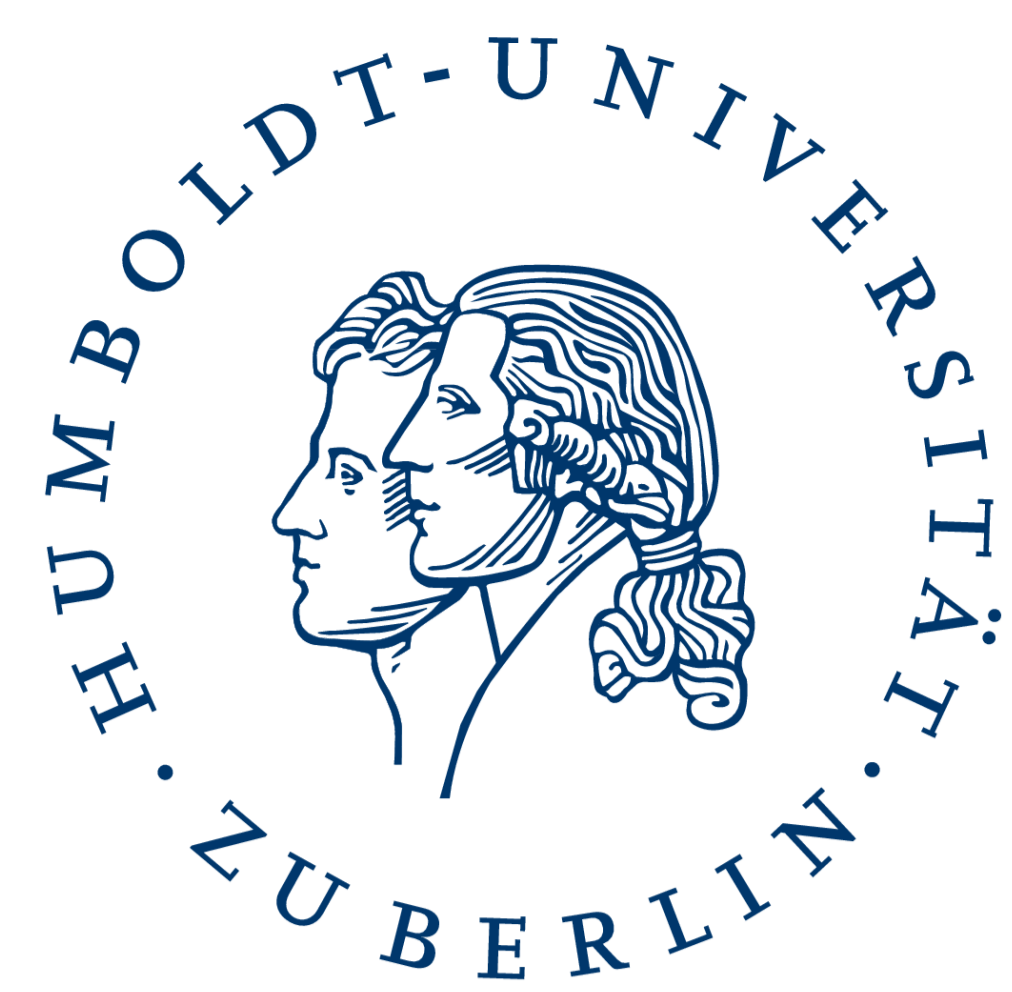


Testung eines neuen Antikörpers zur Erweiterung des Detektionsspektrums von *Cherry leaf roll virus (CLRV)* – Varianten aus Finnland



S. Groschupp • J. Langer • S. von Bargaen • C. Büttner
Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

Einleitung

Seit 2002 treten CLRV-Infektionen zunehmend in verschiedenen Birkenarten in weiten Teilen Fennoskandias auf (Jalkanen et al. 2007; von Bargaen et al. 2009). Untersuchungen zur Verbreitung und genetischen Variabilität des CLRV in Finnland zeigen atypische Verwandtschaftsbeziehungen. So gruppieren diese CLRV-Nukleotidsequenzen nicht erwartungsgemäß nur in die Kirsche/Birken-Gruppe A, sondern heterogen auch in die Cluster B, D, E, die durch CLRV-Varianten aus Rhabarber, Walnuss bzw. Holunder repräsentiert sind (Rebenstorf et al. 2006). Für eine verlässliche Routinediagnose von CLRV-Infektionen in verschiedenen



CLRV-typische Symptome an Birke (siehe auch Büttner et al. 2011)

Wirtspflanzen und Verbreitungsgebieten wurde auf der Basis von zwei verschiedenen Antikörpern gegen ein CLRV-Gruppe A- bzw. Gruppe E-Isolat neben dem DAS-ELISA vor allem die Immunocapture (IC)-RT-PCR etabliert (Gentkow et al. 2007). Mit diesem bislang universellen CLRV-Detektionssystem ist ein verlässlicher und reproduzierbarer Nachweis von in Finnland auftretenden atypischen CLRV-Varianten nicht, oder nur bedingt möglich. Daher wurde ein neuer Antikörper IgG_E395 gegen ein CLRV-Isolat einer anderen Serogruppe (B) entwickelt und mittels DAS-ELISA sowie IC-RT-semi-nested PCR getestet.

Material und Methoden

	DAS-ELISA	IC-RT-semi-nested PCR
Antikörper (AK)	1. AK 1: 1000 2. AK 1: 1500	1:200
Primer cDNA-Synthese	-	Random hexamer
Primer 1. PCR	-	Sense: For 6780 Antisense: RW 1
Primer semi-nested PCR	-	Sense: RW 2 Antisense: RW 1

Antikörper

IgG_E395: 2013 entwickelt gegen das Gruppe B-CLRV-Isolat aus Rhabarber

IgG_E325: 1993 entwickelt gegen das Gruppe A-CLRV-Isolat aus Gemeiner Esche

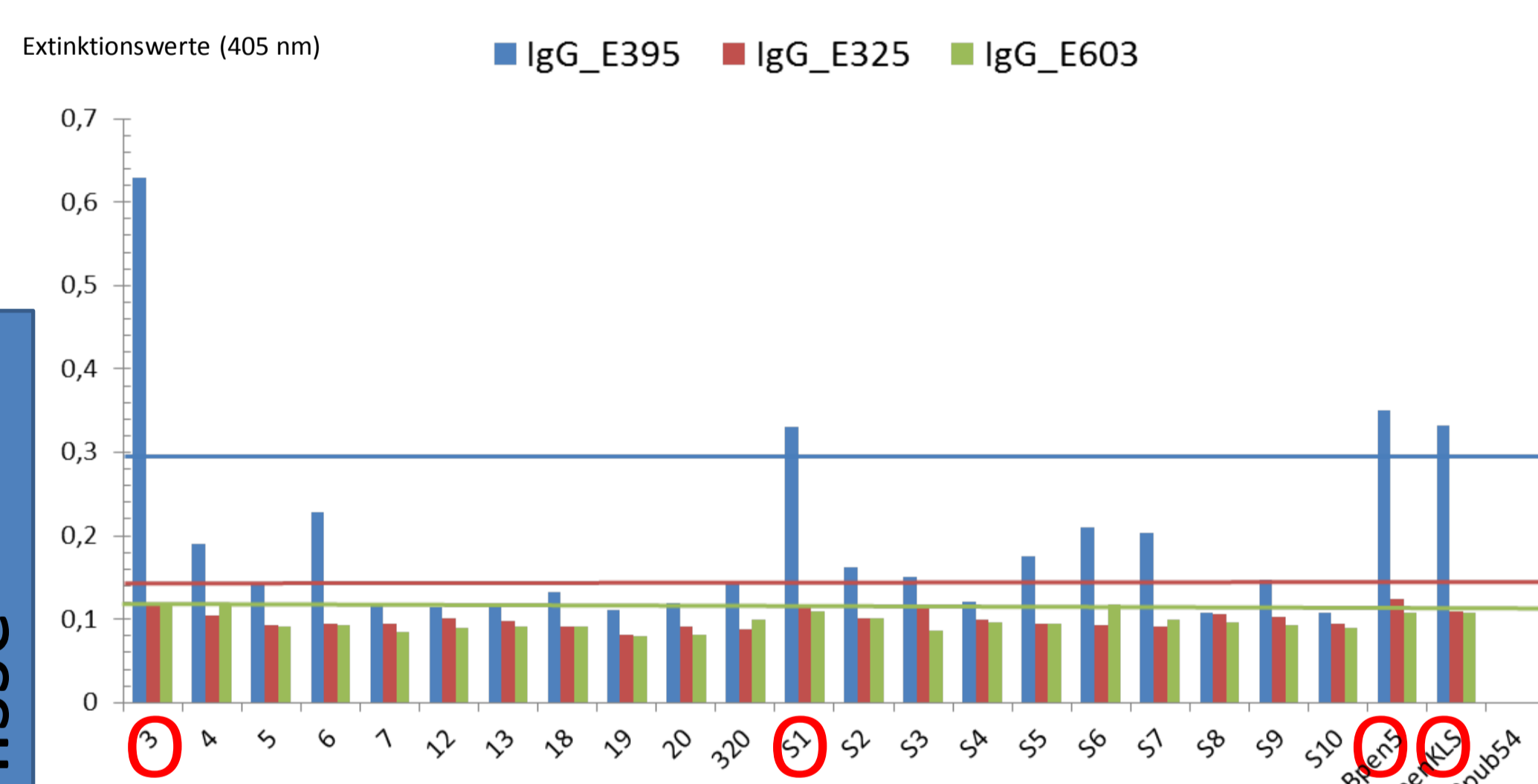
IgG_E603: 2004 entwickelt gegen das Gruppe E-CLRV-Isolat aus Schwarzem Holunder

Blattmaterial

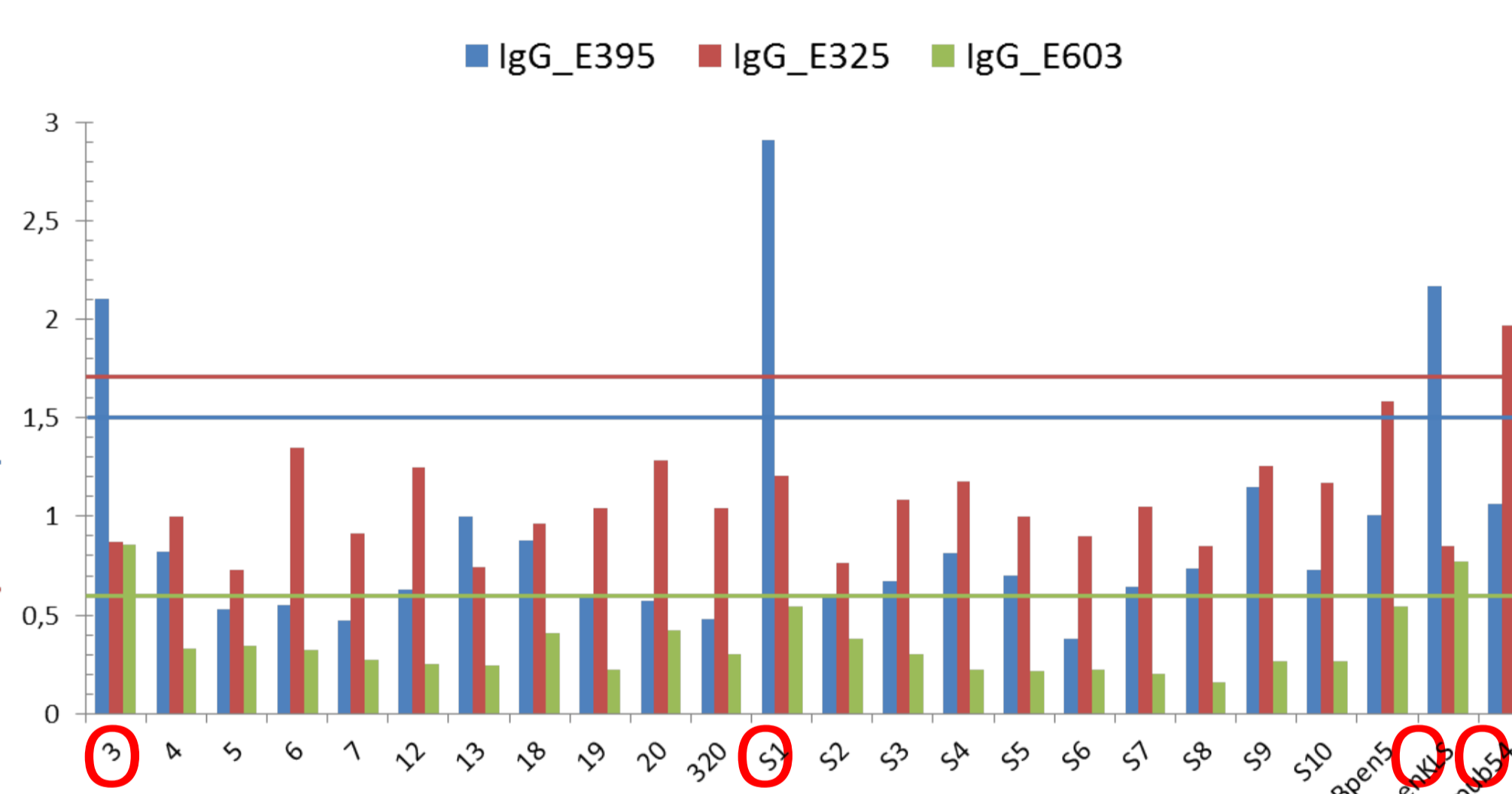
- **10 *Betula pubescens*** (Baumnr. 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 19, 20, 320) und eine ***B. pendula* (Nr. 18)** aus dem Stadtgebiet von Rovaniemi in Nordfinland (Standardprobenbäume; CLRV-Infektionen seit 2006 konsistent nachgewiesen)
- **10 *Betula pendula* var. *carelica* (S1-S10)**; Siperia, Kivalo Research Area in Nordfinland); Verdacht auf CLRV-Infektionen im ca. 6-jährigen Bestand
- Vergleichsmaterial: *Betula pendula* Bpen5; *B. pendula* Bpen5C, gepfropfter Reiser aus Originalbaum; *B. pubescens* 54; *B. pendula* KLS; *B. pubescens* Bpub4A, gepfropfter Reiser vom Originalbaum; *B. pubescens* 56

Ergebnisse

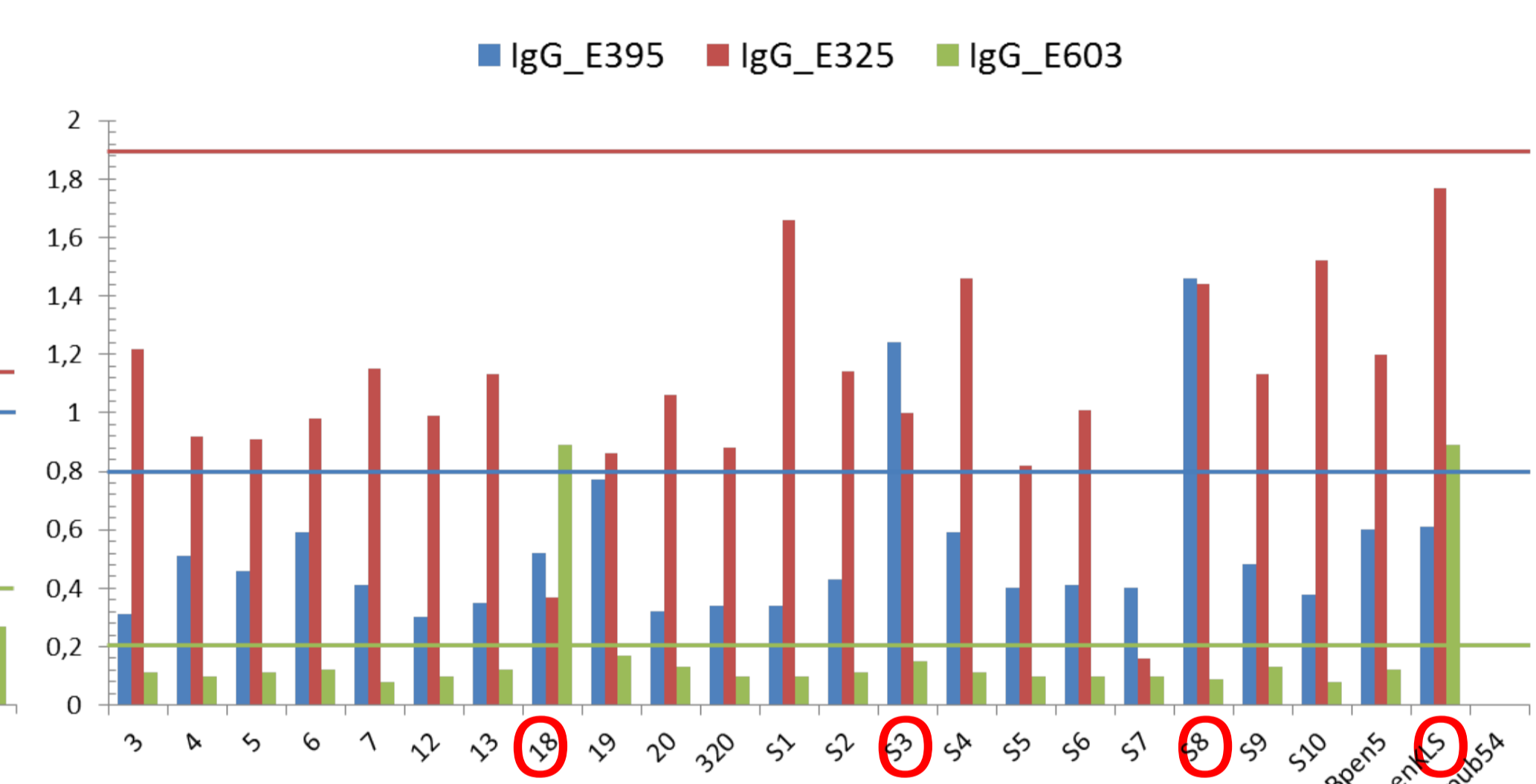
1. DAS-ELISA



2. DAS-ELISA



3. DAS-ELISA



Auswertung DAS-ELISA

Der Plattenspezifische Grenzwert (Cut-off:) nach BIOREBA:

$$(\bar{x} + (3 s)) \times 1,1$$

Alle über dem errechneten Grenzwert liegenden Extinktionswerte beschreiben eine positive CLRV-Detektion.

○ Probe mindestens in einem der DAS-ELISA positiv

Auswertung IC-RT-semi-nested PCR

+ positiv in der IC-RT-PCR getestete Probe detektiert durch ein 420 bp langes Fragment nach IC-RT-semi-nested PCR

IC-RT-semi-nested PCR	3	4	5	6	7	12	13	18	19	20	320	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	54	56
IgG_E395 (Gruppe B)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
IgG_E325 (Gruppe A)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
IgG_E603 (Gruppe E)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-

Fazit

Der neue Antikörper IgG_E395 detektiert grundsätzlich CLRV-Varianten aus Birken finnischer Herkunft. Bei insgesamt geringem Detektionsniveau der durchgeführten DAS-ELISA als auch der IC-RT-semi-nested PCR, detektierte das IgG_E395 teilweise andere CLRV-Varianten im Vergleich zu den beiden anderen Antikörpern. Eine Erweiterung des Detektionsspektrums von finnischen CLRV-

Varianten ist erkennbar. Dabei sind weitere Optimierungsmöglichkeiten der beiden Nachweismethoden gegeben. Hierbei steht besonders die Etablierung der IC-RT-PCR im Vordergrund, um die aufwändige RNA-Extraktion im derzeitigen Routinenachweis des CLRV in Finnland zu ersetzen.