

# Möglichkeiten und Grenzen der Virusdetektion von GLRaV-1 mittels LAMP

Isabell Spieß

## Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science

im Rahmen des Studiums Weinbau, Oenologie und Weinwirtschaft

Eingereicht am 28.07.2021

Abteilung Wein- und Obstbau (WOB | H95800)  
Department für Nutzpflanzenwissenschaften

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Schmid  
Abteilung: Hochschule Geisenheim University  
Department: Institut für Rebenzüchtung

Mitbetreuerin: Univ. Prof. Dipl.-Ing.sc.agr. Dr.sc.agr. Astrid Forneck  
Abteilung: Universität für Bodenkultur Wien  
Department: Institut für Wein- und Obstbau



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüferin/ keinem anderen Prüfer als Prüfungsleistung eingereicht.

Mir ist bekannt, dass Zuwiderhandeln geahndet wird („Verwendung unerlaubter Hilfsmittel“) und weitere rechtliche Schritte nach sich ziehen kann.

28.07.2021

Datum

*A. Spiß*

Unterschrift

# Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Masterarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank geht an:

- Die Betreuerin meiner Arbeit, Dr. Elvira Bleser, für die Unterstützung während der kompletten Zeit – von der Themenauswahl bis zur Abgabe. Sie stand mir stets bei meinen Fragen und Anliegen unterstützend zur Seite und hat mir auch Kraft gegeben, wenn es mal nicht so gelaufen ist, wie ich es mir vorgestellt hatte.
- Mast Diagnostica GmbH, in Person von Dr. Sieghard Frischmann und Dr. Emelie Landmann, für die fachliche Unterstützung und Bereitstellung von Protokollen und Materialien.
- Prof. Dr. Joachim Schmid und Univ. Prof. Dipl.-Ing.sc.agr. Dr.sc.agr. Astrid Forneck für die Korrektur der Arbeit.
- Dr. Johanna Frotscher, Sigrid Roleter, Michele Petrov, Mareike Rij, Johannes Kiesgen, Bettina Lindner und Dr. Heinrich Hildebrand für die Unterstützung im Labor und bei fachlichen Fragen.
- Meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in allen Lebenslagen unterstützen.
- Meinen Freund Marvin, der mir immer zur Seite steht und viel Verständnis gezeigt hat, wenn die Labortage wieder länger wurden.

## **Abstract**

Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) is one of the causing agents of leafroll disease infesting vines worldwide. Infected grapevines show a reduction in vigor, yield and quality of the fruit. Leafroll is characterized by symptoms such as downward rolling of leaves and interveinal reddening, which are often subtle in certain grape varieties. Except for rouging, the only effective way to reduce the spread of the disease is excluding infected grapevines from propagation. This is why rapid and sensitive detection methods are needed. In this thesis a reliable protocol for the detection of GLRaV-1 in grapevines using RNA extraction and a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) was developed. The RT-LAMP is a primer-based method amplifying viral nucleic acids at a constant temperature and detecting it with fluorescence in real time. With this method a reliable, repeatable and specific detection of GLRaV-1 in leaves and wood samples of different grape varieties is possible. For the detection both a tube scanner or a PCR system can be used. Sampled plant material should be tested fresh rather than freezing it before testing. The sensitivity was tested by pooling samples as well as diluting extracts from virus infected plants in healthy ones. While the detection of pooled samples was not feasible in all samples, the detection of GLRaV-1 with RT-LAMP was possible for all replicates diluted up to 1:10. Consequently, the detection through RT-LAMP is faster and more sensitive than DAS-ELISA. Compared to RT-PCR it is not as sensitive but quicker. Besides the possibilities given with this method, some limits concerning the high risk of contamination and the time consuming RNA extraction could be revealed.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Symptome an den Blättern von mit der Blattrollkrankheit infizierten Reben. A: rote Rebsorte (Spätburgunder), B: weiße Rebsorte (Roter Traminer), Oktober 2020 (Quelle: Bettina Lindner) .....	6
Abbildung 2: Darstellung der einzelnen Schritte beim DAS-ELISA (eigene Darstellung, modifiziert nach: Leinco, 2020).....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mechanismus bei der LAMP (FIP = forward inner primer; BIP = backward inner primer; eigene Darstellung, modifiziert nach: Eiken Chemical, 2005; Notomi et al., 2015).....	19
Abbildung 4: Beispielhafte Auswertung der Amplifikationskurven.....	32
Abbildung 5: Erste technische Wiederholung der RT-LAMP bei einer starken und schwachen Probe. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion in Wasser); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC. C: Schmelzkurven aller Proben; D: Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; 1:10 verdünnt; Messung: mittels Lightcycler) .....	40
Abbildung 6: Zweite technische Wiederholung der RT-LAMP bei einer starken und schwachen Probe. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion in Wasser; 1:10 verdünnt); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC. C: Schmelzkurven aller Proben; D: Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; 1:10 verdünnt; Messung: mittels Lightcycler).....	40
Abbildung 7: Dritte technische Wiederholung der RT-LAMP bei einer starken und schwachen Probe. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion in Wasser; 1:10 verdünnt); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC. C: Schmelzkurven aller Proben; D: Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; 1:10 verdünnt; Messung: mittels Lightcycler).....	41
Abbildung 8: Erste technische Wiederholung mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von zwei Proben in der RT-LAMP. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion Wasser) in drei verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:20); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC und Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; Messung: mittels Lightcycler) .....	43
Abbildung 9: Zweite technische Wiederholung mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von zwei Proben in der RT-LAMP. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion Wasser) in drei verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:20); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC und Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; Messung: mittels Lightcycler) .....	44

Abbildung 10: Dritte technische Wiederholung mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von zwei Proben in der RT-LAMP. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion Wasser) in drei verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:20); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC und Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; Messung: mittels Lightcycler) .....	45
Abbildung 11: Vergleich von Verdünnungsstufen bei einer weiteren Holzprobe. A: RT-LAMP von Holzprobe W3 (W = einfache Extraktion in Wasser; unverdünnt, 1:10, 1:20). B: Amplifikationskurven der Kontrollen (PK = W6) und Ergebnisse als Tabelle (n =3; Messung im Lightcycler) .....	46
Abbildung 12: Einfluss von PVP und Tris auf die Virusdetektion in der RT-LAMP. Probe: Holzprobe W4 (W = einfache Extraktion in Wasser). Kontrollen: PK (W6) und NTC (n=1; 1:10 verdünnt; Messung im ESEquant).....	48
Abbildung 13: Überprüfung der Primerspezifität (GLRaV-1) mit Holzproben in der RT-LAMP. Oben: R2, R5, R7. Unten: Proben R8, R9, R10, R11 (R = RNA-Extraktion) und die Ergebnisse von GLRaV-1 als Tabelle. Kontrollen: PK (R3), NK, NTC (Messung im Lightcycler; n=3).....	58
Abbildung 14: Vergleich der Detektion von GLRaV-1 bei einer starken ELISA-Probe mittels RT-LAMP gemessen im Lightcycler (A) bzw. ESEquant (B). Probe: Holzprobe 1, aufbereitet mittels einfacher Wasserextraktion (W), unterschiedlich verdünnt (unverdünnt, 1:10, 1:20). Kontrollen: PK (W6), NK, NTC (Lightcycler: n= 3; ESEquant: n =2) .....	66
Abbildung 15: Vergleich der Detektion von GLRaV-1 bei einer schwachen ELISA-Probe mittels RT-LAMP im ESEquant. Probe: Holzprobe 1, aufbereitet mittels einfacher Wasserextraktion (W), unterschiedlich verdünnt, in dreifacher technischer Wiederholung (1, 2, 3). Kontrollen: PK (W6), NK, NTC (n =2) .....	68
Abbildung 16: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler bis 1:8000: Amplifikation der RT-LAMP im Lightcycler. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (n=3). I: 1:100 bis 1:1.000. II: 1:2.000 bis 1:8.000 und Kontrollen (PK = R6, NK, NTC) .....	70
Abbildung 17: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler bis 1:8000: Amplifikation der RT-LAMP im ESEquant. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (n=3). I: 1:100 bis 1:1.000. II: 1:2.000 bis 1:8.000 und Kontrollen (PK = R6, NK, NTC).....	71

Abbildung 18: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler: Amplifikation der RT-LAMP im Lightcycler bis 1:16.000. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (1:2.000 bis 1:16.000; n = 3). Kontrollen: PK (R6), NK, NTC.....	72
Abbildung 19: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler: Amplifikation der RT-LAMP im ESEquant bis 1:128.000. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (I: 1:4.000 bis 1:16.000; II: 1:32.000 bis 1:128.000; n = 3). Kontrollen: PK (R6), NK, NTC .....	72
Abbildung 20: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben 1 (A), 2 (B) und 5 (C) aus Tabelle 7 (n=3).....	112
Abbildung 21: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben 1 und 5 (A) sowie 2 (B) aus Tabelle 8 (n=3).....	112
Abbildung 22: Kontrollen zu den Versuchen mit der Probe W3 aus Tabelle 9. A: Frische Blattprobe. B: Eingefrorene Blattproben. C: Frische Holzprobe. D: Eingefrorene Holzproben (n=3).....	113
Abbildung 23: Kontrollen zu den Versuchen mit der Probe W4 aus Tabelle 10. A: Frische Blattprobe. B: Eingefrorene Blatt- und Holzproben. C: Frische Holzprobe (n=3) .....	113
Abbildung 24: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben W4, W6 aus Tabelle 10. A: Frische Blattproben. B: Eingefrorene Blattproben. C: Frische Holzproben. D: Eingefrorene Holzproben (n=1).....	114
Abbildung 25: Kontrollen zu den Versuchen mit Probe R3 aus Tabelle 11. A: Frische Blatt- und Holzprobe. B: Eingefrorene Blatt- und Holzproben (n=3).....	114
Abbildung 26: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben R4, R6 aus Tabelle 12. A: Frische Blatt- und Holzprobe, R4. B: Eingefrorene Blatt- und Holzproben, R4 und R6. C: Frische Blatt- und Holzprobe, R6 (n=3) .....	115
Abbildung 27: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben aus Abbildung 13 (n=3) .....	115
Abbildung 28: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben R12 (A), R13 (B), R14 (C) aus Tabelle 13 (n=3).....	116
Abbildung 29: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben R18 (A), R7 und R28 (B) aus Tabelle 15 (n=3).....	116
Abbildung 30: Kontrollen zu den Versuchen mit Probe R1 aus Abbildung 14 (n=3) .....	117
Abbildung 31: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben aus Abbildung 16 (n=3) .....	117
Abbildung 32: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben aus Abbildung 18 (n=3) .....	118

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktuelle taxonomische Einordnung der Blattrollviren (GLRaV) (verändert nach: Ito & Nakaune, 2016; Martelli et al., 2012).....	4
Tabelle 2: Verwendetes Pflanzenmaterial (NK = nicht virusinfizierte Kontrollpflanze).....	24
Tabelle 3: Komponenten des Mastermix für den Ansatz mit 10 µL (nach Mast Diagnostica GmbH).....	31
Tabelle 4: Ansatz des Mastermix für die Umschreibung der RNA in cDNA .....	35
Tabelle 5: Mastermix für die RT-PCR mit SYBR-Green .....	36
Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer für die RT-PCR .....	37
Tabelle 7: Virusdetektion mittels RT-LAMP aus Wasserextrakten (W) oder nach Beadextraktion (B), dargestellt als CP-Werte. Proben: Holzproben 1, 2, 5 (unverdünnt, 1:10, 1:20) (Messung: im Lightcycler; x = kein CP-Wert ermittelt).....	49
Tabelle 8: Virusdetektion mittels RT-LAMP aus Wasserextrakten (W) oder nach RNA-Extraktion nach Gambino (R), dargestellt als CP-Werte. Proben: Holzproben 1, 2 und 5 (unverdünnt, 1:10, 1:20) mit n=3 (Messung: im Lightcycler; x = kein CP-Wert ermittelt).....	50
Tabelle 9: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben. Probe: W3 (W = Wasserextraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt, gemessen als CP-Wert in Zyklen. Je Variante: zwei biologische und zwei technische Wiederholungen (n=3; 1:10 verdünnt; Messung im Lightcycler; x = kein CP-Wert gemessen) .....	53
Tabelle 10: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben, gemessen als CP-Wert in Zyklen. Proben: W4 und W6 (W = Wasserextraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt (n=3; 1:10 verdünnt; Messung im Lightcycler; x = kein CP-Wert).....	54
Tabelle 11: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben. Probe: R3 (R = RNA-Extraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt, zweifache biologische Wiederholung (n=3; nicht verdünnt; Messung im Lightcycler) .....	55
Tabelle 12: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben. Proben: R4 und R6 (R = RNA-Extraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt (n=3; nicht verdünnt; Messung im Lightcycler) .....	56

Tabelle 13: Virusdetektion in Mischproben mittels RT-LAMP. Holzproben: stark virusbelastete Proben R12, R13, R14 (R = RNA-Extraktion); gemischt in der gesunden Holzprobe (NK) zu unterschiedlichen Anteilen (unverdünnt, 1+2, 1+4, 1+6, 1+9, 1+14). Pro Variante: je zwei biologische Wiederholungen. Kontrollen: PK (R6), NK, NTC (x = nicht gemessen, + = positiv, - = negativ; Messung im Lightcycler, n=3) .....	60
Tabelle 14: Sensitivitätsmessung im DAS-ELISA mittels Verdünnungsreihe (Antikörper: Bioreba). Mittelwert der Duplikate, gemessen als OD (OD = optische Dichte). Proben: E5, E6, E15 (E = ELISA-Test). Verdünnung in gesundem Extrakt von NK; Kontrollen: PK (E3), NK (n=2; Messung im Photometer; x = nicht gemessen; Cut off: gemessene Extinktion ist kleiner als das 1,75-fache der NK und wird als negativ beurteilt) .....	61
Tabelle 15: Sensitivitätsmessung in der RT-LAMP mittels Verdünnungsreihe (Primer: Mast Diagnostica GmbH). Proben: R5, R6, R15 (R = RNA-Extraktion). Verdünnung in gesundem Extrakt von NK; Kontrollen: PK (R3), NK, NTC (n=3; Messung im Lightcycler; + = positiv; - = negativ; x = nicht gemessen) .....	62
Tabelle 16: Sensitivitätsmessung in der RT-PCR mittels Verdünnungsreihe (Primer: eigener Laborbestand). Proben: P5, P6, P15 (P = RT-PCR). Verdünnung in gesundem Extrakt von NK; Kontrollen: PK (P3), SAND, NTC (n=3; Messung im Lightcycler; + = positiv; - = negativ; x = nicht berechnet) .....	63
Tabelle 17: Mastermix für die RT-LAMP für ein Reaktionsvolumen von 25 µl (Template = 5 µl) .....	108
Tabelle 18: Mastermix für die RT-LAMP für ein Reaktionsvolumen von 10 µl (Template = 2 µl) .....	109

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
% vol.	Volumenprozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
ArMV	Arabismosaikvirus
CP	crossing point
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
GFkV	Grapevine fleck virus
GFLV	Grapevine fanleaf virus
GLRaV	Grapevine leafroll-associated virus
GRBV	Grapevine red blotch virus
GRSPaV	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus
GVA	Grapevine virus A
GVB	Grapevine virus B
HNB	Hydroxynaphtholblau
IF	Immunfluoreszenz
L	Liter
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification method
M	Molar
mM	Millimolar
mg	Milligramm

ng	Nanogram
NK	negative Kontrolle
nm	Nanometer
NTC	no template control
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Picogramm
PK	positive Kontrolle
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RpRSV-ch	Raspberry Ringspot Virus ch (Himbeerringflecken-Virus)
RT	Reverse Transkriptase
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturüberblick</b> .....	<b>3</b>
2.1	Blattrollviren im Überblick.....	3
2.2	Symptome und Auswirkungen der Blattrollkrankheit .....	5
2.3	Übertragung von GLRaV-1 .....	8
2.4	Kontrolle und Management der Blattrollkrankheit.....	9
2.5	Detektionsmöglichkeiten .....	11
2.5.1	Biologisches Indexing .....	11
2.5.2	ELISA-Test.....	12
2.5.3	Molekularbiologische Methoden.....	16
2.5.3.1	RT-PCR.....	16
2.5.3.2	LAMP.....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1	Pflanzenmaterial und Probennahme .....	23
3.2	Nomenklatur der Versuche .....	25
3.3	RT-LAMP.....	26
3.3.1	Probenaufbereitung und Extraktion.....	26
3.3.1.1	Einfache Extraktion in Wasser (W) .....	26
3.3.1.2	Extraktion mit PVP oder Tris-Puffer .....	27
3.3.1.3	RNA-Extraktion (R).....	27
3.3.1.4	Extraktion mit magnetischen Beads (nach Mast Diagnostica GmbH) (B) ..	29
3.3.2	Durchführung der RT-LAMP .....	30
3.4	DAS-ELISA (E).....	34
3.5	RT-PCR (P).....	35

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1	Etablierung und Optimierung des Protokolls.....	39
4.1.1	Messung einer starken und schwachen ELISA-Probe.....	39
4.1.2	Vergleich von verschiedenen Verdünnungsstufen .....	42
4.1.3	Vergleich der Extraktionsmethoden .....	47
4.1.3.1	Extraktion mit PVP und Tris .....	47
4.1.3.2	Extraktion mit magnetischen Beads .....	48
4.1.3.3	RNA-Extraktion .....	50
4.2	Vergleich von frischen und eingefrorenen Proben .....	52
4.2.1	Vergleich frischer und eingefrorener Proben nach einfacher Wasserextraktion ..	52
4.2.2	Vergleich frischer und eingefrorener Proben nach RNA-Extraktion .....	55
4.3	Validierung .....	57
4.3.1	Primerspezifität.....	57
4.3.2	Sensitivität .....	59
4.3.2.1	Virusdetektion in Mischproben .....	59
4.3.2.2	Vergleich der Sensitivität von DAS-ELISA, RT-LAMP und RT-PCR.....	60
4.4	Vergleich der Messgeräte .....	65
4.4.1	Vergleich Lightcycler und ESequant anhand einer starken ELISA-Probe .....	65
4.4.2	Vergleich Lightcycler und ESequant anhand einer schwachen ELISA-Probe ....	67
4.4.3	Empfindlichkeit der Messgeräte .....	69
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>74</b>
5.1	RT-LAMP-Protokoll zur Detektion von GLRaV-1 .....	74
5.2	Vergleich von frischen und eingefrorenen Proben .....	82
5.3	Validierung und Vergleich mit anderen Methoden.....	84
5.4	Vergleich der Messgeräte .....	89
5.5	Fazit .....	91
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>

<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
8.1	Ausgangsprotokoll der RT-LAMP der Firma Mast Diagnostica GmbH.....	108
8.2	ELISA-Protokolle für den Ansatz der Pufferlösungen .....	110
8.2.1	Beladungspuffer.....	110
8.2.2	Extraktionspuffer .....	110
8.2.3	Konjugatpuffer.....	110
8.2.4	Substratpuffer .....	111
8.2.5	Waschpuffer.....	111
8.3	Ergänzungen zu den Diagrammen .....	112
8.3.1	Kontrollen zum Kapitel 4.1.3, Tabelle 7 .....	112
8.3.2	Kontrollen zum Kapitel 4.1.3, Tabelle 8 .....	112
8.3.3	Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 9 .....	113
8.3.4	Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 10 .....	113
8.3.5	Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 11 .....	114
8.3.6	Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 12 .....	115
8.3.7	Kontrollen zum Kapitel 4.3, Abbildung 13 .....	115
8.3.8	Kontrollen zum Kapitel 4.3, Tabelle 13 .....	116
8.3.9	Kontrollen zum Kapitel 4.3, Tabelle 15 .....	116
8.3.10	Kontrollen zum Kapitel 4.4, Abbildung 14.....	117
8.3.11	Kontrollen zum Kapitel 4.4, Abbildung 16.....	117
8.3.12	Kontrollen zum Kapitel 4.4, Abbildung 18.....	118

# 1 Einleitung

Derzeit sind weltweit nahezu 70 verschiedene Viren bekannt, die die Weinrebe befallen und schädigen können. Keine andere Kulturpflanze ist von mehr unterschiedlichen Viruserkrankungen betroffen als die Rebe (Meng et al., 2017). Die bedeutendsten Rebviren in Deutschland sind die Reisigkrankheit und die Blattrollkrankheit. Seit 2010 ist eine starke Ausbreitung der Blattrollkrankheit in den deutschen Weinanbaugebieten zu beobachten (DLR Mosel, 2021). Die Blattrollkrankheit umfasst verschiedene Virusarten, die als grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs) bezeichnet werden (Martelli et al., 2012). GLRaV-1 und -3 sind die am häufigsten vorkommenden Spezies in Deutschland (DLR Mosel, 2021).

Die Symptome der Blattrollkrankheit sind bei roten Rebsorten durch eine rötliche Blattverfärbung gekennzeichnet. Hierbei bleibt der Bereich um die Blattadern grün. Dahingegen zeigt sich bei weißen Sorten eine chlorotische Aufhellung der Blätter. Bei einigen Weißweinsorten sind die Symptome jedoch so subtil, dass sie oft nicht erkannt werden können. Neben der Blattverfärbung ist die Krankheit durch das Einrollen der Blattränder nach unten gekennzeichnet, was die Namensgebung erklärt. Die Folgen einer Infektion mit Blattrollviren sind eine verringerte Lebensdauer der Reben sowie Ertrags- und Qualitätsverluste. Demnach hat die Krankheit auch eine wirtschaftliche Bedeutung (Naidu et al., 2014).

Die Verbreitung der Blattrollkrankheit erfolgt zum einen durch bereits mit Rebviren infiziertes Pflanzmaterial. Zum anderen agieren verschiedene Schild- und Schmierlausarten als Vektoren der GLRaVs und sind für die Hauptausbreitung der Krankheit verantwortlich (Martelli, 2017). Da keine Bekämpfung von Rebviren im Bestand möglich ist, muss eine indirekte Bekämpfung mittels Gesundheitsselektion in den Rebschulen und Rebenzüchtungen erfolgen. Dazu müssen die Vermehrungsbestände nach der Rebenpflanzgut-Verordnung regelmäßig auf Virusbefall kontrolliert werden, bevor diese als Pflanzgut zu den Winzern gelangen. Zusätzlich sollte dann natürlich nur gesundes Pflanzgut gepflanzt werden, um die Ausbreitung der Krankheit zu begrenzen bzw. unterbinden zu können (EPPO, 2018; RebPflV 1986, 1986).

Für eine erfolgreiche Kontrolle der Krankheit sind zuverlässige Detektionsmethoden unabdingbar. Die verbreitetsten Verfahren sind der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)-Test und molekularbiologische Methoden auf Basis einer Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction; kurz: PCR). Dazu zählt beispielsweise die RT-PCR (reverse-transkriptase-PCR). Die Virusdetektion mittels ELISA ist robust und zuverlässig. Ergebnisse sind jedoch erst nach zwei Tagen vorhanden und die Empfindlichkeit ist geringer als bei der RT-PCR. Die RT-PCR weist dagegen eine höhere Nachweisgrenze auf und ermöglicht eine sensitive, zuverlässige Detektion der Blattrollviren. Es werden aber teure Laborgeräte und eine aufwändige Probenextraktion benötigt (Naidu et al., 2014).

Die loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) ist eine Primer basierte Methode, die bei einer konstanten Temperatur von 60 °C bis 65 °C spezielle Virussequenzen amplifizieren kann. Mithilfe verschiedener Detektionsmöglichkeiten wie der Fluoreszenzmessung können diese sichtbar gemacht werden und darüber Rückschlüsse auf den Befall mit einem bestimmten Virus gezogen werden. Die erste LAMP wurde im Jahre 2000 vorgestellt (Notomi et al., 2000) und ist mittlerweile auch bei vielen Rebviren erfolgreich etabliert (Almasi, 2015, 2018; Frotscher et al., 2021; Romero Romero et al., 2019; Walsh & Pietersen, 2013). Da kein spezielles Labormaterial benötigt wird und Ergebnisse nach kurzer Zeit vorliegen, ist die LAMP kostengünstig, einfach und schnell (Francois et al., 2011; Notomi et al., 2000). Bis jetzt wurde noch kein LAMP-Protokoll speziell für GLRaV-1 in der Literatur veröffentlicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es ein zuverlässiges LAMP-Protokoll für die Detektion von GLRaV-1 zu etablieren und dabei die Möglichkeiten und Grenzen der Methode zu beleuchten. Es soll eine möglichst einfache Extraktionsmethode entwickelt werden, die neben frischen auch aus eingefrorenen Blatt- und Holzproben einen Virusnachweis mittels LAMP ermöglicht. Untersuchungen hinsichtlich der Ermittlung der Nachweisgrenze wurden ebenfalls durchgeführt, um die Sensitivität der Methode im Vergleich zu ELISA und RT-PCR einordnen zu können.

## 2 Literaturüberblick

### 2.1 Blattrollviren im Überblick

Viren leben als Parasiten in Wirtszellen. Sie nutzen den Stoffwechsel ihrer Wirte zur Vermehrung und können diese dadurch schädigen. Auch Reben können von bestimmten Viren befallen und geschädigt werden. Nahezu 70 verschiedene Virusarten wurden bisher in Weinreben (*Vitis* und *Muscadinia* sp.) nachgewiesen. Diese werden in vier Krankheitskomplexe unterteilt, nämlich Reisigkrankheit, Blattrollkrankheit, Rugose-Wood und die Fleck-Krankheit (Meng et al., 2017). Zur Blattrollkrankheit, die im englischen auch grapevine leafroll disease (kurz: GLD) genannt wird, gehören aktuell sechs Arten: GLRaV-1, -2, -3, -4, -7 und -13 (Ito & Nakaune, 2016; Martelli et al., 2012). Sie zählt zu den komplexesten und wirtschaftlich am bedeutendsten Rebkrankheiten in den Weinanbaugebieten weltweit (Naidu et al., 2014). Die Krankheit verbreitete sich vermutlich von Europa aus durch den Handel von Vermehrungsmaterial in der ganzen Welt (Maree et al., 2013).

Erste Symptome wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben (Ravaz & Roos, 1905), die Ätiologie von GLD konnte aber erst mit der erfolgreichen Übertragung durch Pfropfung auf andere Reben nachgewiesen werden (Scheu, 1935). Demnach wurde lange eine Viruskrankheit als Ursache der infektiösen Krankheit vermutet, aber erst später sogenannte Closteroviren als Auslöser bestätigt (Gugerli et al., 1984; Namba et al., 1979). Weitere wissenschaftliche Untersuchungen, teilweise mithilfe molekularbiologischer Methoden, haben zusätzliche Viren in Zusammenhang mit der Blattrollkrankheit identifiziert, die allesamt als GLRaVs bezeichnet werden (Boscia et al., 1995; Gugerli, 2009).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die taxonomische Einordnung der sechs GLRaVs. Alle Blattrollviren gehören zur Familie *Closteroviridae*, gliedern sich aber in drei Gattungen: GLRaV-2 gehört zur Gattung *Closterovirus* und GLRaV-7 zu den *Velariviren*, die anderen hingegen werden zur Gattung *Ampelovirus* gezählt. Die beiden am häufigsten vorkommenden Blattrollviren GLRaV-1 und -3 gehören zur Untergruppe 1 (Martelli et al., 2012). Dazu gehört auch das erst kürzlich entdeckte GLRaV-13, über das noch sehr wenig

bekannt ist (Ito & Nakaune, 2016). Die Untergruppe 2 umfasst GLRaV-4, wozu die Stämme GLRaV-5, -6, -9, -Pr und -De zählen. Diese wurden zunächst als eigenständige Virusarten gezählt, sind aber nach einer Analyse der Aminosäuresequenz zu GLRaV-4 gezählt worden. Allgemein weisen die GLRaVs einige gemeinsame Eigenschaften auf. Jedoch gibt es genetische und serologische Unterschiede, weshalb eine Unterteilung der Nomenklatur erforderlich ist (Martelli et al., 2012).

Tabelle 1: Aktuelle taxonomische Einordnung der Blattrollviren (GLRaV) (verändert nach: Ito & Nakaune, 2016; Martelli et al., 2012)

<b>Familie</b>	<i>Closteroviridae</i>			
<b>Gattung</b>	<i>Closterovirus</i>	<i>Ampelovirus</i>		<i>Velarivirus</i>
<b>Spezies</b>	GLRaV-2	<u>Untergruppe 1</u> GLRaV-1 GLRaV-3 GLRaV-13	<u>Untergruppe 2</u> GLRaV-4	GLRaV-7

Die verschiedenen GLRaVs sind sich morphologisch sehr ähnlich und induzieren die gleichen Symptome. Ihnen allen ist gemeinsam, dass die fadenförmigen Virionen stäbchenförmig sind und eine Länge zwischen 1.400 und 2.200 nm bei einem Durchmesser von etwa 12 nm aufweisen (Naidu et al., 2014). Unter einem Virion versteht man ein einzelnes Viruspartikel, das sich außerhalb einer Zelle befindet (Meng et al., 2017).

Die Virionen der GLRaV-Viren bestehen hauptsächlich aus Nukleinsäuren, die als Erbsubstanz dienen, und der Proteinhülle (Capsid), die diese schützt. Bei den Nukleinsäuren handelt es sich um ein einzelsträngiges RNA (Ribonukleinsäure)-Genom. Manche Viren besitzen zusätzlich noch eine äußere Hülle aus einer Lipiddoppelschicht, die Rebviren jedoch nicht (Ipach, 2014). Am 5'-Ende weist das Virion eine Cap-Struktur auf, jedoch keinen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der RNA. Verschiedene Proteine zählen ebenfalls zum Aufbau der Viren (Naidu et al., 2014). Blattrollviren sind in Reben in geringen Konzentrationen ungleichmäßig verteilt (Tsai et al., 2012). Die Verteilung ist dabei nur auf die Phloemzellen beschränkt (Esteves et al., 2013). Infizierte Reben sind häufig von mehreren GLRaVs betroffen, teilweise auch in Kombination mit anderen Rebviren (Naidu et al., 2014).

## 2.2 Symptome und Auswirkungen der Blattrollkrankheit

Nur die europäischen Reben (*Vitis vinifera*) sowie einige asiatische *Vitis*-Arten zeigen bei einem Befall mit der Blattrollkrankheit deutliche Symptome. Dahingegen sind beispielsweise Muscadinia-Reben (*M. rotundifolia*) und Wildreben (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. champinii* sowie Kreuzungen daraus) asymptomatische Wirte der Viren. Bei den europäischen Reben unterscheiden sich rote und weiße Rebsorten hinsichtlich der Symptomausprägung bei einem Befall mit der Blattrollkrankheit (Naidu et al., 2014; Weber, E., Golino, D., and Rowhani, A., 1993). Unterschiede zeigen sich auch je nach Rebsorte, Jahreszeit und klimatischen Bedingungen (Maree et al., 2013).

Im Sommer sind die ersten Symptome an den Blättern zu erkennen, die sich bis zum Spätherbst verstärken. Die Symptome zeigen sich häufig zuerst an älteren Blättern im basalen Bereich der Laubwand zum Reifebeginn der Beeren, der *Véraison*. Im weiteren Verlauf der Saison weitet sich dies auf die jüngeren Blätter aus (Naidu et al., 2014). Bei roten Rebsorten verfärben sich die Interkostalfelder rot oder rötlich-violett, wobei die Bereiche um die Blattadern grün bleiben (Abb. 1, A). Diese verfrühte Herbstfärbung weitet sich bei einigen Sorten sogar auf dem ganzen Blatt aus, sodass sich auch die Adern verfärben (Maree et al., 2013). Der Grund für die Verfärbung ist eine Anreicherung bestimmter Anthocyanpigmente (Gutha et al., 2010). Eine chlorotische Aufhellung der Interkostalfelder ist bei weißen Rebsorten zu beobachten (siehe Abb. 1, B). Dieses Symptom ist jedoch meist nur dezent ausgeprägt und bleibt daher häufig unerkannt (Maree et al., 2013). Im Spätherbst rollen sich die Blattränder nach unten ein, was der Krankheit ihren Namen gab (Martelli, 2014). Bei manchen weißen Sorten wie Thompson Seedless oder Sauvignon blanc ist das Blattrollen kaum bis gar nicht ausgeprägt, sodass eine visuelle Detektion der Blattrollkrankheit hier nahezu unmöglich ist (Maree et al., 2013).

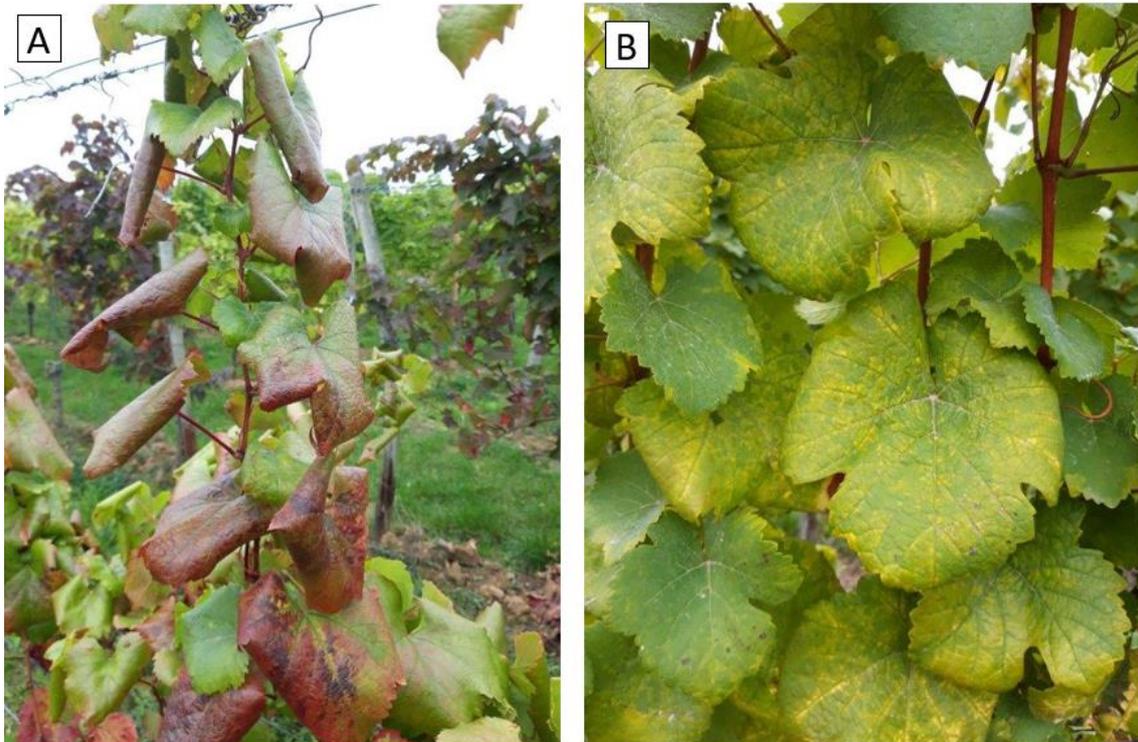


Abbildung 1: Symptome an den Blättern von mit der Blattrollkrankheit infizierten Reben. A: rote Rebsorte (Spätburgunder), B: weiße Rebsorte (Roter Traminer), Oktober 2020 (Quelle: Bettina Lindner)

Die alleinig visuelle Detektion von Symptomen der Blattrollkrankheit erweist sich als schwierig. Dafür gibt es mehrere Gründe. Zunächst dauert es mindestens ein Jahr von der Virusinokulation bis zu den ersten Symptomen (Blaisdell et al., 2016). Allgemein kann die Symptomausprägung neben der Rebsorte auch von anderen Faktoren wie der Kombination von Edelreis und Unterlage sowie den Umweltbedingungen beeinflusst werden. Verwechslungen mit Nährstoffmangel oder mechanischen Stammschäden, die ähnliche Symptome zeigen, können bei roten Rebsorten auftreten (Naidu et al., 2014). Hinzu kommt die Problematik hinsichtlich der fehlenden Symptome bei einigen Rebsorten, die bereits erwähnt wurde. Aufgrund der gleichen Symptomausprägung der verschiedenen GLRaVs ist eine visuelle Unterscheidung zwischen den einzelnen Arten unmöglich (Meng et al., 2017). Daher ist eine zuverlässige Detektion der Viren wichtig. Erst bei erfolgreicher Krankheitsbestimmung können geeignete Maßnahmen getroffen werden und die Virusausbreitung verringert werden (Naidu et al., 2014).

Eine Erkrankung mit Blattrollviren wirkt sich unterschiedlich stark auf Reben aus. Die Auswirkungen variieren z. B. hinsichtlich der Rebsorte, der Virusart und den klimatischen Bedingungen (Basso et al., 2017). Allgemein kann eine Infektion mit der Blattrollkrankheit zu Ertrags- und Qualitätsverlusten in Reben führen. Bei einem Feldversuch konnte gezeigt werden, dass mit GLRaV-1 infizierte Reben einen bis zu 40 % geringeren Ertrag aufweisen können (Cretazzo et al., 2010). Zusätzlich weisen infizierte Pflanzen eine verringerte Vitalität und eine verkürzte Lebensdauer auf. Dies führt zu Reifeverzögerungen, gestörter Farbbildung und einer verringerten Zuckerbildung (Naidu et al., 2014). GLD-infizierte Reben haben oft klein- und lockerbeerige Trauben. In roten Rebsorten zeigen sich durch den Einfluss der Blattrollkrankheit neben der ungleichmäßigen Fruchtreife und Farbausprägung auch veränderte Reifeparameter. Genauer gesagt verringert sich die Beerenqualität aufgrund eines verringerten Mostgewichts, einer reduzierten titrierbare Säure und eines erhöhten pH-Werts. Auch niedrigere Gehalte an Anthocyanen, Tanninen und Gesamtphenolen sind zu beobachten. Zusätzlich sind die Moste weniger aromatisch (Golino et al., 2008; Lee & Martin, 2009; Naidu et al., 2014).

Die Blattrollkrankheit beeinflusst die Genexpression und hat so Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel, die Photosynthese und die Verteilung von Assimilaten zu Sink-Geweben (Basso et al., 2017; Naidu et al., 2015). Zusätzlich werden bestimmte Gene, die bei wichtigen Stoffwechselwegen involviert sind, hoch- oder herunterreguliert. Dazu zählen solche Gene, die an der Regulation der Seneszenz, der Abwehrmechanismen und der vegetativen Entwicklung der Wirtspflanze beteiligt sind. Dadurch verringert sich die Stresstoleranz der Pflanzen und es kann zu Absterbeerscheinungen kommen (Basso et al., 2017; Espinoza et al., 2007; Vega et al., 2011). Durch die negativen Auswirkungen, die mit einer Infektion mit Blattrollviren einhergehen, hat die Krankheit auch eine wirtschaftliche Bedeutung. Bei einer Studie in den USA wurden die Kosten auf etwa 25.000 \$ bis 40.000 \$ pro Hektar bei einer Standzeit der Reben von 25 Jahren geschätzt (Atallah et al., 2012).

## 2.3 Übertragung von GLRaV-1

Reben werden vegetativ vermehrt, um Nachkommen mit denselben Eigenschaften wie die der Mutterrebe zu produzieren. Durch diese Vermehrungsmethode können Blattrollviren auf andere Standorte übertragen werden, wenn das Vermehrungsmaterial von infizierten Reben stammt. Neben dem Edelreis kann auch die Unterlage betroffen sein, die dann als symptomfreier Überträger fungiert (Martelli, 1993). Durch die Verbreitung von Vermehrungsmaterial in andere Länder hat die Blattrollkrankheit weltweite Bedeutung erlangt (Herrbach et al., 2017). Um eine solche Ausbreitung zu verhindern, darf in der EU nur virusfreies und getestetes Pflanzenmaterial zur Vermehrung verwendet werden (siehe Kapitel 2.4). Innerhalb des Weinbergs können die Viren nicht mechanisch, beispielsweise über Scheren oder Lesemaschinen, übertragen werden (Naidu et al., 2014).

Die Verbreitung der Blattrollviren von Rebe zu Rebe kann über Vektoren erfolgen. Bei GLRaV-1 sind dies verschiedene Schild- (*Coccidae*) und Schmierlausarten (*Pseudococcidae*). Die Insekten können die Reben anstechen, sich vom Phloem ernähren und dabei die Viren innerhalb und zwischen den Weinbergen verbreiten (Naidu et al., 2014). Generell können Schmierläuse aller Entwicklungsstadien die Blattrollviren übertragen. Männliche und weibliche sowie adulte und junge Schmierläuse unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Übertragung von Blattrollviren. Männliche Schmierläuse können zwar fliegen und so relativ weite Distanzen zurücklegen, ihnen fehlen jedoch die stechend-saugenden Mundwerkzeuge. Weibliche Schmierläuse dagegen haben solche Mundwerkzeuge, mit denen sie Pflanzensaft vom Phloem entnehmen und so Viren auf die Rebe übertragen bzw. von der Rebe aufnehmen können. Allerdings besitzen sie keine Flügel und können die Krankheit daher nur über kurze Distanzen verbreiten. Demnach ist die Ausbreitung der Blattrollviren innerhalb eines Weinbergs sehr langsam, außer die Insekten werden vom Menschen, dem Wind oder Vögeln weiter transportiert. Da dies vor allem für Larven zutrifft, gelten diese als effiziente Überträger von GLRaV-1. Allgemein können die Schmierläuse am Stamm, den Trieben, Blättern und Beeren saugen, wobei es aber Unterschiede hinsichtlich der Jahreszeiten und Arten gibt (Daane et al., 2012). Manche Arten verbringen einen Teil ihres Lebens an den Wurzeln der Reben. Dies kann ein Problem bei Neupflanzungen darstellen. Im Boden verbliebene Teile der Wurzeln können dann weiterhin GLRaVs und Schmierläuse auf die neuen Pflanzen übertragen (Pietersen, 2006).

## 2.4 Kontrolle und Management der Blattrollkrankheit

Eine Bekämpfung von Viruskrankheiten im Bestand ist nicht möglich, weshalb auf präventive Maßnahmen bei der Kontrolle und dem Management der Blattrollkrankheit gesetzt wird. Dafür wird eine Kombination aus der Pflanzung von virusfreiem Material, Kulturmaßnahmen und Vektorkontrollen in der Praxis angewandt (Naidu et al., 2014).

Eine wichtige Maßnahme umfasst die Gesundheitsselektion im Weinbau, deren Ziel die Erzeugung von gesunden Mutterstöcken zur Vermehrung von ebenfalls gesundem Pflanzgut ist. In Deutschland bildet die Rebenpflanzgut-Verordnung von 1986 die gesetzliche Grundlage, die an EU-Richtlinien angepasst wurde (EPPO, 2018). Neben der Untersuchung der Böden auf Nematoden und den Feldbesichtigungen spielt die Virustestung bei der Gesundheitsselektion eine zentrale Rolle. Seit dem Jahr 2002 müssen alle Mutterrebenbestände zur Erzeugung von Basispflanzgut auf Viren getestet werden, um viruskranke Stöcke von der Vermehrung auszuschließen. Mittels ELISA werden die Reben regelmäßig auf Reisigkrankheit (GFLV), Arabis Mosaic Virus (ArMV), die beiden Blattrollkrankheiten GLRaV-1 und -3 sowie bei Unterlagen auf GFkV untersucht (RebPflV 1986, 1986).

Europaweit werden die Zertifizierungsrichtlinien für Pflanzgut von der European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) festgelegt (Blouin et al., 2017). Im entsprechenden Bulletin der EPPO werden Richtlinien zu den Vermehrungsanlagen, zur Probenahme und Testung aufgeführt (EPPO, 2016). Eine spezifische und schnelle Diagnostik für die Zertifizierung von Pflanzmaterial ist aufgrund der fehlenden kurativen Behandlungen von Rebviren sehr wichtig und der Bedarf dafür in den letzten Jahren stark gewachsen. Für die Virusbefreiung in Vermehrungsanlagen gibt es verschiedene Maßnahmen, beispielsweise eine Hitzebehandlung oder die Regeneration der Pflanzen durch Meristemkulturen, um neue, gesunde Mutterstücke aufbauen zu können (Mannini & Digiario, 2017).

In Ertragsanlagen gibt es keine Möglichkeit der Virusbefreiung. Daher sollten Neuanlagen nur mit virusfreiem Pflanzgut angelegt werden. Bei einem Virusbefall sollte der Winzer versuchen diesen einzudämmen, was sich oft als schwierig darstellt und nur mit begrenzter Wirkungsweise funktioniert. Um dennoch eine Virusausbreitung im Weinberg zu

verringern, sollten kranke Stöcke entfernt oder bei starkem Befall die Anlage gerodet werden. Hier ergibt sich wieder das Problem der Symptomerkennung bei manchen Sorten, weshalb verdächtige bzw. zufällige Stöcke getestet werden sollten (Pietersen et al., 2017). Eine weitere Möglichkeit ist die Unterbindung der Weiterverbreitung durch Vektoren. Eine Bekämpfung der Vektoren ist beispielsweise durch den Einsatz von Insektiziden wie Raps- oder Paraffinöle möglich (Ipach, 2014). Auch biologische Maßnahmen wie die Ansiedlung von natürlichen Feinden oder Pheromonanwendungen sind möglich, aber meist weniger effektiv. Derzeit sind keine Klone bekannt, die resistent gegen die Blattrollkrankheit sind (Pietersen et al., 2017).

## 2.5 Detektionsmöglichkeiten

Eine Diagnose der Blattrollkrankheit ist durch eine alleinige visuelle Detektion unzuverlässig und schwierig. Die Symptome sind nur im Sommer und Herbst zu erkennen, in manchen Rebsorten sogar überhaupt nicht. Weitere Gründe wurden bereits in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben. Um erfolgreiche Maßnahmen gegen die Ausbreitung der Krankheit implementieren zu können, ist eine zuverlässige Detektion von GLRaVs unabdingbar. Die diagnostischen Methoden zum Virusnachweis umfassen das biologische Indexing, serologische Assays und molekularbiologische Methoden. In den letzten Jahren gab es weitere, neue Ansätze wie das „Next Generation Sequencing“ (NGS) (Naidu et al., 2014). Da die Ausführung dieser neuen Methoden den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde, wird darauf verzichtet.

### 2.5.1 Biologisches Indexing

Das biologische Indexing ist eine einfache, klassische Methode zur Virusdetektion. Es wird als Routineverfahren bei einigen Programmen zur Gesundheitsselektion, zur Überprüfung der Virusübertragbarkeit mittels Pfropfung und für die Beschreibung unbekannter Viruserkrankungen angewandt (Naidu et al., 2014). Für die Durchführung werden verholzte Einaugenstecklinge einer Rebe, die auf das Virus untersucht werden soll, auf sogenannte Indikatorpflanzen gepfropft. Diese werden nach einer kurzen Zeit im Gewächshaus ins Freiland ausgepflanzt und zwei bis drei Jahre hinsichtlich einer Symptomausprägung überwacht (Rowhani et al., 2005). Variationen im Gewächshaus oder *in vitro* erfolgen mit Grünveredlungen und sind deutlich schneller. Für GLRaV-1 eignen sich Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Mission, Barbera oder Spätburgunder als Indikatoren, da diese Sorten typische Symptome der Blattrollkrankheit ausbilden. Aufgrund der gleichen Symptomausprägung bei verschiedenen GLRaVs ist eine Unterscheidung des spezifischen Virus nicht möglich (Naidu et al., 2014). Ein weiterer Nachteil ist, dass das biologische Indexing u. a. von den klimatischen Bedingungen im Freiland abhängig ist (Constable et al., 2013). Demnach sind die Ergebnisse nicht immer zuverlässig. Das Verfahren ist auch sehr arbeits- sowie zeitintensiv (Naidu et al., 2014). Die ungleichmäßige Virusverteilung, ein geringer Virustiter und ausbleibende Symptome erschweren die Virusdetektion beim biologischen Indexing (Constable et al., 2013).

## 2.5.2 ELISA-Test

Verschiedene serologische Methoden wurden bereits entwickelt, um Blattrollviren detektieren zu können. Dazu zählen beispielsweise der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), die Immunfluoreszenz (IF) und die Immuno-strip Tests (Schaad et al., 2003). Der ELISA-Test ist der am weitesten verbreitete serologische Test. Er wird oft als Routineverfahren bei der Gesundheitsselektion in deutschen Teststationen angewandt. Der ELISA beruht darauf, dass Virus-Proteine (meist Hüllproteine), die sogenannten Antigene (Viruspartikel), in einer Probe durch Zugabe spezifischer Antikörper, die gegen Teile der Virusproteine gerichtet sind, quantitativ nachgewiesen werden können (Naidu et al., 2014). Serologische Reagenzien sind kommerziell erhältlich und werden seit einigen Jahren bereits routinemäßig im ELISA für GLRaV-1 eingesetzt (Esteves et al., 2013; Komínek & Bryxiová, 2005). Die Methode wird in einer 96-Well-Testplatte durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet neben der Zugabe verschiedener Reagenzien mehrere Inkubationszeiten und Waschschriffe. Insgesamt dauert ein ELISA-Assay zwei Tage. Darin sind längere Inkubationszeiten enthalten, wodurch zwischenzeitlich weitere Aufgaben erledigt werden können (Zherdev et al., 2018).

Der ELISA-Test wird in vielen Laboren weltweit eingesetzt und beruht auf der Fähigkeit der Antikörper (AK) sich sehr spezifisch an ein bestimmtes Antigen zu binden. Demnach ist die Methode nur so gut wie die verwendeten Antikörper. Allgemein sind Antikörper, auch Immunglobuline genannt, Proteine. Sie werden von gegen das Antigen gerichtete B-Lymphozyten des Immunsystems von Wirbeltieren gewonnen und besitzen spezifische Antigen-Bindungsstellen, mit denen sie an diese Antigene binden können. Beispielsweise sind die Hüllproteine der Viren solche Antigene. Das Epitop bildet einen kleinen Teil am Antigen, das der Antikörper erkennt und mithilfe der Antigen-Bindungsstellen bindet. Es gibt polyklonale und monoklonale Antikörper. Man spricht von monoklonalen Antikörpern, wenn die verwendeten Antikörper von einer einzelnen B-Zelle stammen und daher nur ein bestimmtes Epitop erkennen können. Bei polyklonalen Antikörpern stammen diese dementsprechend von unterschiedliche B-Zellen, sodass auch verschiedene Epitope erkannt werden können (Blouin et al., 2017).

Es gibt verschiedene Formen des ELISA-Tests, wobei das sogenannte „double antibody sandwich“ (DAS)-ELISA das verwendete Format für den Virusnachweis bei Reben ist und

nachfolgend beschrieben wird. In Abbildung 2 sind die einzelnen Schritte bei der Durchführung des DAS-ELISAs mit 96er-Mikrotiterplatten aufgeführt. Im ersten Schritt erfolgt das Coating, also die Bindung der Antikörper (in der Abb. blau dargestellt) an die Plastikoberfläche der Wells der Platten, was auch als Beladung bezeichnet wird. Die Bindung der primären, ungelabelten Antikörper erfolgt über den sogenannten Fc-Teil des AK, sodass die Antigenbindungsstelle frei bleibt (Blouin et al., 2017). Im Schritt 2 erfolgt die Zugabe der zu testenden Probe. Falls in dieser Pflanzenprobe das Virus-Antigen (grün dargestellt) enthalten ist, bindet es an die für dieses Antigen spezifischen Antigen-Bindungsstellen des Primärantikörpers. Ist das gesuchte Virus nicht in der Probe enthalten, binden keine Bestandteile der Probe an den Antikörpern (Zherdev et al., 2018).

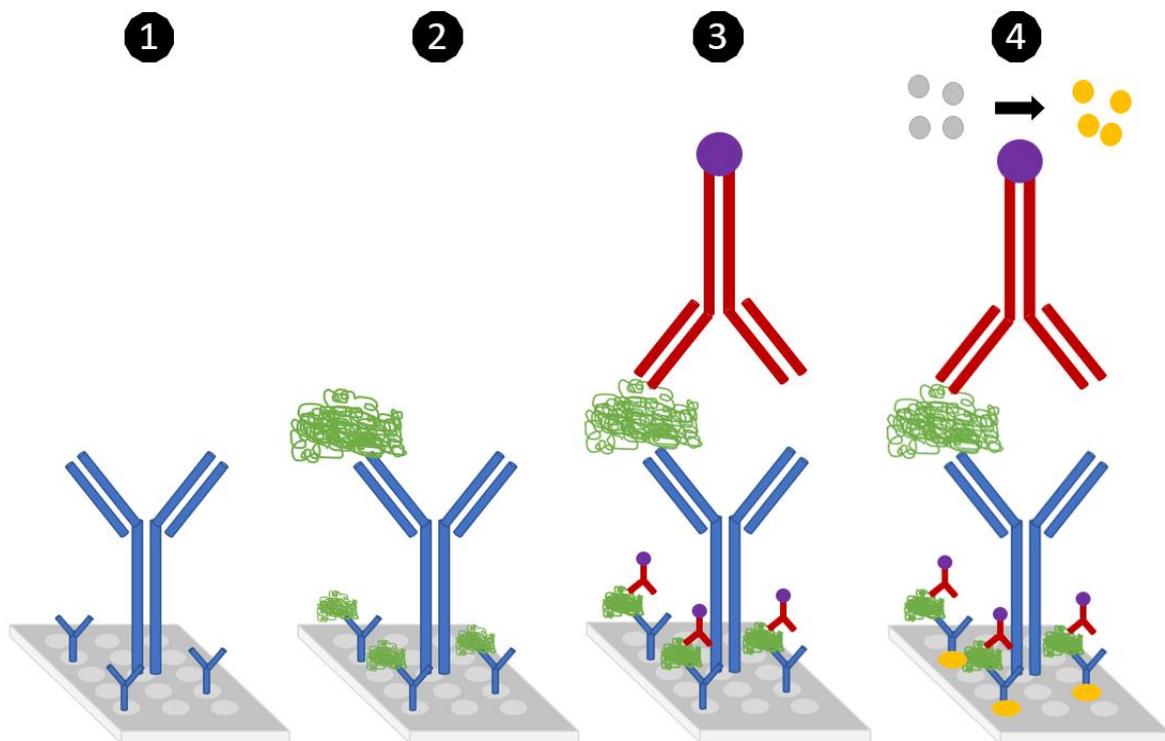


Abbildung 2: Darstellung der einzelnen Schritte beim DAS-ELISA (eigene Darstellung, modifiziert nach: Leinco, 2020)

Nach der Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, um den überschüssigen Extrakt (bzw. nicht gebundene Antigene) der Probe zu entfernen. Im dritten Schritt wird das Konjugat (rot dargestellt) zugegeben. Es handelt sich hierbei um enzymmarkierte, sekundäre Antikörper, die ebenfalls spezifisch gegen die gleichen oder andere Antigene des Hüllproteins gerichtet sind. Haben die Primärantikörper Virusantigene gebunden, dann

entsteht durch die Bindung der Sekundärantikörper eine Art Sandwich: die zwei Antikörper bilden das Brot, das Antigen den Belag. Für das Konjugat wird häufig alkalische Phosphatase (AP), also ein Enzym (in der Abbildung als violetter Kreis dargestellt), verwendet, das bereits an den Sekundärantikörper gebunden ist (Zherdev et al., 2018).

Nach Auswaschen nicht gebundener sekundärer Antikörper können die gebundenen im 4. Schritt sichtbar gemacht werden. Dies ist durch das gelabelte Enzym AP möglich. Gibt man das passende Substrat (als graue Kreise dargestellt) für dieses Enzym zu und lässt es eine bestimmte Zeit einwirken, so färbt sich die Flüssigkeit durch die Umsetzung des Substrats durch das Enzym in den Wells gelb. Häufig wird para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat verwendet. Dieses pNPP kann durch AP zu p-Nitrophenol dephosphoryliert werden, welches gelb erscheint. Anhand der Geschwindigkeit und Intensität der Färbung kann direkt auf die Menge an konjugierten Antikörpern geschlossen werden, die an ein Antigen binden. Die kolorimetrische Ermittlung des Virus kann visuell oder mittels Photometer erfolgen (Blouin et al., 2017).

Für ein valides Testergebnis wird eine geeignete Probe benötigt. Ein geringer Virustiter, eine ungleichmäßige Verteilung der Viren in der Pflanze oder die Tatsache, dass Blattrollviren nur im Phloem vorhanden sind, sind mögliche Gründe für falschnegative Ergebnisse. Es ist entscheidend, dass die Probennahme zu einem Zeitpunkt erfolgt, wenn die Viruslast in der Pflanze in den zu testenden Organen am höchsten ist. Der Virustiter und die Verteilung der Viren ändern sich im Laufe der Saison (Chooi et al., 2016; Constable et al., 2012).

Im Spätsommer und Herbst, wenn die Blätter noch nicht seneszent sind, ist der Titer am höchsten und es sollten ältere Blätter an basaler oder mittlerer Position in der Laubwand gesammelt werden. Im Blatt ist hinsichtlich der Closteroviren der höchste Virustiter in den Blattstielen zu finden, weshalb bevorzugt dieses Pflanzengewebe entnommen werden sollte. Die Blattrollviren verteilen sich über die Saison akropetal, also aus Richtung der Wurzeln und dem Stamm in die Triebe. Wird Holz als Testmaterial verwendet, sollte es erst nach dem Blattfall geschnitten werden. Bei der Testung von Holzproben soll abgeschabtes Phloem von verholzten Trieben verwendet werden. Dies ist vor allem im

Hinblick auf asymptomatisch befallene Reben wichtig (Monis & Bestwick, 1996). Bei der Probennahme wird in der Praxis häufig Pflanzengewebe von verschiedenen Positionen gesammelt, um das Problem der ungleichmäßigen Virusverteilung zu umgehen. Die Proben sollten bei Temperaturen von maximal 4 °C bis zur Probenaufbereitung aufbewahrt werden, damit kein Virusverlust entsteht. Bei längerer Zeit zwischen Probennahme und Messung können die Proben auch bei -20 °C eingefroren werden (Blouin et al., 2017).

Wie bereits erwähnt ist die Spezifität eine der Haupteigenschaften der Antikörper. Sie wird dadurch definiert, wie spezifisch bestimmte Epitope erkannt werden können. Da polyklonale Antikörper auf verschiedene Epitope abzielen, sind sie meist weniger spezifisch. Dies hat dahingehend Vorteile, dass eine größere Bandbreite an Virusvarianten erkannt werden kann. Problematisch ist die Tatsache, dass es zu Kreuzreaktionen kommen kann und ein anderes Virus erkannt wird. Bei den ELISA-Protokollen können sowohl monoklonale oder polyklonale Antikörper als auch Mischungen Verwendung finden, das Protokoll bleibt stets gleich (Zherdev et al., 2018).

Zunächst konnte bei den ersten ELISA-Tests die Auswertung nur visuell erfolgen. Durch die Entwicklung moderner Plattenleser ist es seitdem möglich die Detektion durch die Messung der optischen Dichte (OD) durchzuführen. Beim ELISA wird die Reaktionsrate der Enzymaktivität, die für die Färbung des Substrates verantwortlich ist, gemessen. Die Reaktionsraten verhalten sich linear bis zum Limit des Plattenlesers (meist 2,5 oder höher). Hohe Enzymkonzentrationen und damit auch hohe Viruskonzentrationen können bereits nach 10 Minuten erreicht werden. Solche Proben besitzen einen OD-Wert von über 2,5. Da die Platten in vielen Protokollen über den Zeitraum von einer Stunde gelesen werden, können auch niedrige Virustiter ermittelt werden. Zusätzlich werden negative und positive Kontrollen zur Überprüfung der Testspezifität verwendet. Der Grenzwert, an dem eine Probe als viruskrank gilt, ist häufig als zwei- oder dreifacher Wert des Durchschnitts der negativen Kontrollproben festgelegt (Blouin et al., 2017). Beim Bioreba-Protokoll werden Hintergrundwerte von positiven Proben dahingehend unterschieden, dass letztere einen klaren Anstieg der OD verzeichnen müssen. Zusätzlich wird eine Cut-Off-Grenze anhand der Standardabweichung berechnet (Bioreba, 2014).

Allgemein ist der ELISA ein empfindlicher und zuverlässiger Test, mit dem eine hohe Anzahl an Proben getestet werden kann. Er findet aufgrund seiner Robustheit und Skalierbarkeit als Routinetest für die Herstellung von virusfreiem Pflanzenmaterial weit verbreitete Verwendung (Naidu et al., 2014) und kann bei der Gesundheitsselektion angewandt werden (RebPflV 1986, 1986). Der Grund dafür, dass der ELISA robuster gegenüber molekularen Tests ist, besteht darin, dass er nicht so stark von Polyphenolen und Polysacchariden beeinflusst wird. Diese Hemmstoffe stellen bei der PCR ein Problem dar, wenn diese bei der Extraktion nicht entfernt wurden (Zherdev et al., 2018). Zusätzlich ist es eine einfache und kostengünstige Methode (O'donnell, 1999; Ward et al., 2004). Gegenüber molekularen Methoden hat der ELISA den Vorteil, dass die Probenvorbereitung weniger aufwändig ist und generell einfaches, günstigeres Equipment benötigt wird (Blouin et al., 2017).

Dennoch hat die Identifikation von Blattrollviren mittels ELISA auch Nachteile. Zum einen hat er eine geringere Empfindlichkeit als molekularbiologische Methoden, vor allem bei geringem Virustiter. Molekularbiologische Methoden erkennen übrigens die Nukleinsäure des Virus, während der ELISA ja dessen Proteine erkennt. Demnach gibt es zwischen den Verfahren unterschiedliche Wirkungsweisen. Zusätzlich kann es auch Probleme hinsichtlich der Spezifität geben. Dies ist der Fall, wenn z. B. verschiedene Varianten eines GLRaVs in den Proben enthalten sind, die von den Antikörper nicht erkannt werden (Naidu et al., 2014; Weber, E., Golino, D., und Rowhani, A., 2002).

## **2.5.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.3.1 RT-PCR**

In den letzten Jahrzehnten wurden vermehrt molekularbiologische Methoden für den Nachweis von Viren verwendet (Naidu et al., 2014). Die Grundlage bildet die Polymerasekettenreaktion (polmerase chain reaction, PCR), die in den 1980er Jahren entwickelt worden ist (Mullis et al., 1986). Ursprünglich wurde die PCR für die Detektion von DNA konzipiert, jedoch besitzen die meisten Rebviren eine RNA als Genom. Durch die Hinzunahme des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) kann die RNA in eine DNA umgeschrieben werden, sodass mittels einer RT-PCR zum ersten Mal 1993 auch Rebviren molekularbiologisch nachgewiesen werden konnten (Rowhani, 1993). Neben der RT-PCR

gibt es viele weitere Modifikationen der PCR, von denen teilweise auch Protokolle für die Detektion von GLRaV-1 entwickelt wurden (Little & Rezaian, 2006; López-Fabuel et al., 2013; Osman et al., 2007).

Um eine Analyse mittels RT-PCR durchführen zu können, muss die RNA zunächst extrahiert werden. Dafür gibt es verschiedene Methoden (Gambino et al., 2008). Die Extraktion ist aufgrund hoher Gehalte an Polyphenolen, Polysacchariden und anderen sekundären Stoffwechselprodukten, die im Pflanzengewebe von Reben enthalten sind, schwierig. Phenole binden Proteine und Nukleinsäuren, um größere Komplexe zu bilden. Polysaccharide tendieren dazu in Anwesenheit von Alkohol zusammen mit der RNA auszufallen, kontaminieren damit den Extrakt und stören damit spätere Anwendungen (Salzman et al., 1999). Um dem Einfluss solcher Inhibitoren entgegen zu wirken, werden in den Protokollen häufig Detergenzien, reduzierende oder denaturierende Mittel verwendet. Beispielsweise können Phenole mithilfe von Chloroform entfernt werden (Gambino et al., 2008).

Nach der RNA-Extraktion wird bei einer RT-PCR (wie bereits erwähnt) die RNA in cDNA (komplementäre DNA) enzymatisch umgeschrieben. Zum Mastermix werden u. a. für das entsprechende Virus passende Primer hinzugegeben. Danach erfolgt die Amplifikation, die in drei Schritte untergliedert ist und bei bestimmten Temperaturen abläuft. Zuerst werden bei der Denaturierung die Doppelstränge in Einzelstränge getrennt, damit sich im zweiten Schritt (Anlagerung) die zugegebenen, komplementären Primer anlagern können. Die Primer sind spezifisch für bestimmte Abschnitte des Virusgenoms. Beim dritten Schritt (Verlängerung) werden, ausgehend von den Primern und mithilfe von Polymerasen, die Stücke zwischen den beiden angelagerten Primern amplifiziert. Dieser Ablauf wird mehrmals wiederholt, sodass es sich um eine exponentielle Amplifikation der DNA handelt (Rowhani et al., 2017). Mithilfe von Fluoreszenz, Gelelektrophorese oder visueller Detektion können bei Vorhandensein von Virusnukleinsäuren anschließend Viren nachgewiesen werden (Gambino & Gribaudo, 2006)

Generell ist eine RT-PCR sehr spezifisch und empfindlich. Gegenüber dem ELISA ist sie 100-mal sensitiver und sie zeigt allgemein sehr zuverlässige Ergebnisse (Sefc et al., 2000). Es können geringe Virustiter mittels der PCR-Methoden detektiert werden (Maliogka et

al., 2015). Die RT-PCR ist eine schnelle Methode, ein Ergebnis ist bereits nach einem Tag vorhanden. Durch eine Multiplex RT-PCR können sogar mehrere Viren gleichzeitig untersucht werden, wodurch Zeit und Kosten gespart werden (Gambino et al., 2006).

Neben diesen Vorteilen haben PCR-Methoden auch Nachteile. Das Verfahren ist sehr zeitaufwändig und benötigt eine aufwändige Probenvorbereitung, um Hemmstoffe der Amplifikation zu eliminieren (Fredricks & Relman, 1998). Sie sind allgemein sehr anfällig gegenüber Kontaminationen (Corless et al., 2000). Zusätzlich wird spezielles, teures Equipment wie ein Thermocycler benötigt und die Durchführung ist komplex, sodass die PCR nur von geschultem Fachpersonal durchgeführt wird (Walsh & Pietersen, 2013). Zieht man die Nachteile hinsichtlich der Kosten, der speziellen Geräte und den technischen Anforderungen in Betracht, ist die PCR ungeeignet für eine weitverbreitete Verwendung. Es besteht ein dringender Bedarf an schnellen, hoch spezifischen Tests, aber einfach durchzuführenden Testmethoden für aufkommende Krankheiten (Francois et al., 2011). Die ideale Detektionsmethode müsste daher einfach, schnell und spezifisch sein. Bestenfalls sollte sie Ergebnisse in Echtzeit darstellen und kein spezielles Labormaterial benötigt werden (Walsh & Pietersen, 2013).

### **2.5.3.2 LAMP**

Eine solche Methode könnte die sogenannte loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) darstellen. Sie ist eine weitere Variante der molekularbiologischen Methoden. Es handelt sich um eine Schnellmethode, bei der Nukleinsäuren amplifiziert werden. Das Verfahren wurde im Jahre 2000 erstmals vorgestellt (Notomi et al., 2000). Für GLRaV-3 (Walsh & Pietersen, 2013), GFkV (grapevine fleck virus) (Almasi, 2018; Frotscher et al., 2021), GRBV (grapevine red blotch virus) (Romero Romero et al., 2019) und GFLV (grapevine fanleaf virus) (Almasi, 2015) ist bereits eine LAMP-Methode etabliert worden. Für die Detektion von GLRaV-1 mittels LAMP wurde bisher noch kein Test veröffentlicht.

Das Reaktionsprinzip der LAMP macht sich zunutze, dass Nukleinsäuren bei 60-65 °C in einem sogenannten semistabilen Zustand sind. An sich doppelsträngige Nukleinsäurebereiche liegen dann sowohl einzel- als auch doppelsträngig vor. Für die

Amplifikation benötigt die LAMP eine spezielle DNA-Polymerase mit „5′ – 3′ strand-displacement“-Aktivität, der jedoch die 5′ – 3′ Exonuklease fehlt. Ferner sind vier bis sechs erregerspezifische Primer für die Reaktion essentiell. Aufgrund dieses isothermalen Assaykonzepts laufen die Reaktionen sehr schnell ab (Notomi et al., 2000). Der Mechanismus der LAMP wird anhand der Abbildung 3 erklärt.

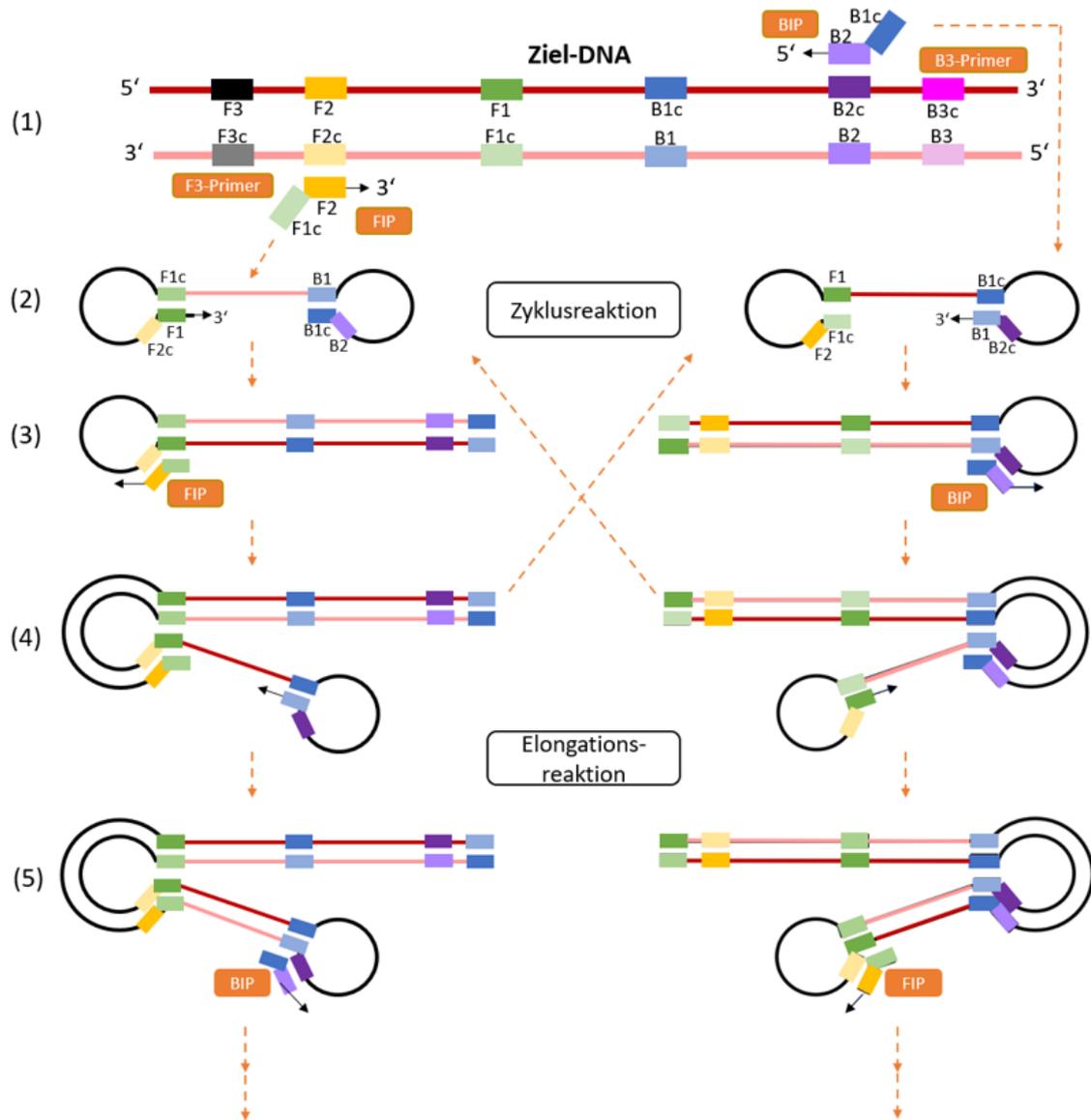


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mechanismus bei der LAMP (FIP = forward inner primer; BIP = backward inner primer; eigene Darstellung, modifiziert nach: Eiken Chemical, 2005; Notomi et al., 2015)

Der Mechanismus der LAMP-Reaktion (siehe Abb. 3) beruht auf der Amplifikation der Proben (Zielsequenz) und ist in zwei Teile untergliedert: in eine nichtzyklische und eine

zyklische Phase. In der nichtzyklischen Phase wird aus der Ziel-DNA (1) ein intermediäres Produkt gebildet, das eine Hantelform aufweist (2). Dieses wird nun in der zyklischen Phase exponentiell amplifiziert (3-5) (Fischbach, 2017). Nach der Extraktion der DNA bzw. der Umschreibung der RNA in cDNA liegt zunächst die Ziel-DNA vor (1). Diese besitzt sechs spezifische Gensequenzen (in farbigen Blöcken dargestellt), die von den vier bis sechs im Mastermix enthaltenen Primer erkannt werden können. Für die Reaktion werden sogenannte innere und äußere Primer verwendet. Diese werden als „forward inner primer“ (FIP), „backward inner primer“ (BIP), F3- und B3-Primer bezeichnet. Die beiden äußeren Primer können die Sequenz an der Region um F3 und B3 erkennen. Sie werden nur am Anfang für die Bildung des intermediären Produkts benötigt. Die inneren Primer setzen sich aus je zwei Primerbindungsstellen zusammen, also F2-F1c bzw. B2-B1c (Notomi et al., 2015).

Der FIP hybridisiert an die F2c-Bindungsstelle (siehe Abb. 3) und anschließend kann, ausgehend vom Primer, die DNA-Polymerase den komplementären Strang synthetisieren. Zugleich hybridisiert der F3-Primer und löst den amplifizierten DNA-Strang ab (Fischbach, 2017). Diese Amplifikationsmethode, die als Alternative zur PCR für die Vervielfältigung von Nukleinsäuren verwendet werden kann, nennt sich „strand displacement amplification“. Das Enzym DNA-Polymerase ist in der Lage eine Neusynthese an einem Einzelstrangbruch anzufangen und hierbei den alten Strang zu verdrängen (Spektrum, 1999). Am anderen Ende hybridisieren der BIP-Primer analog zum FIP-Primer und der B3-Primer analog zum F3-Primer. Durch Rückfaltung von zwei Sequenzen an beiden Enden bilden die beiden Stränge je eine Hantelstruktur mit zwei Schlaufen aus (2). Dies ist das Startmaterial für die anschließenden zyklischen Amplifikationsreaktionen (3-5) (Fischbach, 2017). Die inneren Primer hybridisieren an den entsprechenden Sequenzen (3) und wieder werden mithilfe der DNA-Polymerasen neue DNA-Stränge gebildet (4). Durch sich wiederholende Elongationsreaktionen werden DNA-Produkte verschiedener Längen produziert (5) (Notomi et al., 2015).

Die Durchführung einer LAMP ist in vier Schritte unterteilt. Nach der Probennahme erfolgt die Extraktion der DNA bzw. RNA aus den einzelnen Proben. Der dritte Schritt ist die Amplifikation (Walsh & Pietersen, 2013). Dazu wird der Mastermix vorbereitet, der die Primer, DNA-Polymerasen und weitere Substrate enthält. Häufig wird *Bst* DNA-

Polymerase, die von *Bacillus stearothermophilus* gewonnen wird, verwendet. Die zuvor extrahierte DNA bzw. RNA wird hinzu pipettiert und der Reaktionsansatz bei einer konstanten Temperatur im Bereich um 60 bis 65 °C inkubiert. Da Blattrollviren eine RNA anstelle einer DNA als Genom aufweisen, wird mit einer Reversen Transkriptase, basierend auf den LAMP-Primern, die RNA-Zielsequenz in die cDNA umgeschrieben und somit eine RT-LAMP angewandt. Innerhalb von 15 bis 60 Minuten wird die DNA  $10^9$ - bis  $10^{10}$ -fach amplifiziert. Im letzten Schritt erfolgt die Detektion. Der Virusnachweis kann aufgrund der hohen Spezifität allein durch das Vorhandensein der amplifizierten Produkte erfolgen (Eiken Chemical, 2005).

Die Amplifikationsprodukte sind sehr spezifisch und in großer Menge vorhanden. Daher können einfache Detektionsmethoden am Ende der LAMP Verwendung finden. Eine Möglichkeit stellt die Messung der Trübung dar. Dies geschieht anhand von Magnesiumdiphosphat, einem Zwischenprodukt der DNA-Synthese, als Indikator. Die gebildete Menge dieses Abfallprodukts wird am Ende der Reaktion gemessen und gibt Rückschlüsse auf die DNA-Menge, da sich diese proportional zueinander verhalten. Alternativ kann mithilfe einer Fluoreszenzmessung das Virus in Echtzeit nachgewiesen werden. Dies geschieht durch die Interkalation von Fluorochromen (z. B. SYBR Green oder EVA Green) in die DNA. Je mehr Amplifikate gebildet werden, desto mehr dieser interkalierenden Farbstoffe können eingelagert werden und desto höher (bis zu einem gewissen Endpunkt) ist die gemessene Fluoreszenz (Notomi et al., 2015). Auch eine Gelelektrophorese kann für die Detektion verwendet werden. Mithilfe der Zugabe von Hydroxynaphtholblau (HNB) als Indikator kann anhand eines Farbumschlags bei Vorhandensein des Virus der visuelle Nachweis erfolgen (Walsh & Pietersen, 2013).

Die LAMP vereint Schnelligkeit, Einfachheit und hohe Spezifität (Notomi et al., 2000). Die einfache Durchführung bleibt über alle Schritte, von der Extraktion der Nukleinsäuren bis zur Detektion, erhalten. Für die LAMP werden keine speziellen Gerätschaften benötigt und sie kann in einem üblichen molekularbiologischen Labor durchgeführt werden. Gegenüber anderen molekularen Virusnachweisen wird lediglich ein isothermales strand-displacement Enzym benötigt (Notomi et al., 2015). Da die Amplifikation der LAMP bei einer konstanten Temperatur durchgeführt wird, wird kein Thermocycler benötigt. Ein Wasserbad oder Heizblock ist bei visueller Auswertung ausreichend (Francois et al., 2011).

Der Prozess der Amplifikation ist innerhalb einer Stunde beendet und die Empfindlichkeit ist vergleichbar mit der einer nested PCR und höher als die des ELISAs (Notomi et al., 2015; Walsh & Pietersen, 2013). Die Durchführung einer LAMP benötigt nur wenige Stunden, die Zeit ist dabei vor allem abhängig von der gewählten Extraktions- und Detektionsmethode. Messungen in Echtzeit, z. B. mittels Fluoreszenz, reduzieren die Zeit erheblich. Ferner können im Gegensatz zum ELISA auch geringe Mengen an Virustiter mittels LAMP nachgewiesen werden (Notomi et al., 2015). In Versuchen mit Salmonellen zeigte sich die LAMP sehr robust und war kaum von inhibitorischen Stoffen betroffen (Francois et al., 2011). Die Interpretation der Ergebnisse ist einfach und es werden keine intensiven Analysen der Daten benötigt (Kogovšek et al., 2015).

Die Nachteile der LAMP-Methode sind das komplexe Primerdesign und die Gefahr für falschpositive Ergebnisse, wenn unspezifisch amplifiziert wird (Fischbach, 2017). Nachteilig an der Methode ist auch die Tatsache, dass sie anfällig für Kontaminationen ist. Die Probenvorbereitung muss daher strikt von der Vorbereitung des Mastermix getrennt werden, um falschpositive Ergebnisse zu vermeiden. Des Weiteren kann die Robustheit vom verwendeten Indikator abhängig sein, der mit anderen Substraten reagieren und falsche Ergebnisse liefern kann (Walsh & Pietersen, 2013). Darüber hinaus ist es möglich, dass durch die hohe Spezifität der Primer nicht alle Varianten eines Virus erkannt werden (Rowhani et al., 2017). Für Blattrollviren sind bisher keine Multiplex-LAMPs entwickelt worden, sodass bislang nur ein bestimmtes Virus detektiert werden kann. Die Entwicklung eines solchen Assays gestaltet sich aber als kompliziert und komplex.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Pflanzenmaterial und Probennahme**

Für die Versuche wurden Holz- und Blattproben von Topfreben eingesetzt, die in den Gewächshäusern am Institut für Rebenzüchtung an der Hochschule Geisenheim (Deutschland) stehen. Die viruskranken Proben befinden sich allesamt in einem Gewächshaus, das als „Virushaus“ bezeichnet wird. Die gesunden Kontrollpflanzen stehen in einem separaten Gewächshaus. Tabelle 2 gibt einen Überblick über das verwendete Pflanzenmaterial. Die Holzproben wurden nach dem Blattfall im Winter 2019 bzw. 2020 gesammelt, auf eine Länge von drei Augen geschnitten und in kleinen Plastiksäcken zunächst im Kühlhaus bei 4 °C gelagert. Im Frühjahr wurden die Schnittholzproben nach Durchführung der ELISA-Tests zur längerfristigen, befallsfreien Lagerung bei -20 °C eingefroren. Die Blattproben wurden am 28.5., 8.7. und 20.8.2020 genommen. Dazu wurden jeweils drei basale Blätter inklusive Blattstiele entnommen, in eine Plastiktüte gegeben und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Bei längerer Lagerung wurden auch diese bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Als positive Kontrolle (PK) wurde eine bereits nach Vorversuchen in der RT-LAMP und im DAS-ELISA als positiv getestete Probe (Probe 3 oder 6) verwendet. Als Negativkontrolle wurde eine nicht virusinfizierte Pflanze eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kontrollen und zu testendes Probenmaterial immer aus den entsprechenden Pflanzenteilen gewählt wurden. Bei Messung von Holzproben wurden beispielsweise ebenfalls Holzproben verwendet und bei einer RNA-Extraktion wurden die Kontrollen auch mit dieser Methode aufbereitet.

Tabelle 2: Verwendetes Pflanzenmaterial (NK = nicht virusinfizierte Kontrollpflanze)

Probe	Probenbezeichnung und -art	Virusstatus	Probennahme	Faktor für GLRaV-1 im ELISA	Rebsorte
1	28071, Holzprobe	GLRaV-1, -3, GFkV	Winter 2019	11,952	Gamay noir
2	28062, Holzprobe	GLRaV-1, -2, -3, GFkV, GVB	Winter 2019	3,000	Alicante HB
3	28081, Holz- und Blattprobe	GLRaV-1, GVA	Winter 2020 (Holz)	5,109	Weißer Riesling
			08.07.2020 (Blatt)	12,258	
4	28058, Holzprobe	GLRaV-1, -3	Winter 2019 20.8.2020 (Blatt)	12,715	Merlot
5	28068, Holzprobe	GLRaV-1, -2, GVA, GVB	Winter 2020	6,371	Muscat blanc
6	28080, Holz- und Blattprobe	GLRaV-1, GVA	Winter 2020 (Holz)	4,446	Weißer Riesling
			28.05.2020 (Blatt)	19,271	
7	21495, Holzprobe	GLRaV-1	Winter 2020	2,817	Dunkelfelder
8	21614, Holzprobe	GLRaV-3, GVA, GVB	Winter 2020	0,971	Bonifiche Feraresi Gm
9	28034, Holzprobe	GLRaV-2	Winter 2020	1,043	Chaouch rose
10	28044, Holzprobe	ArMV, GFkV	Winter 2020	1,121	Morio Muskat
11	28046, Holzprobe	GFLV	Winter 2020	1,030	Müller-Thurgau
12	28055, Holzprobe	GLRaV-1, GVA	Winter 2020	16,756	Servant
13	28089, Holzprobe	GLRaV-1, RpRSV-ch	Winter 2020	10,692	ohne
14	21609, Holzprobe	GLRaV-1, -3, GVA	Winter 2020	24,262	Plavac bracki
15	21504, Holzprobe	GLRaV-1	Winter 2020	6,511	ohne
NK	21541, Holz- und Blattprobe	nicht virusinfiziert	28.05.2020 (Blatt)	1,0265	LN 33
			Winter 2019 (Holz)		

## 3.2 Nomenklatur der Versuche

Bei jedem Versuch ist den Probennummern ein Buchstabe vorangestellt. Dabei stehen „W“, „B“ und „R“ für die verwendete Extraktionsmethode der RT-LAMP:

- „W“ steht für die einfache Extraktion in Wasser
- „B“ steht für die Extraktion mittels magnetischer Beads
- „R“ steht für die RNA-Extraktion

Die Abkürzungen „E“ und „P“ beziehen sich auf die Messung mit folgenden Methoden:

- Der Buchstabe „E“ vor einer Probe steht für die Auswertung mittels DAS-ELISA
- „P“ entsprechend für die RT-PCR

„R1“ bedeutet z. B., dass die Probe 1 mittels RNA-Extraktion aufbereitet und in der RT-LAMP gemessen wurde.

## **3.3 RT-LAMP**

### **3.3.1 Probenaufbereitung und Extraktion**

Generell sollte bei der Probenaufbereitung darauf geachtet werden so sauber wie möglich zu arbeiten, um Kontaminationen vorzubeugen. Daher wurde die Arbeitsplatte sowie die Materialien und Gerätschaften mehrmals desinfiziert. Des Weiteren wurden Einweghandschuhe getragen. Wenn nicht anders angegeben, wurden nach jedem Schritt die Proben und Reagenzien auf Eis gestellt.

Einige Versuche wurden in biologischer und technischer Wiederholung gemessen. Bei der biologischen Wiederholung wurden verschiedene Probenstücke entnommen und diese separat aufbereitet. Bei der technischen Wiederholung wurden aus demselben Probenstück mehrere Extraktionen durchgeführt und gemessen.

Bei den Versuchen wurden die folgenden Extraktionsmethoden angewandt.

#### **3.3.1.1 Einfache Extraktion in Wasser (W)**

Das Ausgangsprotokoll der Firma Mast Diagnostica GmbH (Reinfeld, Deutschland) sieht die hier aufgeführte einfache Extraktion in Wasser vor (siehe Anhang 8.1). Für die Extraktion von Viruspartikeln aus Rebholz wurde zunächst der Bast des Schnittholzes mithilfe eines Messers abgeschabt. Mittels einer Rebschere (Felco 2, Felco SA, Les Geneveys-sur-Coffrane, Schweiz) wurden 0,5 g bis 1 g dünne Scheiben der Probe geschnitten und abgewogen, der Anschnitt vorher verworfen. Wenn Blattproben verwendet wurden, wurden diese in kleine Stücke gerupft, überwiegend Blattstiele sowie -adern genommen und ebenfalls 0,5 g bis 1 g Probe abgewogen. Die Holz- bzw. Blattproben wurden in eine Bioreba „Universal Extraktion Bag“ (Bioreba AG, Reinach, Schweiz) gegeben und mithilfe einer Pasteurpipette 2 ml Wasser hinzu pipettiert. Mit einem Hammer wurde die Probe zerkleinert und anschließend in einem Tecan-Homogenisator (Modell THE-500, Tecan AG, Hombrechtikon, Schweiz) 2 Minuten fein homogenisiert. Die Beutel wurden auf Eis gestellt und der Schaum absetzen gelassen.

Etwa 500 µl der Probe wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; nachfolgend wird die Abkürzung „Tube“ verwendet) überführt und bei 6000 x g für 2 Minuten in der Zentrifuge (Thermo Scientific Pico 21, Thermofisher, Waltham, USA) belassen. Der Überstand (ca. 400 µL) wurde mithilfe einer Kolbenhubpipette abgenommen und in ein frisches Tube pipettiert. Der erhaltene Extrakt wurde bei längerer Aufbewahrung zu je 50 µL Aliquoten bei -20 °C eingefroren bzw. bei sofortiger Verwendung auf Eis gestellt.

### **3.3.1.2 Extraktion mit PVP oder Tris-Puffer**

In einem Versuch zur Optimierung des Ausgangsprotokolls wurde die einfache Extraktion in Wasser dahingehend verändert, dass anstelle von Wasser verschiedene Pufferlösungen eingesetzt wurden. Anhand von Vorversuchen wurden die Konzentrationen und Lösungen mit den besten Resultaten bei der LAMP eingesetzt. Zum einen wurde eine 100 mM Lösung mit Tris bei einem pH-Wert von 8 angesetzt. Zum anderen wurden PVP-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (3 %, 1,5 % und 0,25 %) verwendet. Dazu wurde Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) 10 mit entsprechender Menge an Wasser verdünnt.

### **3.3.1.3 RNA-Extraktion (R)**

Zur Optimierung des Ausgangsprotokolls wurde eine RNA-Extraktion verändert nach der Silicamethode (Gambino et al., 2008) durchgeführt. Dafür wurden die Schnitthölzer mithilfe eines Messers vom Bast befreit und etwa 0,5 g Kambiumraspel abgewogen. Bei Blättern wurde die gleiche Menge verwendet und die Probe händisch zerkleinert. Blatt- bzw. Holzproben wurden nun in Aluminiumtütschen platziert und mithilfe eines Hammers grob zerkleinert. Durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und anschließendem Hämmern wurde das Material aufgeschlossen. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Unter dem Abzug wurden die Kambium- bzw. Blattraspel noch gefroren schnell in eine „Universal Extraktion Bag“ (Bioreba AG, Reinach, Schweiz) überführt. In den Beutel wurden 4 ml Lysis-Puffer (4 M Guanidin-isothiocyanat; 0,2 M Natriumacetat (pH 5,2); 25 mM EDTA; 1 M Kaliumacetat; 2,5 % PVP-40; 2 % Sarkosyl), der vorher frisch mit 1 % Mercaptoethanol versetzt wurde, zugegeben. Die Beutel wurden in den Tecan-Homogenisierer (Modell THE-500, Tecan AG, Hombrechtikon, Schweiz) gegeben und

zweimal auf Stufe 6 homogenisiert. Es wurde gewartet, bis sich der Schaum absetzte. Pro Probe wurden 2 Stück 2 ml Tubes genommen und pro Tube 960 µl Gemisch aus dem Beutel darin überführt. Die Röhren wurden bei 70 °C und 750 Umdrehungen pro Minute im „Mischblock MB-102“ (Bioer, Hangzhou, China) inkubiert. Nun wurde die gleiche Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 % vol.) hinzugegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 3.500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 2 ml Tubes pipettiert und die gleiche Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 % vol.) dazugegeben. Wieder wurde 5 Minuten auf Eis invertiert und 15 Minuten bei 3.500 g und 4 °C zentrifugiert.

Ab diesem Zeitpunkt wurde anhand des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und des beiliegenden Protokolls bei Raumtemperatur weitergearbeitet. Die Überstände der Duplikate wurden in einem frischen 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vereint. Anschließend wurde 0,5 % vol. Ethanol (96-100 %) zugegeben und gemischt. Pro Probe wurden 630 µl des Gemischs auf eine RNeasy Säule aus dem Kit aufgetragen und 15 Sekunden bei  $\geq 8000$  g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß genommen und der Schritt dreimal wiederholt bis die gesamte Probe aufgebracht war.

Für den DNase-Verdau auf der Säule wurden 350 µl RW1 auf die Säule gegeben, 15 Sekunden bei  $\geq 8000$  g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß platziert. Pro Probe wurden 10 µl DNase I Stammlösung mit 70 µl Puffer RDD durch invertieren vorsichtig gemischt und direkt auf die Säule pipettiert. Für 15 Minuten wurde bei Raumtemperatur inkubiert. 350 µl RW1 Puffer wurden auf die Säule geben, 15 Sekunden bei  $\geq 8000$  g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule wieder in ein frisches Eppi gegeben. 500 µl RPE Puffer wurden auf die Säule pipettiert, 15 Sekunden bei  $\geq 8000$  g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule wieder in ein frisches „Eppi“ gegeben. Erneut wurden 500 µl RPE Puffer hinzugefügt, 2 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. 30 µl RNase freies Wasser wurde direkt auf jede Säule pipettiert, 1 Minute inkubiert und 1 Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Nochmals wurden 30 µl RNase freies Wasser direkt auf die Säule pipettiert, 1 Minute inkubiert und 1 Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert.

Die Säule wurde entnommen und die RNA-Konzentration im Photometer BioTek Gen5 (BioTek, Winooski, USA) gemessen. Für eine längere Aufbewahrung wurde der Extrakt bei -80 °C gelagert. Für die LAMP wurden die Proben auf 100 ng/µl eingestellt. Diese Art der Extraktion wurde auch für die RT-PCR verwendet.

#### **3.3.1.4 Extraktion mit magnetischen Beads (nach Mast Diagnostica GmbH) (B)**

Auch die folgende Extraktionsmethode wurde zur Optimierung des Ausgangsprotokolls getestet. Dafür wurde der Bast der verholzten Triebe mithilfe eines Messers entfernt und pro Probe etwa 0,5 g Holz abgewogen. Die Probe und 2 ml Lysepuffer (200 ml/L 1 M Tris-HCl pH 7,5; 250 ml/L 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA pH 8; 250 ml 1 M Natriumchlorid; 200 ml 12,5 % PVP-40; 100 ml/L 5,0 % SDS) wurden in eine „Universal Extraktion Bag“ von Bioreba gegeben. Mit einem Hammer wurde die Probe zerkleinert und im Tecan-Homogenisator homogenisiert. Der Extrakt wurde aus dem Beutel mittels Pipette abgenommen, in ein Reaktionsstube überführt und 2 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt.

Zu 200 µl Probe wurden 200 µl 3 M Guanidine thiocyanate hinzu pipettiert. 10 µl „F Beads“ (Analytik Jena, Jena, Deutschland) wurden zu jeder Probe gegeben und mittels Pipette resuspendiert. Mithilfe eines Magnettracks oder magnetischen Würfels wurden die Beads an der Seite des Reaktionsgefäßes gebunden, der Überstand abgenommen und verworfen. 500 µl Waschpuffer (10 ml/L 1 M Tris-HCl pH 7,5; 5 ml/L 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA pH 8; 50 ml/L Natriumchlorid; 500 ml/L 100 % Ethanol; 435 ml/L Wasser) wurden hinzugegeben und vermischt. Die Beads wurden wieder magnetisch gebunden und der Überstand verworfen. Die Reaktionsgefäße im Heizblock trockneten etwa 15 Minuten bei 56 °C, bis keine Flüssigkeit mehr vorhanden war und der Alkohol verdampfte. Die Beads wurden in 100 µl Wasser resuspendiert und 1 Minute inkubiert. Die Beads wurden erneut am Magneten gebunden und der Überstand, der die RNA enthielt, in ein neues Reaktionsstube überführt.

### 3.3.2 Durchführung der RT-LAMP

#### Probenverdünnung

Die Proben wurden laut Ausgangsprotokoll (siehe Anhang, 8.1) im Verhältnis 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Für die RNA-Extraktion und den Versuchen zur Ermittlung der optimalen Verdünnungsstufe wurden Proben auch im Verhältnis 1:20 oder gar nicht verdünnt. Als Kontrollen wurden zum einen eine positive Kontrolle (PK) aufbereitet und verwendet, um zu sehen, ob die Reaktion generell funktioniert. Zum anderen wurde auch eine negative, gesunde Probe (NK) und eine Wasserprobe (NTC, no template control) eingesetzt. Durch die Kontrollen wird sichergestellt, dass die Reagenzien wie angegeben funktionieren und keine Kontaminationen aufgetreten sind. Die Verdünnungsreihe zur Messung der Empfindlichkeit erfolgte in gesundem Holzmaterial.

#### Ansatz Mastermix

Für die Durchführung der LAMP wurden die Reagenzien des „Mast Isoplex Kit“ für GLRaV-1 (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland) verwendet. Die Reagenzien sollten generell bei -20 °C gelagert und maximal viermal aufgetaut und wieder eingefroren werden. Der Primermix wurde vor der Verwendung 5 Minuten im „Mixing Block MB-102“ (Bioer, Hangzhou, China) auf 95 °C erhitzt und im Anschluss 5 Minuten auf Eis zur Lösung der Primermultimere inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung des Mastermix wie folgt (siehe Tab. 3). Es kann mit einem Ansatz von 10 µl oder 25 µl gearbeitet werden (siehe Anhang 8.1). Nach Vorversuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit nur mit dem 10 µl Ansatz gearbeitet.

Tabelle 3: Komponenten des Mastermix für den Ansatz mit 10 µL (nach Mast Diagnostica GmbH)

<b>Reagenzien</b>	<b>10 µL (inkl. 2 µL Template)</b>
Reaktionsmix (RM)	5 µL
Primermix (PM)	0,8 µL
Fluoreszenz Day (FD)	1,0 µL
Bst Polymerase (Bst)	0,4 µL
Reverse Transkriptase (RT)	0,2 µL
Wasser	0,6 µL
<b>total</b>	<b>8,0 µL</b>

### Plattenbeladung

Je 8 µl Mastermix wurde in eine „LightCycler 480 Multiwell Plate 96“ in weiß (Roche, Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) oder in PCR-Tubes (Thermo Scientific, Waltham, USA; für den ESequant) pipettiert. Nun wurde 2 µl Probe in dreifacher Wiederholung zum Mastermix gegeben. Neben den Proben wurden auch in entsprechender Menge die Kontrollen aufgetragen. Als alle Proben aufgetragen wurden, wurde die Platte mit Folie verschlossen bzw. der Deckel der PCR-Tubes aufgelegt und diese kurz anzentrifugiert. Die Wellplatte wurde in den Lightcycler 480 (Roche, Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) gestellt, die PCR-Tubes in den ESequant TS2 (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

### Messbedingungen

Die LAMP lief unter folgenden Einstellungen ab: 60 Zyklen, je 1 Minute, 64 °C, Fluoreszenz von 465 nm – 510 nm. Im Lightcycler wurde zusätzlich am Ende eine Schmelzkurve von 66 °C bis 99 °C durchgeführt.

## Auswertung

Zur Ermittlung der Ergebnisse im Lightcycler wurde die vom Hersteller mitgelieferte Software „LightCycler Software 480“ (Release 1.5.1.62, Roche) und die darin enthaltene Analysemethode „Absolute Quantification / 2nd Derivative Max for All Samples“ verwendet. Bei dieser Methode wird die 2. Ableitung der gemessenen Fluoreszenzkurve berechnet und deren Maximalwert als CP-Wert ausgegeben. Der CP-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Demnach entspricht dieser Wert dem Übergang in die exponentielle Phase. Die Amplifikationskurven erstellt das Programm, ein Beispiel ist in Abbildung 4 gezeigt. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Zyklen bis 60 angegeben, auf der y-Achse ist die Höhe der Fluoreszenz aufgetragen. Eine Probe ist als positiv zu bewerten, wenn eine Amplifikationskurve der Fluoreszenz mit sigmoidem Anstieg innerhalb der ersten 30 Zyklen (= Grenzwert, ist als gestrichelte Linie gezeigt) zu verzeichnen ist, also der CP-Wert einem Wert kleiner als 30 Zyklen entspricht. Dies trifft in der Abbildung auf alle roten Kurven zu. Wenn kein Anstieg der Fluoreszenz vor dem Grenzwert gemessen wurde, ist die Probe negativ (grüne und schwarze Kurven).

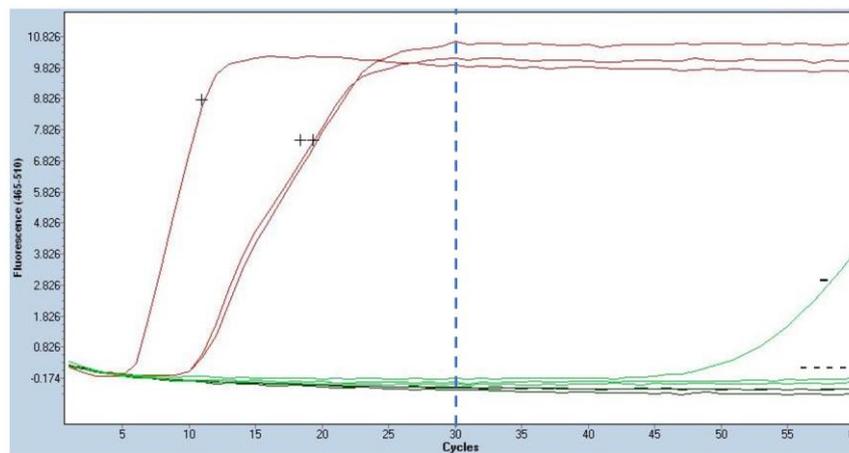


Abbildung 4: Beispielhafte Auswertung der Amplifikationskurven

Zusätzlich wurde eine Schmelzkurve erstellt. Anhand dieser Schmelzkurven ist zu erkennen, ob die Produkte einen gleichen Schmelzpunkt besitzen und die Reaktion demnach spezifisch ist. Dafür wurde die Methode „Melting Curve“ verwendet.

Wurde der Versuch mithilfe des ESEquants durchgeführt, wurde zur Ermittlung der Ergebnisse die mitgelieferte Software „TS2-Studio“ herangezogen. Die Diagramme können direkt aus dem Programm entnommen werden oder über die Rohdaten in Excel erstellt werden. Die Erstellung einer Schmelzkurve ist nicht möglich. CP-Werte werden ebenfalls nicht angezeigt, sodass die Auswertung nur visuell anhand der Diagramme erfolgen kann.

### Ergebnisdarstellung

Die Ergebnisse werden im Ergebnisteil als Amplifikationskurven sowie in tabellarischer Form dargestellt. Für die Tabelle, bei der die Resultate als „+“ (positiv) und „-“ (negativ) angegeben werden, wurden die Amplifikationskurven und beim Lightcycler zusätzlich die CP-Werte herangezogen und demnach eine Interpretation vollzogen. Für die Ergebnisdarstellung würde eine Abbildung der Amplifikationskurven ausreichen. Da es aber Fälle gibt, die sich nahe am Grenzbereich befinden oder viele Kurven nahezu aufeinander befinden, wird zusätzlich eine Tabelle aufgeführt. Außerdem ist es möglich, dass die Darstellung der Graphenfarben unzureichend ist oder eine Interpretation dieser für ungeübte Personen, die mit der LAMP weniger vertraut sind, schwierig ist. Die Tabelle soll die Ergebnisse nochmals deutlicher und verständlich machen. Da es bei einigen Versuchen darauf ankommt, dass Varianten eine Verbesserung der CP-Werte erzielen sollten, werden die drei CP-Werte ohne Interpretation mit „+“ und „-“ dargestellt.

### 3.4 DAS-ELISA (E)

Der DAS-ELISA für GLRaV-1 wurde anhand der Herstellervorschrift von Bioreba (Bioreba AG, Reinach, Schweiz) durchgeführt (Bioreba, 2017). Die benötigten Pufferlösungen (Beladungspuffer, Waschpuffer, Extraktionspuffer, Konjugatpuffer, Substratpuffer) wurden entsprechend der Vorschriften des Instituts für Rebenzüchtung hergestellt (siehe Anhang, 8.2) und bei 8 °C im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert. Die entsprechenden Antikörper stammten von Bioreba und sind hier zusammen mit den verwendeten Kontrollen aufgelistet:

- Serum: GLRaV-1 IgG, Artikelnummer 120115
- Konjugat: GLRaV-1 conjugate, Artikelnummer 120122
- Positive Kontrolle: Probe Nr. 13
- Negative Kontrolle: NK

Die Probennahme und –aufbereitung erfolgte anhand der dem Kit beiliegenden Produktinformation für Rebviren (Bioreba, 2018). Die Verdünnungsreihe in 10er-Schritten zur Messung der Empfindlichkeit erfolgte in gesundem, aufbereitetem Holzmaterial. Die Absorption, angegeben als optische Dichte (OD), erfolgte im Photometer „Dynatech Microplate Reader MR 5000“ (DynaTech, Rückersdorf, Deutschland) bei 405 nm. Die Auswertung erfolgte nach 30 Minuten Inkubationszeit mithilfe der Software EAP (ELISA Auswerteprogramm), die von Christoph Lorenz Consulting (Wiesbaden, Deutschland) speziell für das Institut für Rebenzüchtung programmiert wurde. Alle Proben sowie die positive und negative Kontrolle wurden als Duplikate bestimmt. Der Grenzwert, bei dem eine Probe als positiv zu beurteilen ist, entspricht dem 1,75-fachen Faktor des Mittelwerts der negativen Kontrolle und wird als „cut-off“ bezeichnet.

### 3.5 RT-PCR (P)

Zur Durchführung der RT-PCR sind folgende Schritte notwendig.

1. Extraktion: Für die RT-PCR wurden die Proben nach dem Protokoll von Gambino extrahiert, wie es bereits in 3.3.1.3 beschrieben wurde.

2. cDNA-Synthese: Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde die RNA auf eine Konzentration von 100 ng pro 8 µl in Wasser eingestellt. Die cDNA-Synthese wurde in 0,2 ml-Tubes auf Eis durchgeführt. Zu den 8 µl extrahierter RNA wurden 3 µl Random Nonamer (50 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzu pipettiert, nach vorsichtigem Resuspendieren und Anzentrifugieren wurde die Reaktion im Thermocycler (T3000, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde es auf Eis schnell abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Der Mastermix wurde aus den folgenden Komponenten hergestellt (Tab. 4). Die Reagenzien stammten alle bis auf DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) von Invitrogen (Carlsbad, USA).

Tabelle 4: Ansatz des Mastermix für die Umschreibung der RNA in cDNA

Reagenz	Volumen
5x First-Strand Buffer	4 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
DTT (0,1 M)	2 µL
RNaseOUT (40 units/µL)	1 µL
M-MLV RT (200 U)	1 µL
<b>Total</b>	<b>9 µL</b>

Zu jeder Probe wurden 9 µl Mastermix hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig angeschnickt und kurz anzentrifugiert. Bei 37 °C wurde er für 60 Minuten im Thermocycler inkubiert. Anschließend bei 4 °C hold belassen und bei längerer Lagerung wurde er bei -20 °C eingefroren.

3. Real-Time PCR (LightCycler PCR): Für die LightCycler-PCR wurde folgender Mastermix hergestellt (Tab. 5). Der SYBR Green Mastermix (ein Mix aus Taq-Polymerase, Puffer und Sybr Green) stammte von Roche, die Primer wurden aus dem Laborbestand übernommen (Tab. 6).

Tabelle 5: Mastermix für die RT-PCR mit SYBR-Green

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix	10 µL
Forward Primer	1,2 µL
Reverse Primer	1,2 µL
Wasser	4,6 µL
<b>Total</b>	<b>17 µL</b>

17 µl Mastermix wurde auf eine Lightcycler-Platte vorgelegt und 3 µl cDNA bzw. Wasser für die NTC hinzupipettiert. Die Platte wurde mit Folie verschlossen, kurz anzentrifugiert und in den Schlitten des Lightcyclers gestellt. Schließlich wurde das folgende Thermo-Programm laufen gelassen: 10 Minuten bei 95 °C (Initial Denaturing) und anschließend 45 Zyklen mit je 10 Sekunden bei 95 °C (Melting), 10 Sekunden bei 56 °C (Annealing) und 30 Sekunden bei 72 °C (Elongation). Die Fluoreszenz wurde während des Elongationsschrittes in einem Wellenlängenbereich von 465 bis 510 nm gemessen. Dies entspricht dem Emissionsbereich des Farbstoffs SYBR Green.

Als Kontrollen wurde neben der NTC eine positive Kontrolle und eine SAND-Kontrolle eingesetzt. Für letztere wurden sogenannte SAND-Primer verwendet, die auf das SAND-Gen der Rebe abzielen. Die SAND-Kontrolle wird verwendet, um sicherzustellen, dass die PCR generell funktioniert. Die Primer wurden aus dem Laborbestand übernommen und weisen die folgenden Nukleotidsequenzen in Tabelle 6 auf (Gambino & Gribaudo, 2006; Hildebrand, 2017; Reid et al., 2006).

Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer für die RT-PCR

Primer	Forward/ reverse Primer	Nukleotidsequenz	Größe des Produktes (bp)
<b>SAND</b>	forward	ACCCCTTTGCTCGGAGGAACAGA	129
	reverse	ACCTGAAGCTTGCCTTGTCGC	
<b>GLRaV-1</b>	forward	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	232
	reverse	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	

4. Ergebnisauswertung: Zur Auswertung der Ergebnisse wurden wie bei der RT-LAMP die ermittelten CP-Werte herangezogen. Dieser Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem eine signifikante Differenz zwischen dem Background und dem Fluoreszenzsignal der Probe gemessen werden kann. Zur Ermittlung wurde erneut die „LightCycler Software 480“ (Release 1.5.1.62, Roche) und Analysemethode „Absolute Quantification / 2nd Derivative Max for All Samples“ verwendet.

Um die Nachweisgrenze bei der RT-PCR herauszufinden, wurden drei verschiedene Proben in einer Verdünnungsreihe gemessen. Dafür wurden diese mit entsprechender Menge an bereits extrahiertem, gesundem Material in 10er-Schritten verdünnt. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze werden allgemein zwei Kriterien herangezogen. Zum einen muss sich der ermittelte CP-Wert idealerweise um eine Differenz von 3,32 von der vorherigen Verdünnungsstufe unterscheiden (Ginzinger, 2002). Dem ist so, da bei einer idealen Effizienz der PCR von 2 der Wert von  $2^{3,32}$  gleich 10 ist, also dem Verdünnungsfaktor entspricht.

Zum anderen muss sich der CP-Wert auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  (95 %) von der Nullkontrolle unterscheiden (Bustin et al., 2009). Die Nullkontrolle ist in diesem Versuch die NTC. Der p-Wert wurde anhand eines zweiseitigen Einstichproben-T-Tests mithilfe von Excel berechnet. Für den T-Test wurde zunächst der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung der Proben ( $s$ ) mithilfe der entsprechenden Excelfunktionen ermittelt. Des Weiteren wurde zur Berechnung die Standardabweichung der Nullkontrolle ( $\mu_l$ ) und die Anzahl der Messwerte ( $n=3$ ) benötigt. Diese Werte wurden in folgende Formel eingebaut:

$$t - Wert = \frac{x - \mu}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)}$$

Mithilfe der Excel-Funktion T.VERT.2S(t;y) wurde der p-Wert berechnet. Dabei entspricht „t“ dem t-Wert und „y“ der Anzahl an Freiheitsgraden (= n-1).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung und Optimierung des Protokolls

Ziel der Arbeit ist es ein LAMP-Protokoll zu entwickeln, mit dem eine zuverlässige Detektion von GLRaV-1-Viren möglich ist. Dazu wurde zunächst das Ausgangsprotokoll der Firma Mast Diagnostica GmbH angewandt, das aufgrund von Schwierigkeiten bei der Detektion an unterschiedlichen Stellen optimiert wurde. Das Ausgangsprotokoll sieht eine einfache Extraktion in Wasser (W) sowie eine Verdünnung des erhaltenen Extrakts vor (siehe Anhang, 8.1).

#### 4.1.1 Messung einer starken und schwachen ELISA-Probe

Zu Beginn wurde das Ausgangsprotokoll bei zwei Holzproben (Probe 1 und 2) angewandt, die zuvor im ELISA als positiv für GLRaV-1 ermittelt wurden. Es sollte überprüft werden, ob das Protokoll mit einer einfachen Extraktion in Wasser (W) und einer 1:10-Verdünnung für einen sicheren Virusnachweis funktioniert. Probe 1 zeigte im ELISA (vgl. Tab. 2) gegenüber der negativen Kontrolle einen hohen OD-Wert, sodass sie aufgrund des ebenfalls hohen Faktors von 11,952 als starke ELISA-Probe bezeichnet werden kann. Der niedrigere Faktor von 3,000 bei Probe 2 macht diese zur schwachen ELISA-Probe. Zusätzlich wurde dieser Versuch in einer dreifachen technischen Wiederholung durchgeführt, um die Zuverlässigkeit bzw. Testsicherheit des Ausgangsprotokolls zu ermitteln. Dafür wurde dasselbe Probenmaterial verwendet und dreimal in gleicher Weise aufbereitet. Die Messung erfolgte im Lightcycler.

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der ersten, Abbildung 6 die der zweiten und Abbildung 7 die der dritten technischen Wiederholung. Jeweils dargestellt sind in A: die Ergebnisse der Proben W1 und W2; in B: die Ergebnisse der Kontrollen PK, NK und NTC; in C: die Schmelzkurven und in D: die Zusammenfassung in tabellarischer Form inklusive der Zuordnung der Probenfarben. Bei den Amplifikationskurven wurde die Fluoreszenz (y-Achse) innerhalb der Zeit von 60 Minuten (x-Achse) gemessen, bei den Schmelzkurven sind auf den Achsen die Temperatur und das Differential der Fluoreszenz aufgeführt. Jede Probe sowie die Kontrollen wurden in Triplikaten aufgetragen. Als Kontrollen wurden wie in den folgenden Versuchen auch eine Positivkontrolle (PK), Negativkontrolle (NK) und

Wasserkontrolle (NTC) verwendet. Die Ergebnisse sind mit „+“ (positiv) und „-“ (negativ) in der Tabelle aufgeführt. Die Bewertung erfolgte anhand der Amplifikations-, Schmelzkurven sowie dem CP-Wert.

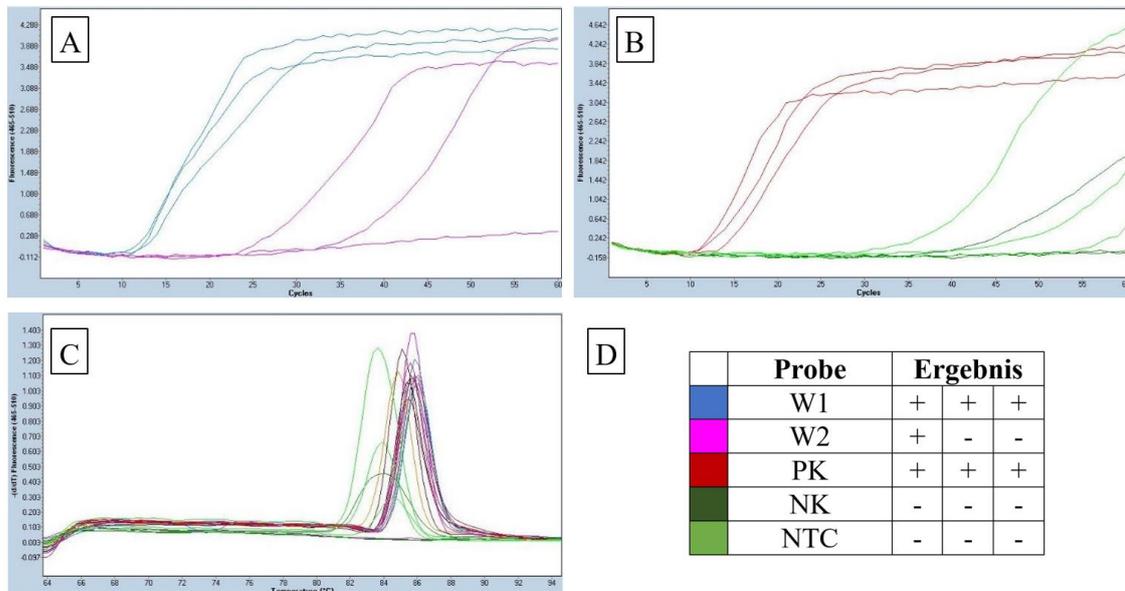


Abbildung 5: Erste technische Wiederholung der RT-LAMP bei einer starken und schwachen Probe. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion in Wasser); B: Holzextrakte der Kontrollen (W6), NK, NTC. C: Schmelzkurven aller Proben; D: Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; 1:10 verdünnt; Messung: mittels Lightcycler)

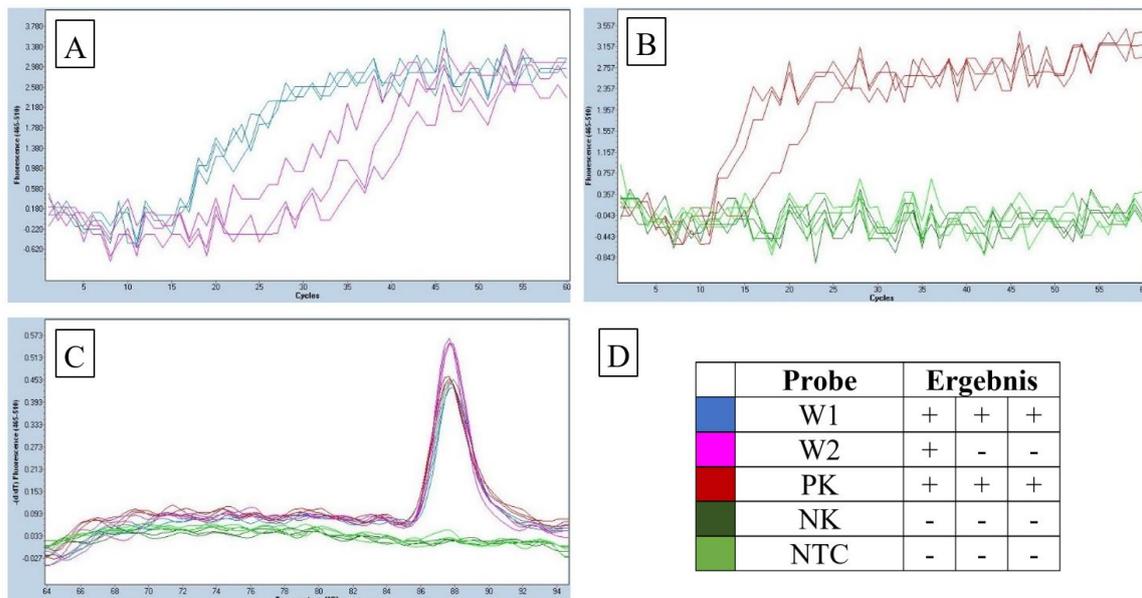


Abbildung 6: Zweite technische Wiederholung der RT-LAMP bei einer starken und schwachen Probe. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion in Wasser; 1:10 verdünnt); B: Holzextrakte der

Kontrollen PK (W6), NK, NTC. C: Schmelzkurven aller Proben; D: Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; 1:10 verdünnt; Messung: mittels Lightcycler)

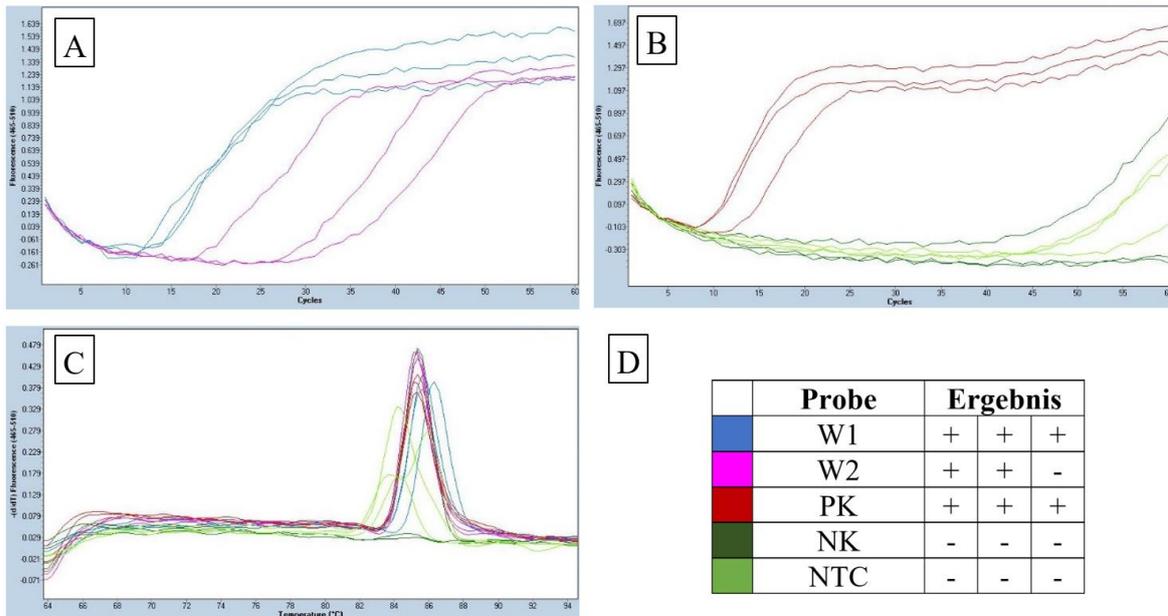


Abbildung 7: Dritte technische Wiederholung der RT-LAMP bei einer starken und schwachen Probe. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion in Wasser; 1:10 verdünnt); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC. C: Schmelzkurven aller Proben; D: Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; 1:10 verdünnt; Messung: mittels Lightcycler)

Anhand der Ergebnisse (Abb. 5-7) zeigt sich, dass die Probe W1 in allen Replikaten der drei technischen Wiederholungen positiv für GLRaV-1 ist. Sie zeigt zwischen 10 und 20 Zyklen einen sigmoiden Anstieg der Amplifikationskurven. Die Probe W2, also die schwache ELISA-Probe, konnte dagegen nur in 4 von 9 Replikaten als viruskrank nachgewiesen werden. Die Kurven steigen bei 4 Replikaten nach dem Grenzwert von 30 Zyklen an, in einem Fall ist kein Anstieg innerhalb von 60 Zyklen zu verzeichnen. Bei dieser Probe war, wie bei anderen schwachen Proben auch (hier nicht dargestellt), daher nur eine eingeschränkte oder keine zuverlässige Detektion möglich.

Die positiven Kontrollen (PK) sind wie W1 auch alle positiv. Teilweise steigen die Kurven der negativen Kontrollen ebenfalls an, aber alle nach dem Grenzwert. Der Schmelzpunkt, der anhand des Scheitelpunkts der Schmelzkurven in C ermittelt werden kann, liegt bei den Proben bei etwa 86 °C (Abb. 5 und 7) bzw. 88 °C (Abb. 6). Bei den Wiederholungen, bei denen die negativen Kontrollen einen Anstieg verzeichnen (1 und 3), sind die Schmelzpunkte etwa 2 °C geringer als die der Proben W1 und W2. Wenn kein Anstieg der

Fluoreszenz gemessen wurde, ist auch die Schmelzkurve linear und ohne Anstieg. Bei der zweiten Wiederholung ist noch zu erwähnen, dass das Programm des Lightcyclers keine CP-Werte gemessen hat und bei der Auswertung demnach nur die Amplifikations- und Schmelzkurven herangezogen werden konnten. Anhand dieser Kurven ist eine starke Streuung zu erkennen.

#### **4.1.2 Vergleich von verschiedenen Verdünnungsstufen**

Wie in den Abbildungen 5 bis 7 dargestellt, war GLRaV-1 in der schwachen ELISA-Probe nicht zuverlässig detektierbar. Die Ursache könnte in der gewählten Verdünnungsstufe von 1:10 gemäß dem Ausgangsprotokoll liegen. Diese Stufe wurde mit einer unverdünnten Variante und einer 1:20-verdünnten Variante verglichen, um zu überprüfen, ob für eine sichere Detektion schwächer oder stärker verdünnt werden muss. Unverdünnt bedeutet in diesem Fall, dass die Probe nach der Extraktion direkt, also ohne weitere Verdünnung mit Wasser, aufgetragen wurde.

Erneut wurde die Probe W2 in drei technischen Wiederholungen eingesetzt (Abb. 8-10). In A sind jeweils die Amplifikationskurven der Proben und in B die der Kontrollen zu sehen, die alle in Triplikaten aufgetragen wurden. Zusätzlich sind die Ergebnisse wieder in tabellarischer Form aufgeführt. Die Schmelzkurven waren ohne Auffälligkeiten und sind daher nicht abgebildet.

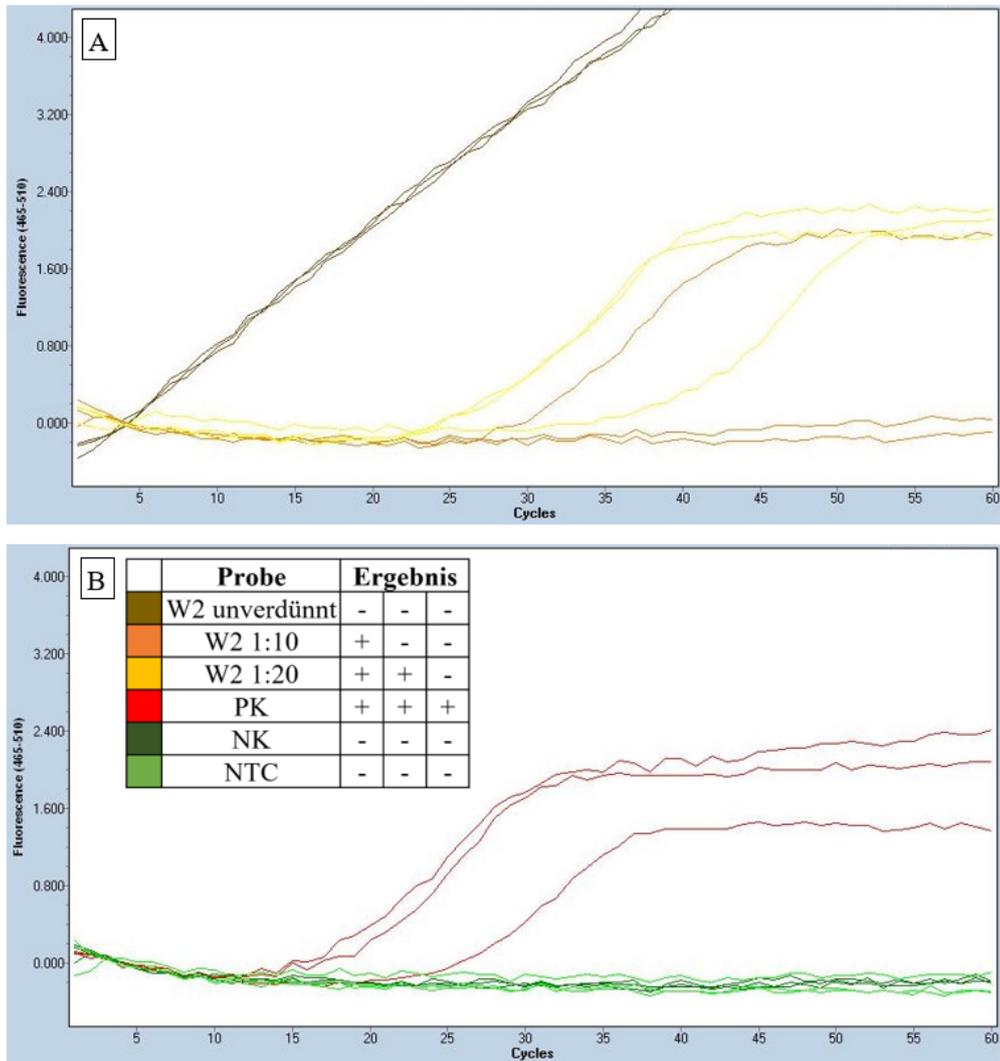


Abbildung 8: Erste technische Wiederholung mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von zwei Proben in der RT-LAMP. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion Wasser) in drei verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:20); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC und Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; Messung: mittels Lightcycler)

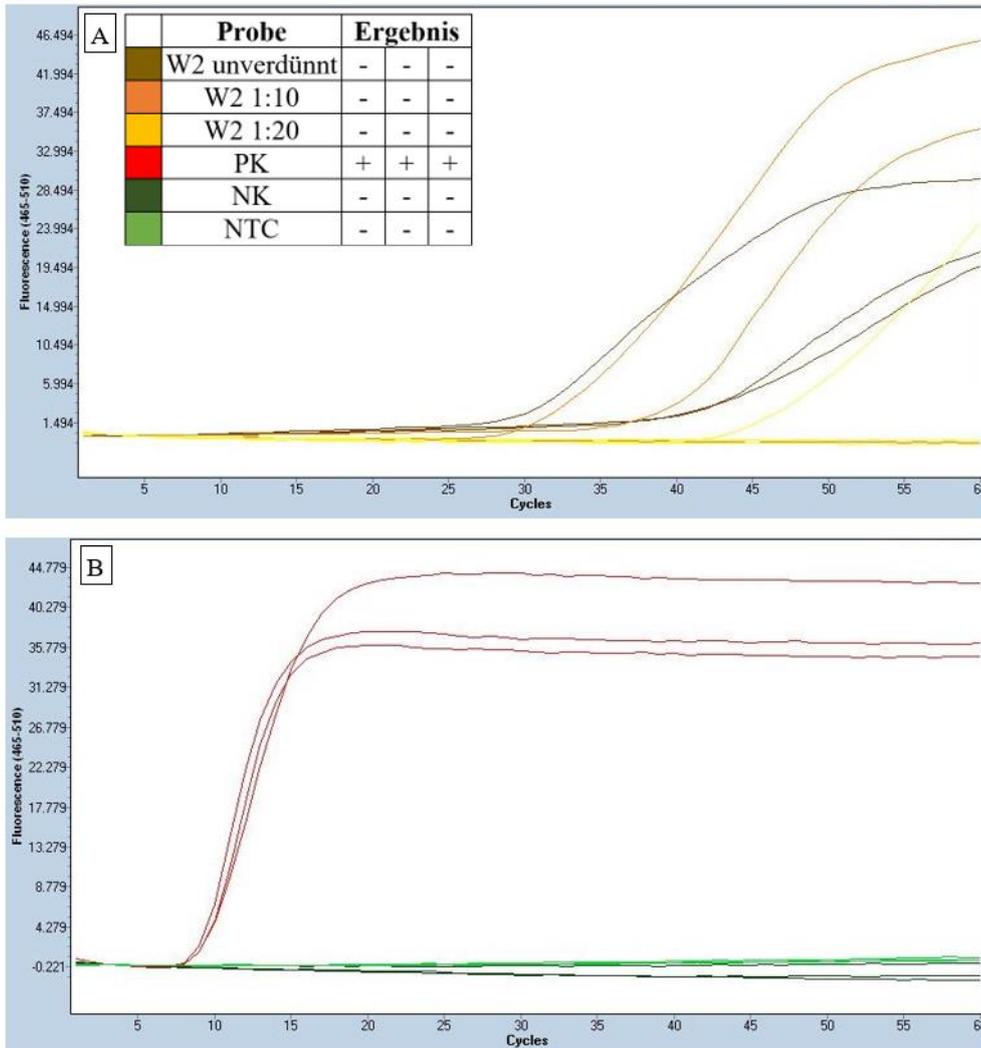


Abbildung 9: Zweite technische Wiederholung mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von zwei Proben in der RT-LAMP. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion Wasser) in drei verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:20); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC und Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; Messung: mittels Lightcycler)

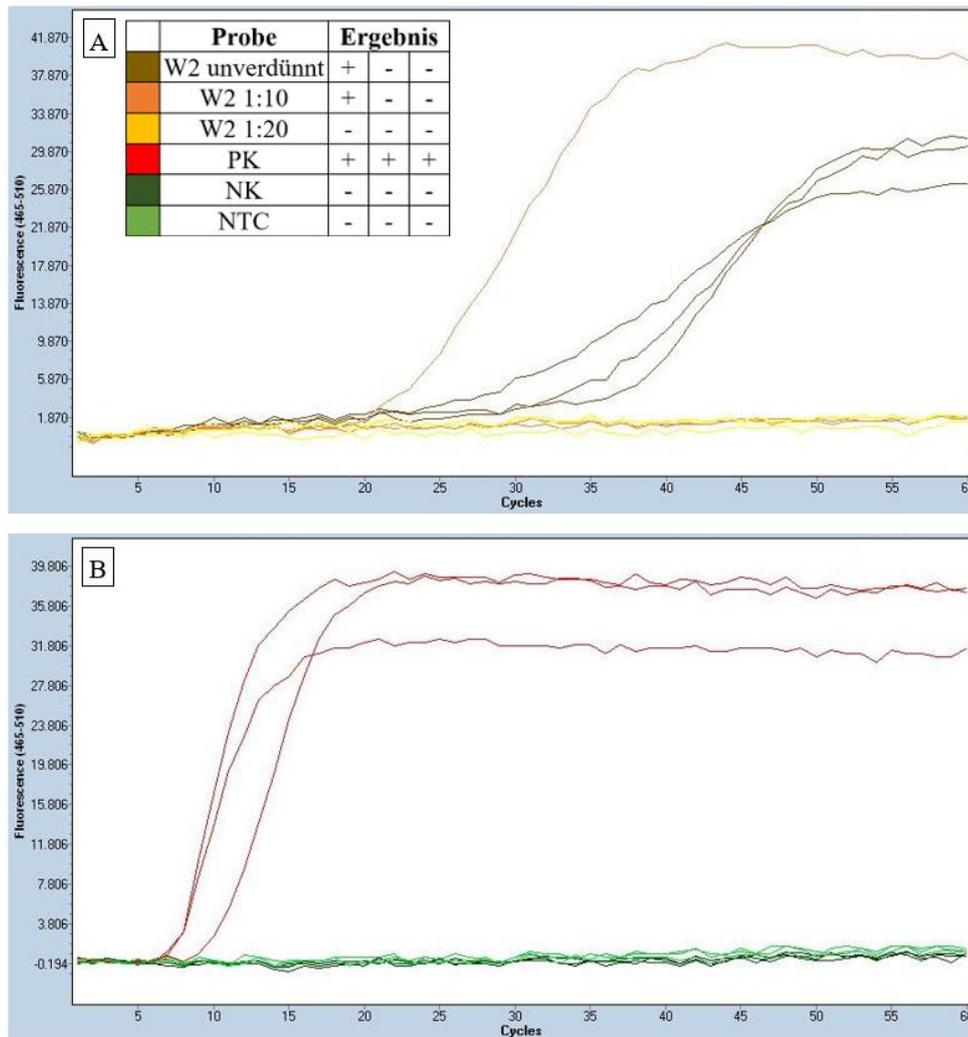


Abbildung 10: Dritte technische Wiederholung mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von zwei Proben in der RT-LAMP. A: Holzextrakte W1, W2 (W = Extraktion Wasser) in drei verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:20); B: Holzextrakte der Kontrollen PK (W6), NK, NTC und Ergebnisse in tabellarischer Form (n = 3; Messung: mittels Lightcycler)

Die PK, NK und NTC zeigen in allen Wiederholungen (Abb. 8-10) keine Auffälligkeiten. Bei der Schmelzkurve gab es ebenfalls keine Auffälligkeiten, weshalb sie hier nicht aufgeführt wurde. Anhand der Amplifikationskurven der Proben in A und den Ergebnissen in der Tabelle zeigt sich, dass die unverdünnte Probe bis auf ein Replikat keinen sigmoiden Anstieg der Fluoreszenz innerhalb von 30 Zyklen aufweist. Daher ist lediglich ein Replikat von insgesamt neun Replikaten positiv. Zusätzlich ist der Anstieg in der ersten technischen Wiederholung bei der unverdünnten Variante nicht sigmoid, sondern linear und steigt von Beginn an kontinuierlich an. Die restlichen Amplifikationskurven dieser Replikate steigen erst nach dem Grenzwert von 30 Zyklen an. Bei der Variante, die 1:10 verdünnt wurde,

konnten zwei Replikate erfolgreich nach fast 30 Zyklen detektiert werden. Bei der 1:20-Variante waren es ebenfalls zwei. Da bei der zweiten Wiederholung bis auf die PK keine Probe positiv ist, ist die Testsicherheit nicht gegeben und es musste weiterhin an der Optimierung des Protokolls gearbeitet werden. Keine Variante zeigt eine eindeutige und zuverlässige Detektion der Probe W2.

Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse probenspezifisch sind, wurde eine weitere, schwache Holzprobe in Wasser in den zuvor verwendeten Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:20) aufbereitet (Abb. 11). Die Amplifikationskurven der Probe sind im oberen Teil der Abbildung (A), die der Kontrollen unten zu finden (B). In B ist außerdem eine Tabelle mit den Resultaten der Triplikate aufgeführt.

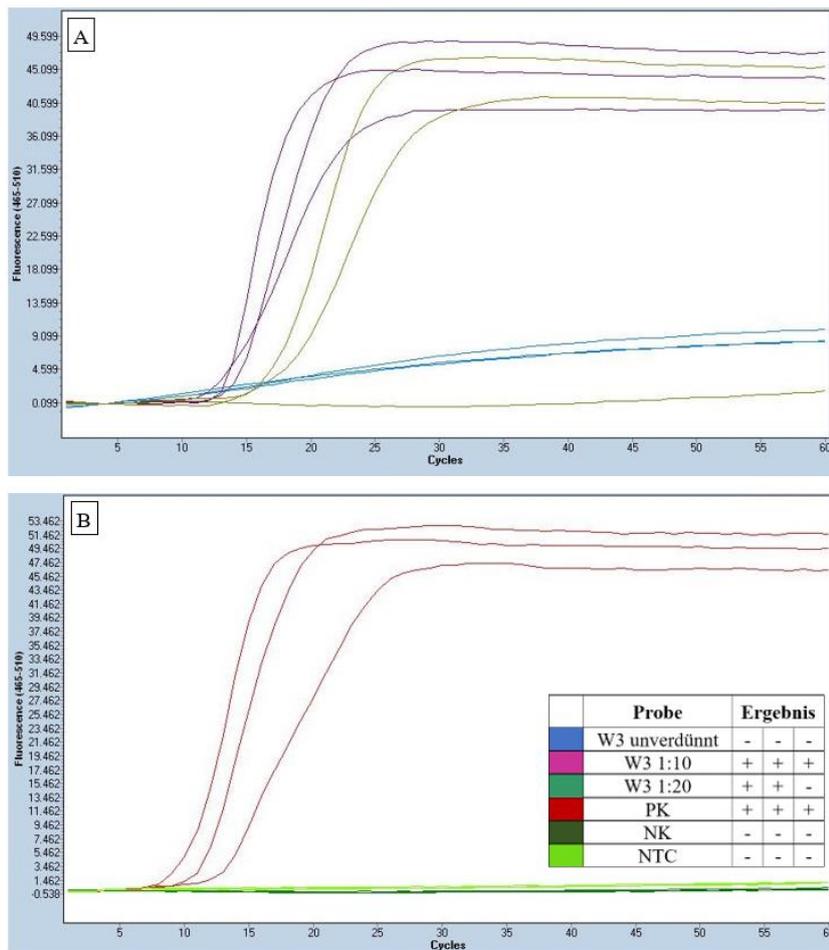


Abbildung 11: Vergleich von Verdünnungsstufen bei einer weiteren Holzprobe. A: RT-LAMP von Holzprobe W3 (W = einfache Extraktion in Wasser; unverdünnt, 1:10, 1:20). B: Amplifikationskurven der Kontrollen (PK = W6) und Ergebnisse als Tabelle (n = 3; Messung im Lightcycler)

Die unverdünnte Variante in Abbildung 11 zeigt einen linearen Anstieg der Fluoreszenz, ähnlich wie in Abbildung 8. Alle Replikate dieser Variante sind negativ. Die Triplikate von 1:10 konnten wie die PK alle als positiv detektiert werden. Zwei von drei Replikaten bei 1:20 zeigen einen sigmoiden Anstieg der Fluoreszenz und sind positiv. NK und NTC sind komplett negativ.

### **4.1.3 Vergleich der Extraktionsmethoden**

Bisher konnte bei den schwachen Proben 2 und 3 mithilfe der einfachen Extraktion in Wasser (W) keine zuverlässige GLRaV-1-Detektion durchgeführt werden. Ursache könnte die Extraktionsmethode und eventuell im Extrakt enthaltene hemmende Substanzen wie Phenole sein. Um diese abzufuffern bzw. abzubinden, wurden weitere Extraktionsmethoden angewandt und so an der Optimierung des Standardprotokolls gearbeitet.

#### **4.1.3.1 Extraktion mit PVP und Tris**

PVP und Tris sind laut Literatur in der Lage im Pflanzenextrakt enthaltene Hemmstoffe abzufuffern. Um zu überprüfen, ob die wenig zuverlässigen Ergebnisse durch enthaltene phenolische Verbindungen zustande kamen, wurde im Standardprotokoll das Wasser als Extraktionsmedium durch PVP- und Trislösungen (siehe 3.3.1.2) ersetzt. Nach Vorversuchen stellten sich eine 100 mM Trislösung sowie drei unterschiedlich konzentrierte PVP-Lösungen (3 %, 1,5 % und 0,25 %) als beste Varianten heraus. Diese wurden miteinander in der RT-LAMP verglichen. Die folgende Abbildung 12 zeigt diesen Versuchen anhand der starken Holzprobe W4. Es wurde lediglich je ein Replikat aufgetragen und die Messung erfolgte im ESequant. Es wird die Fluoreszenzintensität (RFU; y-Achse) über eine Zeitspanne von 60 Zyklen (x-Achse) gezeigt. Des Weiteren wurde eine PK und eine NTC als Kontrollen eingesetzt.

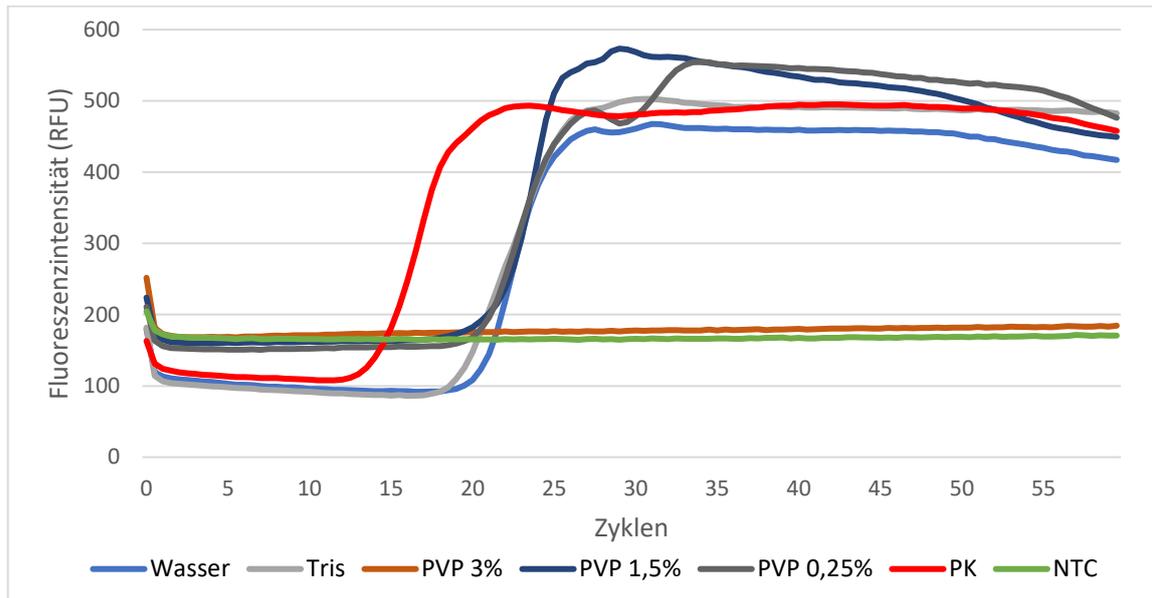


Abbildung 12: Einfluss von PVP und Tris auf die Virusdetektion in der RT-LAMP. Probe: Holzprobe W4 (W = einfache Extraktion in Wasser). Kontrollen: PK (W6) und NTC (n=1; 1:10 verdünnt; Messung im ESEquant)

Es konnte durch Extraktion in PVP und Tris keine Verbesserung der Detektion erzielt werden (Abb. 12). Alle Proben mit Ausnahme der Variante „PVP 3 %“ zeigen einen sigmoiden Anstieg der Fluoreszenz nach etwa 20 Zyklen. Die hohe Konzentration mit PVP konnte im Gegensatz zur Wasservariante nicht detektiert werden. Der Versuch wird hier exemplarisch für mehrere Versuche mit unterschiedlichen Proben dargestellt, die zu keiner Verbesserung der Ergebnisse führten.

#### **4.1.3.2 Extraktion mit magnetischen Beads**

Die einfache Extraktion in Wasser (W) wurde auch mit einer weiteren Extraktionsmethode verglichen: der Extraktion mit magnetischen Beads (B). Damit sollte der Frage nachgegangen werden, ob es möglich ist durch Reinigung der extrahierten Nukleinsäuren mittels Anhaftung an magnetische Beads, die Nachweisbarkeit in der RT-LAMP zu verbessern. Dadurch sollten Hemmstoffe aus dem Extrakt entfernt werden. Um dies zu überprüfen, wurden drei viruspositive Holzproben (1, 2 und 5) in Wasser (W) sowie mittels magnetischer Beads (B) extrahiert. Eingesetzt in der RT-LAMP und in verschiedenen Verdünnungsstufen konnten die folgenden CP-Werte in Tabelle 7 ermittelt werden. Für jede Variante wurden drei Replikate aufgetragen. Da die Proben nicht alle auf

einer Platte gemessen werden konnten, wurden für jede Platte eigene Kontrollen angelegt. NK und NTC waren in jedem Fall negativ, PK positiv (siehe Anhang, 8.3.1).

Tabelle 7: Virusdetektion mittels RT-LAMP aus Wasserextrakten (W) oder nach Beadextraktion (B), dargestellt als CP-Werte. Proben: Holzproben 1, 2, 5 (unverdünnt, 1:10, 1:20) (Messung: im Lightcycler; x = kein CP-Wert ermittelt)

Probe	Verdünnungsstufe	CP-Werte nach Wasserextraktion (W)			CP-Werte nach Beadextraktion (B)		
1	unverdünnt	10,33	10,85	13,76	14,41	14,54	16,27
	1:10	14,61	14,99	15,07	20,34	25,80	27,64
	1:20	11,55	14,55	14,99	29,57	30,45	x
2	unverdünnt	47,73	50,45	52,52	13,71	19,82	20,93
	1:10	28,66	x	x	15,65	26,34	35,45
	1:20	46,16	55,00	x	28,69	33,06	33,41
5	unverdünnt	20,49	23,52	24,61	17,12	17,92	29,82
	1:10	17,84	36,72	51,89	28,72	51,32	55,00
	1:20	18,76	23,95	32,73	15,26	50,51	x

Die CP-Werte der starken Probe W1 (Tab. 7) liegen in allen Replikaten, unabhängig von der Verdünnungsstufe, unterhalb von 15 Zyklen in einem ähnlichen Bereich und sind demnach positiv. Bei den Werten von B1 dagegen zeigt sich, dass mit steigender Verdünnung der Probe der Virusnachweis schlechter wird. Bis auf zwei Proben der 1:20-Variante liegen die CP-Werte von Probe B1 aber in allen Verdünnungsstufen noch vor dem Grenzwert von 30 Zyklen. Hinsichtlich der schwachen Probe W2 konnte lediglich in einem Replikat das Virus detektiert werden (1:10). Betrachtet man aber die Ergebnisse von B2 ist festzustellen, dass die unverdünnte Variante in allen drei Replikaten einen CP-Wert vor 30 Zyklen aufzeigt. Bei den anderen beiden Varianten gibt es ein bzw. zwei Replikate mit einem CP-Wert, der nach dem Grenzwert liegt. Bei der schwachen Probe W5 weisen alle drei Replikate der unverdünnten Variante von W5 einen CP-Wert unter 30 auf. Ein (1:10) bzw. zwei Replikate (1:20) der anderen Verdünnungsstufen liegen ebenfalls unter diesem Grenzbereich. Bei den Ergebnissen von B5 liegen die drei CP-Werte der unverdünnten Variante vor 30 Zyklen. Lediglich je ein Replikat der anderen beiden Varianten zeigt einen Anstieg der Fluoreszenz vor dem Grenzwert, der Rest kommt kurz vor 60 Zyklen oder gar nicht.

Zusammenfassend ist in Tabelle 7 ersichtlich, dass alle drei Proben detektiert werden konnten, wenn sie unverdünnt nach einer Beadextraktion gemessen wurden. Außer bei Probe 1 sind die CP-Werte bei unverdünnt geringer als bei der Wasserextraktion. Über alle

Proben hinweg erhöhen sich die Werte bei B mit der Verdünnung. Da Probe W2 in keiner Verdünnungsstufe sicher nachgewiesen werden konnte und die Variante „unverdünnt“ nach Beadextraktion CP-Werte unter dem Grenzwert von 30 Zyklen aufzeigt, kann die Nachweisbarkeit der RT-LAMP durch die Beadextraktion bestätigt werden. Dennoch zeigen die Triplets untereinander große Schwankungen auf. Wenn verdünnt wurde, sind die CP-Werte von Proben nach Wasserextraktion geringer als die nach Beadextraktion, mit Ausnahme von Probe 2. Demnach stellt sich die Frage, ob die RNA zu wenig stabilisiert wurde und mit einer RNA-Extraktion stabilere Ergebnisse erzielt werden könnten. Dies wurde im Folgenden untersucht.

#### 4.1.3.3 RNA-Extraktion

Um der Frage nachzugehen, ob die unzureichend stabile Nachweisbarkeit nach einer Wasserextraktion bei der RT-LAMP durch eine RNA-Extraktion (R) nach Gambino behoben werden kann, wurden die drei Holzproben 1, 2 und 5 nochmals extrahiert. Sowohl wie bisher mittels einfacher Extraktion in Wasser (W) und parallel mittels Gambino-RNA-Extraktion (R). Es wurden erneut drei unterschiedliche Verdünnungsstufen eingesetzt, um die optimale Stufe zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Erneut sind die Kontrollen, die keine Auffälligkeiten zeigen, lediglich im Anhang (8.3.2) aufgeführt.

Tabelle 8: Virusdetektion mittels RT-LAMP aus Wasserextrakten (W) oder nach RNA-Extraktion nach Gambino (R), dargestellt als CP-Werte. Proben: Holzproben 1, 2 und 5 (unverdünnt, 1:10, 1:20) mit n=3 (Messung: im Lightcycler; x = kein CP-Wert ermittelt)

Probe	Verdünnungsstufe	CP-Werte nach Wasserextraktion (W)			CP-Werte nach RNA-Extraktion Gambino (R)		
1	unverdünnt	14,69	17,23	18,81	6,75	7,22	7,80
	1:10	11,18	13,71	19,64	9,52	10,23	11,59
	1:20	9,23	14,45	14,60	8,28	8,89	12,81
2	unverdünnt	30,68	41,38	42,57	7,86	7,96	10,33
	1:10	30,74	41,13	x	10,74	10,81	14,16
	1:20	44,24	x	x	11,87	14,05	14,71
5	unverdünnt	16,77	17,66	24,78	15,53	15,73	17,37
	1:10	23,41	34,69	39,47	15,12	15,50	17,57
	1:20	20,59	42,08	46,60	13,76	16,02	17,47

Deutlich erkennbar bei Betrachtung von Tabelle 8 ist eine frühere Virus-Detektion nach RNA-Extraktion im Vergleich zur Extraktion in Wasser. Bei der starken Probe W1 kann

unabhängig der Verdünnungsstufe bei allen Varianten ein CP-Wert zwischen 9,23 und 19,64 Zyklen gemessen werden. Die CP-Werte von R1 liegen dagegen niedriger und zwar zwischen 6,75 und 12,81 Zyklen. Bei Betrachtung der schwachen Probe 2 fällt auf, dass bei Wasserextraktion die Detektion nicht möglich war. Ab einer Verdünnung von 1:10 ließ zudem die Reproduzierbarkeit der Replikate zunehmend nach. Dahingegen liegen die CP-Werte bei allen Stufen von R2 bei maximal 15 Zyklen. Die Werte liegen dabei dicht zusammen. Alle Replikate der schwachen Probe W5 unverdünnt, zwei von der 1:10-Variante und eins der 1:20-Variante zeigen einen CP unter 30. Der Rest liegt darüber. Alle Replikate von R5 können einen CP-Wert unter dem Grenzwert von 30 Zyklen aufweisen, die Messwerte liegen zwischen 13,76 und 17,57 Zyklen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Proben nach einer RNA-Extraktion bei allen drei Proben früher als die der einfachen Wasserextraktion detektiert werden konnten. Alle Proben, auch Probe 2, die zuvor Schwierigkeiten bei der Detektion zeigte, konnten mithilfe der RNA-Extraktion problemlos in allen Replikaten als positiv bestimmt werden und zeigen keine großen Streuungen der CP-Werte auf. Die RNA-Extraktion führte wie bereits erwähnt zu einem deutlich früheren Nachweis und bei stärkerer Verdünnung der Probe gab es zunächst nur eine geringfügige Verschiebung des CP-Wertes. Bei Proben nach Wasserextraktion ist ein solcher Trend nicht festzumachen. Daher sind die niedrigsten CP-Werte (und damit auch besten Ergebnisse) bei den unverdünnten Varianten nach RNA-Extraktion vorzufinden. Eine zuverlässige Detektion von GLRaV-1 war mittels RT-LAMP aus Extrakten nach Gambino deutlich zuverlässiger möglich.

## **4.2 Vergleich von frischen und eingefrorenen Proben**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein Vergleich von frischem und eingefrorenem Material gefahren, um die Lagerfähigkeit der Proben zu ermitteln. Dazu wurde Holz- und Blattmaterial von drei GLRaV-1 positiven Proben von Topfreben (Probe 3, 4 und 6) genommen und nach einfacher Extraktion in Wasser (4.2.1) und RNA-Extraktion (4.2.2) gemessen. Aufgrund der Vortests wurden die mit einfacher Wasserextraktion hergestellten Proben 1:10 verdünnt, die mit RNA-Extraktion dagegen unverdünnt aufbereitet. Das Probenmaterial wurde frisch (= frisch) und nachdem es etwa ein halbes Jahr bei -20 °C gelagert wurde (= eingefroren) gemessen. Zusätzlich wurde auch der Extrakt der frischen Probe eingefroren und nach einem halben Jahr gemessen (= eingefrorener Extrakt). Die Ergebnisse werden miteinander verglichen, um herauszufinden, welches Material sich am besten für eine zuverlässige Detektion von GLRaV-1 mittels RT-LAMP eignet.

### **4.2.1 Vergleich frischer und eingefrorener Proben nach einfacher Wasserextraktion**

Zunächst wird der Vergleich der frischen und eingefrorenen Holz- und Blattproben anhand einer Aufbereitung durch die Wasserextraktion und der starken Probe 3 gezeigt. Diese Probe konnte beim Vergleich der Verdünnungsstufen bereits erfolgreich nach Wasserextraktion detektiert werden (Abb. 11). W3 wurde hier in zweifacher biologischer sowie zweifacher technischer Wiederholung gemessen, um erneut die Testsicherheit zu überprüfen. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Varianten (frisch, eingefroren und eingefrorener Extrakt) als CP-Werte aufgeführt. Die Kontrollen waren unauffällig und sind deshalb nur im Anhang (8.3.3) aufgeführt.

Tabelle 9: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben. Probe: W3 (W = Wasserextraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt, gemessen als CP-Wert in Zyklen. Je Variante: zwei biologische und zwei technische Wiederholungen (n=3; 1:10 verdünnt; Messung im Lightcycler; x = kein CP-Wert gemessen)

Material	Biologische Wiederholung	Technische Wiederholung	CP-Werte der Holzproben			CP-Werte der Blattproben		
frisch	A	a	14,60	15,13	15,96	19,68	20,17	49,55
		b	13,85	13,88	15,40	18,91	20,77	25,68
	B	a	12,89	13,29	15,76	16,84	21,09	21,86
		b	14,79	17,98	24,05	14,62	20,00	35,71
eingefroren	A	a	10,37	14,56	16,85	x	x	x
		b	13,34	13,36	15,25	x	x	x
	B	a	12,19	16,38	x	29,80	x	x
		b	17,21	17,82	26,49	45,21	46,52	x
eingefrorener Extrakt	A	a	14,75	15,36	15,52	10,56	12,19	13,13
		b	13,50	16,45	17,15	11,50	14,56	15,40
	B	a	13,13	13,61	14,78	9,76	10,20	10,56
		b	9,07	13,23	13,48	12,19	13,23	13,56

Bei Betrachtung der Ergebnisse von Probe W3 zeigen sich sowohl Unterschiede hinsichtlich des Materials als auch zwischen Holz- und Blattproben (Tab. 9). Während die frische Holzprobe in allen Replikaten der Wiederholungen einen CP-Wert unter dem Grenzwert von 30 Zyklen aufzeigt, liegen bei den Blattproben zwei der zwölf Replikate darüber. Dieser Unterschied, dass Holzproben geringere CP-Werte aufzeigen als die Blattproben, ist bei der eingefrorenen Variante noch deutlicher: im Holz konnte GLRaV-1 bis auf eine Ausnahme in allen Replikaten detektiert werden, im Blatt dagegen lediglich einmal. Wurde der eingefrorene Extrakt gemessen, war eine Detektion sowohl von Holz- als auch als Blattextrakt möglich. Die niedrigsten CP-Werte und damit auch die beste Detektion konnten bei W3 erzielt werden, wenn Holzproben frisch oder als eingefrorener Extrakt detektiert wurden. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass an den Amplifikationskurven der eingefrorenen Blattproben (hier nicht gezeigt) auffällig ist, dass diese in einer Art „Zickzack“-Muster verlaufen, also die Werte streuen.

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede auch bei anderen Proben bestätigt werden können, wurden zwei weitere Proben (4 und 6) ebenfalls in den drei Varianten (frisch, eingefroren

und eingefrorener Extrakt) aufbereitet. Bei Probe 4 wurde beim Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden das Virus bereits erfolgreich nachgewiesen (Abb. 12). Probe 6 wurde bisher noch nicht verwendet. Der Aufbau des Versuchs ist gleich, nur wurden hier keine Wiederholungen durchgeführt. Die CP-Werte der entsprechenden Holz- und Blattproben sind in Tabelle 10 gezeigt. Da die Kontrollen ohne Auffälligkeiten waren, sind diese nur im Anhang aufgeführt (siehe 8.3.4).

Tabelle 10: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben, gemessen als CP-Wert in Zyklen. Proben: W4 und W6 (W = Wasserextraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt (n=3; 1:10 verdünnt; Messung im Lightcycler; x = kein CP-Wert)

Probe	Material	CP-Werte der Holzproben			CP-Werte der Blattproben		
W4	frisch	25,46	43,80	x	23,34	23,89	25,80
	eingefroren	55,00	x	x	x	x	x
	eingefrorener Extrakt	25,98	35,45	36,11	x	x	x
W6	frisch	16,33	27,03	27,64	11,05	11,53	12,19
	eingefroren	25,15	37,80	38,03	x	x	x
	eingefrorener Extrakt	17,19	25,80	25,89	10,32	10,60	11,54

Auch hier zeigen sich Unterschiede zwischen den Varianten (Tab. 10). GLRaV-1 konnte bei W4 lediglich in der frischen Blattprobe sicher detektiert werden, bei den beiden eingefrorenen Varianten wurden keine CP-Werte gemessen. Bei den Holzproben liegen die CP-Werte lediglich bei einem frischen Replikat und einem der Variante „eingefrorener Extrakt“ unter dem Grenzwert von 30 Zyklen. Bei W6 dagegen weisen nur die eingefrorenen Holz- und Blattproben keine oder CP-Werte über dem Grenzwert auf. Frisches Holz- und Blattmaterial sowie der eingefrorene Extrakt davon konnten sicher detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich über die Messung der verschiedenen, mittels einfacher Wasserextraktion aufbereiteten Varianten sagen, dass mit frischen Proben, sowohl bei Holz- als auch bei Blattproben, eine zuverlässige Detektion von GLRaV-1 möglich war. Lediglich Probe W4 als Holzprobe zeigte Detektionsprobleme. Die Variante, bei der der Probenextrakt eingefroren wurde, zeigte bei W3 (Holz und Blatt) und W6 (Holz) einen positiven Nachweis und ist demnach die zweitbeste Variante. Die meisten negativen

Ergebnisse konnten beim eingefrorenen Blatt- und Holzmaterial gemessen werden. Mit dieser Variante konnte GLRaV-1 lediglich bei W3 als Holz nachgewiesen werden. Generell konnten in Holzproben mehr positive Ergebnisse erzielt werden.

#### 4.2.2 Vergleich frischer und eingefrorener Proben nach RNA-Extraktion

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede hinsichtlich der Extraktionsmethode bei den verwendeten Varianten gibt, wurde der gleiche Versuch mit einer RNA-Extraktion bei den Proben 3, 4 und 6 gefahren. Die drei Varianten (frisch, eingefrorener Extrakt und eingefrorenes Probenmaterial) wurden als Holz- und Blattproben sowie nach der Extraktion unverdünnt gemessen. Es wurde im Gegensatz zu 4.2.1 keine technische Wiederholung, sondern nur zwei biologische Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse als CP-Werte sind in Tabelle 11 abgebildet. Die Kontrollen werden aufgrund der Tatsache, dass keine Auffälligkeiten vorhanden sind, nur im Anhang (8.3.5) gezeigt.

Tabelle 11: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben. Probe: R3 (R = RNA-Extraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt, zweifache biologische Wiederholung (n=3; nicht verdünnt; Messung im Lightcycler)

Material	Biologische Wiederholung	CP-Werte der Holzproben			CP-Werte der Blattproben		
frisch	A	6,36	8,32	8,34	15,07	16,62	16,89
	B	5,00	6,00	7,13	17,02	19,56	23,41
eingefroren	A	6,45	9,91	16,15	5,00	7,53	7,72
	B	6,69	9,65	10,69	6,97	7,18	8,68
eingefrorener Extrakt	A	8,14	8,67	9,05	6,00	6,00	6,00
	B	9,19	9,22	10,95	7,29	8,04	8,66

Unabhängig davon, welche Variante der Holz- und Blattproben getestet wurde, war eine sehr gute, reproduzierbare Detektion von GLRaV-1 möglich (Tab. 11). Die Werte liegen alle in einem ähnlichen Bereich zwischen 5 und 11 Zyklen. Interessanterweise wurde die frische Blattprobe im Vergleich zu den eingefrorenen Varianten etwas später detektiert. Gegenüber der einfachen Wasserextraktion (Tab. 9) sind die CP-Werte nach RNA-

Extraktion damit über alle Varianten geringer und konnten dadurch früher detektiert werden.

Um auch bei den RNA-extrahierten Proben sicherzustellen, dass die Ergebnisse nicht probenabhängig sind, wurden auch Probe 4 und 6 in den drei Varianten in der RT-LAMP gemessen. Die Ergebnisse als CP-Werte sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Kontrollen waren hier ebenfalls unauffällig und werden im Anhang aufgeführt (Anhang 8.3.6).

Tabelle 12: Vergleich von frischen und eingefrorenen Blatt- und Holzproben. Proben: R4 und R6 (R = RNA-Extraktion) als frische, eingefrorene Probe und eingefrorener Extrakt (n=3; nicht verdünnt; Messung im Lightcycler)

Probe	Material	CP-Werte der Holzproben			CP-Werte der Blattproben		
R4	frisch	5,00	5,00	5,00	10,38	10,50	17,21
	eingefroren	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	eingefrorener Extrakt	5,00	5,00	5,23	5,51	5,67	6,83
R6	frisch	6,21	6,45	6,55	14,93	15,29	15,36
	eingefroren	6,90	7,10	7,48	8,41	9,51	9,70
	eingefrorener Extrakt	6,79	7,01	7,23	6,09	6,78	7,21

Auch bei den Proben R4 und R6 war eine sichere Detektion von GLRaV-1 in allen Varianten der Holz- und Blattmaterials möglich (Tab. 12). Die höchsten CP-Werte wurden auch hier bei der frischen Blattprobe gemessen, alle anderen liegen zwischen 5 und 10 Zyklen. Zusammenfassend konnte eine sichere Detektion von RNA-extrahierten Proben, unabhängig davon ob frische, eingefrorene oder der eingefrorene Extrakt der Holz- oder Blattproben verwendet wurden, erreicht werden, anders als bei der Wasserextraktion. Da bei 4.2.1 keine problemlose, zuverlässige Detektion in allen Varianten möglich war, sind erneut Unterschiede zwischen den Extraktionsmethoden festzumachen.

## 4.3 Validierung

Hinsichtlich der Validierung der RT-LAMP wurde die Spezifität der GLRaV-1-LAMP-Primer und die Empfindlichkeit der Methode im Vergleich zu DAS-ELISA und RT-PCR untersucht. Dadurch soll bezogen auf das Ziel der Arbeit ermittelt werden, ob die Ergebnisse und die Detektion mittels der RT-LAMP zuverlässig, spezifisch, empfindlich und wiederholbar sind.

### 4.3.1 Primerspezifität

Die im Kit der Firma Mast Diagnostica GmbH enthaltenen Primer wurden speziell für die Detektion von GLRaV-1 entwickelt. Zur Überprüfung der Primerspezifität ausschließlich für GLRaV-1 wurden Proben eingesetzt, die mit verschiedenen Viren infiziert waren. Die gewählten Proben wurden beim vorherigen ELISA-Test auf die folgenden Viren positiv getestet (vgl. Tab. 2):

- Probe 2: GLRaV-1, -2, -3, GFkV, GVB
- Probe 5: GLRaV-1, -2, GVB
- Probe 7: GLRaV-1
- Probe 8: GLRaV-3, GVA, GVB
- Probe 9: GLRaV-2
- Probe 10: ArMV, GFkV
- Probe 11: GFLV

Nach den ELISA-Ergebnissen waren die Proben 2 und 5 neben GLRaV-1 zusätzlich mit weiteren Rebviren infiziert, Probe 7 trug nachweisbar nur Viren von GLRaV-1 in sich. Um Kreuzreaktionen mit anderen Virusarten auszuschließen, wurden die Proben 8-11 getestet, die mit anderen Rebviren infiziert waren. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der RT-LAMP-Analyse der laut ELISA unterschiedlich infizierten Proben (Holzproben, nach RNA-Extraktion). Die Abbildung ist folgendermaßen unterteilt: die obere Abbildung zeigt die Amplifikationskurven der Proben R2, R5 und R7; die untere die von R8 bis R11 sowie die Ergebnisse als Tabelle. Die Kontrollen sind im Anhang aufgeführt (8.3.7).

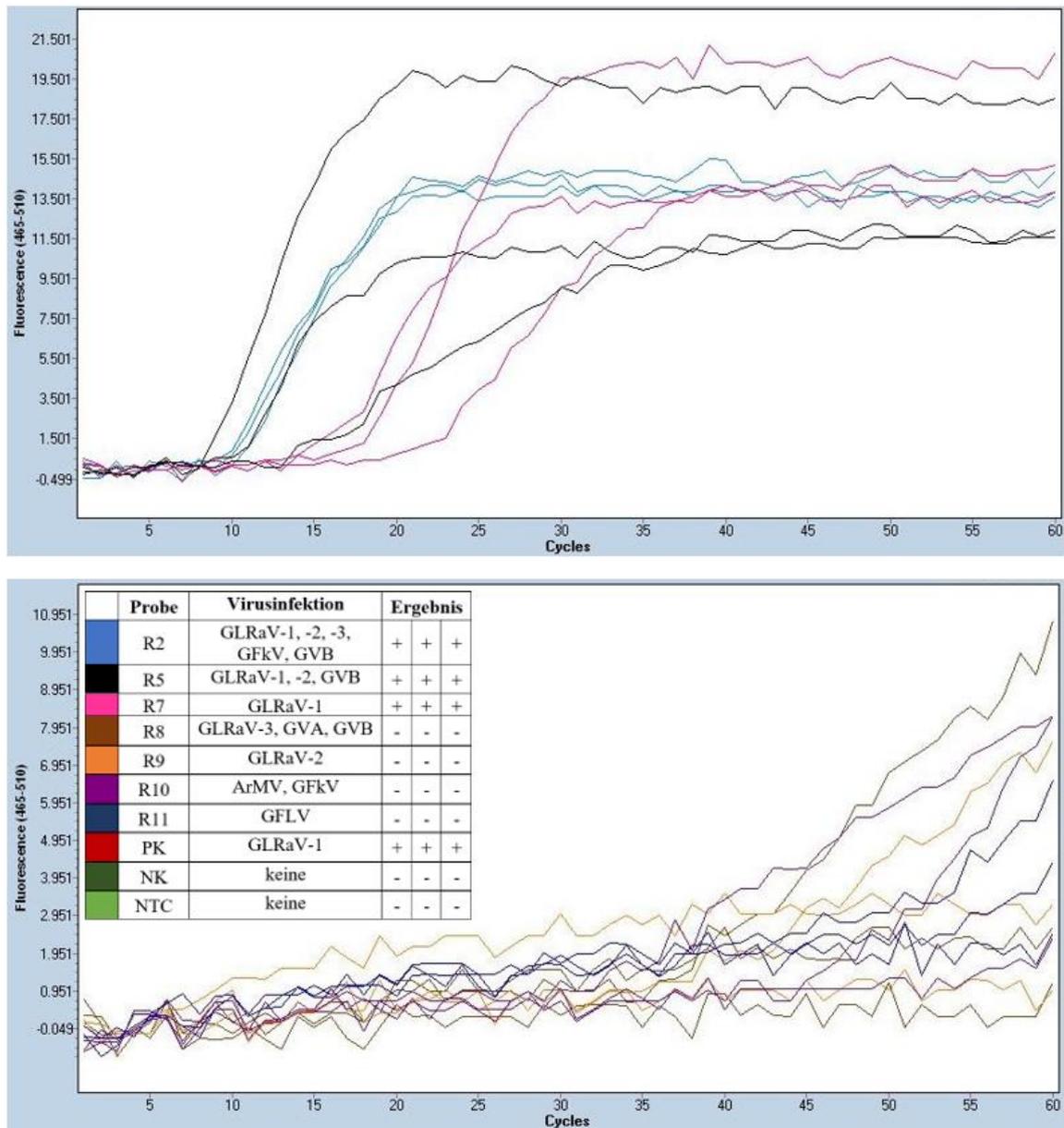


Abbildung 13: Überprüfung der Primerspezifität (GLRaV-1) mit Holzproben in der RT-LAMP. Oben: R2, R5, R7. Unten: Proben R8, R9, R10, R11 (R = RNA-Extraktion) und die Ergebnisse von GLRaV-1 als Tabelle. Kontrollen: PK (R3), NK, NTC (Messung im Lightcycler; n=3)

Die Proben R2, R5 und R7 können in allen Replikaten als positiv gewertet werden (Abb. 13). Die Proben R8, R9, R10 und R11 dagegen sind wie erwartet in allen Replikaten negativ. Die Darstellung ist etwas größer, da die y-Achse vom Programm nur bis zu einer Fluoreszenz von 10,951 gezeigt wird. Demnach wirkt der Anstieg verhältnismäßig zur oberen Abbildung größer. Anhand der Abbildung kann also die spezifische Detektion von GLRaV-1 mittels des Primers der Firma Mast Diagnostica GmbH bestätigt werden.

### **4.3.2 Sensitivität**

Um die Sensitivität der RT-LAMP zur Detektion von GLRaV-1 zu bestimmen, wurden zwei unterschiedliche Versuche durchgeführt. Im ersten Versuchsansatz wurde eine GLRaV-1 positive Holzprobe mit einer unterschiedlichen Anzahl verschiedener gesunder Holzproben gemischt (Mischprobe). In diesem Ansatz sollte ermittelt werden, bis zu welcher Anzahl an gesunden Proben in einer Mischprobe das Virus noch mittels RT-LAMP detektiert werden kann. Im zweiten Versuchsansatz wurde der RNA-Extrakt einer stark positiven Probe in einer Verdünnungsreihe in gesundem Holzextrakt verdünnt, um festzustellen, bei welcher Verdünnungsstufe die RT-LAMP GLRaV-1 noch nachgewiesen werden kann.

#### **4.3.2.1 Virusdetektion in Mischproben**

Tabelle 13 beinhaltet die Ergebnisse der im ELISA als stark positiv für GLRaV-1 infizierte Holzproben R12, R13 und R14 in gesundem Holzmaterial. Für das gesunde Material wurde die NK verwendet (vgl. Tab. 2). Das mit GLRaV-1 infizierte Holz wurde in unterschiedlichen Anteilen mit virusfreiem Holz vermischt (z. B. 1+14 = 1 Stück krank in 14 gesunden Stücken) und 0,5 g aus allen Holzstücken zu gleichen Teilen eingewogen. Von jeder Probe wurden zwei biologische Wiederholungen (außer bei den Kontrollen) durchgeführt, in Triplikaten aufgetragen und im Lightcycler gemessen. Als Kontrollen wurden eine positive, eine negative Kontrolle und eine NTC für jede Testreihe (R13 wurde einzeln, R14 und R15 zusammen gemessen) verwendet, die im Anhang (8.3.8) aufgeführt sind. Alle PK sind im Gegensatz zu den negativen Kontrollen positiv und daher wurde auf die Aufführung aller Kontroll-Replikate in Tabelle 13 verzichtet.

Tabelle 13: Virusdetektion in Mischproben mittels RT-LAMP. Holzproben: stark virusbelastete Proben R12, R13, R14 (R = RNA-Extraktion); gemischt in der gesunden Holzprobe (NK) zu unterschiedlichen Anteilen (unverdünnt, 1+2, 1+4, 1+6, 1+9, 1+14). Pro Variante: je zwei biologische Wiederholungen. Kontrollen: PK (R6), NK, NTC (x = nicht gemessen, + = positiv, - = negativ; Messung im Lightcycler, n=3)

Probe	Biologische Wiederholung	Pooling					
		1	1+2	1+4	1+6	1+9	1+14
R12	1	+++	+++	+++	+++	+++	---
	2	+++	+-	+++	+-	+-	---
R13	1	+++	+++	+++	---	---	---
	2	+++	+++	+++	---	---	---
R14	1	+++	+++	---	---	---	---
	2	+++	+-	---	---	---	---
PK	1	+++	x	x	x	x	x
NK	1	---	x	x	x	x	x
NTC	1	---	x	x	x	x	x

Im Versuch (Tab. 13) zeigen sich Unterschiede zwischen den Proben und in den biologischen Wiederholungen. In der ersten Wiederholung kann Probe R12, die im ELISA mit einem Faktor von etwa 17 stark positiv war, bis zur Variante 1+9 als positiv angesehen werden. In der zweiten Wiederholung liegt das letzte sichere Signal bei 1+4. Probe R13 (Faktor im ELISA: ca. 11) ist in beiden Wiederholungen bis zur Variante 1+4 positiv. Drei positive Replikate konnten bei R14, die den höchsten Faktor im ELISA hatte (ca. 24), letztmals bei 1+2 in der ersten Wiederholung gemessen werden. In der zweiten biologischen Wiederholung dagegen sind die Triplikate bei R14 nur bei der nicht gemischten Probe positiv. Mischproben ermöglichen demnach nicht bei allen Proben eine sichere Detektion.

#### 4.3.2.2 Vergleich der Sensitivität von DAS-ELISA, RT-LAMP und RT-PCR

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Nachweismethoden DAS-ELISA, RT-LAMP und RT-PCR für GLRaV-1 verglichen, um eine Aussage über die Sensitivität der RT-LAMP treffen zu können. Es wurden jeweils drei verschiedene Holzproben (R5, R6, R15) in Holzextrakt von gesunden Proben verdünnt (bis zu einer Verdünnung von  $10^{-6}$ ) und in allen drei Nachweisverfahren detektiert.

## DAS-ELISA

Die Verdünnungsreihe der drei Holzproben erfolgte u. a. beim DAS-ELISA. In Tabelle 14 sind die gemittelten Absorptionswerte des DAS-ELISAs aufgeführt. Die Proben wurden bis zu  $10^{-6}$  in negativer Kontrolle verdünnt und die Extinktion bei 405 nm im Photometer gemessen. Als Kontrollen wurde eine positive Kontrolle (PK) und eine negative Kontrolle (NK) unverdünnt eingesetzt. Des Weiteren ist der von der Software berechnete Wert für den cut-off angegeben und liegt bei 0,252. In der Tabelle sind positive Proben mit rot und negative in grün dargestellt.

Tabelle 14: Sensitivitätsmessung im DAS-ELISA mittels Verdünnungsreihe (Antikörper: Bioreba). Mittelwert der Duplikate, gemessen als OD (OD = optische Dichte). Proben: E5, E6, E15 (E = ELISA-Test). Verdünnung in gesundem Extrakt von NK; Kontrollen: PK (E3), NK (n=2; Messung im Photometer; x = nicht gemessen; Cut off: gemessene Extinktion ist kleiner als das 1,75-fache der NK und wird als negativ beurteilt)

Probe	Verdünnungsstufen (gemessen als Extinktion bei 405 nm)						
	1	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
<b>E5</b>	1,691	0,287	0,157	0,158	0,134	0,132	0,125
<b>E6</b>	3,001	0,249	0,132	0,119	0,156	0,118	0,113
<b>E15</b>	0,164	0,113	0,116	0,115	0,120	0,114	0,114
<b>PK</b>	1,520	x	x	x	x	x	x
<b>NK</b>	0,149	x	x	x	x	x	x
<b>Cut-off</b>	0,252	0,252	0,252	0,252	0,252	0,252	0,252

Es zeigt sich, dass nur zwei (E5, E6) der drei in Tabelle 14 dargestellten Proben im ELISA als GLRaV-1 positiv detektiert werden konnten, während in der Probe E15 kein GLRaV-1 nachgewiesen werden konnte. Interessant ist, dass in der unverdünnten Probe E5 die Extinktion geringer war als bei E6, trotzdem aber noch bei 1:100 eine schwach positive Reaktion gefunden wurde. Probe E6 konnte dagegen bei einer Verdünnung von 1:100 bereits negativ getestet werden. Für den weiteren Vergleich dieser Proben in RT-LAMP und RT-PCR standen also eine sehr stark positive Probe, eine starke sowie eine im ELISA negative Probe zur Verfügung.

## RT-LAMP

Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der RT-LAMP zusammen. Die Ergebnisse sind mit einem „+“ als positiv und mit einem „-“ als negativ gekennzeichnet. Die Kontrollen wurden nur unverdünnt gemessen und nicht gemessene Werte sind mit einem „x“ markiert. Die Amplifikationskurven der Kontrollen sind im Anhang aufgeführt (8.3.9).

Tabelle 15: Sensitivitätsmessung in der RT-LAMP mittels Verdünnungsreihe (Primer: Mast Diagnostica GmbH). Proben: R5, R6, R15 (R = RNA-Extraktion). Verdünnung in gesundem Extrakt von NK; Kontrollen: PK (R3), NK, NTC (n=3; Messung im Lightcycler; + = positiv; - = negativ; x = nicht gemessen)

Probe	Verdünnungsstufen						
	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
<b>R5</b>	+++	+++	+++	+++	+-	-	-
<b>R6</b>	+++	+++	+++	+++	+++	-	+-
<b>R15</b>	+++	+-	+-	-	-	-	-
<b>PK</b>	+++	x	x	x	x	x	x
<b>NK</b>	-	x	x	x	x	x	x
<b>NTC</b>	-	x	x	x	x	x	x

Anhand Tabelle 15 zeigt sich, dass in allen drei Proben GLRaV-1 nachweisbar war, jedoch bis zu einer sehr unterschiedlichen Verdünnungsstufe: R5 bis zu 10<sup>-3</sup> in allen drei Replikaten, R6 sogar bis 10<sup>-4</sup>. Dagegen zeigt R15 nur unverdünnt eine positive Reaktion. Alle drei Proben wurden zuvor im ELISA mit einem Faktor zwischen ca. 4,4 und 6,5 als schwach positiv für GLRaV-1 getestet (vgl. Tab. 2). Die größte Verdünnungsstufe konnte interessanterweise bei R6 nachgewiesen werden, die im ELISA am schwächsten war (Faktor: 4,446).

## RT-PCR

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR, für die gleichen Proben und Verdünnungsstufen wie in der RT-LAMP. Die Proben wurden im Lightcycler mit entsprechenden Primern und nach RNA-Extraktion (nach Gambino) gemessen. Neben den Proben wurden eine positive Kontrolle, pro Probe eine Kontrolle mit dem SAND-Primer und eine NTC eingesetzt. Die Darstellung der Ergebnisse in der Tabelle beinhaltet folgende Werte:

- die über die drei technischen Replikate gemittelten CP-Werte (also den Mittelwert)
- die Standardabweichung der drei CP-Werte
- die Differenz zum CP-Wert der vorherigen Verdünnungsstufe
- und den p-Wert, der gegenüber der NTC ermittelt wurde.

Tabelle 16: Sensitivitätsmessung in der RT-PCR mittels Verdünnungsreihe (Primer: eigener Laborbestand). Proben: P5, P6, P15 (P = RT-PCR). Verdünnung in gesundem Extrakt von NK; Kontrollen: PK (P3), SAND, NTC (n=3; Messung im Lightcycler; + = positiv; - = negativ; x = nicht berechnet)

Probe	Verdünnung	Mittelwert CP-Werte	Differenz zum vorherigen CP-Wert	p-Wert (vs. NTC)	Ergebnis
<b>P5</b>	1	21,88	x	0,0002	+
	10 <sup>-1</sup>	24,67	2,79	0,0000	+
	10 <sup>-2</sup>	28,31	3,64	0,0004	+
	10 <sup>-3</sup>	30,89	2,58	0,0009	+
	10 <sup>-4</sup>	32,26	1,37	0,0063	+
	10 <sup>-5</sup>	34,01	1,75	0,5672	-
	10 <sup>-6</sup>	35,38	1,37	0,0130	-
<b>P6</b>	1	19,03	x	0,0000	+
	10 <sup>-1</sup>	22,46	3,43	0,0000	+
	10 <sup>-2</sup>	26,80	4,33	0,0003	+
	10 <sup>-3</sup>	27,53	0,73	0,0001	+
	10 <sup>-4</sup>	29,15	1,62	0,0003	+
	10 <sup>-5</sup>	30,41	1,26	0,0178	+
	10 <sup>-6</sup>	34,78	4,37	0,1521	-
<b>P15</b>	1	28,03	x	0,0064	+
	10 <sup>-1</sup>	30,83	2,80	0,0037	+
	10 <sup>-2</sup>	34,09	3,27	0,9288	-
	10 <sup>-3</sup>	34,37	0,28	0,1220	-
	10 <sup>-4</sup>	35,03	0,66	0,0927	-
	10 <sup>-5</sup>	34,39	0,64	0,1458	-
	10 <sup>-6</sup>	34,54	0,15	0,0901	-
<b>PK</b>	1	19,67	x	0,0002	+
<b>SAND P5</b>	1	23,38	x	0,0002	+
<b>SAND P6</b>	1	21,70	x	0,0004	+
<b>SAND P15</b>	1	21,28	x	0,0001	+
<b>NTC</b>	1	34,07	x	x	-

Es zeigen sich in der RT-PCR (Tab. 16) Ergebnisse mit höherer Sensitivität als in der RT-LAMP. Hier war GLRaV-1 in der Probe 5 noch bei einer Verdünnung von  $10^{-4}$  zuverlässig (in allen drei Replikaten) nachweisbar. Bei R6 konnte das Virus sogar noch bis zu einer Verdünnung von  $10^{-5}$  nachgewiesen werden. P15 war noch bis zu  $10^{-1}$  nachweisbar. Demnach ist die Sensitivität in jeder Probe um eine Stufe höher als bei der RT-LAMP. Die SAND-Primer dienen nur als Kontrolle, ob die Reaktion generell funktioniert und konnte bei allen drei Proben erfolgreich detektiert werden.

Im Vergleich der Empfindlichkeit der drei Methoden zeigt sich, dass die RT-PCR um eine Verdünnungsstufe sensitiver ist als die RT-LAMP. Der ELISA zeigt hinsichtlich der Sensitivitätsmessung die schlechtesten Resultate.

## **4.4 Vergleich der Messgeräte**

Die zuvor ermittelten Ergebnisse wurden bis auf 4.1.3.1 (Versuch mit Pufferlösungen) alle im Lightcycler gemessen. Es ist jedoch auch möglich die Fluoreszenz mithilfe eines einfachen Tubescanners, wie dem ESEquant, zu ermitteln. Mit diesem Gerät können zwar keine Schmelzkurven oder CP-Werte ermittelt werden, aber durch die Darstellung der Amplifikationskurven kann ein schneller Nachweis ohne große Laborausstattung mithilfe des Geräts ermöglicht werden. Um Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der beiden Messgeräte, Lightcycler und ESEquant, herauszufinden, wurden verschiedene Proben mit unterschiedlicher Viruslast in beiden Geräten parallel gemessen. Die Kontrollen zu den Versuchen im Lightcycler sind im Anhang aufgeführt (8.3.10 bis 8.3.12).

### **4.4.1 Vergleich Lightcycler und ESEquant anhand einer starken ELISA-Probe**

Um die Sensitivität beider Geräte vergleichen zu können, wurde zunächst die starke ELISA-Probe 1 mittels Wasserextraktion in drei unterschiedlichen Verdünnungsstufen aufbereitet. Der erhaltene Extrakt wurde anschließend sowohl im Lightcycler (Abb. 14 A) als auch im ESEquant (Abb. 14 B) gemessen. Die Proben und Kontrollen wurden als Triplikate im Lightcycler bzw. aufgrund des geringeren Platzes in Duplikaten im ESEquant gemessen. Die Kontrollen im Lightcycler zeigten keine Besonderheiten und sind demnach nur in der Tabelle sowie als Graphen im Anhang (8.3.10) aufgeführt. Da die Schmelzkurve keine Auffälligkeiten zeigte, wird diese ebenfalls nicht gezeigt. Zusätzlich sind die Ergebnisse zur besseren Übersichtlichkeit als Tabelle aufgeführt.

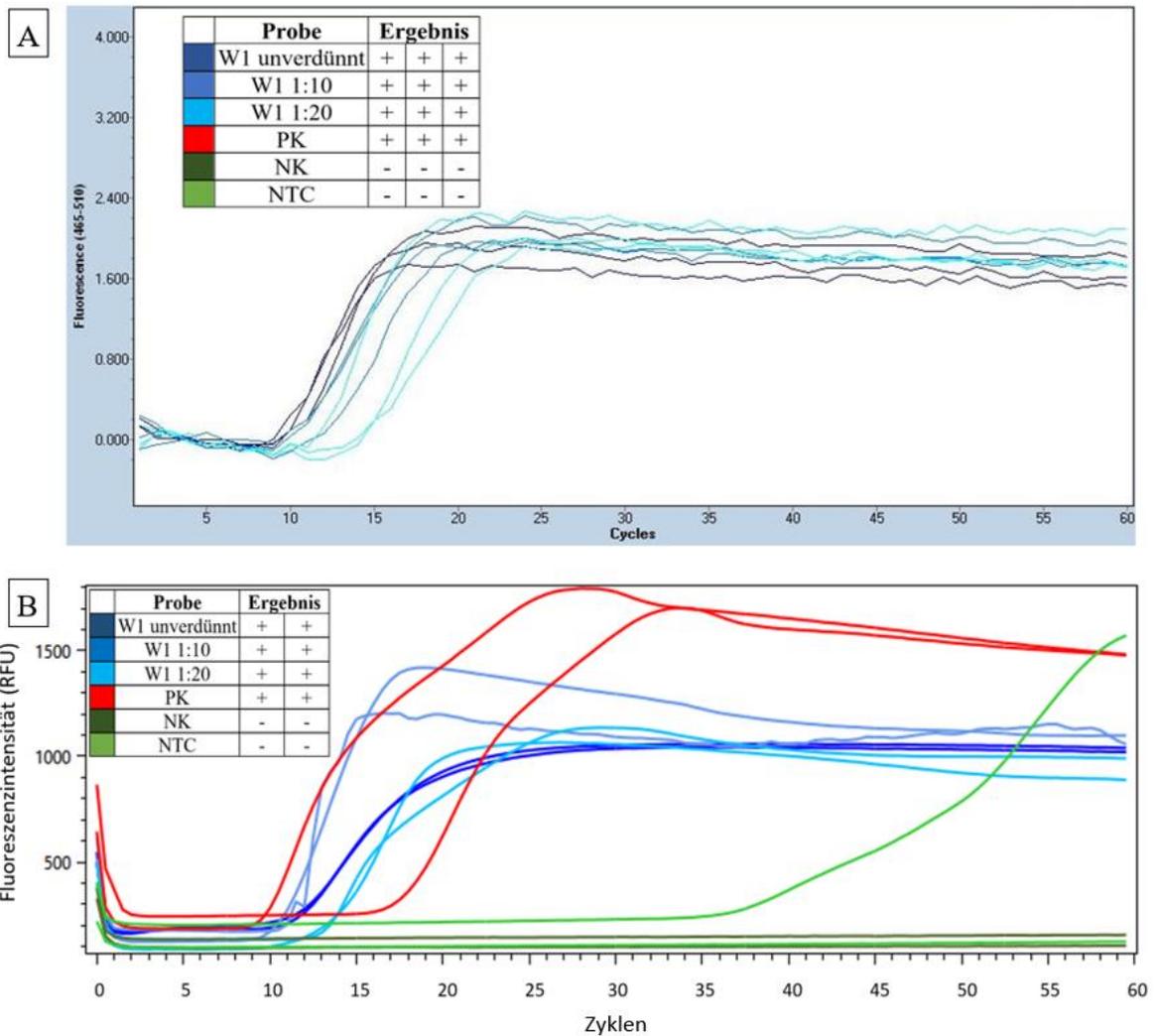


Abbildung 14: Vergleich der Detektion von GLRaV-1 bei einer starken ELISA-Probe mittels RT-LAMP gemessen im Lightcycler (A) bzw. ESequant (B). Probe: Holzprobe 1, aufbereitet mittels einfacher Wasserextraktion (W), unterschiedlich verdünnt (unverdünnt, 1:10, 1:20). Kontrollen: PK (W6), NK, NTC (Lightcycler: n= 3; ESequant: n =2)

Anhand der Amplifikationskurven ist in Abbildung 14 zu erkennen, dass alle Proben unabhängig des Messgerätes und der Verdünnungsstufe nach spätestens 15 Zyklen detektiert werden konnten. Der sigmoide Anstieg der Varianten erfolgte in beiden Geräten eng beieinander. Auffällig ist, dass ein Replikat der NTC beim ESequant einen Anstieg nach etwa 40 Zyklen zeigt. Generell zeigt sich die Detektion von Probe 1 in beiden Messgeräten zuverlässig und ohne Probleme. Dieser Versuch mit der starken ELISA-Probe 1 wurde weder im Lightcycler noch im ESequant aufgrund der eindeutigen Ergebnisse wiederholt.

#### **4.4.2 Vergleich Lightcycler und ESequant anhand einer schwachen ELISA-Probe**

Zur Überprüfung des GLRaV-1 Nachweises bei einer schwachen ELISA-Probe wurde in diesem Fall Probe Nummer 2 eingesetzt, deren Messung im Lightcycler bereits vorgestellt wurde (Abb. 8-10). Dort zeigte sich, dass nur wenige positive Replikate detektiert wurden. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse mittels ESequant wurden die Proben ebenfalls nach Wasserextraktion frisch aufbereitet und unverdünnt, 1:10 und 1:20 verdünnt im Esequant gemessen (Abb. 15). Zur Überprüfung der Testsicherheit wurde auch hier in dreifacher technischer Wiederholung gemessen (1, 2, 3). Die Proben bzw. Kontrollen wurden in Duplikaten aufgetragen. Die Ergebnisse der drei technischen Wiederholungen sind jeweils als Amplifikationskurven und als Tabelle abgebildet.

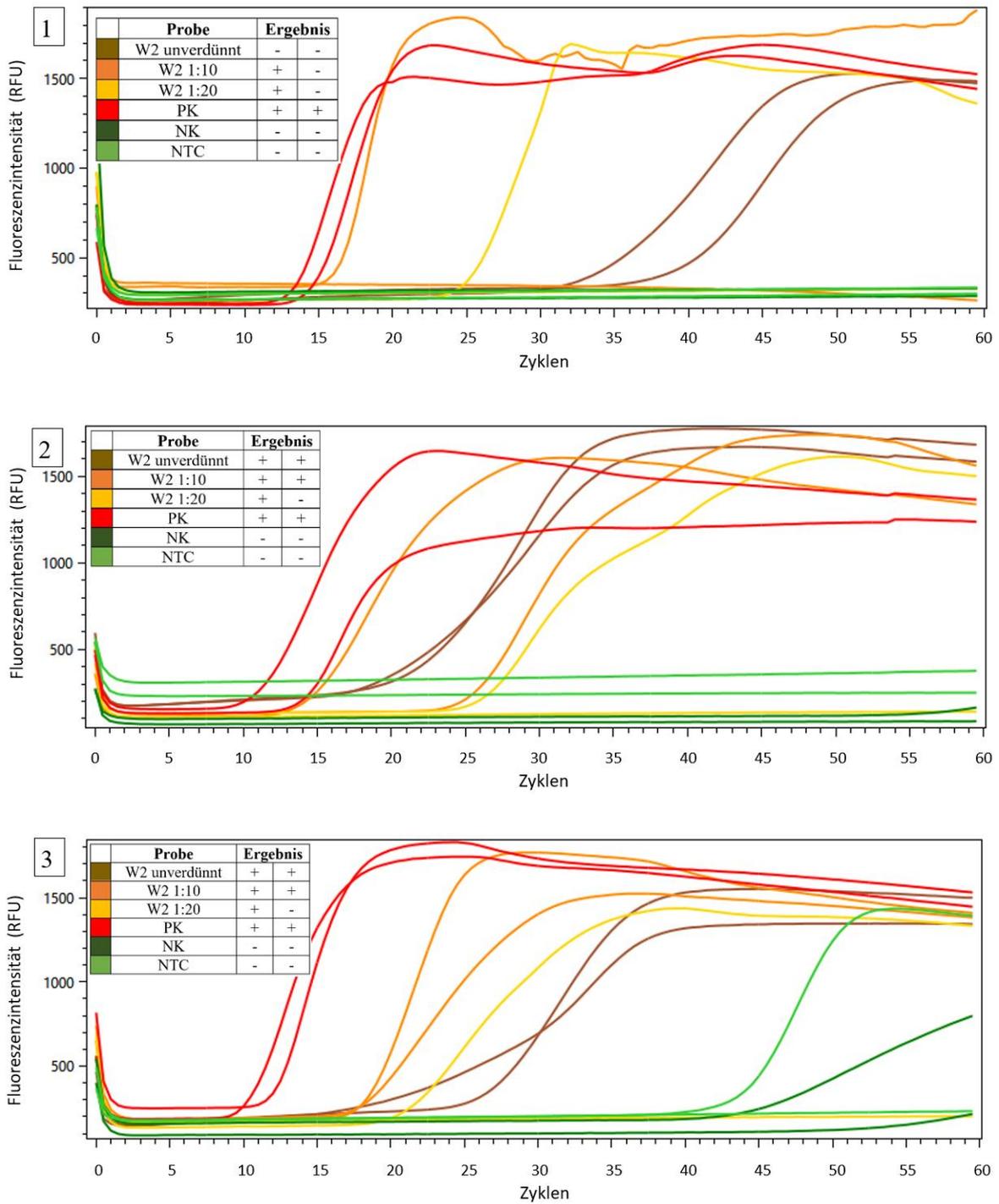


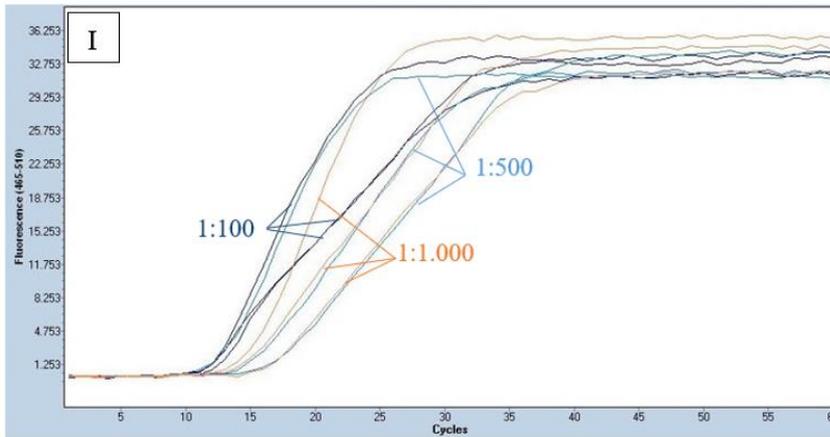
Abbildung 15: Vergleich der Detektion von GLRaV-1 bei einer schwachen ELISA-Probe mittels RT-LAMP im ESequant. Probe: Holzprobe 1, aufbereitet mittels einfacher Wasserextraktion (W), unterschiedlich verdünnt, in dreifacher technischer Wiederholung (1, 2, 3). Kontrollen: PK (W6), NK, NTC (n =2)

Zusammenfassend ist festzustellen, dass gegenüber der Messung im Lightcycler (Abb. 8-10) mehr positive Replikate im ESEquant gemessen werden konnten (Abb. 15). Die Variante 1:10 ist am häufigsten positiv und zeigt lediglich bei A in einem Replikat keinen Anstieg. Die Variante 1:20 konnte in jeder Wiederholung nur einmal erfolgreich detektiert werden. 4 von 6 Replikate der unverdünnten Variante sind positiv, in der ersten Wiederholung erfolgte der Anstieg der Fluoreszenz erst nach dem Grenzwert. Auffallend hinsichtlich der Kontrollen ist die Tatsache, dass bei der dritten Wiederholung des Versuchs (3) zu erkennen ist, dass bei einem Replikat der NTC und einer negativen Kontrolle ein Anstieg der Fluoreszenz nach etwa 45 Zyklen zu verzeichnen ist. Es bestätigen sich auch hier die bisherigen Ergebnisse einer nicht ganz zuverlässigen Nachweisbarkeit von GLRaV-1.

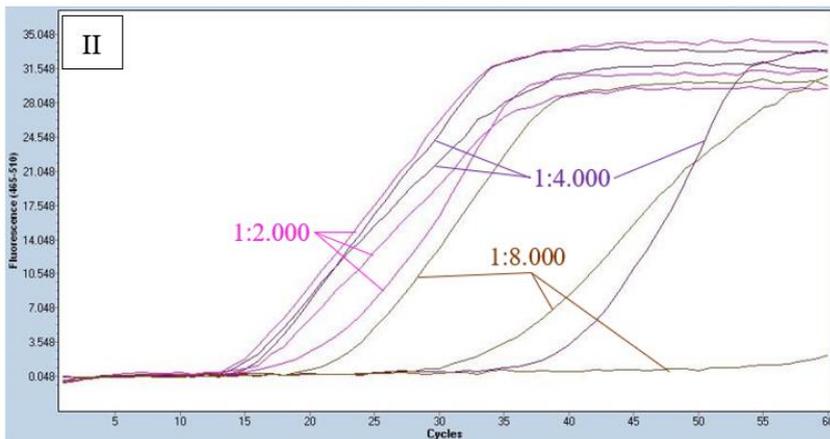
#### **4.4.3 Empfindlichkeit der Messgeräte**

Um die Empfindlichkeit der beiden „Thermocycler“ in Bezug auf die Detektion der Probe zu ermitteln, wurde Probe 1, die sowohl im ELISA als auch in der RT-LAMP eindeutig positiv detektiert werden konnte, in beiden Geräten gemessen. Dazu wurde die Probe in verschiedenen Verdünnungsstufen gemessen. Die Aufbereitung der Probe R1 erfolgte mittels RNA-Extraktion. Die Probe wurde dann in den Verdünnungsstufen (1:100, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:8.000) in den beiden Cyclern amplifiziert. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse im Lightcycler dargestellt, der besseren Übersichtlichkeit wegen in zwei Abbildungen geteilt (I: Verdünnungen 1:100 bis 1:1.000; II: 1:2.000 bis 1:8.000). Die Amplifikationskurven der Kontrollen sind aufgrund der besseren Übersichtlichkeit nur im Anhang (8.3.11) aufgeführt.

Wegen der Tatsache, dass im ESEquant zeitgleich nur zwölf Proben gemessen werden können, wurden die Proben als Duplikate aufgetragen und der Versuch in zwei Teile gegliedert (Abb. 17). Zuerst wurden neben den üblichen Kontrollen die Verdünnungsstufen 1:100 bis 1:1.000 gemessen (I), anschließend die Varianten 1:2.000, 1:4.000 und 1:8.000 (II). Links sind die jeweiligen Amplifikationskurven und rechts daneben die Ergebnisse als Tabelle zur besseren Übersicht dargestellt.



	Probe	Ergebnis		
	R1 1:100	+	+	+
	R1 1:500	+	+	+
	R1 1:1.000	+	+	+



	Probe	Ergebnis		
	R1 1:2.000	+	+	+
	R1 1:4.000	+	+	-
	R1 1:8.000	+	-	-
	PK	+	+	+
	NK	-	-	-
	NTC	-	-	-

Abbildung 16: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler bis 1:8000: Amplifikation der RT-LAMP im Lightcycler. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (n=3). I: 1:100 bis 1:1.000. II: 1:2.000 bis 1:8.000 und Kontrollen (PK = R6, NK, NTC)

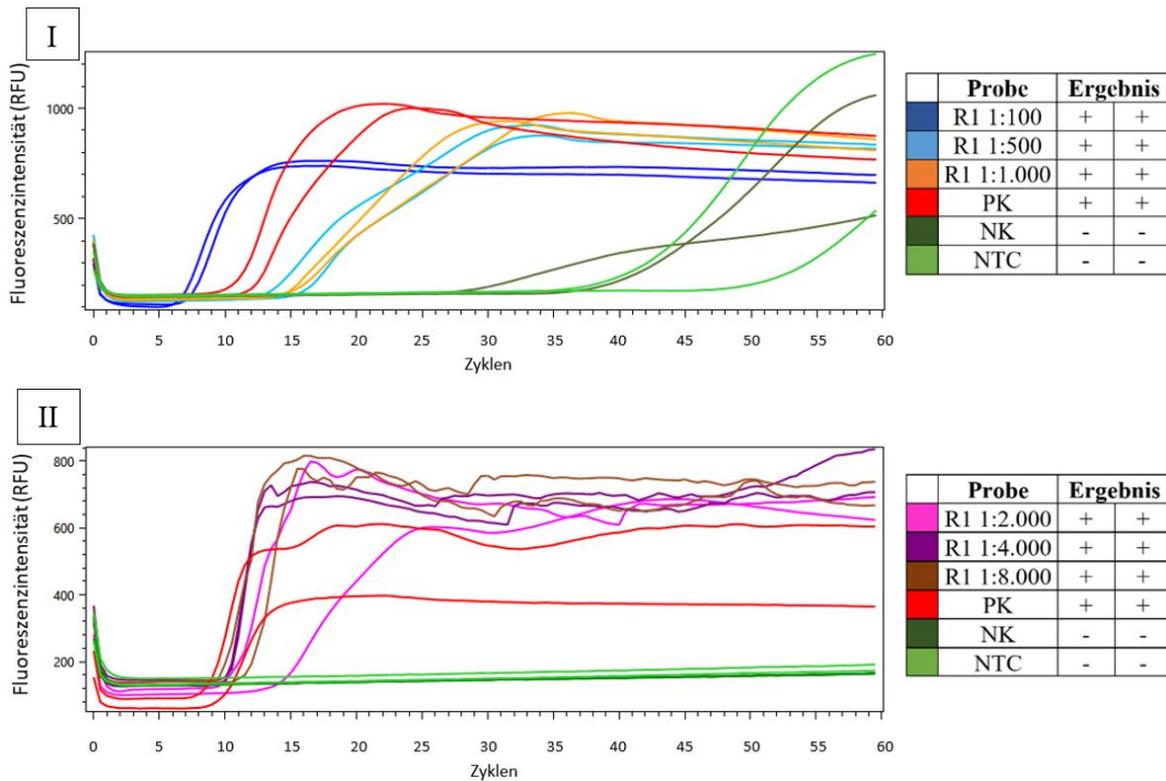


Abbildung 17: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler bis 1:8000: Amplifikation der RT-LAMP im ESEquant. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (n=3). I: 1:100 bis 1:1.000. II: 1:2.000 bis 1:8.000 und Kontrollen (PK = R6, NK, NTC)

Im Lightcycler waren bis zu einer Verdünnung von 1:2.000 alle Replikate positiv (Abb. 16). Bei der Variante 1:4.000 war lediglich ein Replikat positiv. Im Vergleich zum Lightcycler war im ESEquant (Abb. 17) auch nach einer Verdünnung von 1:8000 noch eine Detektion von GLRaV-1 mittels LAMP möglich. Es ist darüber hinaus noch zu erwähnen, dass die negativen Kontrollen im Lightcycler zwar einen Anstieg der Fluoreszenz zeigten, aber erst nach 30 Zyklen (nicht dargestellt).

Der Test wurde mit stärkeren Verdünnungsstufen wiederholt und wieder in beiden Geräten die Amplifikation durchgeführt. Da im Lightcycler bereits bei einer Verdünnung von 1:4.000 keine sichere Amplifikation mehr stattfand, wurden die Proben für den Lightcycler nur bis 1:16.000 verdünnt (Abb. 18). Die Kontrollen sind im Anhang aufgeführt (8.3.12) Um die Grenze des Thermocyclers ESEquant für diese Probe zu ermitteln, wurde die Probe nochmal stärker verdünnt: von 1:4.000 bis 1:128.000 (Abb. 19). Erneut wurde dieser Versuch aufgrund des geringeren Platzes im Messgerät aufgeteilt (I, II).

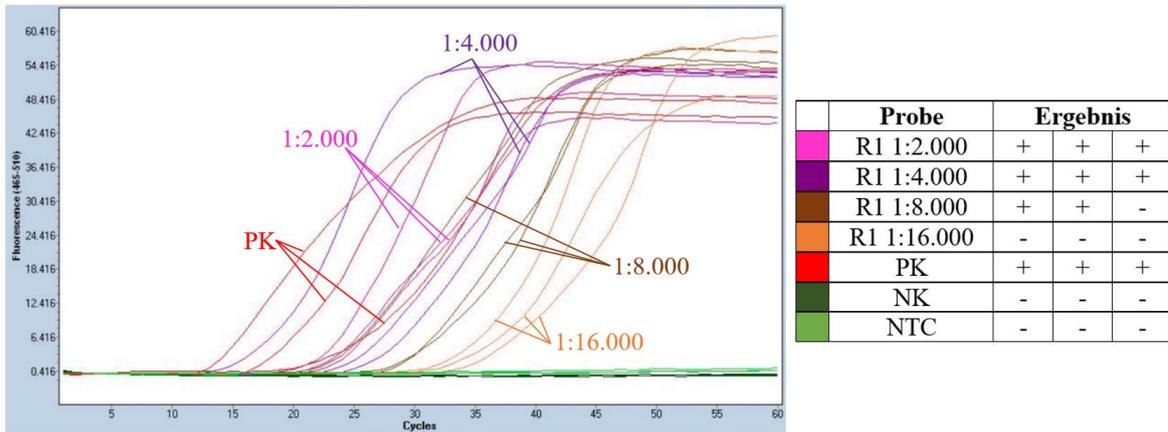


Abbildung 18: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler: Amplifikation der RT-LAMP im Lightcycler bis 1:16.000. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (1:2.000 bis 1:16.000; n = 3). Kontrollen: PK (R6), NK, NTC

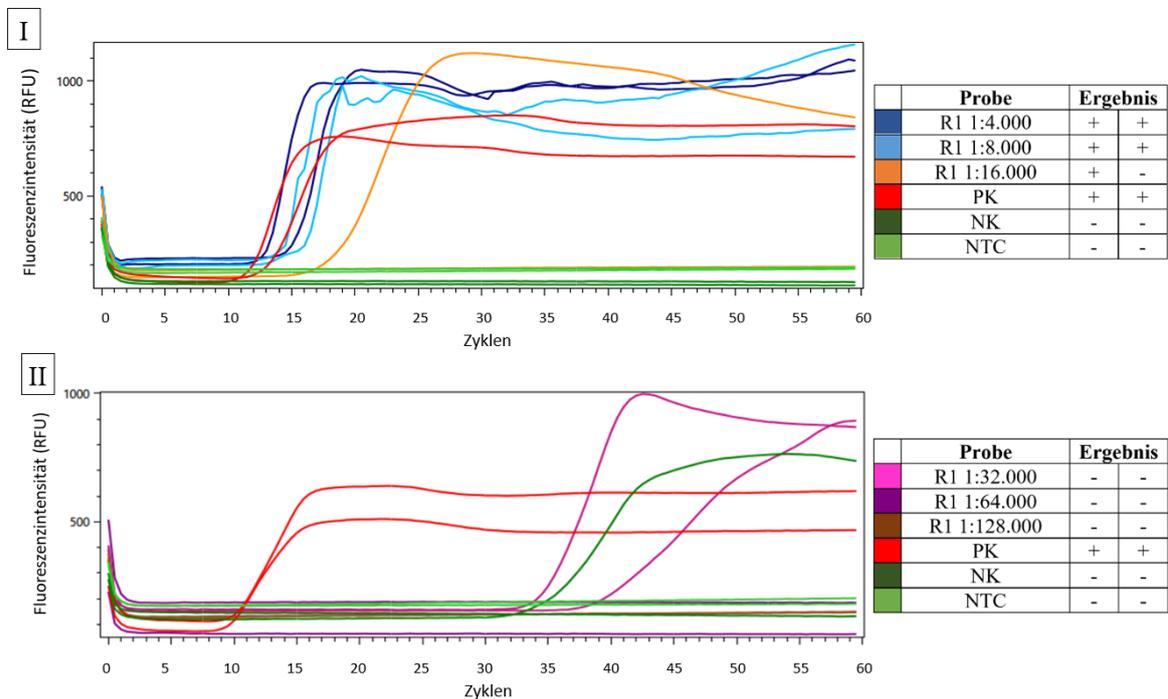


Abbildung 19: Sensitivitätsvergleich der Thermocycler: Amplifikation der RT-LAMP im ESEquant bis 1:128.000. Probe: R1 (R = RNA-Extraktion), unterschiedliche Verdünnung (I: 1:4.000 bis 1:16.000; II: 1:32.000 bis 1:128.000; n = 3). Kontrollen: PK (R6), NK, NTC

Bei Betrachtung der Ergebnisse des Lightcyclers (Abb. 18) fällt auf, dass bei dieser Wiederholung, anders als im ersten Vergleich, auch die Replikate mit einer Verdünnung von 1:4.000 noch zuverlässig detektiert werden konnten. Bei 1:8000 ist nur noch eins von

drei Replikaten positiv und bei allen weiteren Verdünnungsstufen konnte kein Virus mehr detektiert werden. Vergleicht man die Ergebnisse des ESEquant (Abb. 19), so war hier eine sichere Detektion noch bei einer Verdünnung von 1:8000 möglich. Bis auf ein Replikat von 1:16.000 war bei den höheren Verdünnungsstufen keine Detektion vor dem Grenzwert mehr möglich. Zudem ist bei II auffällig, dass die NK einen Anstieg nach etwa 35 Zyklen zeigt.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Virusinfektion mit GLRaV-1 an Topfreben erfolgreich durch die Verwendung einer RT-LAMP detektiert werden kann. Das Ausgangsprotokoll konnte durch eine RNA-Extraktion optimiert werden und eine zuverlässigere sowie gegenüber der RT-PCR und dem ELISA schnellere Methode etabliert werden. Jedoch konnten neben den Möglichkeiten dieser Detektionsmethode auch deren Grenzen aufgezeigt werden.

### 5.1 RT-LAMP-Protokoll zur Detektion von GLRaV-1

Das ursprüngliche Protokoll, das dem „Mast Isoplex Kit“ beiliegt, sieht eine einfache Extraktion in Wasser und eine Verdünnung des aufbereiteten Probenextrakts im Verhältnis von 1:10 in Wasser vor. Als Proben wurde Holz viruskranker Topfreben verwendet, das zuvor bei den jährlichen Routineuntersuchungen des Instituts für Rebenzüchtung mittels ELISA-Test positiv auf GLRaV-1 getestet worden war. Für die ersten Analysen zum Einsatz der Extraktion in Wasser (Abb. 5-7) wurden zwei Proben eingesetzt: Dabei wurde für Probe 1 im Testjahr 2019/20 ein Faktor von 11,952 und für Probe 2 ein Faktor von 3,000 gegenüber der NK gemessen (vgl. Tab. 2).

Beim ELISA wird die Reaktionsrate der Enzymaktivität, die für die Färbung des Substrates verantwortlich ist, als optische Dichte gemessen. Hohe Enzymkonzentrationen bedeuten viele Sekundärantikörper mit entsprechend einer höheren Konzentration an gebundenem Enzym und damit einer stärkeren Substratumsetzung. Das Ergebnis sind höhere Extinktionswerte, die gemessen werden, und damit auch hohe Viruskonzentrationen (Blouin et al., 2017). Die Auswertesoftware des Instituts setzt einen „cut off“ bei OD-Werten, die um den Faktor 1,75 über den Werten der Negativkontrolle liegen. Die OD-Werte werden mit der Negativkontrolle ins Verhältnis gesetzt, was einen bestimmten Faktor ergibt, und hohe Faktoren bedeuten auch hohe OD-Werte. Aus diesen Gründen kann Probe 1 aufgrund des Faktors als „starke ELISA-Probe“ und Probe 2 als „schwache ELISA-Probe“ angesehen werden. Generell ist aber zu erwähnen, dass der ELISA lediglich eine quantitative Aussage über das Vorhandensein eines Virus gibt (Zherdev et al., 2018). Auch die Ergebnisse der RT-LAMP sind nur quantitativer Art und es kann nicht auf die

Höhe des Virustiters geschlossen werden (Frotscher et al., 2021). Daher können qualitative Aussagen wie „stark“ und „schwach“ nicht eindeutig gemacht werden, es kann lediglich von einer Tendenz gesprochen werden.

Hinsichtlich der Gegenüberstellung der Ergebnisse von ELISA und RT-LAMP ist ferner darauf hinzuweisen, dass diese Methoden unterschiedliche Sachverhalte messen. Während der ELISA die Hüllproteine der Viren detektiert (Blouin et al., 2017), wird bei der RT-PCR die Menge an vervielfältigter Virus-DNA ermittelt (Notomi et al., 2000). Daher basiert die eine Methode auf der vorhandenen Menge an Virusproteinen und die andere auf der Anzahl an Virusnukleinsäuren. Da der ELISA-Test somit die Hüllproteine und nicht die Nukleinsäuren nachweist, die anhand der Virus-RNA erstellt werden, sind die Ergebnisse beider Tests nicht direkt vergleichbar. Lediglich die Aussage, dass Viren vorhanden sind, können getroffen werden.

Probe W1 konnte in allen Replikaten und technischen Wiederholungen der ersten Versuche zur RT-LAMP, die nach Wasserextraktion aufbereitet und im Lightcycler gemessen wurden (Abb. 5-7), als positiv für GLRaV-1 detektiert werden. Hier konnte das angewandte Protokoll zuverlässige, wiederholbare Ergebnisse liefern. Die schwache ELISA-Probe W2 konnte dagegen nur in 4 von 9 technischen Replikaten als GLRaV-1-krank ermittelt werden. Häufig ist zwar ein Anstieg der Fluoreszenzkurven zu erkennen, der auch sigmoid ist. Jedoch wurde dieser in den meisten Fällen erst nach dem Grenzwert von 30 Zyklen detektiert. 30 Zyklen wurden nach Vorversuchen als Grenzwert für die Beurteilung der Ergebnisse festgelegt, da nach dieser Zyklenzahl gehäuft unspezifische Reaktionen entstanden sind (nicht dargestellt). Dass dieser Anstieg der schwachen Probe W2 später erfolgt als der von W1, kann zum einen mit der niedrigeren Konzentration des Erregers begründet werden. Ist weniger Virus-RNA, also Templatmenge vorhanden, ist die Wahrscheinlichkeit, dass die zugegebenen Primer die entsprechende Virussequenz schnell erkennen und die Amplifikation auslösen können geringer als bei Proben, die viel Virusmaterial bzw. einen hohen Titer enthalten (González-González et al., 2021; Meng et al., 2017). Es dauert zu lange bis spezifisch amplifiziert werden kann, sodass offensichtlich die Nachweissicherheit bei zu geringer Konzentration an Virus-Nukleinsäuren in der Probe nicht mehr sicher möglich ist.

Das Problem, dass nur stärker mit dem Virus infizierte Proben eindeutig positiv detektiert werden konnten, könnte andererseits auch auf eine geringere Empfindlichkeit der LAMP hindeuten, worauf in Abschnitt 5.3 eingegangen wird. Ein weiteres Problem stellt die ungleichmäßige Verteilung der Viren innerhalb der Pflanze (Chooi et al., 2016) und über die Saison (Constable et al., 2012) dar, die zu Fluktuationen des Virustiters führt. Als Grund für die ungleichmäßige Verteilung wird die ineffiziente Verlagerung und Reproduktion der Viren im Phloem vermutet (Monis & Bestwick, 1996).

Um eine zuverlässige Detektion zu ermöglichen, muss daher auf eine optimale Probennahme (Zeitpunkt und Material) geachtet werden. Die höchsten Titer für GLRaV-1 können im ausgereiften Holz nach dem Blattfall (Oktober bis Februar) sowie in älteren Blattstielen nachgewiesen werden (Osman et al., 2018). Die beste Zeit für Blätter ist für GLRaV-1 im Spätsommer/Herbst (Bioreba, 2018; Osman et al., 2018). In diesem Versuch wurde zum optimalen Zeitpunkt im Winter die Probennahme durchgeführt. Dennoch kann es vorkommen, dass einzelne Proben(teile) einen zu geringen Titer enthalten und deshalb nicht detektiert werden. Dies kann beispielsweise an der Jahreswitterung oder der Vitalität der Pflanzen liegen (Chooi et al., 2016; Constable et al., 2012).

Da die Probennahme des ELISAs im gleichen Zeitraum und vom gleichen Material (Holz) erfolgte und trotz des geringeren Titers das Virus dennoch eindeutig nachweisen konnte, muss der Grund an anderer Stelle begründet liegen. Es kann die Verdünnung des Probenextrakts als mögliche Ursache für eine spätere Detektion genannt werden. Um auszuschließen, dass durch die Wasserzugabe zum Probenextrakt die Virus-RNA so stark verdünnt wurde, dass der Titer zu gering war, wurde anhand von zwei Proben (Abb. 8 bis 11) die optimale Verdünnungsstufe ermittelt. Nach Vortests (nicht dargestellt) zeigten die drei Verdünnungsstufen „unverdünnt“, „1:10“ und „1:20“ die zuverlässigste Detektion von GLRaV-1. Bei stärkerer Verdünnung (ab 1:40) kann die sigmoide Amplifikation der Fluoreszenz erst spät oder gar nicht detektiert werden. Auch hier ist nochmals zu erwähnen, dass sich diese Angabe der Verdünnung nur auf den Zeitraum nach der Probenextraktion bezieht. Das Template muss selbstverständlich vorher aus dem Probenmaterial entnommen und in eine Lösung überführt werden. Daher ist die Bezeichnung „unverdünnt“ nicht ganz zutreffend. Bei diesem Schritt wurde ebenfalls in

Vortests mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen und Extraktionspuffern gearbeitet, die keine Verbesserung gegenüber dem Ausgangsprotokoll zeigten.

Anhand der Ergebnisse des Vergleichs unterschiedlicher Verdünnungsstufen (Abb. 8-11) konnte keine eindeutig beste Verdünnungsstufe ermittelt werden. W2 konnte unverdünnt nur in 1 von 9 Replikaten als positiv detektiert werden. Die 1:10-Variante von W2 konnte dagegen genauso wie „1:20“ zweimal (von 9 Replikaten) erfolgreich positiv nachgewiesen werden (Abb. 8-10). Bei W3 (Abb. 11) zeigte sich die 1:10-Variante als die beste und war als einzige in allen drei Replikaten positiv. Bei der ersten Wiederholung zur Messung der schwachen Probe W2 (Abb. 8) und bei der Messung der ebenfalls schwachen Probe W3 (Abb. 11) ist der Anstieg der Fluoreszenz der unverdünnten Probe linear und nicht exponentiell. Demnach ist auch die Amplifikation der DNA-Stücke nicht exponentieller Natur und es kann keine Aussage getroffen werden, ob die Detektion virusspezifisch ist. Eine mögliche Ursache könnten inhibierende Substanzen im Extrakt sein. Im Pflanzengewebe der Reben sind hohe Gehalte an Polysacchariden, Phenolen und anderen sekundären Pflanzenstoffen enthalten, die die Reaktion PCR-basierter Methoden stören könnten. Phenole können Proteine und Nukleinsäuren binden sowie Komplexe ausbilden, Polysaccharide können die RNA ausfällen. Dies hat zur Folge, dass der Extrakt kontaminiert ist und die eigentliche Reaktion stört (Salzman et al., 1999). Um zu ermitteln, ob solche Substanzen die LAMP-Reaktion bei den Wasserextrakten stören, wurde die Detektion von Proben, die nach Wasserextraktion und RNA-Extraktion aufbereitet wurden, miteinander verglichen (s. Seite 79 f.).

Der ELISA wird wegen der verschiedenen Puffer von solchen inhibitorischen Stoffen, die die Empfindlichkeit verringern, weniger beeinflusst (Zherdev et al., 2018). Dies erklärt, warum die Detektion mittels ELISA möglich war und bei der RT-LAMP Schwierigkeiten zeigte. Durch eine Verdünnung kann dieses Problem zwar nicht gelöst, aber verbessert werden und ist demnach einer nicht verdünnten Probe bei einer einfachen Extraktion in Wasser vorzuziehen. Die Verdünnung könnte die Wirkung inhibitorischer Stoffe reduzieren und so den geregelten Ablauf der Amplifikation mittels RT-LAMP möglich machen.

Aufgrund der insgesamt leicht besseren Ergebnisse und den Resultaten aus den Vorversuchen, wurde mit einer 1:10-Verdünnung bei der Wassereextraktion weiter verfahren. Die generelle Empfehlung von Mast, die Proben 1:10 zu verdünnen, kann aufgrund der reproduzierbaren Ergebnisse nur bei starken Proben empfohlen werden. Denkbar wäre bei einer solchen starken Probe (wie bei Probe 1), dass die Affinität der Primersysteme aufgrund der höheren Konzentration an spezifischen Nukleinsäuren schnell zum Start der Amplifikation führt, die dann nicht mehr unterbrochen wird. Dieser Sachverhalt konnte beispielsweise bei einer LAMP mit anderen Viren beobachtet werden (González-González et al., 2021).

Um die Probleme der inhibitorischen Stoffe bei der Detektion zu lösen, wurde an der Optimierung der Probenextraktion gearbeitet. Pufferlösungen wie PVP oder Tris können laut Literatur inhibitorische Substanzen binden bzw. unschädlich machen und so die bereits aufgeführten Probleme durch inhibitorische Stoffe verringern. Also den gleichen Effekt der Puffer wie beim ELISA erzielen. PVP kann phenolische Komponenten abbinden (Gambino et al., 2008). Tris ist wie andere Puffer in der Lage das Milieu bei einem konstanten pH-Wert zu halten und so gleichbleibende, optimale Bedingungen zu schaffen (Tan, 2018). Die Verwendung der Pufferlösungen Tris und PVP zeigte gegenüber der einfachen Extraktion in Wasser keine Verbesserung der Detektion bei Probe W4 (Abb. 12). Mit Ausnahme der Variante „PVP 3 %“ konnten alle Varianten nach etwa 20 Zyklen positiv detektiert werden. Würde es durch die Hinzunahme der Pufferlösungen zu einer Verbesserung der Detektionsleistung kommen, müssten diese Replikate einen früheren Anstieg der Amplifikation zeigen. Auch in anderen Versuchen an der Hochschule Geisenheim (unveröffentlicht) zeigte sich keine Verbesserung durch die Verwendung solcher Pufferlösungen anstelle von Wasser.

Da die Verwendung von PVP und Tris keine Verbesserung hinsichtlich der Detektion erzielten, wurde eine weitere Methode zur Optimierung der Probenextraktion angewandt. Um die Virus-RNA aufzureinigen, wurde eine Extraktionsmethode mittels magnetischer Beads durchgeführt und mit den Ergebnissen der einfachen Extraktion in Wasser verglichen (Tabelle 7). Mithilfe der magnetischen Kugeln kann die Ziel-RNA (also die Virus-RNA) von den restlichen Nukleinsäuren und anderen störenden Komponenten separiert werden. Durch die Aufreinigung können daher störende Substanzen entfernt und

die Detektion optimiert werden. Zusätzlich kommt es auch zu einer Aufkonzentrierung des Templates, also der Virus-RNA (Little & Rezaian, 2006).

Der Vergleich von Beadextraktion und Wasserextraktion wurde mit der starken Probe 1 sowie den schwachen Proben 2 und 5 durchgeführt. Mithilfe der Beadextraktion konnte jedoch nur bei Probe 2 (Tabelle 7) eine verbesserte Detektierbarkeit erreicht werden. Die mit der einfachen Wasserextraktion aufbereitete Probe W2 konnte nur in einem Replikat und zwar in der Variante 1:10 positiv nachgewiesen werden. Die CP-Werte von B2 sind dagegen deutlich geringer, sodass bei der unverdünnten Variante eine Verbesserung um etwa 30 Zyklen in allen drei Replikaten erreicht werden konnte. Die Aufreinigung der Virus-RNA und der damit einhergehenden besseren Detektierbarkeit konnte bei der stark positiven Probe 1 nicht gezeigt werden. Die CP-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen sind in jedem Replikat der Bead-extrahierten Probe 1 (B1) schlechter als in der wasserextrahierten Probe 1 (W1). W1 ist die stark positive Probe, die bereits zuverlässig mittels einfacher Wasserextraktion als GLRaV-1-positiv ermittelt werden konnte (Abb. 5-7). Die im ELISA schwach positive Probe 5 zeigt im Vergleich der beiden Extraktionsmethoden keine eindeutige Tendenz: manche Replikate von B5 zeigen einen geringeren, manche einen höheren CP-Wert gegenüber der gleichen Verdünnungsstufe von W5.

Die inhibitorischen Effekte bei der Wasserextraktion konnten somit nicht ganz mittels Beadextraktion ausgeschlossen werden. Die Verbesserung der Detektion durch Zuhilfenahme von magnetischen Kugeln durch Little & Rezaian (2006) kann hier nicht bestätigt werden. Die Schwankungen in den Ergebnissen weisen darauf hin, dass auch durch eine Reinigung der Extrakte durch Beads keine zuverlässige Verbesserung der Nachweisbarkeit mittels RT-LAMP erreicht werden kann. Eine weitere Möglichkeit, die neben der inhibitorischen Stoffe zu den Detektionsproblemen führen kann, stellen die im Probenmaterial enthaltenen Nukleasen dar. Genauer gesagt handelt es sich bei diesen Enzymen um Ribonukleasen (RNasen), die in der Lage sind RNA und damit auch die Virus-RNA unspezifisch zu zerstören (Salzman et al., 1999). Demnach ist es möglich, dass durch den Abbau keine Viren mehr im Probenmaterial nachgewiesen werden konnten. Durch eine Inaktivierung mittels RNase-Inhibitoren und ein Nuklease-freies Laborumfeld kann dies verhindert werden (New England Biolabs, 2021).

Diese Schritte sind bei der ebenfalls durchgeführten RNA-Extraktion enthalten. Eine verbesserte Detektierbarkeit der Holzproben 1, 2 und 5 konnte mithilfe einer RNA-Extraktion (R) erzielt werden (Tabelle 8). Alle Replikate zeigen in jeder Probe und jeder Verdünnungsstufe einen niedrigeren CP-Wert als die Wasserextraktion. Die Probe 1, die bereits mittels der einfachen Wasserextraktion zuverlässig detektiert werden konnte, war bereits 11 Zyklen früher eindeutig detektierbar. Die im ELISA schwach positive Probe 2 konnte bisher nicht zuverlässig als GLRaV-1-positiv durch die RT-LAMP nach Wasserextraktion nachgewiesen werden. Nach RNA-Extraktion (R2) ist die Probe jedoch in allen drei Verdünnungsstufen nach spätestens 14,71 Zyklen positiv, also liegt deutlich über dem Grenzwert. Auch bei Probe 5 sind die Ergebnisse der RNA-Extraktion besser: alle 9 Replikate sind positiv. Bei W5 sind es nur 5 von 9 Replikate. Da die niedrigsten CP-Werte bei der unverdünnten Variante gemessen wurden, wurden für alle weiteren Versuche die RNA-Extrakte unverdünnt eingesetzt.

Durch den Einsatz der RNA-Extraktionsmethode nach Gambino werden, anders als bei der Wasserextraktion, Inhibitoren ebenso inaktiviert oder entfernt wie Ribonukleasen, die die RNA sehr schnell degradieren können. Das Grundprinzip der RNA-Aufreinigung besteht darin, dass die Zellen zuerst lysiert, RNasen und weitere Inhibitoren inaktiviert werden und schließlich RNA isoliert vorliegt. Die Ribonukleasen befinden sich überall, sodass beim Umgang mit RNA auf die größte Sorgfalt und Hygiene geachtet werden muss. Um aufgereinigte RNA ohne solche Enzyme zu erhalten, werden diese bei der RNA-Extraktion entfernt. Zunächst wird das Probenmaterial in einer Guanidinisothiocyanatlösung lysiert. Guanidinisothiocyanat (kurz: GTC) ist ein Salz, das Proteine denaturieren und inaktivieren kann, auch RNasen (Mülhardt, 2009). Zusätzlich ist PVP im Extraktionspuffer enthalten, dessen Wirkung bereits erläutert wurde. Die Zentrifugationsschritte werden bei 4 °C durchgeführt, da die geringe Temperatur den Abbau der RNA und Reaktionen zwischen den Nukleinsäuren und phenolischen Komponenten verringert. Dies unterstützt die Beseitigung der Phenole durch das Chloroform (Gambino et al., 2008).

Hinsichtlich der Extraktionsmethoden lässt sich zusammenfassen, dass eine einfache Extraktion in Wasser nicht für eine zuverlässige Detektion von GLRaV-1 mittels RT-LAMP ausreicht. Inhibitorische Stoffe und RNasen stören die Reaktion und müssen mithilfe einer RNA-Extraktion entfernt werden. Die RNA-Extraktion ist zwar mit etwa

3,5 Stunden Extraktionszeit deutlich zeitaufwändiger als die einfache Extraktion in Wasser (etwa 40 Minuten für 10 Proben), ermöglicht aber mittels RT-LAMP einen sicheren Nachweis von GLRaV-1. Lediglich bei Versuchen mit GFkV zeigt die einfache Extraktion in Wasser zuverlässige Ergebnisse (Frotscher et al., 2021). In diesen Versuchen wurde aber keine RNA-Extraktion verglichen. Für die Rebviren GFLV, GFkV und GLRaV-3 konnte eine LAMP mit einer vorausgehenden RNA-Extraktion bereits erfolgreich eingesetzt werden (Almasi, 2015, 2018; Walsh & Pietersen, 2013). Es wurden dabei Protokolle mit teils kürzeren Detektionszeiten als im Protokoll der vorliegenden Arbeit verwendet. Bei der Detektion von GRBV kann die Extraktion mithilfe einer „pin-prick“-Methode durchgeführt werden, bei der mithilfe einer Pipette Pflanzensaft entnommen wird (Romero Romero et al., 2019). Die Detektion von GFLV und GFkV kann mithilfe einer immunocapture RT-LAMP durch die Kombination mit einer serologischen Methode sogar ohne RNA-Extraktion durchgeführt werden, die Extraktionszeit ist aber länger (Almasi, 2015, 2018). Auch diese Methode könnte bei weiteren, zukünftigen Versuchen mit dem hier gezeigten Kit angewandt bzw. kombiniert werden.

## 5.2 Vergleich von frischen und eingefrorenen Proben

In den Versuchen in Tabelle 9 bis 12 kann grundsätzlich gezeigt werden, dass GLRaV-1 mittels RT-LAMP sowohl im Blatt als auch im Holz nachweisbar ist. Der optimale Zeitpunkt der Probennahme von Holz- und Blattproben zur Detektion von Rebviren ist bereits in vielen Versuchen untersucht worden und wurde in 5.1 aufgeführt. Das Sammeln der Holzproben erfolgte nach dem Blattfall im Winter. Die Blätter wurden teilweise im August, einige aber auch im Mai und Juli gesammelt. Dies ist gegenüber des optimalen Zeitpunkts zum Ende der Saison (Bioreba, 2018; Gambino & Gribaudo, 2006; Osman et al., 2018) etwas früh. Jedoch stammen die Proben von Topfreben aus dem Gewächshaus, die gegenüber Reben aus dem Weinberg in ihrer jahreszeitlichen Entwicklung generell einige Wochen fortgeschritten sind.

Das Ziel der Versuche zum Holz-Blatt-Vergleich bestand darin, die Lagerfähigkeit des Probenmaterials ohne Verlust der Viruslast zu untersuchen. Dazu wurde ausreichend Holz- und Blattmaterial gesammelt, kurzfristig bei 4 °C gelagert und in verschiedene Fraktionen eingeteilt: eine Hälfte wurde sofort analysiert, die andere Hälfte wurde für mehr als 6 Monate bei -20 °C gelagert. Nach der Extraktion der frisch aufbereiteten Probe, wurde ein Teil dieses Extraktes sofort untersucht, ein Teil des Extraktes eingefroren und erst zu einem späteren Zeitpunkt mittels RT-LAMP analysiert.

Bei den Proben, die mittels RNA-Extraktion aufbereitet wurden, können alle Replikate unabhängig des verwendeten Materials (Holz, Blatt) und der Verarbeitung (frisch, eingefroren, eingefrorener Extrakt) nach spätestens 20 Zyklen als positiv für GLRaV-1 detektiert werden (Tabelle 11 und 12). Auch in diesen Versuchen zeigt sich wieder, dass die Resultate bei RNA-extrahierten Proben deutlich besser und zuverlässiger sind als bei Proben, die mittels einfacher Wasserextraktion aufbereitet wurden. Die Gründe dafür wurden bereits herausgestellt. Um Unterschiede hinsichtlich der Lagerfähigkeit der Proben zu ermitteln, müssen demnach die Ergebnisse der anderen, weniger zuverlässigeren Methode verglichen werden.

Bei der einfachen Extraktion in Wasser zeigten sich Unterschiede zwischen Holz- und Blattproben, sowie zwischen der Aufbewahrungsart bzw. Lagerung und naturgemäß den verschiedenen Proben. Zunächst wird lediglich auf die Holzproben eingegangen. Wie auch

bei der RNA-Extraktion wurden die (als Holzextrakt im ELISA) schwachen Proben 3 und 6 sowie die starke Probe 4 mittels RT-LAMP gemessen. Die schwache Probe 3 (W3) konnte als Holzprobe in allen Varianten (frisch, eingefrorener Extrakt, eingefrorene Probe) und Wiederholungen bis auf eine Ausnahme positiv detektiert werden (Tab. 9). Die ebenfalls schwache Probe 6 zeigte dagegen Detektionsprobleme beim eingefrorenen Holz (Tab. 10). Die größten Schwierigkeiten zeigten sich aber überraschend bei der starken Probe (W4). Die frische Variante sowie der eingefrorene Extrakt von W4 konnte nur in je einem von drei Replikaten positiv detektiert werden (Tab. 10). Der Nachweis im eingefrorenen Holz war daher in zwei Proben nicht möglich. Zusätzlich dazu zeigen sich Unterschiede zwischen den untersuchten Proben und es kann erneut bestätigt werden, dass von den ELISA-Ergebnissen nicht direkt auf die Virusdetektion der RT-LAMP geschlossen werden kann.

Demnach kann festgestellt werden, dass der Extrakt durch das Einfrieren negativ beeinflusst wird. Die Viren waren in der Holzprobe nach dem Einfrieren nicht mehr nachweisbar. Es können Abbauprozesse, z. B. durch RNasen, über die lange Aufbewahrungsdauer vermutet werden. In der Literatur ist jedoch kein Hinweis auf einen Abbau bei einer längeren, aber gekühlten Lagerung zu finden. Eine Aufbewahrung von Holzproben bei -20 °C bzw. -80 °C wird sogar empfohlen, wenn nicht frisch detektiert werden kann (Blouin et al., 2017; Kogovšek et al., 2015). Holzproben sollten daher besser frisch getestet oder zumindest aufbereitet und der Extrakt eingefroren werden. Schaut man sich die Ergebnisse der Lagerung von Blattmaterial bzw. Blattextrakten an (Tab. 9 und 10), so konnte auch an frischen Blättern, ähnlich wie beim Holz, in den meisten Proben GLRaV-1 mittels RT-LAMP zuverlässig nachgewiesen werden. Der eingefrorene Extrakt erlaubt ebenfalls eine zuverlässige Detektion (außer bei Probe 4). Ebenso wie beim Holz, konnte auch in eingefrorenem Blattmaterial kein GLRaV-1 mehr detektiert werden. Es zeigt sich, dass für die Detektion von GLRaV-1 am besten frisch aufbereitete Blätter verwendet werden sollen. Auch hier könnten RNasen die Virus-RNA abgebaut haben, sodass diese nach Aufbereitung mittels Wasserextraktion nicht mehr nachgewiesen werden können. Ein kompletter Abbau hat nicht stattgefunden, da die Viren mittels RNA-Extraktion noch in Holz und Blatt nachweisbar waren. Ist eine frische Testung nicht möglich, könnten die Proben mittels Calciumchlorid getrocknet und bei -80 °C aufbewahrt werden (Almasi, 2015).

### 5.3 Validierung und Vergleich mit anderen Methoden

Für die Überprüfung der Validierung der RT-LAMP wurde die Methode hinsichtlich der Spezifität der Primer und der Sensitivität getestet. Die Zuverlässigkeit des Tests konnte bereits anhand und ausschließlich mit RNA-extrahierten Proben gezeigt werden.

Zur Ermittlung der Primerspezifität wurden Proben untersucht, die mit GLRaV-1 und/oder anderen Viren (GLRaV-2, -3, GfKV, GVA, GVB, ArMV, GFLV) infiziert waren. Alle Proben, die zuvor mittels ELISA als positiv für GLRaV-1 ermittelt wurden, konnten auch mit der LAMP positiv nachgewiesen werden (Abb. 13). Die verwendeten LAMP-Primer detektierten spezifisch die GLRaV-1 kranken Proben, das heißt sie zeigten keine Reaktionen mit Sequenzabschnitten anderer Virussequenzen. Jedoch ist zu erwähnen, dass es im ersten Durchgang Probleme bei der Detektion gab (nicht dargestellt). Alle Proben, also auch die ohne GLRaV-1-Infektion, zeigten dabei einen eindeutigen Anstieg der Fluoreszenz. Da aber auch die negativen Kontrollen einen Anstieg verzeichneten, wurde eine Kontamination des Wassers oder der Raumluft im Labor vermutet und der Versuch wiederholt. Generell ist die RT-LAMP sehr anfällig gegenüber Kontaminationen und falschpositiven Ergebnissen (Walsh & Pietersen, 2013). Dies bestätigte sich in diesem Beispiel.

Die hohe Variation in der RNA-Sequenz des GLRaV-1-Virus stellt ein weiteres Problem dar, das den Nachweis von GLRaV-1 erschwert. Der Grund für die große Variation ist ein geringer selektiver Druck der meisten Viren (Little et al., 2001). In einem Weinberg können viele unterschiedliche Variationen vorhanden sein (Le Maguet et al., 2013). Je nachdem wie die Sequenzunterschiede sind, ist es möglich, dass die Primer die Varianten nicht erkennen können. Das Primerdesign vom Mast Isoplex Kit basiert aber auf den zu dieser Zeit 50 vorhandenen GLRaV-1-Sequenzen aus der GeneBank, sodass möglichst alle Varianten abgedeckt werden. Die Primerspezifität konnte demnach auch für die im Versuch angewandten Proben bestätigt werden.

Ein weiterer, zu berücksichtigender Punkt, um die routinemäßige Einsetzbarkeit der RT-LAMP zu beleuchten, stellt die Frage der Detektion in Mischproben dar. Ist das Primersystem in der Lage auch in Mischproben aus gesunden Pflanzen eine untergemischte GLRaV-1 infizierte Proben zu detektieren, eignet sich die Methode für

routinemäßige, größere Testreihen. Dazu wurden unterschiedlich viele gesunde Proben mit einer kranken Probe gemischt und diese Mischproben in der RT-LAMP untersucht. Die Ergebnisse in Tabelle 13 zeigen, dass maximal eine Probe unter neun negativen (1+9 bzw. 1:10) bei Probe R12 detektiert werden konnte. Dies war aber auch nur in einer der beiden Wiederholungen der Fall, also nur mit einer sehr geringen Sicherheit. Bei den anderen Proben liegt der Endpunkt bei 1+4 (R13) und bei 1 bzw. 1+2 (R14). Trotz der Tatsache, dass es sich bei der Probe R14 um eine starke ELISA-Probe handelt, konnte diese als Mischprobe in einer Wiederholung nicht mittels der hier eingesetzten LAMP-Primer nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass trotz der RNA-Extraktion und einer Aufkonzentrierung der Templatmenge nur eine geringe Empfindlichkeit des Primersystems vorliegt. Die Verwendung von Mischproben zur Verringerung von Aufwand und Kosten ist bei diesem Protokoll daher derzeit nicht zu empfehlen. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig bzw. müssten weitere RT-LAMP-Primer synthetisiert werden und deren Spezifität untersucht werden.

In der Literatur gibt es keine Arbeiten zum GLRaV-1 Nachweis mittels RT-LAMP. Allerdings finden sich Informationen zu solchen Tests bei GLRaV-3. In einer Mischprobe von 49 gesunden Proben konnte eine GLRaV-3 infizierte Pflanze noch nachgewiesen werden (Walsh & Pietersen, 2013). Eine solch hohe Empfindlichkeit des Tests kann bei GLRaV-1 und den Versuchen in dieser Arbeit (Tab. 13) nicht bestätigt werden. Grundsätzlich kann man mit gemischten Proben schneller und günstiger eine größere Anzahl an Proben messen. Es ist jedoch so, dass dieses sogenannte Pooling in einer geringeren Empfindlichkeit des Tests resultiert (Brinkhof et al., 2007).

Generell zeigt sich, dass das Protokoll der RT-LAMP wiederholbar und reproduzierbar ist. Zuvor im ELISA positiv für das Virus getestete Proben konnten auch in der RT-LAMP in mehreren Replikaten, biologischen sowie technischen Wiederholungen, an verschiedenen Tagen, in unterschiedlichem Probenmaterial und in verschiedenen Messgeräten positiv detektiert werden. Jedoch können auch hier die Grenzen der Methode aufgezeigt werden. Es gibt teilweise große Unterschiede zwischen den Ergebnissen von biologischen und technischen Wiederholungen. Ein Beispiel dazu gibt es im Mischprobenversuch aus Tabelle 13. Probe R12 konnte in der ersten biologischen Wiederholung bis zu einem Verhältnis von 1:10 noch eindeutig positiv detektiert werden. In der zweiten Wiederholung

liegt der Endpunkt nur bei 1:5. Dies könnte an der bereits erklärten, zu geringen Viruskonzentration bzw. ungleichmäßigen Verteilung der Viren innerhalb der Phloemzellen liegen (Chooi et al., 2016).

Eine weitere Möglichkeit könnte in der Spezifität des Primers begründet liegen. Bei Sequenzunterschieden zwischen Varianten ist es möglich, dass die Primer nicht ganz angepasst an die Zielsequenzen sind, sprich diese nicht passgenau zu den Basenpaaren sind. Zwar wurde beim Primerdesign bereits eine große Bandbreite an Sequenzen abgedeckt, vermutlich waren es nicht alle. Auch Mutationen an den Primerbindungsstellen können für falschnegative Ergebnisse verantwortlich sein (Frotscher et al., 2021). Für die Zukunft wäre daher die Synthese von weiteren Primerpaaren mit leicht abweichenden Zielsequenzen wichtig, um die Spezifität und Sensitivität des Tests mittels LAMP zu weiter zu optimieren. Auch Hemmungen durch RNasen könnten der Grund für die mangelnde Testsicherheit in diesem Versuch sein. Für eine sichere, zuverlässige Detektion von Mischproben ist die Methode daher noch unzureichend. Demnach müssten weitere Optimierungen des Protokolls, z. B. der Zusatz von RNase-Inhibitoren bei der Extraktion, vorgenommen werden.

Die Sensitivität der Methode wurde auch mithilfe von Verdünnungsreihen in der Arbeit bestimmt. Dieselben Proben, die im ELISA als schwach positiv detektiert wurden, wurden mit drei unterschiedlichen Methoden (RT-LAMP, RT-PCR und DAS-ELISA) aufbereitet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Nachweisgrenzen im DAS-ELISA (Tab. 14) lagen maximal bei  $10^{-1}$  und zwar bei Probe E5, die in diesem ELISA sehr schnell eine hohe Extinktion erreichte. E5 war bei einem Test zu einem früheren Zeitpunkt eher schwach-positiv (Tab. 2). Die Probe E6 kann nur unverdünnt und E15 im ELISA sogar (abgesehen von den Vorversuchen) gar nicht positiv detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse mit einer Sensitivität von  $10^{-1}$  fand auch Hildebrand (2017) für GLRaV-1.

Die Sensitivität der RT-LAMP (Tab. 15) ist dagegen bei allen Proben höher. Hier konnte die Probe R5 noch bei einer Verdünnung von  $10^{-3}$  detektiert werden. Der Endpunkt für R6 liegt sogar bei  $10^{-4}$  und R15 konnte nur unverdünnt gemessen werden. Arbeiten bzgl. der Sensitivität anderer Rebviren zeigen eine ähnlich hohe Sensitivität der Primersysteme. Für GFkV liegt der Endpunkt bei  $10^{-2}$ , für GRSPaV (Grapevine rupestris stem pitting-

associated virus) bei  $10^{-4}$  (Fan et al., 2013). Generell wird die Empfindlichkeit der RT-LAMP höher als die des DAS-ELISA angegeben (Frotscher et al., 2021; Notomi et al., 2015; Walsh & Pietersen, 2013), was auch hier bestätigt werden kann. Zusätzlich ist zu beachten, dass die Nachweisgrenze von Probe zu Probe unterschiedlich und demnach abhängig von der Viruskonzentration in der jeweiligen Probe ist, was bereits in 5.1 erläutert wurde.

Die Proben 5, 6 und 15 wurden auch mittels RT-PCR detektiert (Tab. 16). Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der RT-PCR werden im Allgemeinen zwei Kriterien herangezogen. Zum einen muss sich der CP-Wert um den Wert 3,32 von der vorherigen Verdünnungsstufe unterscheiden (Ginzinger, 2002). Dem ist so, da bei einer idealen Effizienz der PCR von 2 der Wert von  $2^{3,32}$  gleich 10 entspricht (Hildebrand, 2017). Zum anderen muss sich der gemittelte CP-Wert auf einem Signifikanzniveau von 95 % von der NTC als Nullkontrolle unterscheiden (Bustin et al., 2009). Anhand Tabelle 16 kann festgestellt werden, dass bei der Probe P5 und einer Verdünnung von  $10^{-5}$  beide Kriterien nicht mehr erfüllt werden können: die Differenz liegt unter dem Idealwert und auch der p-Wert liegt mit 0,5672 deutlich über der Grenze von 0,05. Demnach konnte diese Probe bis zu einer Verdünnung von  $10^{-4}$  noch sicher detektiert werden. Die Nachweisgrenze von Probe P6 liegt sogar bei  $10^{-5}$ , die von P15 jedoch nur bei  $10^{-1}$ . Im Vergleich zu den Ergebnissen beim DAS-ELISA und der RT-LAMP ist die RT-PCR damit empfindlicher.

Bei der in diesem Versuch angewandten RT-PCR wurde die Ausgangskonzentration von 300 ng (die Proben wurden immer auf 100 ng/ $\mu$ l verdünnt und davon 3  $\mu$ l eingesetzt) in 10er-Schritten verdünnt. Demnach konnten bei Probe P5 noch 30 pg, P6 3 pg und bei P15 30 ng RNA sicher nachgewiesen werden. In einem Versuch zur Bestimmung der Empfindlichkeit der RT-PCR bei GLRaV-2 wurde RNA mit einer Konzentration von 12,5 ng pro Reaktion in unterschiedlichen Stufen verdünnt. Bis zu einer 1.000-fachen ( $10^3$ ) Verdünnung konnte das Virus noch nachgewiesen werden (Beuve et al., 2007). Es konnte also noch eine RNA-Menge von 0,0125 ng bzw. 12,5 pg nachgewiesen werden. Bei Probe 5 und 6 sind diese Werte vergleichbar.

In dieser Arbeit kann bestätigt werden, dass die Sensitivität der RT-LAMP zwar geringer ist als die der RT-PCR, aber höher als die des DAS-ELISAs. Die Methoden unterscheiden

sich zusätzlich in Zeitaufwand und Kosten für die Durchführung. Der Arbeitsablauf der RT-LAMP setzt sich aus der Probenextraktion, der Herstellung des Mastermix (etwa 20 Minuten), der Probenzugabe (etwa 20 Minuten) und der eigentlichen Messung (60 Minuten) zusammen. Für die Extraktion werden je nach Methode zwischen 40 Minuten und 3,5 Stunden für 10 Proben benötigt. Für eine RT-LAMP mittels einfacher Extraktion in Wasser (W) oder Extraktion mit Beads (B) werden aufgrund der kürzeren Extraktionszeiten insgesamt nur etwa 3,5 Stunden benötigt, also genauso viel wie allein für die RNA-Extraktion nach Gambino benötigt wird. Da aber durch Wasserextraktion oder den Einsatz der Beads keine zuverlässige Detektion erreicht werden konnte, ist eine RT-LAMP mit RNA-Extraktion trotz des höheren Aufwands klar vorzuziehen. Mit dieser Methode ist ein Ergebnis nach etwa 5,5 Stunden vorhanden. Damit ist die RT-LAMP trotzdem noch schneller als die RT-PCR, bei der die Umschreibung der cDNA die Dauer auf knapp 7 Stunden verlängert. Etwa 10 Stunden wurden bei einer Real-Time-PCR für die Detektion von FD (flavescence dorée) benötigt (Kogovšek et al., 2015). Mit Abstand die längste Zeit wird für den DAS-ELISA benötigt (2 Tage). Jedoch ist zu erwähnen, dass in den Wartezeiten auch weitere Tätigkeiten erledigt werden können. Zu berücksichtigen bleibt allerdings, dass in einem ELISA beim Ansatz von Doppelbestimmungen in einem Arbeitsgang 46 Proben untersucht werden können, wodurch bei großen Untersuchungen Zeit eingespart werden kann.

Das Protokoll bildet eine gute Basis, um an der Optimierung der Testsysteme zu arbeiten, um in Zukunft auch bei Mischproben zuverlässige Ergebnisse erzielen zu können. Die Durchführungszeit könnte noch verkürzt werden, da der Cut nach 30 Zyklen gemacht wird und die Amplifikationszeit somit nur ca. eine halbe Stunde beträgt. In zukünftigen Versuchen sollte man sich darauf fokussieren die Extraktionszeit zu verkürzen, um die RT-LAMP als Schnellmethode etablieren zu können. In Zukunft könnten auch andere Detektionsmethoden Verwendung finden. Zum Beispiel könnte man, wie bei Almasi (2015) eine visuelle Detektion mittels bestimmter Farbstoffen durchführen und so die Anschaffung teurer Analysegeräte umgehen. Auch weitere spezifische Primer für andere Rebviren sind bereits entwickelt worden, sodass das hier vorgestellte Protokoll auch zum Nachweis anderer Viren Verwendung finden kann. Auch eine Multiplex-RT-LAMP ist denkbar, aber schwierig und komplex im Essayaufbau. Dafür müsste neben der Zugabe von weiteren Gensequenzen auch eine Detektion auf einem weiteren Farbkanal erfolgen.

## 5.4 Vergleich der Messgeräte

Um Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität der Messgeräte zu überprüfen, wurden die Proben W1, W2 und R1 sowohl im Lightcycler als auch im ESEquant amplifiziert und gemessen. In beiden Geräten konnte die Probe W1 in allen Replikaten und unabhängig der Verdünnungsstufe als positiv für GLRaV-1 nachgewiesen werden (Abb. 14). Bei der Detektion der Probe W2 dagegen zeigten sich in beiden Geräten auch negative Replikate und damit Schwierigkeiten bei der Detektion. Hierbei konnte der ESEquant mehr Replikate (12 von 18 Replikate, Abb. 15) als virusbelastet nachweisen als der Lightcycler (5 von 27 Replikaten, Abb. 8-10). Es wurde hier bei beiden Messgeräten mit der weniger zuverlässigeren Wasser-Extraktionsmethode (W) gearbeitet. Dies erklärt sicherlich die vielen negativen Ergebnisse. Hier besteht weiterer Analysebedarf. Grundsätzlich sind beide Geräte für den Einsatz in der RT-LAMP einsetzbar, wobei der ESEquant offensichtlich einen empfindlicheren Nachweis ermöglicht, was mit Hilfe von Verdünnungsreihen belegt werden konnte.

Die Probe R1, die im ELISA einen hohen Faktor aufweist und mittels RNA-Extraktion aufbereitet wurde, wurde in verschiedenen Stufen in Wasser verdünnt und erneut in beiden Geräten gemessen (Abb. 16-19). Die letzte sichere Verdünnung, bei der ein eindeutiges positives Signal nachgewiesen werden konnte, liegt beim Lightcycler bei 1:2.000 in der ersten Wiederholung und (Abb. 16) und 1:4.000 in der zweiten Wiederholung (Abb. 18). Im ESEquant konnten noch bei einer Verdünnung von 1:8.000 Viruspartikel sicher nachgewiesen werden (Abb. 19).

Hinsichtlich der Sensitivität zeigt sich der ESEquant damit nach den besseren Ergebnissen bei der Messung von Probe W2 und der höheren Nachweisgrenze bei den Verdünnungsreihen mit R1 sensitiver als der Lightcycler und kann demnach auch geringere Titer besser nachweisen als der Lightcycler. Die geringere Empfindlichkeit beim Lightcycler zeigte sich auch bei Versuchen von Frotscher am Institut (nicht veröffentlicht), bei welchen der hier verwendete Cyclus schlechtere Ergebnisse brachte. Es bleibt unklar, warum dieses Gerät weniger empfindlich hinsichtlich der Detektion der Fluoreszenz ist. Zudem zeigte sich bei einigen Tests (z. B. Abb. 6), dass es Probleme im Cyclus bei der Detektion der genauen Ermittlung der Fluoreszenzwerte gibt, die sich als stark streuende Messpunkte erkennbar machten.

Neben der Empfindlichkeit unterscheiden sich die beiden Geräte noch in anderen Punkten. Zum einen hat der Lightcycler den Vorteil, dass er auch eine Schmelzkurve abbilden kann. Diese wird benötigt, um zu zeigen, ob Primerdimere gebildet wurden oder die Primer spezifisch binden. Bei unspezifischen Amplifikationen können dann LAMP-Produkte gebildet werden, deren Schmelzpunkt über- oder unterhalb liegen (Ahmed et al., 2017). Der Schmelzpunkt der Produkte, die bei der Reaktion für die Detektion von GLRaV-1 mit der RT-LAMP entstehen, liegt bei etwa 86 °C (Abb. 5-7). Unspezifische Reaktionen, die einen anderen Schmelzpunkt besitzen, können so ausfindig gemacht werden. Dies ist beispielsweise dann hilfreich, wenn die negativen Kontrollen einen frühen Anstieg der Amplifikationskurve zeigen. Dies ist z. B. in Abbildung 5 der Fall. Da aber der Schmelzpunkt der NTC geringer als der der positiven Kontrolle und Probe ist, kann hier von einer unspezifischen Reaktion der Primer ausgegangen werden und die Kontrolle als eindeutig negativ eingestuft werden. Der ESequant kann keine Schmelzkurve erstellen, sodass die Anstiege von negativen Kontrollen, wie z. B. in den Abbildungen 17 und 19, nicht als unspezifisch gewertet werden können.

Gegenüber dem ESequant hat der Lightcycler zwar einen deutlich höheren Anschaffungspreis, er kann aber für viele unterschiedliche Untersuchungen (z. B. RT-PCR) verwendet werden. Zum anderen hat der Lightcycler dahingehend Vorteile, dass er mit 96 Wells ein großes Platzangebot für Proben hat. Dadurch können zeitgleich mehr Proben gemessen werden und so Zeit und Kosten gespart werden. Im ESequant ist lediglich Platz für 12 Replikate. Wenn man bedenkt, dass die Proben mindestens in Duplikaten gemessen und mit drei Kontrollen verglichen werden müssen, ist das Gerät für größere Testreihen ungeeignet. Aufgrund der größeren Testkapazität und der Möglichkeit unspezifische Proben mithilfe der Schmelzkurve zu erkennen, wurde in den hier gezeigten Versuchen die Proben hauptsächlich im Lightcycler gemessen. Aufgrund der Aufreinigung des Targets durch die RNA-Extraktion können damit trotz einer geringeren Empfindlichkeit zuverlässige Ergebnisse erzielt werden. Für eine schnelle Messung einzelner weniger Proben ist der ESequant jedoch aufgrund der höheren Empfindlichkeit vorzuziehen.

## 5.5 Fazit

Eine zuverlässige und schnelle Detektion von GLRaV-1 ist mittels RT-LAMP und vorangestellter RNA-Extraktion möglich. Mithilfe dieser Methode können Viren sowohl aus Blatt- als auch Holzproben nachgewiesen werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Probenmaterial nach der Aufbereitung direkt gemessen oder der Extrakt nach einer Lagerung bei  $-20\text{ °C}$  gemessen wird. Auch nicht aufgearbeitetes, eingefrorenes Probenmaterial, das ca. ein halbes Jahr bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt wurde, kann noch positiv detektiert werden. Eine sofortige Extraktion und Testung ist jedoch vorzuziehen, um den Virustiter nicht negativ zu beeinflussen.

Das Virus kann bis zu einer Verdünnung von  $10^{-3}$  noch erfolgreich nachgewiesen werden. Für die Detektion kann die RT-LAMP sowohl im Lightcycler als auch in kleineren Tubescannern wie dem ESequant erfolgen. Für kleinere Probenmengen eignet sich der ESequant aufgrund seiner höheren Empfindlichkeit besser. Bei größeren Ansätzen sollte der Lightcycler wegen des Platzangebots von 96 Wells und auch aufgrund der Möglichkeit, dass mittels einer Schmelzkurve falschpositive Proben erkannt werden können, bevorzugt werden. Generell kann die Tatsache, dass die Ergebnisse der LAMP einfach auszuwerten sind (Kogovšek et al., 2015), bestätigt werden. Gegenüber dem DAS-ELISA als Routineverfahren bei der Gesundheitsselektion, das standardmäßig auch am Institut für Rebenzüchtung in Geisenheim zur Virusdetektion eingesetzt wird, ist die RT-LAMP schneller, empfindlicher und ebenfalls zuverlässig. Allerdings ist die Methode deutlich störanfälliger und zum jetzigen Zeitpunkt für größere Testreihen mit Mischproben noch nicht zuverlässig genug. Im Vergleich zur RT-PCR ist die RT-LAMP zwar schneller, aber nicht ganz so empfindlich.

Neben diesen Möglichkeiten, die die RT-LAMP bei der Virusdetektion bietet, konnten auch die Grenzen der Methode aufgezeigt werden. Zunächst ist das System sehr störanfällig, was zu falschpositiven Ergebnissen führt. Dieses Problem tritt allgemein bei der LAMP auf (Fischbach, 2017; Walsh & Pietersen, 2013) und stellt einen deutlichen Kritikpunkt der Methode zum jetzigen Zeitpunkt dar. Mithilfe der Erstellung einer Schmelzkurve ist dieses Problem zwar einfach zu erkennen, aber nicht zu verhindern. Trotz sorgfältigem Arbeiten, räumlicher Trennung von Mastermix-Ansatz und Probenzugabe sowie die Aufrechterhaltung der Hygienestandards im Labor, können

Kontaminationen bei dieser wenig robusten Detektionsmethode nicht ausgeschlossen werden. Die Robustheit des Systems (Francois et al., 2011) kann nicht bestätigt werden.

Grundsätzlich ist die RT-LAMP schnell, einfach durchzuführen und es werden keine speziellen Gerätschaften benötigt (Notomi et al., 2015). Da jedoch eine RNA-Extraktion anstelle der einfachen Extraktion in Wasser aufgrund der unsicheren Ergebnisse vorzuziehen ist, ist die Schnelligkeit und Einfachheit der Methode nicht mehr gegeben. Des Weiteren zeigen sich in den Ergebnissen große Streuungen hinsichtlich der Empfindlichkeit (von  $10^0$  bis  $10^{-3}$ ) und zwischen biologischen Wiederholungen. Generell könnte die Methode zukünftig, nach weiteren Optimierungen zur Detektion nicht nur von GLRaV-1, sondern verschiedener Viren eingesetzt werden. Die RT-LAMP hat vielleicht eine Zukunft am Institut, wenn es um eine schnelle Überprüfung von kritischen ELISA-Ergebnisse geht oder ein zweites System eingesetzt werden soll.

## 6 Zusammenfassung

Die Blattrollkrankheit gehört zu den wirtschaftlich bedeutendsten Krankheiten der Rebe weltweit (DLR Mosel, 2021). Die am häufigsten vorkommenden Blattrollviren sind GLRaV-1 und -3 (Meng et al., 2017). Da die Übertragung über infiziertes Pflanzgut erfolgen kann und keine direkte Bekämpfung im Bestand möglich ist (Naidu et al., 2014), schreibt die Rebenpflanzgutverordnung in Deutschland zur Kontrolle der Blattrollkrankheit eine Gesundheitsselektion des Rebpflanzguts vor. Zur Erzeugung von gesundem Pflanzgut müssen diese auf die fünf am häufigsten vorkommenden Virusarten getestet werden (RebPflV 1986, 1986). Da eine visuelle Detektion nicht ausreichend ist, sind für eine erfolgreiche Kontrolle der Krankheit zuverlässige Detektionsmethoden unabdingbar. Der DAS-ELISA, der routinemäßig in den meisten Teststationen verwendet wird, ist eine robuste, aber zeitaufwändige Methode. Die Alternativen zum ELISA sind PCR-Methoden, mit denen eine spezifische und empfindliche Detektion möglich ist (Naidu et al., 2014).

Eine weitere Methode ist die RT-LAMP (reverse transkriptase loop-mediated isothermal amplification method). Dabei handelt es sich um eine Schnellmethode, bei der Virus-Nukleinsäuren bei einer konstanten Temperatur spezifisch amplifiziert werden. Innerhalb weniger Stunden kann die Ziel-RNA bis zu  $10^{10}$ -fach vervielfältigt und visuell, mittels Fluoreszenz oder einer Gelelektrophorese ausgewertet werden (Notomi et al., 2000). Die LAMP gilt als kostengünstig, einfach und schnell (Francois et al., 2011). Für andere Rebviren ist diese Detektionsmethode bereits erfolgreich etabliert worden (Almasi, 2015, 2018; Frotscher et al., 2021; Romero Romero et al., 2019; Walsh & Pietersen, 2013). Bisher wurde jedoch noch kein LAMP-Protokoll zum Nachweis von GLRaV-1 veröffentlicht. Demnach besteht das Ziel dieser Arbeit darin, ein zuverlässiges Protokoll für die Detektion von GLRaV-1 zu etablieren und dabei die Möglichkeiten und Grenzen der Methode zu beleuchten. Zu diesem Zweck wurde Holz- und Blattmaterial von GLRaV-1 infizierten Topfreben des Instituts für Rebenzüchtung, Geisenheim eingesetzt.

Das Ausgangsprotokoll sieht eine einfache Extraktion in Wasser vor. Anschließend wird der Extrakt verdünnt, der Mastermix zu den Proben zugegeben und schließlich erfolgt die Messung der Fluoreszenzamplifikation bei 64 °C in einem Tubescanner. Mittels Extraktion in Wasser konnte jedoch kein zuverlässiger Virusnachweis erzielt werden. Auch die

Versuche inhibitorische Stoffe mittels PVP oder Tris zu entfernen sowie der Einsatz von Nukleinsäure-bindenden Beads zur Aufreinigung führten nicht zu stabileren Ergebnissen in der RT-LAMP. Mithilfe einer RNA-Extraktion nach Gambino konnten inhibitorische Stoffe sowie RNasen entfernt werden, sodass reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten und diese Extraktionsmethode für die weiteren Versuche verwendet wurde.

Der Nachweis von GLRaV-1 war sowohl in frischen als auch in eingefrorenen Holz- und Blattproben nach einer RNA-Extraktion möglich. Da sich der Virustiter bei einer längeren Lagerung bei -20 °C aber verringerte, ist eine Messung frisch gesammelter Proben zu empfehlen. Ferner wurde gezeigt, dass die LAMP-Primer spezifisch für GLRaV-1 detektieren. Allerdings war der Nachweis in Mischproben nicht in allen untersuchten Proben sicher möglich, sodass in schwach infizierten Proben die Nachweissicherheit der RT-LAMP derzeit noch zu gering ist. Hier wäre die Synthese weiterer RT-LAMP-Primersysteme in Zukunft wichtig. Im Vergleich zu anderen Methoden zeigte sich die RT-LAMP mit einer Nachweisgrenze von bis zu  $10^{-4}$  empfindlicher als der DAS-ELISA ( $10^{-2}$ ), aber weniger sensitiv als die RT-PCR ( $10^{-5}$ ). Für die Messung von 10 Proben werden beim DAS-ELISA 2 Tage benötigt. Im Gegensatz dazu sind die RT-PCR (ca. 7 Stunden) und die RT-LAMP (5,5 Stunden) mit deutlich weniger Aufwand verbunden. Beim Vergleich der Messgeräte zeigte sich der kostengünstigere ESequant zwar empfindlicher als der hier eingesetzte Lightcycler. Jedoch können lediglich drei Proben bei Zweifachbestimmung gleichzeitig gemessen werden, sodass er nicht genügend Platz für größere Testreihen wie bei den Tests für die Gesundheitsselektion bietet.

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein Protokoll zur zuverlässigen Detektion von GLRaV-1 mittels RT-LAMP und den Reagenzien aus dem „Mast Isoplex Kit“ etabliert werden. Ferner lag aber in einigen Versuchen eine mangelnde Testsicherheit vor, da die Ergebnisse bei Mehrfachwiederholungen nicht immer reproduzierbar waren. Die RT-LAMP kann als sehr störanfällig beschrieben werden, was auch von weiteren Autoren bestätigt werden kann (Fischbach, 2017; Walsh & Pietersen, 2013). Daher muss die Methode aufgrund der geringeren Empfindlichkeit bei Mischproben und der Anfälligkeit für Kontaminationen noch verbessert werden. In weiterführenden Untersuchungen wäre ein möglicher Weg, die Extraktionszeit weiter zu verkürzen und durch die Synthese weiterer LAMP-Primer für GLRaV-1 die Methode zu verbessern, um zu einer höheren Nachweissicherheit bei gleichzeitiger Verkürzung der Testzeit zu gelangen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmed, F., Gouda, M., Hussein, L., Ahmed, N., Vos, P. & Mohammad, M. (2017). Role of Melt Curve Analysis in Interpretation of Nutrigenomics' MicroRNA Expression Data. *Cancer Genomics & Proteomics*, 14(6), 469–481.  
<https://doi.org/10.21873/cgp.20057>
- Almasi, M. (2015). Establishment and Application of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Grapevine Fanleaf Virus. *Molecular biology*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2168-9547.1000149>
- Almasi, M. (2018). Development of reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay for visual detection of Grapevine fleck virus (GFkV). Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.5073/VITIS.2018.57.125-128> (125-128 Pages / VITIS - Journal of Grapevine Research, Vol 57 No 4 (2018): Vitis / VITIS - Journal of Grapevine Research, Vol 57 No 4 (2018): Vitis).
- Atallah, S. S., Gomez, M. I., Fuchs, M. F. & Martinson, T. E. (2012). Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(1), 73–79.  
<https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11055>
- Basso, M., Fajardo, T. & Saldarelli, P [Pasquale] (2017). Grapevine virus diseases: Economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(1). <https://doi.org/10.1590/0100-29452017411>
- Beuve, M., Sempé, L. & Lemaire, O. (2007). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. *Journal of virological methods*, 141(2), 117–124.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.042>
- Bioreba. (2014). *ELISA Data Analysis*.  
<https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/374O357O340O370O356O369O350O321>

O360O366O369O356O353O352O350O320O326O/ELISA\_Data\_Analysis.pdf, zuletzt aufgerufen: 23.4.2021

Bioreba. (2017). *Technische Information: Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA): Testvorschrift*.  
[https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/374O357O340O370O356O369O350O321O360O366O369O356O353O352O350O320O326O/ELISA\\_test\\_procedure\\_e\\_f\\_d.pdf](https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/374O357O340O370O356O369O350O321O360O366O369O356O353O352O350O320O326O/ELISA_test_procedure_e_f_d.pdf),  
zuletzt aufgerufen: 24.4.2021

Bioreba. (2018). *Product Information: ELISA Tests for Grapevine Pathogens*.  
[https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/374O357O340O370O356O369O350O321O360O366O369O356O353O352O350O320O326O/Pathogens\\_of\\_grapevines\\_2.pdf](https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/374O357O340O370O356O369O350O321O360O366O369O356O353O352O350O320O326O/Pathogens_of_grapevines_2.pdf),  
zuletzt aufgerufen: 24.4.2021

Blaisdell, G. K., Cooper, M. L., Kuhn, E. J., Taylor, K. A., Daane, K. M. & Almeida, R. P. P [Rodrigo P. P.] (2016). Disease progression of vector-mediated Grapevine leafroll-associated virus 3 infection of mature plants under commercial vineyard conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 146(1), 105–116.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-016-0896-8>

Blouin, A., Chooi, K. M., Cohen, D. & MacDiarmid, R. (2017). Serological Methods for the Detection of Major Grapevine Viruses. In B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino & M. Fuchs (Hrsg.), *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management* (S. 409–425). Springer. ISBN 978-3-319-57706-7

Boscia, D., Greif, C., Gugerli, P., Martelli, G. P [G. P.], Walter, B. & Gonsalves, D. (1995). Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. *Vitis*, 34, 171–175.

Brinkhof, J., Houwers, D. J. & van Maanen, C. (2007). Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. *Small Ruminant Research*, 70(2-3), 194–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.03.003>

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, *55*(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chooi, K. M., Cohen, D. & Pearson, M. N. (2016). Differential distribution and titre of selected grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants within grapevine rootstocks. *Archives of virology*, *161*(5), 1371–1375. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2791-1>
- Constable, F. E., Connellan, J., Nicholas, P. & Rodoni, B. C. (2012). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays and reverse transcription-polymerase chain reaction for the reliable detection of Australian grapevine viruses in two climates during three growing seasons. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *18*(2), 239–244. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00188.x>
- Constable, F. E., Connellan, J., Nicholas, P. & Rodoni, B. C. (2013). The reliability of woody indexing for detection of grapevine virus-associated diseases in three different climatic conditions in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *19*(1), 74–80. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00204.x>
- Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarski, E. B. & Fox, A. J. (2000). Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of clinical microbiology*, *38*(5), 1747–1752. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1747-1752.2000>
- Cretazzo, E., Padilla, C., Carambula, C., Hita, I., Salmerón, E. & Cifre, J. (2010). Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan grapevine cultivars in field conditions. *Annals of Applied Biology*, *156*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00355.x>
- Daane, K. M., Almeida, R. P. P [Rodrigo P. P.], Bell, V. A., Walker, J. T. S., Botton, M., Fallahzadeh, M., Mani, M., Miano, J. L., Sforza, R., Walton, V. M. & Zaviezo, T. (2012). Biology and Management of Mealybugs in Vineyards. In N. J. Bostanian

- (Hrsg.), *Arthropod management in vineyards: Pests, approaches, and future directions* (S. 271–307). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7_12). ISBN 978-94-007-4032-7
- DLR Mosel. (2021). *Integrierter Weinbau - Rahmenempfehlungen 2021*.  
[https://www.dlr.rlp.de/Internet/global/themen.nsf/\(Web\\_P\\_WB\\_Rebschutz\\_XP\)/FB5053082B0314E6C12585540038C389/\\$FILE/Integrierter%20Weinbau%20Rahmenempfehlungen%202021\\_DLR.pdf](https://www.dlr.rlp.de/Internet/global/themen.nsf/(Web_P_WB_Rebschutz_XP)/FB5053082B0314E6C12585540038C389/$FILE/Integrierter%20Weinbau%20Rahmenempfehlungen%202021_DLR.pdf), zuletzt aufgerufen: 2.2.2021
- Eiken Chemical (Hrsg.). (2005). *The principle of LAMP method*.  
<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>, zuletzt aufgerufen: 12.5.2021
- EPPO (2016). PM 7/079 (2) Grapevine flavescence dorée phytoplasma. *EPPO Bulletin*, 46(1), 78–93. <https://doi.org/10.1111/epp.12280>
- EPPO (2018). PM 3/85 (1) Inspection of places of production – Vitis plants for planting. *EPPO Bulletin*, 48(3), 330–349. <https://doi.org/10.1111/epp.12502>
- Espinoza, C., Vega, A [A.], Medina, C., Schlauch, K., Cramer, G. & Arce-Johnson, P [P.] (2007). Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. *Functional & integrative genomics*, 7(2), 95–110.  
<https://doi.org/10.1007/s10142-006-0031-6>
- Esteves, F., Teixeira Santos, M., Eiras-Dias, J. E. & Fonseca, F. (2013). Molecular data mining to improve antibody-based detection of Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1). *Journal of virological methods*, 194(1-2), 258–270.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.004>
- Fan, X., Dong, Y., Zhang, Z., Ren, F., Hu, G. & Zhu, H. (2013). RT-LAMP assay for detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. *Acta Phytopathologica Sinica*(3), 283–293. [https://en.cnki.com.cn/article\\_en/cjfdtotal-zwbl201303010.htm](https://en.cnki.com.cn/article_en/cjfdtotal-zwbl201303010.htm)
- Fischbach, J. (2017). *Isothermale Amplifikationsmethoden für den DNA- und Pyrophosphat-abhängigen Pathogennachweis*. Universität Potsdam.  
<https://publishup.uni-potsdam.de/opus4->

ubp/frontdoor/deliver/index/docId/40607/file/fischbach\_diss.pdf, zuletzt aufgerufen:  
26.5.2021

- Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E.-J., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D. & Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS immunology and medical microbiology*, 62(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>
- Fredricks, D. N. & Relman, D. A. (1998). Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *Journal of clinical microbiology*, 36(10), 2810–2816. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.10.2810-2816.1998>
- Frotscher, J., Strobach, X., Bakheit, M., Bleser, E. & Frischmann, S. (2021). Sensitive, fast and easy detection of Grapevine fleck virus from crude extracts by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Acta Horticulturae*(1307), 339–342. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1307.52>
- Gambino, G., Bondaz, J. & Gribaudo, I. (2006). Detection and Elimination of Viruses in Callus, Somatic Embryos and Regenerated Plantlets of Grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-0004-6>
- Gambino, G. & Gribaudo, I. (2006). Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology*, 96(11), 1223–1229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1223>
- Gambino, G., Perrone, I. & Gribaudo, I. (2008). A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical analysis : PCA*, 19(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology*, 30(6), 503–512. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)

- Golino, D [D.], Wolpert, J., Sim, S., Benz, J., Anderson, M. & Rowhani, A [A.] (2008). Virus Effects on Vine Growth and Fruit Components of Cabernet Sauvignon on Six Rootstocks. *Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference*, 243–244.
- González-González, E., Lara-Mayorga, I. M., Rodríguez-Sánchez, I. P., Zhang, Y. S., Martínez-Chapa, S. O., Santiago, G. T. & Alvarez, M. M. (2021). Colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for cost-effective and quantitative detection of SARS-CoV-2: the change in color in LAMP-based assays quantitatively correlates with viral copy number. *Analytical methods : advancing methods and applications*, 13(2), 169–178. <https://doi.org/10.1039/d0ay01658f>
- Gugerli, P. (2009). 25 years of serological identification of Grapevine leafroll-associated viruses: anti-serum and monoclonal antibodies to GLRaV-1 to GLRaV-9. *Proceedings of the 16th congress of ICVG 31 August– 4 September (Dijon: Le Progres Agricole et Viticole)*, 24–28.
- Gugerli, P., Brugger, J. J. & Bovey, R. (1984). L'enroulement de la vigne : mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*(16), 299–304.
- Gutha, L. R., Casassa, L. F., Harbertson, J. F. & Naidu, R. A. (2010). Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology*, 10, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-187>
- Herrbach, E., Alliaume, A., Prator, C. A., Daane, K. M., Cooper, M. L. & Almeida, R. P. P [R. P. P.]. (2017). Vector Transmission of Grapevine Vector Transmission of Grapevine Leafroll-Associated Viruses. In B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino & M. Fuchs (Hrsg.), *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*. Springer. 483-504. ISBN 978-3-319-57706-7

- Hildebrand, H. (2017). *Untersuchungen zur Vollständigkeit der Virusbefreiung durch somatische Embryogenese bei Weinreben* [Bachelorarbeit]. Hochschule Geisenheim, Geisenheim.
- Ipach, U. (2014). *Gesundheitsselektion im Weinbau*.  
[https://www.dlr.rlp.de/Internet/global/themen.nsf/Web\\_P\\_Pfs\\_Weinbau\\_Kat\\_XP/51F39F13971AF799C12578710035A045/\\$FILE/Gesundheitsselektion-im-Weinbau-2014.pdf](https://www.dlr.rlp.de/Internet/global/themen.nsf/Web_P_Pfs_Weinbau_Kat_XP/51F39F13971AF799C12578710035A045/$FILE/Gesundheitsselektion-im-Weinbau-2014.pdf), zuletzt aufgerufen: 20.3.2021
- Ito, T. & Nakaune, R. (2016). Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13. *Archives of virology*, *161*(9), 2555–2559. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2914-8>
- Kogovšek, P., Hodgetts, J., Hall, J., Prezelj, N., Nikolić, P., Mehle, N., Lenarčič, R., Rotter, A., Dickinson, M., Boonham, N., Dermastia, M. & Ravnikar, M. (2015). LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant pathology*, *64*(2), 286–296.  
<https://doi.org/10.1111/ppa.12266>
- Komínek, P. & Bryxiová, M. (2005). Comparison of three techniques for detection of grapevine leafroll-associated virus 1. *Acta virologica*, *49*(1), 37–43.
- Le Maguet, J., Fuchs, J.-J., Chadœuf, J., Beuve, M., Herrbach, E. & Lemaire, O. (2013). The role of the mealybug *Phenacoccus aceris* in the spread of Grapevine leafroll-associated virus –1 (GLRaV-1) in two French vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, *135*(2), 415–427. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0099-x>
- Lee, J. & Martin, R. R. (2009). Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics. *Food chemistry*, *112*(4), 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.065>
- Leinco. (2020). *Sandwich ELISA*. <https://www.leinco.com/wp-content/uploads/2020/05/Sandwich-ELISA-illustration-02.jpg>, zuletzt aufgerufen: 4.4.2021

- Little, A., Fazeli, C. & Rezaian, M. (2001). Hypervariable genes in Grapevine leafroll associated virus 1. *Virus Research*, 80(1-2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00343-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00343-4)
- Little, A. & Rezaian, M. A. (2006). Improved detection of grapevine leafroll-associated virus 1 by magnetic capture hybridisation RT-PCR on a conserved region of viral RNA. *Archives of virology*, 151(4), 753–761. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0649-z>
- López-Fabuel, I., Wetzel, T., Bertolini, E., Bassler, A., Vidal, E., Torres, L. B., Yuste, A. & Olmos, A. (2013). Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *Journal of virological methods*, 188(1-2), 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.034>
- Maliogka, V. I [Varvara I.], Martelli, G. P [Giovanni P.], Fuchs, M. & Katis, N. I [Nikolaos I.] (2015). Control of viruses infecting grapevine. *Advances in virus research*, 91, 175–227. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.002>
- Mannini, F. & Digiario, M. (2017). The Effects of Viruses and Viral Diseases on Grapes and Wine. In B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino & M. Fuchs (Hrsg.), *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management* (S. 453–482). Springer. ISBN 978-3-319-57706-7
- Maree, H. J., Almeida, R. P. P [Rodrigo P. P.], Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V [Valerian V.], Fuchs, M. F., Golino, D. A., Jooste, A. E. C., Martelli, G. P [Giovanni P.], Naidu, R. A., Rowhani, A [Adib], Saldarelli, P [Pasquale] & Burger, J. T. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in microbiology*, 4, 82. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082>
- Martelli, G. P [G. P.] (Hrsg.). (1993). *Graft transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Martelli, G. P [G. P.] (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96(1sup). <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1SUP>

- Martelli, G. P [G. P.]. (2017). An Overview on Grapevine Viruses, Viroids, and the Diseases They Cause. In B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino & M. Fuchs (Hrsg.), *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management* (S. 31–46). Springer. ISBN 978-3-319-57706-7
- Martelli, G. P [G. P.], Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A. A., Al Rwahnih, M., Dolja, V. V [V. V.], Dovas, C. I., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, J. S., Jelkmann, W., Katis, N. I [N. I.], Maliogka, V. I [V. I.], Melzer, M. J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M. E., Rowhani, A [A.], Sabanadzovic, S. & Saldarelli, P [P.] (2012). Taxonomic revision of the Family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94(1).  
<https://doi.org/10.4454/jpp.fa.2012.022>
- Meng, B., Martelli, G. P [Giovanni P.], Golino, D. A. & Fuchs, M. (Hrsg.). (2017). *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*. Springer. ISBN 978-3-319-57706-7
- Rebenpflanzgutverordnung (1986). [https://www.gesetze-im-internet.de/rebpflv\\_1986/RebPflV\\_1986.pdf](https://www.gesetze-im-internet.de/rebpflv_1986/RebPflV_1986.pdf), zuletzt aufgerufen am 20.7.2021
- Monis, J. & Bestwick, R. K. (1996). Detection and Localization of Grapevine Leafroll Associated Closteroviruses in Greenhouse and Tissue Culture Grown Plants. *American Journal of Enology and Viticulture*(47), 199–205.
- Mülhardt, C. (2009). *Molekularbiologie/Genomics* (6. Aufl.). *Experimentator*. Spektrum Akademischer Verlag. <http://d-nb.info/997617799/34> <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2158-6>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263–273.  
<https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>

- Naidu, R., Maree, H. J. & Burger, J. T. (2015). Grapevine leafroll disease and associated viruses: a unique pathosystem. *Annual review of phytopathology*, 53, 613–634. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045946>
- Naidu, R., Rowhani, A [Adib], Fuchs, M., Golino, D. & Martelli, G. P [Giovanni P.] (2014). Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. *Plant disease*, 98(9), 1172–1185. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0880-FE>
- Namba, S., Yamashita, S., Doi, I., Yora, K. & Yano, R. (1979). Grapevine leafrollvirus, a possible member of closteroviruses. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*(45), 497–502.
- New England Biolabs (Hrsg.). (2021). *Tipps für erfolgreiche RNA-Aufreinigungen*. <https://www.neb-online.de/monarch-dna-rna-aufreinigungskits/monarch-total-rna-miniprep-kit/tipps-fuer-erfolgreiche-rna-aufreinigungen/>, zuletzt aufgerufen am 10.7.2021
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. & Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 53(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- O'donnell, K. J. (1999). Plant pathogen diagnostics: present status and future developments. *Potato Research*, 42(3-4), 437–447. <https://doi.org/10.1007/BF02358160>
- Osman, F [Fatima], Golino, D., Hodzic, E. & Rowhani, A [Adib] (2018). Virus Distribution and Seasonal Changes of Grapevine Leafroll-Associated Viruses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 69(1), 70–76. <https://doi.org/10.5344/ajev.2017.17032>
- Osman, F [Fatima], Leutenegger, C., Golino, D. & Rowhani, A [Adib] (2007). Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5

and 9. *Journal of virological methods*, 141(1), 22–29.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035>

Pietersen, G. (Hrsg.). (2006). Spatio-temporal distribution dynamics of grapevine leafroll disease in Western Cape vineyards [Sonderheft]. *Extended abstracts of the 15th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of Grapevines (ICVG)*. Stellenbosch.

Pietersen, G., Bell, V. A. & Krüger, K. (2017). Management of Grapevine Leafroll Disease and Associated Vectors in Vineyards. In B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino & M. Fuchs (Hrsg.), *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*. Springer. ISBN 978-3-319-57706-7

Ravaz, L. & Roos, L. (1905). Le rougeau de la vigne. *Progrés Agric. Vitic.*(22), 39–40.

Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. & Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6, 27.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-27>

Romero Romero, J. L., Carver, G. D., Arce Johnson, P., Perry, K. L. & Thompson, J. R. (2019). A rapid, sensitive and inexpensive method for detection of grapevine red blotch virus without tissue extraction using loop-mediated isothermal amplification. *Archives of virology*, 164(5), 1453–1457. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04207-y>

Rowhani, A [Adib] (1993). Development of a Polymerase Chain Reaction Technique for the Detection of Grapevine Fanleaf Virus in Grapevine Tissue. *Phytopathology*, 83(9), 749. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-749>

Rowhani, A [Adib], Osman, F [F.], Daubert, S. D., M. Al Rwahnih, Al Rwahnih, M. & Saldarelli, P [P.]. (2017). Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of Grapevine Viruses and Viroids. In B. Meng, G. P. Martelli, D. A. Golino & M. Fuchs (Hrsg.), *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*. Springer. ISBN 978-3-319-57706-7

- Rowhani, A [Adib], Uyemoto, J. K., Golino, D. A. & Martelli, G. P [Giovanni P.] (2005). Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annual review of phytopathology*, 43, 261–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135919>
- Salzman, R. A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (1999). An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(1), 11–17. <https://doi.org/10.1023/A:1007520314478>
- Schaad, N. W., Frederick, R. D., Shaw, J., Schneider, W. L., Hickson, R., Petrillo, M. D. & Luster, D. G. (2003). Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annual review of phytopathology*, 41, 305–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095435>
- Scheu, G. (1935). Die Rollkrankheit des Rebenstockes. *Der Deutsche Weinbau*(14), 222–223.
- Sefc, K. M., Leonhardt, W. & Steinkellner, H. (2000). Partial sequence identification of grapevine-leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *Journal of virological methods*, 86(1), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00135-X)
- Spektrum (Hrsg.). (1999). *strand displacement amplification*. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/strand-displacement-amplification/64123>, zuletzt aufgerufen: 2.3.2021
- Tan, A. (2018). *What Is the Function of a Tris Buffer in DNA Extraction?* <https://sciencing.com/chemicals-used-dna-analysis-6869624.html>, zuletzt aufgerufen: 3.7.2021
- Tsai, C. W., Daugherty, M. P. & Almeida, R. P. P [R. P. P.] (2012). Seasonal dynamics and virus translocation of Grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. *Plant pathology*, 61(5), 977–985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02571.x>

- Vega, A [Andrea], Gutiérrez, R. A., Peña-Neira, A., Cramer, G. R. & Arce-Johnson, P [Patricio] (2011). Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant molecular biology*, 77(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9807-8>
- Walsh, H. A. & Pietersen, G. (2013). Rapid detection of Grapevine leafroll-associated virus type 3 using a reverse transcription loop-mediated amplification method. *Journal of virological methods*, 194(1-2), 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.030>
- Ward, E., Foster, S., Fraaije, B. & McCartney, H. A. (2004). Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology*, 145(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00354.x>
- Weber, E., Golino, D., and Rowhani, A. (1993). Leafroll diseases of grapevines. *Practical Winery and Vineyard*(13), 21–25.
- Weber, E., Golino, D., und Rowhani, A. (2002). Laboratory testing for grapevine virus diseases. *Practical Winery and Vineyard*, 22(2), 13–26.
- Zherdev, A., Vinogradova, S., Byzova, N., Porotikova, E., Kamionskaya, A. & Dzantiev, B. (2018). Methods for the Diagnosis of Grapevine Viral Infections: A Review. *Agriculture*, 8(12), 195. <https://doi.org/10.3390/agriculture8120195>

## 8 Anhang

### 8.1 Ausgangsprotokoll der RT-LAMP der Firma Mast Diagnostica GmbH

#### Herstellung der Extrakte aus Holz

1. Extraktion von Virenpartikeln aus Holz Proben mittels eines Extraktionsbeutels (BIOREBA).
2. Zwischen 0,5 und 1g Probe abwiegen, Rinde entfernen.
3. Zu den Proben in dem Beutel werden 2 mL Wasser geben. Beutel mit Programm 6 verschweißen und Proben mit einem Hammer zermatschen.
4. Das Extrakt mit einer Pipette abnehmen und in ein Reaktionstube überführen.
5. Das Tube bei 6000 x g 1min zentrifugieren und den Probenüberstand (ca. 500 µL) abnehmen und in ein neues Tube überführen.
6. Erhaltenen Extrakt zur längeren Aufbewahrung bei -20°C zu je 50 µL aliquotieren und einfrieren.

#### Durchführung der LAMP

7. Primermix vor der Verwendung 5 min bei 95 °C aufkochen, 5 min auf Eis stellen.
8. Mastermix zusammen pipettieren.

Tabelle 17: Mastermix für die RT-LAMP für ein Reaktionsvolumen von 25 µl (Template = 5 µl)

Reagenz	1 x	x
Reaktionsmix RM	12,5 µL	µL
Primermix PM	2 µL	µL
Fluoreszenz Day FD	1,0 µL	µL
Bst Polymerase	1,0 µL	µL
Reverse Transkriptase RT	0,5 µL	µL
H2O	3,0 µL	µL
total	20,0 µL	µL

Tabelle 18: Mastermix für die RT-LAMP für ein Reaktionsvolumen von 10 µl (Template = 2 µl)

<b>Reagenz</b>	<b>1 x</b>	<b>x</b>
Reaktionsmix RM	5 µL	µL
Primermix PM	0,8 µL	µL
Fluoreszenz Day FD	1,0 µL	µL
Bst Polymerase	0,4 µL	µL
Reverse Transkriptase RT	0,2 µL	µL
H <sub>2</sub> O	0,6 µL	µL
total	8,0 µL	µL

9. 20 bzw. 8 µl Mastermix auf die Reaktionstubes verteilen
10. 5 bzw. 2 µl Wasserprobe bzw. Holzextrakt in Mastermix pipettieren
11. Tubes in das Gerät stellen
12. LAMP unter folgenden Einstellungen laufen lassen: 60 Zyklen a 1 min, 64 °C, Schmelzkurve von 60°C auf 99°C. Die Proben wurden unverdünnt und 1:10 verdünnt (Verdünnung mit Wasser) gemessen.
13. Datenauswertung

## 8.2 ELISA-Protokolle für den Ansatz der Pufferlösungen

### 8.2.1 Beladungspuffer

1. 1,8 Liter destilliertes Wasser in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben füllen.
2. Nacheinander 3,18 g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) und 5,86 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) zum Erlenmeyerkolben geben und so lange rühren, bis es komplett aufgelöst ist.
3. Mittels Salzsäure (HCl) den pH-Wert auf 9,6 einstellen.
4. Erlenmeyerkolben mit destilliertem Wasser auf 2,0 Liter auffüllen, vermengen und in eine 2-Liter-Laborglasflasche umfüllen.
5. Beladungspuffer bei 4 °C im Kühlschrank lagern.

### 8.2.2 Extraktionspuffer

1. 1 Liter destilliertes Wasser in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben geben.
2. 121,0 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) einwiegen, in den Erlenmeyerkolben geben und verrühren bis alles aufgelöst ist.
3. Mittels Salzsäure (HCl) den pH-Wert auf 8,20 einstellen.
4. Nacheinander 40,0 g Polyvinylpyrrolidone (PVP 25), 20,0 g Polyethylenglycol (PEG 6000) und 16,0 g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) zugeben und unter Rühren in den Erlenmeyerkolben geben.
5. Erlenmeyerkolben mit destilliertem Wasser auf 2,0 Liter auffüllen, erneut rühren bis sich alles aufgelöst hat.
6. Inhalt in eine 2-Liter-Laborglasflasche umfüllen, 1 ml Tween 20 hinzugeben, verrühren.
7. Extraktionspuffer bei 4 °C im Kühlschrank lagern.

### 8.2.3 Konjugatpuffer

1. Etwa 1 Liter destilliertes Wasser in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben füllen.
2. 16,0 g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) einwiegen und in den Erlenmeyerkolben geben, gut verrühren.
3. 0,4 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) einwiegen und erneut unter Rühren zum Erlenmeyerkolben zugeben.
4. 5,8 g Natriumhydrogenphosphat ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) einwiegen und in den Erlenmeyerkolben geben, gut verrühren.
5. 0,4 g Kaliumchlorid (KCl) einwiegen und unter Rühren in den Erlenmeyerkolben geben.
6. 40 g Polyvinylpyrrolidone (PVP 25) ebenfalls unter Rühren hinzugeben.
7. 4,0 g Rinderserumalbumin (Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C) einwiegen und in Erlenmeyerkolben geben, warten bis alles vermischt ist.
8. 0,4 g Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) einwiegen und zum Erlenmeyerkolben geben, alles vermischen lassen.
9. Mittels Salzsäure (HCl) bzw. Natronlauge (NaOH) den pH-Wert auf 7,40 stellen.

10. 1 ml Tween 20 zugeben und Erlenmeyerkolben mit destilliertem Wasser auf 2 L auffüllen.
11. Etwa 10 Minuten Rühren lassen.
12. Zu je 130 ml in Honiggläser füllen und bei -18 °C lagern.

#### **8.2.4 Substratpuffer**

1. Etwa 0,9 Liter destilliertes Wasser in einen 1-Liter-Erlenmeyerkolben geben.
2. 96 ml Diethanolamin ( $C_4H_{11}NO_2$ ) zum Erlenmeyerkolben geben und verrühren.
3. Den pH-Wert mittels Salzsäure (HCl) auf 9,80 stellen.
4. Erlenmeyerkolben mit destilliertem Wasser auf 1,0 Liter auffüllen und etwa 5 Minuten mischen.
5. In eine 1-Liter-Laborglasflasche umfüllen und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahren.

#### **8.2.5 Waschpuffer**

1. Etwa 1,7 Liter destilliertes Wasser in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben geben.
2. 16,0 Natriumchlorid (NaCl) einwiegen und in den Erlenmeyerkolben geben. Rühren lassen bis alles gelöst ist.
3. 0,4 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ) einwiegen und ebenfalls unter Rühren zum Erlenmeyerkolben geben.
4. 5,8 g Natriumhydrogenphosphat ( $NaHPO_4 \cdot 12 H_2O$ ) einwiegen und ebenfalls unter Rühren zum Erlenmeyerkolben geben.
5. 0,4 g Kaliumchlorid (KCl) einwiegen und ebenfalls unter Rühren zum Erlenmeyerkolben geben.
6. Den pH-Wert mittels Salzsäure (HCl) auf 7,40 stellen.
7. Mit destilliertem Wasser auf 2 Liter auffüllen und etwa 3 Minuten rühren lassen bis alles vermischt ist.
8. In eine 2,0-L-Laborglasflasche umfüllen, gut verrühren.
9. Zugabe von 1,0 ml Tween 20 zur Laborglasflasche, etwa 3 Minuten rühren lassen.
10. Bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahren.

### 8.3 Ergänzungen zu den Diagrammen

In diesem Kapitel werden die fehlenden Kontrollen von einzelnen Versuchen aufgeführt. Die Abkürzung PK steht dabei für die Positivkontrolle, NK für die Negativkontrolle und NTC ist die Wasserkontrolle (no template control).

#### 8.3.1 Kontrollen zum Kapitel 4.1.3, Tabelle 7

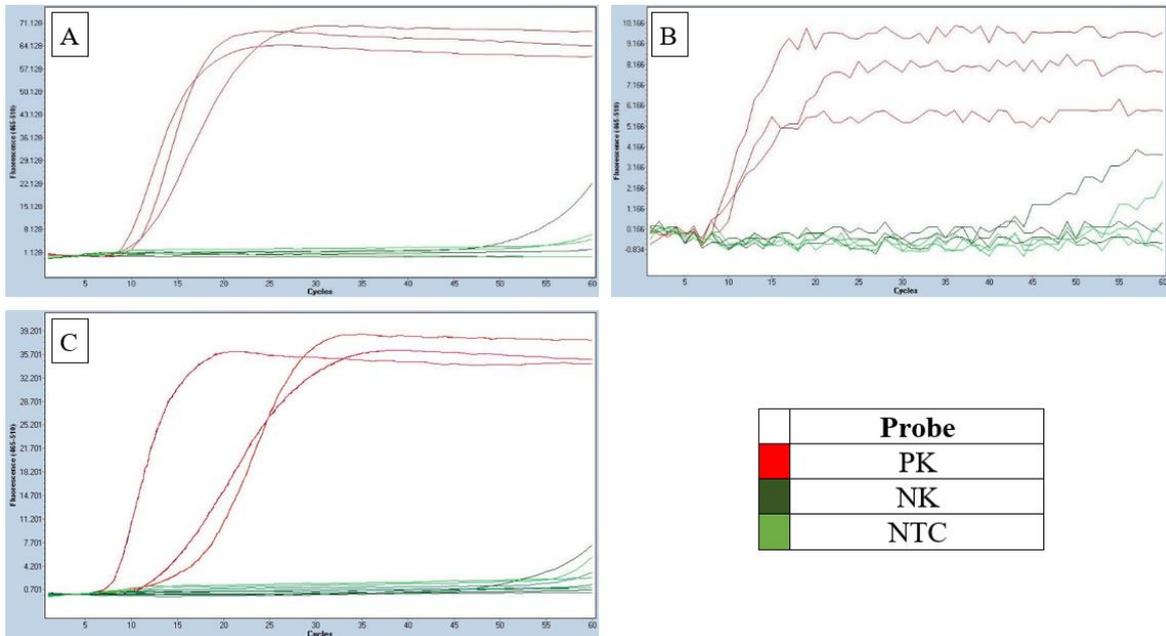


Abbildung 20: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben 1 (A), 2 (B) und 5 (C) aus Tabelle 7 (n=3)

#### 8.3.2 Kontrollen zum Kapitel 4.1.3, Tabelle 8

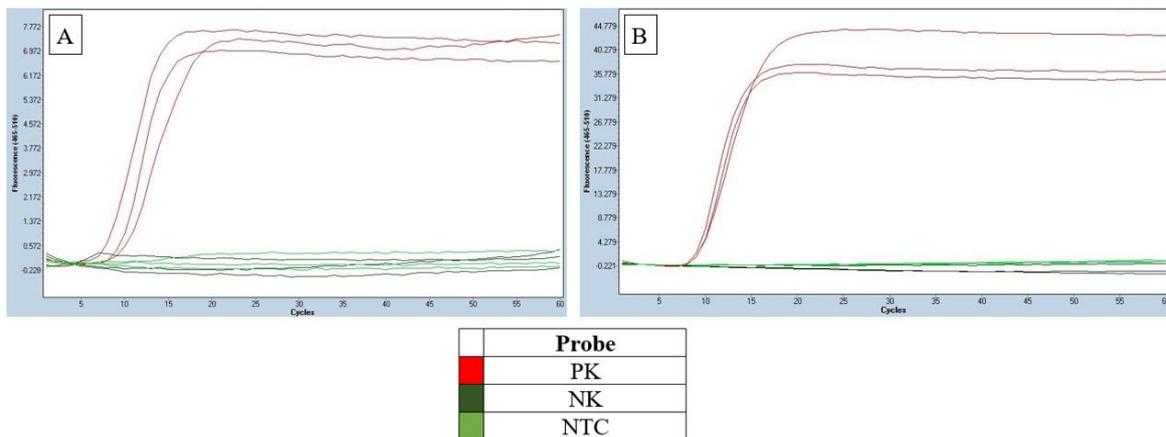


Abbildung 21: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben 1 und 5 (A) sowie 2 (B) aus Tabelle 8 (n=3)

### 8.3.3 Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 9

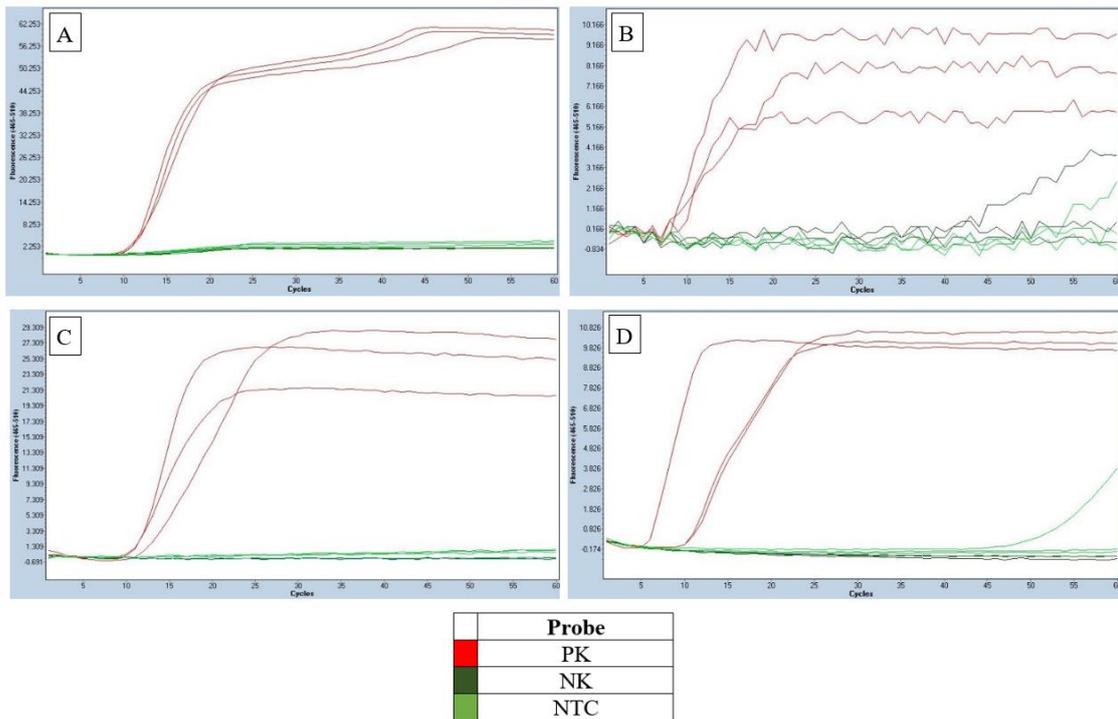


Abbildung 22: Kontrollen zu den Versuchen mit der Probe W3 aus Tabelle 9. A: Frische Blattprobe. B: Eingefrorene Blattproben. C: Frische Holzprobe. D: Eingefrorene Holzproben (n=3)

### 8.3.4 Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 10

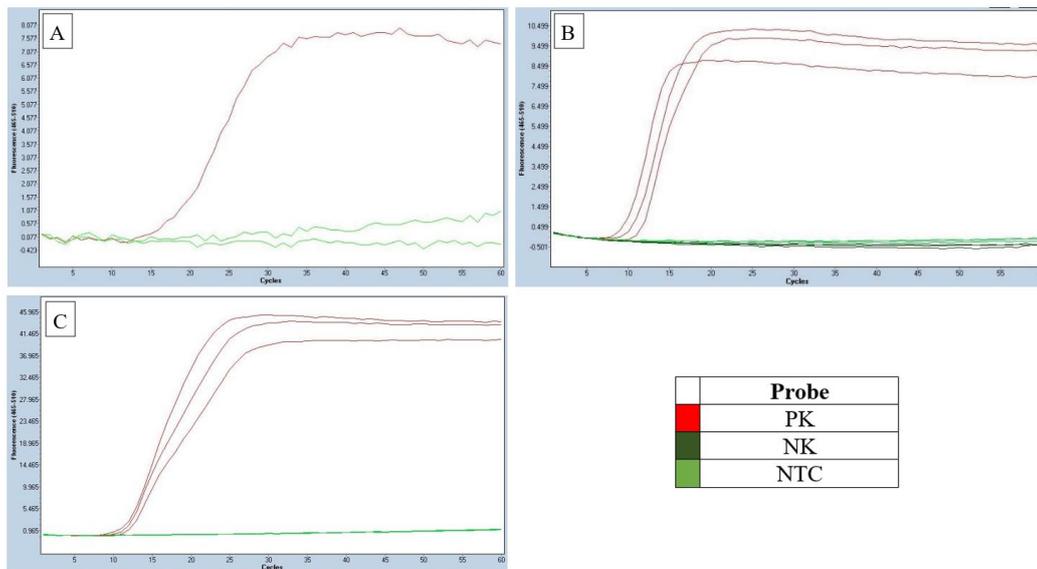


Abbildung 23: Kontrollen zu den Versuchen mit der Probe W4 aus Tabelle 10. A: Frische Blattprobe. B: Eingefrorene Blatt- und Holzproben. C: Frische Holzprobe (n=3)

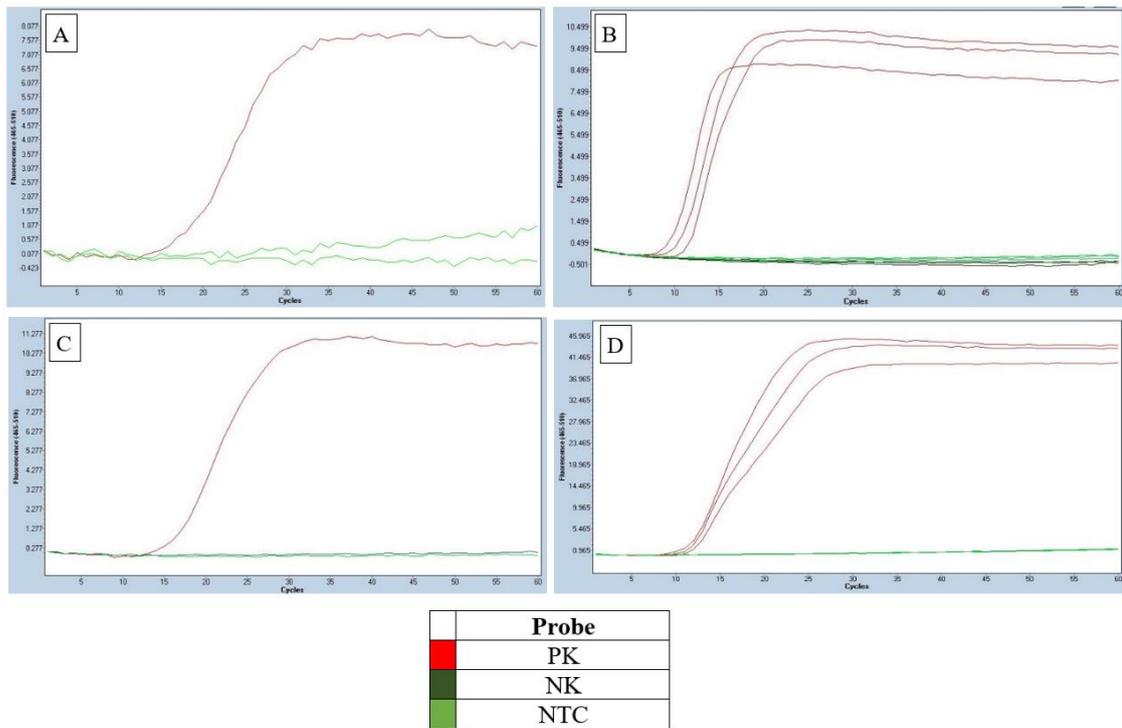


Abbildung 24: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben W4, W6 aus Tabelle 10. A: Frische Blattproben. B: Eingefrorene Blattproben. C: Frische Holzproben. D: Eingefrorene Holzproben (n=1)

### 8.3.5 Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 11

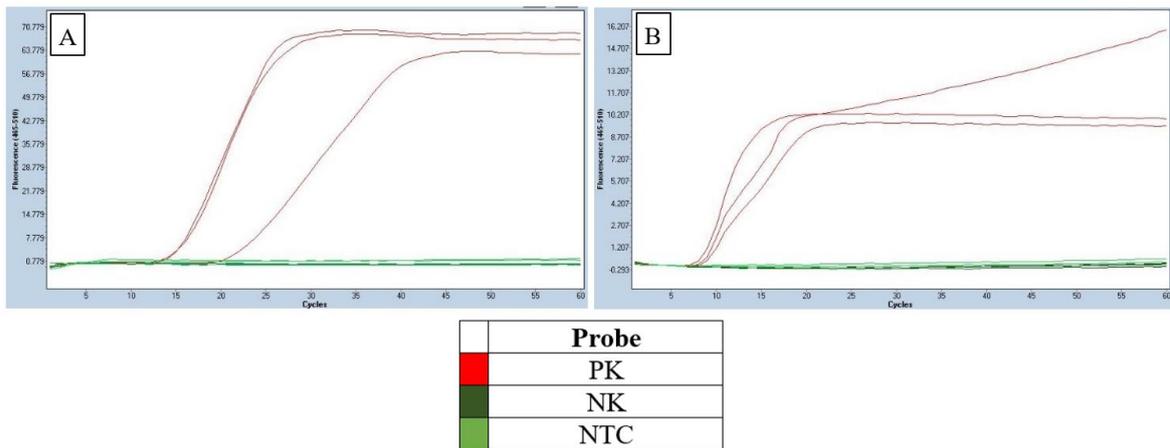


Abbildung 25: Kontrollen zu den Versuchen mit Probe R3 aus Tabelle 11. A: Frische Blatt- und Holzprobe. B: Eingefrorene Blatt- und Holzproben (n=3)

### 8.3.6 Kontrollen zum Kapitel 4.2, Tabelle 12

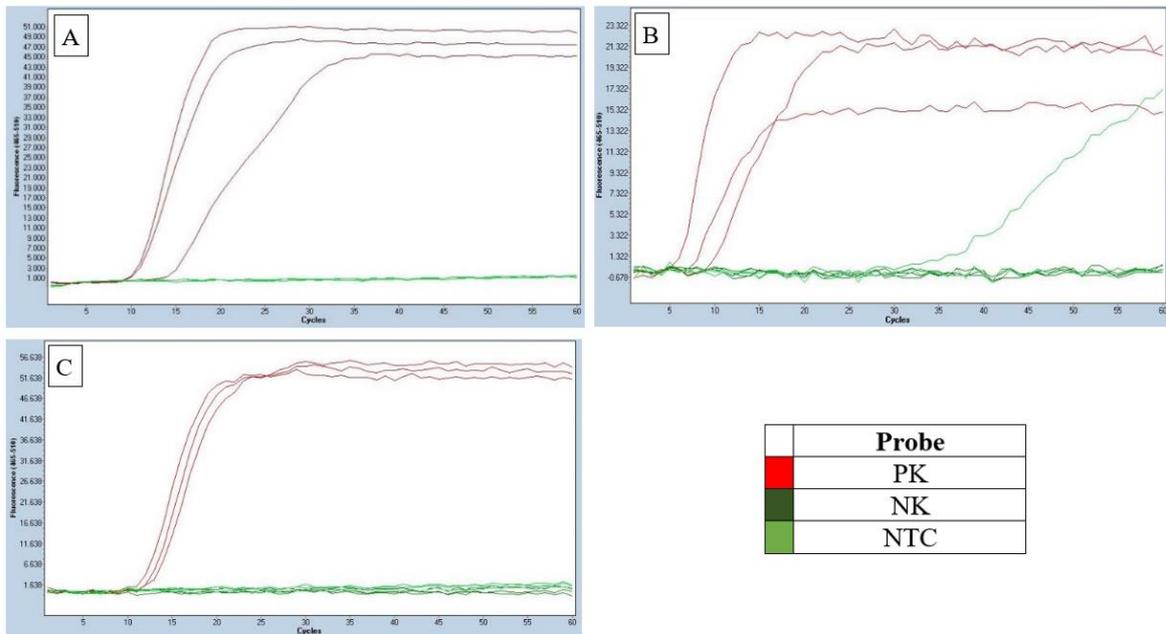


Abbildung 26: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben R4, R6 aus Tabelle 12. A: Frische Blatt- und Holzprobe, R4. B: Eingefrorene Blatt- und Holzproben, R4 und R6. C: Frische Blatt- und Holzprobe, R6 (n=3)

### 8.3.7 Kontrollen zum Kapitel 4.3, Abbildung 13

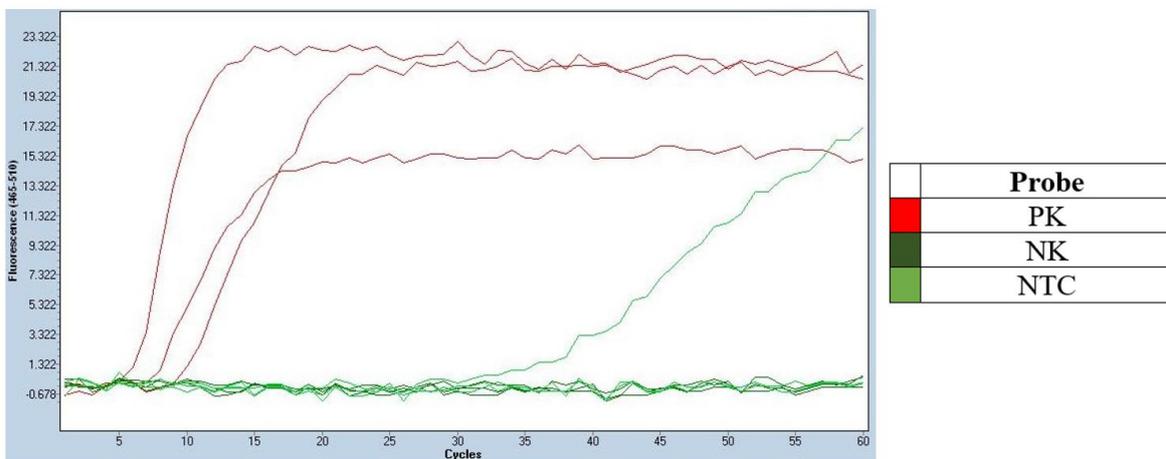


Abbildung 27: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben aus Abbildung 13 (n=3)

### 8.3.8 Kontrollen zum Kapitel 4.3, Tabelle 13

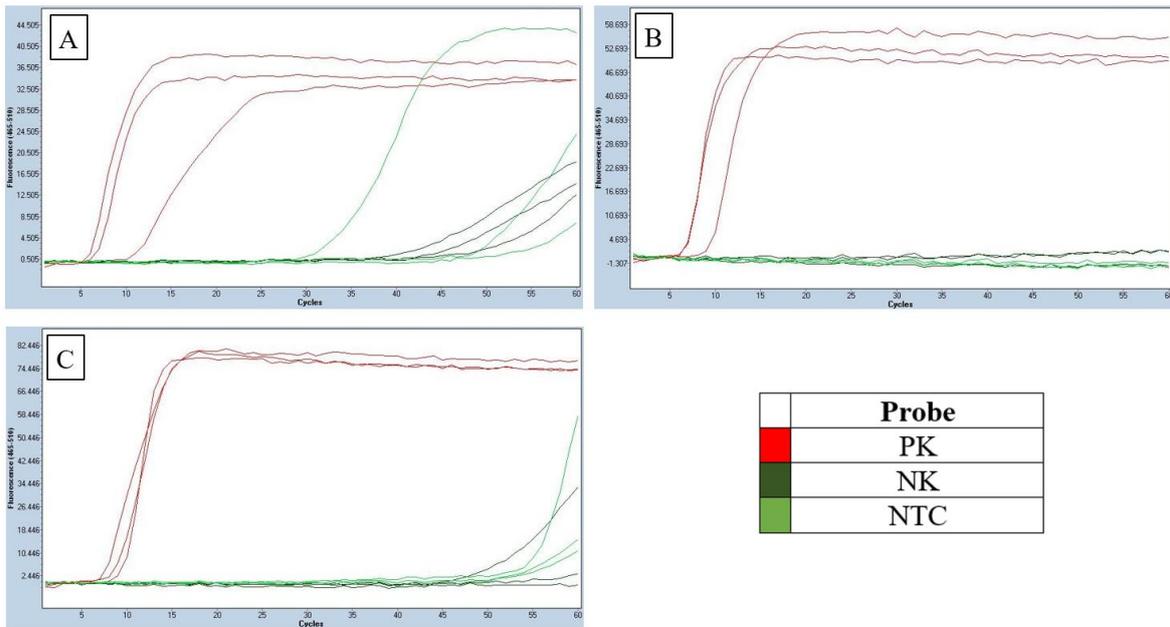


Abbildung 28: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben R12 (A), R13 (B), R14 (C) aus Tabelle 13 (n=3)

### 8.3.9 Kontrollen zum Kapitel 4.3, Tabelle 15

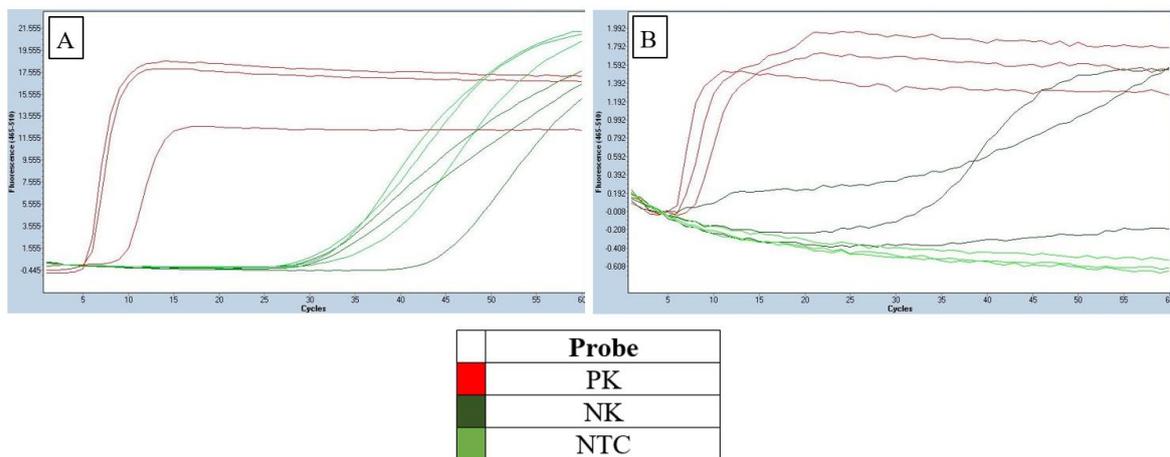


Abbildung 29: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben R18 (A), R7 und R28 (B) aus Tabelle 15 (n=3)

### 8.3.10 Kontrollen zum Kapitel 4.4, Abbildung 14

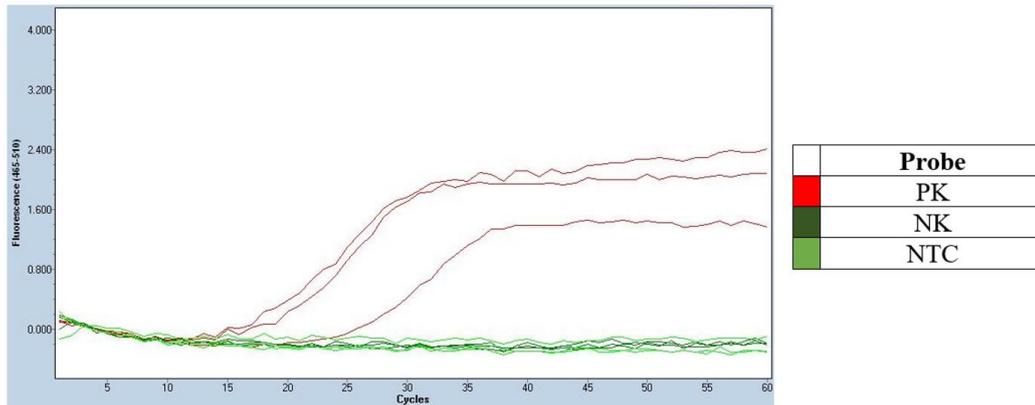


Abbildung 30: Kontrollen zu den Versuchen mit Probe R1 aus Abbildung 14 (n=3)

### 8.3.11 Kontrollen zum Kapitel 4.4, Abbildung 16

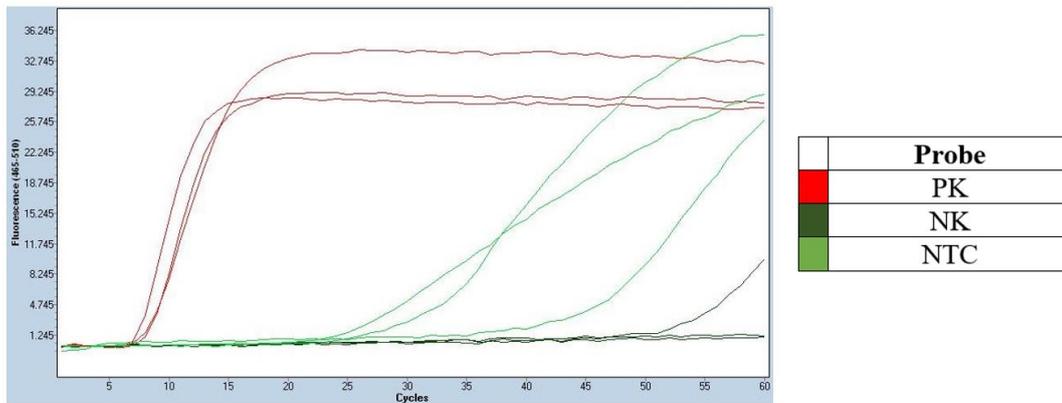


Abbildung 31: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben aus Abbildung 16 (n=3)

### 8.3.12 Kontrollen zum Kapitel 4.4, Abbildung 18

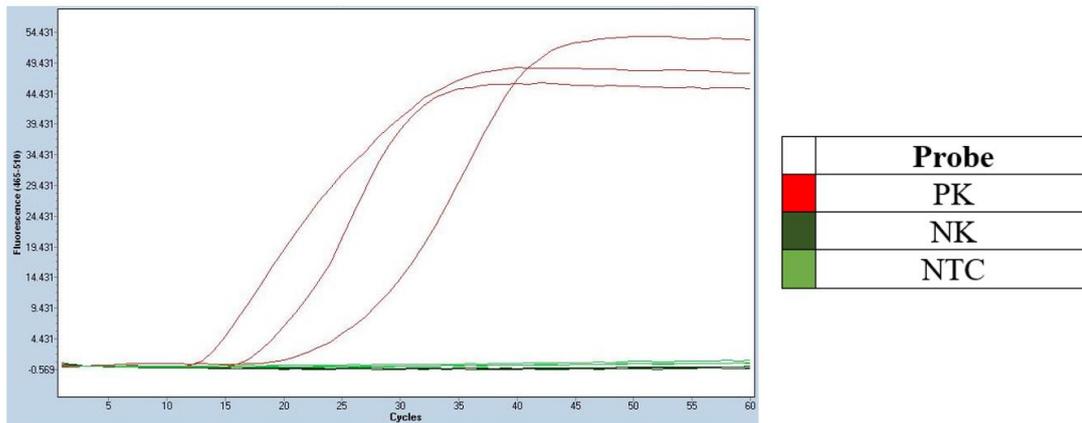


Abbildung 32: Kontrollen zu den Versuchen mit den Proben aus Abbildung 18 (n=3)