Singh, R.P., 1997. Potato virus Y detection: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 149-155.
- 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.
- Singh, R.P., Nie, X., Singh, M., Coffin, R., Duplessis, P., 2002. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection. *Journal of Virological Methods* 99, 123-131.
- Skorzeczkowski, 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.
- Smith, W.W., Barrat, J.G., Rich, A.E., 1956. Dapple apple, an unusual fruit symptom of apples in New Hampshire. *Plant Disease Reporter* 40, 765-788.
- Soumet, C., Ermel, G., Salvat, G., Colin, P., 1997. Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. *Letters in Applied Microbiology* 24, 113-116.
- Souza, C.H., Parish, C.L., 1992. Apple decline in Brazil. *Acta Horticulturae* 309, 241-243.
- Staub, U., Polivca, H., Gross, H.J., 1995. Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids. *Journal of Virological Methods* 52, 209-218.
- Stouffer, R. F., 1989. Apple stem pitting. In: Fridlund, P.R., Hrsg. *Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University Pullman, Washington, 138-144.



Stouffer, R.F., 1983. Sugar Crab, an effective indicator for dapple apple. *Acta Horticulturae* 130, 141.

Sweet, J.B., 1980. Fruit tree infections of woody exotic and indigenous plants in Britain. *Acta Phytopathologica Hungarica* 15, 231-238.

Sweet, J.B., Campbell, A.I., 1976. Pome fruit virus infection of some woody ornamental and indigenous species of Rosaceae. *Journal of Horticultural Sciences* 51, 91-97.

Sweet, J.B., Sparks, T.R., Constantine, D.R., 1978. Improving the quality and the virus status of hardy ornamental trees and shrubs. *Report of Long Ashton Research Station 1977*, 36-37.

Thomsen, A., 1961. Split bark of pears. (rough bark of pears). *Tidsskrift for Planteavl* 65, 69-72.

Thomsen, A., 1975. Cross-protection experiments with apple mosaic virus. *Statens Forsogvirksomked i Plantekultur* 57, 1196.

Torrance, L., Dolby, C.A., 1984. Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. *Annals of Applied Biology* 104, 267-276.

Tyagi, S., Kramer, F.R., 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14, 303-308.

Van der Meer, F.A., 1975. Plant species outside the genus *malus* as indicators for latent viruses of apple. *Acta Horticulturae* 44, 213-220.

Van der Meer, F.A., 1976. Observations on apple stem grooving virus. *Acta Horticulturae* 67, 293-304.

Van der Meer, F.A., 1986. Observations on the aetiology of some virus diseases of apple and pear. *Acta Horticulturae* 309, 73-74.

Van Katwijk, W., 1955. Ruwshilligheid bij appels, een virusziekte. *Plantenziekten* 61, 4-6.

Van Katwijk, W., Meijneke, C.A.R., 1963. Apple rough skin. *Technical Communication of the Commonwealth Bureau of Horticulture* 30, 41-44.

Wallace, J.M., Drake, R.J., 1962. Tatterleaf, a previously undescribed virus effect on citrus. *Plant Disease Reporter* 46, 211-212.

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

Waterworth, H.E., Gilmer, R.M., 1969. Dark green epinasty of *Chenopodium quinoa*, a syndrome induced by a virus latent in apple and pear. *Phytopathology* 54, 1155.

Welsh, M. F., van der Meer, F. A., 1989. Apple stem grooving. In: Fridlund, P.R., Hrsg. *Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, Washington State University Pullman, Washington, 127-137.

Welsh, M.F., Nyland, G., 1965. Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat. *Canadian Journal of Plant Sciences* 45, 443-454.

Wickner, R.B., 2001. Fungal prions. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Hrsg. *Virus Taxonomy*. Academic Press, London, 1040-1045.

Yaarwood, C.E., 1955. Mechanical transmission of an apple mosaic virus. *Hilgardia* 23, 613-628.

Yamaguchi, A., Yanase, H., 1976. Possible relationship between the causal agent of dapple apple and scar skin. *Acta Horticulturae* 67, 249-254.

Yanase, H., Sawamura, K., Yamaguchi, A., Mink, G.I., 1975. Viruses causing apple topworking disease in Japan. *Acta Horticulturae* 44, 221-230.

Yoshikawa, N., Imaizumi, M., Takahashi, T., Inouye, N., 1993. Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organisation of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. *Journal of General Virology* 74, 2743-2747.

Yoshikawa, N., Matsudo, H., Oda, Y., Isogai, M., Takahashi, T., 2001. Genome heterogeneity of apple stem pitting virus in apple trees. *Acta Horticulturae* 550, 285-290.

Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M., Takahashi, T., 1992. The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome. *Virology* 191, 98-105.

Yoshikawa, N., Takahashi, T., 1988. Properties of RNA and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. *Journal of General Virology* 69, 241-245.

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, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Universität Hannover.

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

Zahn, V., 1999. Kontrollergebnisse auf das Vorkommen von Obstviren in niedersächsischen Baumschulen von 1965 bis 1998 und die möglichen Auswirkungen der neuen Anbaumaterialverordnung für Gemüse, Obst und Zierpflanzen auf den erreichten Standard. *Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* 29 (3), 66-67.

Zangenberg, G., Saiki, R., Reynolds, R., 1999. Multiplex PCR: Optimization guidelines. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sinninsky, J.J., Hrsg. *PCR applications: Protocols for functional genomics*. Academic Press, San Diego, 73-94.

Zhao, X., Jiang, Y., He, X., Zhou, C., Chen, J., Ouyang, L., Li, S., Su, W., Huang, T., Huang, Z., 1990. Occurrence and distribution of citrus virus and virus-like diseases in the mainland of China. *Proceedings of the International Citrus Symposium Guangzhou, China*, 547-552.

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.

## **9 Anhang**

### **9.1 Alignments der Primer und Capture Oligonukleotide**

Es sind die Nukleinsäuresequenzen der Primer und Capture Oligonukleotide und die an den entsprechenden Positionen auftretenden Unterschiede mit den in der Genbank (NCBI) vorhandenen Sequenzen in 5'-3' Orientierung wiedergegeben (abgerufen am 22.11.2002). Die Accession Nummern der Sequenzen ohne Unterschiede sind in Klammern angegeben. Die eigenen Sequenzen (siehe 9.2) sind nur für die Capture Oligonukleotide überprüft worden, da die Bereiche der Primersequenzen nicht überprüfbar sind. (Degenerierte Positionen der Capture Oligonukleotide: Y steht für die Nukleotide T oder C, M für A oder C)

#### **ACLSV**

**sense** **TTCATGGAAAGACAGGGGCAA**  
AJ243438 .....T..

(X99752, AB060950-AB060964, D14996, M58152)

**antisense** **AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA**

(AJ243438, D14996, X99752, M58152)

**Capture Oligo** **AAGATGGMCTCCAGTGTCTGTTCAG**  
AF251275, AJ243438,  
X99752, AB060963,  
M58152 .....A.....

(D14996, AB060950-AB060962, -64, eigene Sequenz)

#### **ASGV**

**sense** **GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA**  
AF438409, AF233295,  
-98, -99, D14995 .....C.....  
AF465354 .....A.....C.....

(AB004063, D16368, D16681, D14455)

**antisense** **AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA**  
AF465354 .....C.....

(AB004063, D16368, D16681, D14455, D14995, AF233298, -99, AF438409)

**Capture Oligo** **TGTTTCTCATCAGGYGTTAGACGATTCA**  
 AB004063, D16368, .....A.....  
 D16688, D14455 .....G.....  
 AF438409 .....A.....  
 eigene Sequenz  
 (D14995, AF233298, -99)

**ASPV**

**sense** **ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA**  
 AF491929, AF345894 .C.....  
 AF345895 .....T.....  
 AF345893 .....T.....  
 AF345892 .....T.....  
 (AF495382, AF491930, -31, AF438521, -22, AB045371, D21828, -  
 29)

**antisense** **TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA**  
 AF345894 .....T.....  
 AF345892 .....T.G.....  
 AB045371 .C.....T.C.....  
 (AF345893, D21828, -29)

**Capture Oligo** **CAAAGAAGAAGTCAAAGCTGCATACCT**  
 AF491929, AF345894, -95 .....G.....  
 AF438522 .....G.....  
 AF495382, AF491931 .....G..A.....  
 AF491930 .....G.....G.....  
 eigene Sequenz .....G.....C..G.....  
 (AF438521, AF345892, -93, D21828, -29)

**ApMV**

**sense** **ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA**  
 AF473580-AF473587, .....A.....  
 AY054387, -89, .....T.....  
 AF473588 .....G.....  
 AY054388 .....A.....A...  
 AY054386 .....T.....G.....  
 AY054385  
 (AF548367, AY125977, AF473589-AF473596, S78319, U15608,  
 L03726)

**antisense** **GTA**ACTCACTCGTTATCACGTACAA  
 AY054388 .....G.....  
 AY054385 .....C.....  
 AF473589-AF473595 .....T.....  
 AF473580-AF473584, -87 .....A.....

(AF548367, AY125977, AY054386, -87, -89, AF473588, -96, S78319, U15608, L03726)

**Capture Oligo** **AGTAATCCGAAAGGTCCGAATCCGAT**  
 AF473596 .....G.....  
 AF473588-AF473595 .....A.....

(AF548367, AY125977, AY054385-AY054389, AF473580-AF473587, S78319, U15608, L03726, eigene Sequenz)

**nad5**

**sense** **GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGT**

(D37958)

**antisense** **CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA**

(D37958)

**Capture Oligo** **CTATGCGGATCCTCGGACATATATG**

(D37958, eigene Sequenz)

**9.2 Sequenzen der verschiedenen Fragmente der multiplex RT-PCR I und II**

Die Sequenzen sind um die Vektorsequenzen bereinigt in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die Primersequenzen (sense Primer) bzw. komplementären Bereiche (antisense Primer) sind unterstrichen. Rechts oberhalb der Zeilen sind die Zählnummern der Nukleotide angegeben.

**ACLSV**

60  
TTCATGGAAAGACAGGGGCAATCCTGGAACAGACACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAG 120  
 CAATCCAAGGAACATCGGAGCAGACGGAATTCCTGGATCTAGTGGTGGAGGTGAAATCAA 180  
 TGGAGGACCAGAAGGTCATCGGGTCTTACAATCTGAAAGAGGTGGTCAGCATGATCAAAG 240  
 CATTCAAGACTACCTCTTCGGATCCGAACATCAGCAACATGACTTTCGCCAGGTGTGTG 300  
 AGGCTTTCGCACCCGAGGCGAGAAACGGGTTGGTAAAATTGAAGTACAAAGGGGTTTTCA 360  
 CCAACCTCTTTACCACTATGCCAGAGGGGGGAACAAGTACCCGGAGCTGATGTTTGATT

TTAATAAAGGGCTTAACATGTTTATCATGAATAAGGCCAGCAAAAAGTCATAACTAATA 420  
TGAACCGGCGTCTTTTACAACTGAGTTTGCAAAAAGTGAGAATGAGGCGAAGCTCTCAT 480  
CTGTTACAACCTGATCTTTGCATTTAGTTTGTTAAGAAGTTTGGCTTAATAAATAAAATA 540  
AATAAATAGTGTGTTGTGTGTTTAAATATATTTGTATTGAATATGTTTGCATTAGATAGA 600  
CAAACCTCTTGAACCCATGAAAGAGTATAAAGAGTCATGGTATTTGATTGGAGTGTTTAGA 660  
685  
CTTATAAATAAATAGCCTGTAGACTT

### ASGV

GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAACGAATGTACTGTTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATT 60  
TGCTGATTTGGCTCGGGAATTTCTTCATGAAAGATGGTCAAGGGGACCTTGCCACCAACA 120  
TTTATAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTGA AAAAAGCCCTTGGGTGGCTTTTGTATTTGCCA 180  
CCGGTCTTAAATGAATCGTCTAACGCCTGATGAAAAACAGGTAATAGACAGAATGACCA 240  
AGAGGCTTTTTTCGTACTGAAGGACAAAAAGGGTT 275

### ASPV

ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAAACTCAAAGTCCCCCGCCAATTGGGTTGGCAAGGAAT 60  
TCAAATTTGAAACTAGGTACGCGGCTTTCGACTTCTTCTTTGGGGTTGAGAGCACTGCTT 120  
CCTTAGAACCTGCAGATGGCCTAATAAGGCTGCCAACCCAAGCTGAGAGAGTGGCCAATG 180  
CCACCAGTAAAGAAATACAGATGTACCGCATCCGCTCAATGGAGGGTACACAAGCTGTCA 240  
ATCTTGGTGAGGTCACAGGAGGAAAAGTTGGACCAAAGCCAGTTCTATCTATTAGGAAGT 300  
AATTAGTTAATTAATTTCTGCAATTTCAATTTCCGTACTTATGCTTTTTTAGTAAAGTTG 360  
367  
ATCCCAA

### ApMV

ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAATGGATGGATTGGGTTAGTGGAGGATTACGATGAG 60  
120

AGTAATCCGAAAGGTCCGAATCCGATGGACCGAAAGGGTTTCAAAAAAGACCNTCCGAGA 180  
GGTTGGCAGTGGGAAGCCCCTCCAAACACAACCTTTTGATGACTTCGTGAGGAAGTTTAGG 240  
TTGGTATTGGAGTTTAAGACGAATTTGCGCCGCTGGCGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTG  
262  
TACGTGATAACGAGTGAGTTAC

*nad5*

60  
GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTTTCGATAGCCTGACCGTAGTGATGTTAATTGTGGTTACA  
120  
TTTATAAGTAGCTTGGTCCATCTTTATTCATATCATATATGTCCGAGGATCCGCATAGC  
180  
CCTCGATTTATGTGTTATTTATCCATTTTTACTTTTTTTATGCCAATGTTGGTACTGGA  
181  
G



### 9.3 Meßwerte der multiplex RT-PCR ELISA I und II

**Tabelle 29: Absorptionsmeßwerte, Mittelwert und Standardabweichung des multiplex RT-PCR-ELISA I**

(Die Werte sind auf die dritte Stelle hinter dem Komma gerundet.)

Fragment	ACLSV infiziert	ACLSV gesund	ACLSV Kontrolle	ASGV infiziert	ASGV gesund	ASGV Kontrolle	<i>nad5</i> infiziert	<i>nad5</i> gesund	<i>nad5</i> Kontrolle
Mittelwert	2,670	0,028	0,020	2,294	0,004	0,005	0,705	0,685	0,002
Standardabweichung	0,695	0,013	0,003	0,962	0,006	0,004	0,133	0,066	0,003
Meßwerte	1,364	0,013	0,022	0,598	-0,009	0,004	0,667	0,787	-0,001
	1,586	0,014	0,017	0,613	-0,005	0,002	0,567	0,648	0,001
	1,829	0,015	0,02	1,083	-0,002	0,009	0,71	0,769	0,005
	2,797	0,018		1,465	-0,002		0,592	0,641	
	2,832	0,019		1,986	-0,001		0,791	0,693	
	2,901	0,021		2,053	0		0,641	0,625	
	3,018	0,021		2,181	0,001		0,792	0,729	
	3,059	0,022		2,542	0,002		0,674	0,68	
	3,174	0,023		3,056	0,002		0,766	0,673	
	3,24	0,023		3,077	0,003		0,813	0,648	
	3,296	0,023		3,102	0,004		0,746	0,705	
	3,299	0,024		3,127	0,004		0,685	0,79	
		0,024		3,129	0,004		0,816	0,682	
		0,025		3,19	0,005		1,055	0,744	
		0,027		3,203	0,005		0,467	0,704	
		0,028			0,006		0,597	0,624	
		0,028			0,008		0,605	0,676	
		0,029			0,008			0,686	
		0,032			0,008			0,495	
		0,034			0,013			0,701	
	0,036			0,015					
	0,037			0,016					
	0,049								
	0,061								
	0,064								

**Tabelle 30: Absorptionsmeßwerte, Mittelwert und Standardabweichung des multiplex RT-PCR-ELISA II**

(Die Werte sind auf die dritte Stelle hinter dem Komma gerundet.)

Fragment	ASPV infiziert	ASPV gesund	ASPV Kontrolle	ApMV infiziert	ApMV gesund	ApMV Kontrolle	<i>nad5</i> infiziert	<i>nad5</i> gesund	<i>nad5</i> Kontrolle
Mittelwert	3,196	0,003	0,04	2,831	-0,002	0	1,615	0,836	0,005
Standardabweichung	0,166	0,009	0,01	0,684	0,01	0,001	0,448	0,232	0,002
Meßwerte	3,208	-0,012	0,039	3,221	-0,009	-0,001	0,857	0,787	0,003
	2,892	0,002	0,05	2,732	-0,009	0	2,424	1,079	0,007
	3,49	-0,003	0,031	3,121	-0,012	0,001	1,477	1,06	0,004
	3,154	0,001		3,123	0,001		1,815	1,048	
	3,216	0,003		1,323	-0,003		2,067	0,899	
	3,081	0,002		3,135	0,008		1,837	0,98	
	3,237	-0,008		3,159	0,031		1,907	0,85	
	3,219	0,006			-0,006		1,575	0,786	
	3,076	0,006			0,003		0,916	0,549	
	3,136	0,034			0		1,549	0,781	
	3,15	0			0		1,323	1,158	
	3,49	0,004			-0,01		1,633	1,069	
		0,007			-0,009			0,543	
		-0,003			-0,001			0,537	
		-0,005			-0,007			0,497	
		0,002			0,008			0,531	
		0,003			0,001			0,836	
		0,016			-0,009			0,902	
		-0,009			0,012			0,716	
		0,006			-0,016			0,514	
		0,007			0,01			1,148	
		0,014			0,005			1,147	
		-0,002			-0,011			0,503	
	0,003			0,001			1,039		
	0,007			-0,005			0,951		
				-0,004					
				-0,002					
				-0,005					
				-0,015					
				0,003					

**Tabelle 31: Absorptionsmeßwerte des Sensitivitätsvergleichs Gelelektrophorese/multiplex RT-PCR-ELISA I und II**

(Die Werte sind auf die dritte Stelle hinter dem Komma gerundet.)

µl 1:20 verdünnte Amplifikate	20	15	10	7,5	5	3,75	2,5	1,5	1	0,5
ACLSV	2,355	1,23	0,92	0,869	0,452	0,305	0,231	0,146	0,149	0,062
ASGV	0,920	0,483	0,448	0,274	0,179	0,174	0,12	0,09	0,049	0,021
nad5 (I)	0,756	0,573	0,53	0,395	0,328	0,241	0,183	0,128	0,111	0,038
ASPV	1,489	1,214	0,877	0,77	0,399	0,486	0,182	0,155	0,094	0,041
ApMV	2,07	1,695	1,071	0,818	0,814	0,54	0,362	0,24	0,213	0,09
nad5 (II)	0,366	0,316	0,248	0,187	0,175	0,124	0,093	0,042	0,032	0,012

**Tabelle 32: Absorptionsmeßwerte des Vergleichs Nunc/Exiqon Strips im RT-PCR-ELISA für ASPV**

(Die Werte sind auf die dritte Stelle hinter dem Komma gerundet.)

	Nunc Nucleo Link Strips			Exiqon DNA Immobilizer		
	infiziert	gesund	Kontrolle	infiziert	gesund	Kontrolle
Mittelwert	2,623	0,008	0,006	1,018	-0,002	-0,002
Stabndard- abweichung	0,791	0,007	0,003	0,547	0,005	0,005
Meßwerte	2,54	0,01	0,008	0,729	-0,001	-0,004
	3,186	0,004	0,003	1,515	-0,007	0,006
	3,087	0,005	0,004	1,22	-0,001	-0,004
	2,944	0,023	0,009	1,422	-0,003	-0,004
	3,106	0,007		0,958	-0,004	
	0,699	0,008		0,108	0,009	
	3,280	0,007		1,852	-0,003	
	3,169	0,018		1,635	-0,002	
	1,423	0,006		0,271	-0,006	
	2,655	0		0,842	0,006	
	2,44	0,001		0,525	-0,006	
	2,947	0,01		1,14	0	

#### 9.4 Sequenzen der SISPA-Technik und subtraktiven Hybridisierung

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. Rechts oberhalb der Zeilen sind die Zählnummern der Nukleotide angegeben.

##### SISPA 1

```
CGAAGTCGGGGGCGAAGACGCCGTGCACTCGGCTCACATGCACCCACCTTTTCGGTGA 60
ATCTGGGCTCGATCTTCGACCTCATGGATTTCTGTGCCGGTTGAGGGCGACAGCGCGCCGG 120
GCGCCGGCGACCTGCCGCAGCCGGCGGTGGAAGACGAGGAATTCGACGAGGGTGAAGTCG 180
CCGAGGAGGAGGGCGAAGCCTGAAGTGATCGCTGAAGCGCCTCCGATCGCCGAGCCCCCG 240
ATGACGGCGATCCAGGGGAGACCCAGCCCAGGAGGCCGAGGGGAATGGACAGCAACATG 300
GCCACCGGGATCAGGGCGGCGATCAGTCAAGCCGGCCTGAACCTTGGGCCACTCATCCAC 360
CAGGATCGAAAAGACCACAGTGTGCGGCACCCGACCGGTCCAAGTGACGCGATCCTGGCG 420
CAAGATTCCATCTTGGTGCGCCCCAGCTTGGTCATGGCCGCGCGGCGTGGCCATCATCG 480
AATGGCCGCGAGCGGCTGGAGGGTCGCCTGCCGGCGGATCGCTCCCTCCCCCTCGGATAGC 540
542
AC
```

##### SISPA 2

```
GTGGACCAACTGTTCCGCTGCATCAGCGGCAGTGTGCGAGTCTCGGCTTTCGAACTTGAA 60
TCGCTTCCGCTTCCGTCCGTCCGAGGCGATGGGGGCGACCACCGAGGGCTGAGCCATGAG 120
CCAAGCCAGCGCCGCCTGAGCCGGCGAGCACCGCCAGGGCCGACAGGCCCTGGATAATCA 180
GGAAGCTCGAAGACATCTGGACGTTTTCTCTTTTTTCGTCAGCCTCATCGAGCGTGACGG 240
CCTCGTCAAGTTTTCTCTGGGACTGCTCGGGCCTTCGAGGCGCTGAAGCCGCACGAGGCC 300
357
GCGCCGTTCGTGGAGGAGACCTCCAAGCTGGCCAATCTCTACCGGCTGGAGAGCCAT
```

SISPA 3

GTGGCATTGACATACGCTCCCAGTTGAAGATCGCCGGTCAGACCGTATTCCAGTTCCGAG 60  
CGATAGAGACCGAAGTCGTAGGTTCCGACCGCCTGCCGGTGGGTGACATCCACCTTCTGC 120  
TCGAATTCCAGCTTGCCCCTGGGCTGCAGATCGAGCGTATAGACCCAGCCCATGACGCC 180  
TCGCCCCGCATGGGCCGAAGGCAGGCACGTACAGGTGGCGCAGGCGAGCACTGCCAACAGC 240  
CGACGGACCGGCCACTCCCTTTTCTTCTCATGAAGACTCCCTTTTGTATGGTTTTGGA 300  
GGACTCAAATGCGACTATATCTCATTTCGCATCTTAGAGATCCACCATGCCATGTCGCCAT 360  
GCGGCGCCGAACTCCACCGGCATCCGCAGTCCTGCTTTGTCCCCGCGGGGAACGGTCGCT 420  
CGCCGACTATGGGAAAATCCGGCCCTCTCCACGTCCGGCGCACCCCTGCACGCCCGACCGG 480  
CCTTCTCTGCGAAACCAATGTCCG 504

SISPA 4

ACCGTTGATTTCGCACAATTGGTCATCGCGCTTGGTTGAAAAGCCAGTGGCGCGAAGCTAC 60  
CGTGCGCTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCAGAATCCGGGCTAGAAGCGACGCGTG 120  
CGCCCGCCGCCCGATTGCCGACCTGCAGTAGGGGCCTCGCCCCCAAAGGCTCGTGTTCGT 180  
TGGTCAGGCCGTCGCGGGCGGACCAGCCGCGCCGGCCGCTTGAATCGTAATCCCACCGA 240  
GCGGCGGGTAGAATCCTTTGC 261

11/1

CACTAGTGATTTTCGAGCGGCGCCCGGGCAGGTACATGAGCTGTCTTGAGGCAGCTTCTAG 60  
GTCTCCACATTCGTTGCACGTTGTCTACATTAATACTTCTCTAGAAACAAAAGCATATGC 120  
TCATGAGGTTGTGCCAACAAATTACGTGCACATCTTCAAATGTTGTCCAAACCATTTTGCA 180  
GGCTTTTGTTC AAGTGCCAGATACAAACATATGGTACCTCGGCCGCGACCACGCTAATCG 240  
AATCCCCGCGG 251

13/1

ACCTTCTCTACCACATCATTGCACTGCTGTAGATTTGAATGGACATTGACAACGGACCCG 60  
AAGTGTTACATAGAAAGGTCTCATGGCACTACATTGTTTCAGTTCCCACCTTCTCTTCTCT 120  
TCCTAGTAATCCAGGAACCTTTTCTGCGACATTATGGACATCCAGCCAGAAAACCCAACA 180  
GCTCGAGGCAACATTCCAATCAGACGCCGGTTCCATGGATTTGGCGAGAACCCATTTGTT 240  
CGTATTTTCGTCATCAGCATCTGTCTTCTTCAATTCCTTGCTCTTCATTTTGCACATTA 300  
ATCAGTTGTAGCTTTTTTGGCGCTTGACTTATGATTCATCTTGCTTTATATATAGATTAT 360  
TTGTATTTTGAAGAACACTAGAAGAACATCTTCTGCAGTATCCGAATGTGATGAAACTCA 420  
AAAGCAGTCCTCTGTCAGCTGTGCAAGATGGAGGAGAGAATCCGTGAGCCTGTTATTAGC 480  
AAAAGCTGATACAACAAGCCATTTACATAGGAGCTCAACCAGAATTGCTTTGGAGATGGT 540  
TTTTTCTGCTCAAGAACTTTTAGTTCCGCTTCAAAATCTTTTTTCATGACGAGGTTCTAA 600  
TTCTTTGAAATTTCCGACGAGCCGTGCGAACAGAGATGAGAGGGGTCAACCTCTGCCCT 660  
GGCAACCAGGATAAGAACATTTGGATGCTTTCAAGTTTTGAGCACTTGAGAATCCATCAG 720  
ACGCTCATTTTGGTGGAGCAGAAGACTTTGCATATCCAGCTCTACACGACGTTGA 775

14/1

CTACTACGGCACAGTGAATTGTAGTACCACTCACTATAGGGCCGAGTTGGGCCCGACGTC 60  
GCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 120  
ACATCTCCTCCACCATTGGCTTCCACAGCCGGACACGAGCGTTTATAAACCAATTGGAAA 180  
CCTGACTCCTAGTGAGTCCAGTTTGTGTTTCAAGCATGTGCTTATCTGAATCCTTCGGAT 240  
ATGGGTGGAGGAAGTGTTTCAAGAGCCAAGCGCAAGAACAGAAACAGATCTTTCTGGCA 300  
ATCCTCTTTGTGGTCTCCAAGCATTGTGCTGGACCATTCCCAACTGTTGGAGAGCCCTTT 360  
GCTGCCTCAGCTGATGGTCAACATATTTGAGCCTTGAGCCTTCAATCTTACCTCCAACGC 420  
TATCTTCTTCTCCAAGCTCTTGTTGGCGGATCGAATTTGGTTCGTTATGGCGTCCTTCA 480  
GGCACCTGAATTGCTTTGAGATTGTTTGCAGTGCCAGAGCAGTGTATGTTCTTGCTGAGC 540  
CAATTCCAGCTGCTTGCTCAAATGATGAAATCACCATTTGCATCTGCCGGCGGTATTGCC 600

TGTATCTTTGGTCCACCTCATCAAGCATGTTGATTAGCTTCCCCTTCTTCATCTGAATTT 660  
CCTGCCTCTCAGCAGTGCTCAACTCAGCCGCACGCTTTCTACTCCCTTCACGCCTACTGA 720  
ACCGTCTCTGGCCTCCGCCATCGAGGACCCAGCTGCCGCTTTACTCTGCTGCCCATTACC 780  
CTTTCTTTGGCAACTCAGTCCTCATCCCATTCCCGACGTTCCCAACTCATCGAGCAGCTC 840  
CTGCGCCGCCTTCAAGT 857

15/1

ACAGCATTCTCTGGACTGACTCTCAGATCATCTTTTATGTTGACAATGTTCCCATTAGAG 60  
AGTTCAAGAAAACAGAGTCGATGGATGGTGACTTCCCTGCTAAGCCGATGTCATTGTATG 120  
CCACAATATGGGATGGATCTGATTGGGCTACCAATGGTGGCAAATACCGAGTGAATTACA 180  
AGT 183

16/1

AGCGTGGTTGCGGCCGAGGTACCATTATTGGACTAATTTTCATTCTTTATCTGAAAGAGTC 60  
GTTCTAACTCTAAACTATATATTTTAAAACAATTATGGATATATTAATTAATGGATTTTC 120  
AATCCAAATTAAGACGCGTTTCTTACCAACCAATCAATAGTTGGTATTTGTAGTTATTGA 180  
CCAAACAACACGAAAGAAACCTAAATTCCTTCTATATTAGTTATTAGTAAAGTAATTATA 240  
AATTATTCGTTAATAAGAGATTTACTTATTTATTTGAGGCGAATT 285

13/2

ACACAACGAGATTCTGGGTCCAATCAAACATCTACACAGGCAGCTGCTGCTCATGTGAAT 60  
GACATTATTCTTGCTAGATCATTTGTTACATGCTCGTGACATACTGCTTGAAAACTGCAG 120  
AACTTATCAAGGCTATTGACCAAGCTATTGATTTGACTGATTTTATATCTAAAATACGA 180  
CGACGCATAAGTTCGATTTCCCTGCTAGAAAATTGGGGTGCAGCATATGACAAAGTTTCAG 240  
GACAAGGCAAGCCACTGAAATGGTCTTGAGAAATTAAATGGCACATCGAACCTTTGGTAA 300  
GCGGTGAGTTGGGACTTTTTTCCATCTGCGTCCGTTGTGAACATCTGGTTCGGCCCCATA 360  
AGCGACCATACCATGGAGATGGAGCGTCCACTGATCGGCTAGCTTTTGGATGCTAGTTTCG 420  
480

AAGCCGGTGAGTGATAACTGAGGTTTTTGGTCACCGGATAAGGTTCTGGCCAGACAGTG  
540  
TTGGGGCAGTTGTTTGTGAAAGTGATTTTCGCTGCATGTGCACCTGAGAAGAAGACGATG  
600  
GCCAAGTGACGCCCAAGAGGGAAGCTACTTGGCTCTTCATCATCGACATTGAATATGTCT  
649  
TAATTGCCTGGTTGCTGCTAATTAACTTACTTCTGATTTGATCCC GCGT



## **Danksagung**

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Maiß für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. W. Jekmann danke ich für die Übernahme des Koreferates sowie für die Bereitstellung von einem umfangreichen Virusisolatspektrum für die Entwicklung der Nachweisverfahren.

Dem Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft möchte ich für die Bereitstellung der Forschungsmittel (Forschungsauftrag 98 HS 043) zur Durchführung dieser Arbeit danken.

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

Außerdem danke ich in alphabetischer Reihenfolge:

den Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Molekulare Phytopathologie und Virologie" für die tägliche Unterstützung im Labor

Frau Dr. F. Krajinski für die Unterstützung und Beratung bei der cDNA Subtraktion

Herrn Dr. Kruse für die Durchführung der Viroidtestung mittels R-PAGE

Herrn Dr. E. Lesemann und Dr. H.J. Vetten für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie

Herrn Dr. E. Seemüller für die Unterstützung bei der Auswahl geeigneter Primer für den Phytoplasmanachweis

Frau Dr. K. Wydra für die Bestimmung des isolierten Bakteriums

Bei meiner gesamten Familie möchte ich mich für die entgegengebrachte Toleranz und willkommene Ablenkung ganz besonders bedanken.