

Prämunisierung (cross protection) als neue Strategie zur Bekämpfung von Phytoplasmosen im Obstbau am Beispiel der Apfeltriebsucht

**Premunization (cross protection) as a new strategy to control phytoplasma diseases in fruit production:
Apple proliferation as case study**

FKZ: 11NA062

Projektnehmer:

Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau
Schwabenheimer Straße 101, 69221 Dossenheim
Tel.: +49 6221 86805-00
Fax: +49 6221 86805-15
E-Mail: owd@julius-kuehn.de
Internet: www.julius-kuehn.de

Autoren:

Schneider, Bernd; Jelkmann, Wilhelm

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

1. Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Phytoplasmosen sind durch Bakterien verursachte Krankheiten, die im Obstbau eine enorme wirtschaftliche Bedeutung haben. Die Erreger werden durch phloemsaugende Insekten übertragen und parasitieren persistent in den Siebröhren der Wirtspflanzen. Wirtschaftliche Bedeutung haben in Europa vor allem Phytoplasmosen an Kern- und Steinobst sowie Weinreben. Die verursachten Schäden betreffen vor allem die Ernteerträge, aber es kommt auch zu Ausfällen im Pflanzenbestand. Die angebauten Kultursorten und Unterlagen besitzen keine Resistenz und daher beschränkt sich die Kontrolle der Krankheit auf die Bekämpfung der Vektoren mit Insektiziden und der Rodung befallener Bäume. Beide Praktiken führen jedoch nur zu einer unwesentlichen Verringerung des Infektionsrisikos, da oft alternative Infektionsquellen in der Nähe vorhanden sind. Insektizidbehandlungen sind aus ökologischer Sicht kritisch zu sehen, da oft keine geeigneten Präparate zur Verfügung stehen, sie nicht den Auflagen des Bienenschutzes entsprechen, oder keine befriedigende Wirksamkeit zeigen. Ein Ansatz, der am Julius Kühn-Institut in Dossenheim seit längerem verfolgt wird, besteht in der Züchtung resistenter Pflanzen, genauer gesagt resistenter Unterlagen. Mit *Malus sieboldii* wurde eine Resistenzquelle identifiziert, mit der in Kreuzungsexperimenten, Nachkommen mit guten Resistenzeigenschaften erhalten wurden. Die agronomische Testung einiger dieser Selektionen wird in einem Bundessortenversuch an mehreren Standorten in Deutschland in 2016 beginnen. Mit einer nahen Praxiseinführung ist jedoch wegen der langen Testphase nicht zu rechnen. Daher wird eine neue Bekämpfungsstrategie vorgeschlagen, die Gegenstand dieses Vorhabens ist und auf eigenen Beobachtungen basiert. In Anlehnung an die virologische Terminologie, wird das Verfahren als "Prämunisierung" oder "cross-protection" bezeichnet und in den folgenden Abschnitten weiter erläutert.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Der praktische Nutzen der Prämunisierung liegt darin, dass Apfelbäume durch die Vorinfektion mit einem avirulenten Stamm des Triebsuchterregers vor einer Infektion mit einem virulenten Stamm geschützt werden. Dieses Verfahren würde eine umweltfreundlichere Apfelproduktion ermöglichen, da spezifische Insektizidanwendungen gegen den Überträger der Krankheit nicht mehr erforderlich sind. Das Verfahren wäre für den Erwerbs- und Streuobstbau, aber insbesondere für den ökologischen Obstbau von Bedeutung, da hier eine wirksame Vektorbekämpfung nicht möglich ist. Es stellt eine Alternative zur oben genannten Resistenzzüchtung dar und bietet folgende Vorteile:

- a) Alle existierenden Apfelsorten und Unterlagen können mit diesem Verfahren geschützt werden.
- b) Es findet keine genetische Veränderung von Sorten und Unterlagen statt. Somit ist eine erneute agronomische Prüfung und Zulassung nicht notwendig.
- c) Das Verfahren ließe sich direkt in die Praxis umsetzen, sofern der Quarantäneschad-erregersstatus auf die beabsichtigte Stufe eines Qualitätsschad-erregers herabgestuft werden würde.

Trotz des praktischen Aspekts der Arbeiten ist das Vorhaben in die Kategorie Forschungs- und Entwicklungsmaßnahmen einzuordnen, da zum tieferen Verständnis des Mechanismus die molekularen Grundlagen erarbeitet werden müssen. Ein Wissenstransfer ist nach Abschluss der Arbeiten geplant.

1.3 Planung und Ablauf des Projekts

Die Prämunisierung wird im Gewächshaus mit der Modellpflanze *Catharanthus roseus* und im Freiland mit vier verschiedenen Apfelunterlagen/Sortenkombinationen durchgeführt. Da biologische Systeme zur Variation neigen, sind mehrere Versuchsreihen geplant, um die Ergebnisse abzusichern. Zur Infektion von *C. roseus* stehen zwei Apfeltriebsuchtsisolate 1/93 und 12/93 zur Verfügung, die sich bereits seit langer Zeit in diesem Wirt befinden. Zur Infektion im Freiland stehen zwei avirulente Isolate (1/93 und 2/4) und zwei virulente Isolate (12/93 und 3/6) zur Verfügung. Ein Teil der Pflanzen wird zuerst mit den avirulenten Stämmen, der andere mit den virulenten Stämmen inokuliert. Der Status der Infektion wird anschließend geprüft. Im Falle von *C. roseus* kann beim Feststellen einer systemischen Infektion direkt mit der Inokulation durch das jeweils andere Isolat begonnen werden. Beim Apfel müssen die Pfropfinfektionen saisonabhängig entweder im März oder August durchgeführt werden. Bei *C. roseus* wurden auch Pfropfexperimente durchgeführt, in dem gesunde Pflanzen zur gleichen Zeit mit beiden Inokula gepfropft wurden. Der Infektionsverlauf wird mit einer pathogen-spezifischen quantitativen real time PCR zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft. Dazu wird die DNA aus Blattmittelrippe, Spross und Wurzel extrahiert.

Die molekularen Untersuchungen sollen zunächst mit der Genomsequenzierung des avirulenten Stammes 1/93 und des virulenten Stammes 12/93 begonnen werden. Auf der Basis vollständiger Genomsequenzen soll ein Vergleich ihrer metabolischen Fähigkeiten erfolgen. Es wird erwartet, dass durch den Vergleich Gene identifiziert werden, die Rückschlüsse auf eine Beteiligung am Prämunisierungseffekt ermöglichen. Basierend auf Proteinsequenzunterschieden der putativ membranständigen ATPase 460 werden spezifische Antiseren hergestellt, mit denen in immunhistologischen Untersuchungen die Pathogenstämme *in planta* markiert werden sollen. Diese sollen den Prozess der Besiedlung und der Lokalisation durch die virulenten und avirulenten Stämme im mikroskopischen Bild wiedergeben. Im ursprünglichen Antrag war vorgesehen monoklonale Antikörper gegen die Proteine zu generieren. Durch die Art des Immunogens, wurde darauf jedoch zu Gunsten einer Transkriptomanalyse verzichtet. In dieser ist beabsichtigt die Transkriptome von infizierten und nicht-infizierten *Malus x domestica* cv. Golden Delicious Pflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Jahr zu bestimmen. Dadurch sollen Unterschiede im Expressionsmuster festgestellt werden, die u. U. an der Krankheitsentwicklung beteiligt sind.

Das Projekt ist in fünf Arbeitspakete eingeteilt, die sich über die gesamte Projektlaufzeit erstrecken. Das Arbeitspaket 1 umfasst die Pfropfexperimente an *C. roseus* und Apfel und beginnt zum Projektstart. Wiederholungsexperimente werden im Folgenden durchgeführt. Die Probenahme im Arbeitspaket 2 findet bei den *C. roseus* Versuchen kontinuierlich statt, während sie beim Apfel auf die Zeit nach der ersten Infektion und auf das Spätjahr beschränkt ist. Die Maitermine sind zur Symptombewertung eingeplant. Das Arbeitspaket 3 (Genomanalyse) ist in zwei größere Abschnitte eingeteilt. In der ersten Phase wird die DNA der Erreger aus infiziertem Pflanzenmaterial gewonnen. In der zweiten Phase erfolgt die Sequenzierung, das Assemblieren sowie das Zusammenfügen der größeren Contigs. Im Paket 4 sind die Arbeiten zur Erzeugung der spezifischen Antiseren und der monoklonalen Antikörper zusammengefasst. Hier wurden die Arbeiten zu den monoklonalen Antikörpern durch die Transkriptionsanalyse ersetzt. Das fünfte Arbeitspaket umfasste die immunhistologischen und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen, die sich nach Erzeugung der Antikörper ebenfalls über die gesamte Projektlaufzeit erstrecken.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Phytoplasmen sind *in vitro* nicht kultivierbar und entziehen sich damit den meisten mikrobiologischen, gentechnischen und phytopathologischen Methoden. Als Pathogene sind

sie schlecht charakterisiert und genetische Manipulationen zur Feststellung von Genfunktionen oder gezielte Infektionsversuche lassen sich nicht durchführen. Trotzdem wurden in den vergangenen Jahrzehnten beachtliche Fortschritte in der Erforschung der Krankheiten und der Erreger erzielt. Dies beruht vor allem auf dem Einsatz molekularer Techniken. Die Sequenzierung von vier Phytoplasma-Genomen (Oshima et al. 2004, Bai et al., 2006, Kube et al., 2008, Tran-Nguyen et al., 2008) hat Einblicke in die metabolischen Fähigkeiten der Organismen ermöglicht und Gründe für ihre parasitische Lebensweise aufgezeigt. Über die Wirt-Parasit Interaktionen und die Grundlagen der Krankheitsinduktion ist wenig bekannt. Mit Tengu (Hoshi et al., 2009) und SAP11 (Bai et al., 2009) wurden zwei sekretierte Proteine der A sternvergilbungsphytoplasmen identifiziert, die rekombinant exprimiert, in transgenen Pflanzen Symptome einer Infektion verursachten und somit Pathogenitätsfaktoren darstellen. In der Genomsequenz von *Ca. P. mali* konnten jedoch keine homologen Proteine identifiziert werden. Eine kürzlich durchgeführte Transkriptomanalyse des onion yellows Phytoplasma aus tierischem und pflanzlichem Gewebe hat große Unterschiede im bakteriellen Expressionsprofil aufgezeigt (Oshima et al., 2011). Es wurden Proteine identifiziert, die an der Pathogenitätsinduktion beteiligt sein könnten, aber auch solche, die als Ziel für eine chemische Bekämpfung der Organismen infrage kämen. Da Phytoplasmen genetisch nicht manipulierbar sind, lassen sich Wirt-Parasit Interaktionen nur schwer studieren. Dies trifft besonders für die Funktionsanalyse, der als hypothetisch annotierten bakteriellen Gene zu, worunter sich eine Reihe pathogenitätsrelevanter Proteine verbergen könnten.

Die pflanzliche Resistenz gegen Phytoplasmaerkrankungen ist wenig erforscht. Dies liegt zum einen daran, dass die Organismen erst in den 1960er Jahren als Pflanzenpathogene entdeckt wurden, aber vor allem, an den oben genannten methodischen Schwierigkeiten im Umgang mit den Erregern. Die Durchführung von Resistenzprüfungen in größerem Stil ist bei holzigen Wirten nach wie vor nur durch die Inokulation mit infiziertem Reisermaterial möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass auch die klassische Züchtung holziger Pflanzen ein langwieriger Prozess ist.

Die Möglichkeiten zur Bekämpfung der Apfeltriebsucht sind begrenzt. Eine Bekämpfung durch Antibiotika wäre möglich, ist jedoch nicht erlaubt und wäre in der Praxis auch nicht durchführbar. Da resistente Unterlagen oder Sorten nicht vorhanden sind, sind im Moment Vektorkontrolle und Rodung die einzig verbleibenden Möglichkeiten. Nach langjährigen Vorarbeiten durch das Julius Kühn-Institut in Dossenheim, konnte eine alternative Bekämpfungsstrategie gegen Kernobstphytoplasmen erarbeitet werden. Diese besteht darin, die Phytoplasmaerkrankungen durch die Verwendung resistenter Unterlagen zu kontrollieren. Die Strategie basiert auf zwei fundamentalen Beobachtungen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass bei Kernobst jahreszeitliche Schwankungen in der Besiedlung auftreten und die Phytoplasmen im Winter nur in der Wurzel überdauern (Schaper und Seemüller, 1982; Seemüller et al., 1984). Zum anderen, dass einige *Malus* Taxa und Genotypen Resistenzeigenschaften besitzen (Kartte und Seemüller, 1988; 1991). Dies hat zu umfangreichen Kreuzungsexperimenten geführt, indem die phytoplasmaresistenten Genotypen mit kommerziellen Unterlagen gekreuzt wurden. Die Nachkommen dieser Kreuzungsserien werden durch experimentelle Inokulation auf Resistenz geprüft, deren Auswertung immer noch andauert (Bisognin et al., 2008).

Die Notwendigkeit einer schneller umsetzbaren Methode hat eine weitere Bekämpfungsstrategie ins Blickfeld gerückt, das Verfahren der "Prämunisierung" oder cross-protection. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde dieses Phänomen bei virologischen Versuchen beobachtet (McKinney, 1929) und wird inzwischen zur Bekämpfung virulenter Stämme des Citrus Tristeza Virus in Brasilien (Costa und Muller, 1980) und Südafrika (VanHuuren et al., 1993) und des Papaya Ringspot Virus auf Hawaii und Taiwan eingesetzt (Yeh et al., 1984, 1988). Mitte der 1950er Jahre wurde bei asternvergilbungsinfizierten Chrysanthenen ein ähnliches Phänomen von Kunkel beschrieben und als "cross-protection"

bezeichnet (Kunkel, 1955). Ähnliche Beobachtungen wurden in den 1980er und 1990er Jahren in südfranzösischen Aprikosenanlagen gemacht (Morvan und Castelain, 1984), die durch das Europäische Steinobstphytoplasma (ESFY) stark geschädigt waren. Einige der infizierten Bäume überlebten die Epidemie und Reisermaterial von diesen Bäumen wurde zur Inokulation gesunder Unterlagen verwendet, die natürlichen und künstlichen Infektionsbedingungen ausgesetzt waren. Nur die vorinfizierten Bäume überlebten und legen nahe, dass es sich hier ebenfalls um cross-protection handelte. Dass die avirulenten Stämme biologisch nicht inaktiv sind, konnte durch Veredelung auf anfällige Unterlagen gezeigt werden, die mit deutlichen Krankheitssymptomen reagierten (Castelain et al., 1997; 2007). Leider wurden in den Untersuchungen der französischen Kollegen weder Einzelheiten zu den prämunisierenden Stämmen noch Angaben zur Entwicklung der Phytoplasmapopulation erwähnt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in norditalienischen Steinobstanlagen gemacht, die unter starkem Infektionsdruck des Steinobstphytoplasmas standen (Ermacora et al., 2010). Genau wie in Frankreich wurden ESFY-infizierte Bäume identifiziert, die avirulente Stämme beherbergten und weitgehend symptomlos blieben. Ein weiteres Beispiel in dieser Richtung wurde auch beim nordamerikanischen Eschenvergilbungsphytoplasma beobachtet. Wenn Stämme mit unterschiedlicher Virulenz auf eine Pflanze übertragen wurden, setzte sich bei gleichzeitiger Inokulation meist der aggressivere Stamm durchsetzte, während sich bei zeitlich versetzter Inokulation, immer der zuerst inokulierte Stamm durchsetzte (Sinclair und Griffiths, 2000).

Das geplante Vorhaben schließt an obige Beobachtungen an, hat jedoch durch die langjährigen Erfahrungen mit den Apfeltriebsuchtisolaten aus der Erregerstammsammlung des JKI-Dossenheims einen großen Wissensvorsprung. Das burgundische Triebsuchtisolat 1/93 rief über einen Zeitraum von 15 Jahren keine, oder nur sehr schwache Symptome hervor und die infizierten Bäume waren weder in der vegetativen Entwicklung noch in der Fruchtausbildung von gesunden Kontrollbäumen zu unterscheiden (Seemüller und Schneider, 2007). In der Genomsequenz des *Candidatus* Phytoplasma mali Stamms AT wurde ein Gen identifiziert, das sich in bestimmten Bereichen als hochvariabel erwies und eine hochauflösende Differenzierung von Stämmen erlaubte (Schneider und Seemüller, 2009). Sequenzen verschiedener Stämme unterschieden sich in bestimmten Bereichen und in Kombination mit dem Phänotypus infizierter Pflanzen, ließ sich eine Koppelung mit der Eigenschaft "virulent" oder "avirulent" vornehmen. Eine detaillierte Analyse des Isolats 1/93 zeigte, dass es sich um eine Mischinfektion aus 3 genetisch unterschiedlichen Stämmen handelt. Zwei Typen waren im Spross nachweisbar und zeigten das typische Muster avirulenter oder schwach virulenter Stämme. Diese Stämme waren auch in der Wurzel vorherrschend, wobei hier noch ein dritter Stamm in Erscheinung trat, der mit virulenten Stämmen gruppierte, aber dessen Anteil an der Gesamtpopulation nur 3% betrug (Seemüller et al., 2010; 2011). Um die Suppression von virulenten Apfeltriebsuchtstämmen durch avirulente Stämme näher zu untersuchen, wurde der experimentelle Wirt *Catharanthus roseus* in die Untersuchungen einbezogen (Seemüller et al., 2010). Versetzte und simultane Inokulationen mit dem auf *C. roseus* übertragenen Stamm 1/93 und verschiedenen stark virulenten Apfeltriebsuchtstämmen zeigten Analogien zu den Ergebnissen mit den Eschen- und A sternvergilbungsstämmen aus den USA. Nur bei Vorinokulation mit dem Stamm 1/93 war eine Suppression der virulenten Stämme zu beobachten. Bei einer simultanen Inokulation verlief die Suppression langsamer und war auch nicht immer vollständig.

3. Material und Methoden

Pflanzenmaterial. Gesunde *Catharanthus roseus* cv. Nana Pflanzen wurden über Stecklinge vermehrt und für alle Gewächshausversuche verwendet. Die durch *Cuscuta* sp. auf *C. roseus* übertragenen Apfeltriebsuchtstämmen 1/93 und 12/93 wurden durch periodische Pfropfung infizierter Reiser auf gesunde Pflanzen erhalten. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei Temperaturen von 20-28°C mit einer Lichtdauer von 16h kultiviert. Die Apfelunterlagen M 9, M 27, MM 106 und Bittenfelder wurden als einjährige Pflanzen von

verschiedenen Baumschulen bezogen, ebenso wie Reiser der Sorten Gala, Fuji, Pinova und Topaz. *M. x domestica* cv. Golden Delicious auf M 11 Unterlagen wurden in einem Kalthaus angezogen und waren mit den Apfeltriebsuchstämmen 1/93, 2/4, 3/6 und 12/93 infiziert. Reiser dieses Materials dienten zu Inokulationszwecken. Pflanzenschutzmaßnahmen wurden bedarfsentsprechend durchgeführt.

Pfropfungen und Veredelungen. Die vier oben genannten Apfelunterlagen wurden mit jeweils einer Sorte veredelt, so dass von jeder Unterlage/Sortenkombination 11 bis 13 Pflanzen je Versuchsserie vorhanden waren. Zwei Freilandversuche wurden durchgeführt. Der erste Versuch CP-IA umfasste 184 Individuen, der zweite CP-IIA 209 Individuen. Im CP-IA Versuch wurden 76 Bäume mit dem Treibsuchstamm 1/93, 32 Bäume mit jeweils dem Stamm 12/93 und 2/4 und 28 Bäume mit dem Stamm 3/6 durch seitliche Pfropfung inokuliert. Die restlichen Bäume stellten die Gesundheitskontrollen dar. Im CP-IIA Versuch wurden 80 Bäume mit dem Stamm 1/93, 48 Bäume mit dem Stamm 12/93 und je 32 Bäume mit dem Stamm 2/4 und 3/6 auf die gleiche Weise inokuliert. Auch hier waren die restlichen Pflanzen gesunde Kontrollen. Nachdem die Infektion der Unterlage durch PCR Tests bestätigt wurde, erfolgte saisonabhängig die Zweitinfektion mit jeweils einem Stamm der anderen Virulenzkategorie. Während der Erst- und Zweitinfektion befanden sich die Pflanzen in Töpfen unter einem überdachten Gelände. Eine regelmäßige Düngung wurde durchgeführt. Im Einzelnen war das zeitliche Schema wie folgt, CP-IA: Okulation März 2012, erste Infektion August 2012, zweite Infektion August 2013, Auspflanzung in die Baumschule November 2013. Beim CP-IIA Versuch war die zeitliche Abfolge wie folgt: Okulation März 2013, erste Infektion August 2013, zweite Infektion August 2014, Auspflanzung in die Baumschule November 2014.

Im Gewächshaus wurden drei cross-protection Versuche mit drei verschiedenen Pfropfkombinationen durchgeführt. Der CP-I Versuch startete im Juli 2012, der CP-II Versuch im Dezember 2012 und CP-III Versuch im Juli 2013. Dazu wurden 8 bis 12 gesunde Pflanzen durch Pfropfung an drei Stellen, entweder mit dem Stamm 1/93 oder 12/93 infiziert. Nach 4 bis 5 Monaten (systemische Besiedlung) wurde die Zweitinfektion mit dem jeweils anderen Stamm durchgeführt. Zusätzlich wurde in den drei Versuchsserien eine simultane Infektion mit beiden Stämmen durchgeführt.

Probenahme. Bei Apfel- und *C. roseus* Pflanzen wurden Wurzel, Blattmittelrippe und Spross beprobt. Zur Überprüfung der Erstinfektion am Apfel wurden Wurzelproben entnommen. Die Zweitinfektion wurde jeweils an Blattmittelrippen getestet, die sich unterhalb der Pfropfstelle befanden. Nach dem Auspflanzen ins Freiland wurden Spross- und Wurzelproben im Oktober/November zum Phytoplasma-Monitoring entnommen. Die *C. roseus* Versuche wurden in ein- bis fünfmonatigem Abstand beprobt. Wegen der häufigen Probenahme wurden Sprosstiele nur dann entnommen, wenn keine Blätter mehr vorhanden waren. Die Gewächshausversuche liefen über 20, 28 und 17 Monate. Die Freilandversuche dauern an.

DNA Extraktion für PCR Anwendungen. 20 – 300mg Frischgewebe wurden in 3ml CTAB Puffer (2% CTAB, 0,7M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM EDTA (pH8.0), 0,2% β -Mercaptoethanol) in Bioreba-Extraktionstüten homogenisiert. 1ml des Extrakts wurde in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 30min bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit 1ml Chloroform für 10min. Die Phasen wurden durch Zentrifugation bei 10000rpm und Zimmertemperatur für 10min getrennt. 0,75ml der oberen wässrigen Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen 2-Propanol zur Fällung der Nukleinsäuren versetzt. Nach einer erneuten Zentrifugation (s. o.) wurde das Pellet mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 50 μ l Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Phytoplasma DNA Reinigung zur Genomsequenzierung. Zur Extraktion großer Phytoplasma DNA Mengen wurde gefriergetrocknetes Material infizierter Tabakpflanzen (*Nicotiana*

occidentalis) verwendet. Die Stämme 1/93 und 12/93 wurden vor längerer Zeit durch *Cuscuta sp.* auf diese Pflanzen übertragen und werden seitdem durch Pfropfung erhalten und vermehrt. Das gefriergetrocknete Material wurde mithilfe einer elektrischen Mühle (Retsch ZM200) zerkleinert. 25 – 100g des lyophilisiertes Gewebes wurden mit 250 – 1000ml des oben genannten CTAB Puffers homogenisiert und 1h bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde, wie in den Schritten oben, die DNA extrahiert. Zur Vorbereitung auf die Dichtegradientenzentrifugation wurde das DNA-Pellet in Cäsiumchlorid (1,4g/ml in 10mM Tris-HCl; pH8.0) gelöst und die DNA-Menge photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die DNA, mit dem im Dialyseschlauch befindlichen Farbstoff Hoechst 33258 (0,1mg in Wasser pro DNA OD), übernacht komplexiert. Durch Zugabe von kristallinem Cäsiumchlorid wurde der Brechungsindex in einem Refraktometer auf 1,3942 eingestellt. Danach wurde die pflanzliche von der bakteriellen DNA für 48h mit 33000rpm bei 20°C in einer Ultrazentrifuge getrennt. Die sichtbare obere Bande, die die Phytoplasma DNA repräsentiert wurde abpipettiert und unter gleichen Bedingungen rezentrifugiert. Dies wurde solange wiederholt, bis keine pflanzliche Kontamination mehr zu sehen war. Der verbleibende Hoechst Farbstoff wurde durch Schütteln mit 2-Propanol entfernt und die DNA anschließend mit 2 Volumen 80% Ethanol gefällt. Nach dem Lösen in 10mM Tris-HCl (pH8.0) stand die DNA zur Sequenzanalyse bereit.

DNA Extraktion für Pulsfeldgelelektrophorese und DNA Verdau. Die Methode wird zur Isolierung vollständiger Phytoplasmagenome oder hochgereinigter DNA verwendet. Die Arbeitsschritte sind aufwendig und die extrahierten DNA-Mengen gering. Alle Arbeitsschritte erfolgen auf Eis oder bei 4°C. Phloemgewebe wird in einem isotonischen Sucrosepuffer (11ml pro 0,5g Gewebe; pro L:100g Sucrose, 1,5g BSA, 20g, PVP-15; 21,4 g KH₂PO₄, 4,1g K₂HPO₄, 5,3g Ascorbinsäure; pH 7,6) durch Mörsern homogenisiert. Grobe Zellbestandteile werden bei 3000rpm für 5min abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Zentrifugengefäß überführt und die Phytoplasmen werden bei hoher Geschwindigkeit (20min bei 12000rpm, Hochgeschwindigkeitspellet) pelletiert. Anschließend wird das Pellet vorsichtig in Sucrosepuffer resuspendiert und der Vorgang wiederholt. Das so erhaltene Pellet wird erneut vorsichtig resuspendiert und für 2min im Wasserbad auf 41°C erwärmt. Dann wird die gleiche Menge an 41°C warmer Agarose (2% InCert-Agarose) zugegeben und zügig gemischt. Die Mischung wird in rechteckige 50µl Mulden pipetiert und auf Eis erstarren lassen. Die verfestigten grünen Blöckchen werden in eine Sarcosin-Lösung (250µl je Blöckchen; 1% Sarcosin, 0,5M EDTA (pH8.0), 0,1mg Proteinase K) unter ständiger Bewegung bei 52°C übernacht inkubiert. Die Lösung wird gewechselt, bis die Blöckchen nahezu farblos sind. Anschließend werden die Blöckchen in 0,5M EDTA überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Vor der Pulsfeldelektrophorese werden die Blöckchen mehrmals mit 1x TAE (40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA; pH8.0) gewaschen um EDTA Reste zu entfernen. Anschließend werden die Agaroseblöckchen in ein 1%iges Agarosegel eingegossen und die Phytoplasma Genome von kontaminierender pflanzlicher DNA durch Elektrophorese getrennt (BioRad, CHEF-II PFGE Apparat). Nach Färbung mit Ethidiumbromid, wird der Gelbereich in dem sich die Phytoplasma Genome befinden aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wird in kleine Quader zerschnitten (5x2x5mm). Die isolierten Phytoplasma Genome können nun mit verschiedenen Restriktionsenzymen in der Gelmatrix in Fragmente gespalten werden. Die Auftrennung der Fragmente findet erneut im CHEF-II unter veränderten Laufbedingungen statt.

RNA Extraktion aus pflanzlichem Gewebe. Zur Transkriptomanalyse und c-DNA Herstellung wurde hochmolekulare RNA benötigt, die aus Phloem, Blattmittelrippen oder Knospen extrahiert wurde. Für die Apfeltranskriptomuntersuchungen wurden im März, August und November Proben von 1/93- und 12/93-infiziertem und nicht-infiziertem *M. x domestica cv.* Golden Delicious gesammelt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach der Zerkleinerung des Gewebes in der Retsch ZM200 Mühle in flüssigem Stickstoff wurden aus dem Gewebe RNA mit dem Sigma Spectrum Plant RNA Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Bei *C. roseus* und Tabak wurde die RNA aus isoliertem

Phloemgewebe mit dem oben genannten Kit nach Herstellerangaben extrahiert. Die Qualität der RNA wurde in Agarosegelen überprüft und die Menge photometrisch bestimmt.

PCR Amplifikation. Verschiedene PCR Verfahren wurden zur Amplifikation von Phytoplasma DNA aus pflanzlichem Gewebe durchgeführt. Zur generellen Überprüfung auf Apfeltriebsuchtinfection wurden die Primer fO1/rO1 eingesetzt (Lorenz et al., 1996). Dazu wurde 1µl des DNA Extrakts in einem 24µl PCR Reaktionsansatz pipetiert, der folgende Komponenten enthielt: 1x Reaktionspuffer, 5pmol fO1, 5pmol rO1, 0,1mM je Nukleotid und 0,125U Taq-Polymerase (Nippon Genetics). Die Reaktion wurde zu Beginn für 5min auf 95°C erhitzt und die DNA 35 Mal im Zyklus 30sec 95°C, 30sec 52°C, 1min 70°C amplifiziert. Die Reaktion wurde durch einen 5 minütigen 70°C Schritt beendet. Die Amplifikationsprodukte wurden durch Ethidiumbromid/Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Zum pathogenspezifischen Nachweis wurde das real time PCR Verfahren verwendet. Für die Amplifikation der avirulenten Stämme 1/93 und 2/4 wurden die Primer f460-1/93 (5'-GCCCCG AAATCCCTCCAAAAG-3') und r460-1/93 (5'-GGGTAAATTTTATCTTTTTTT-3') in Kombination mit der Taqman Sonde q1_93-460 (5'-[Cy5]TTTTGAAGGGGTAAATATTATCTT TTTTT[BHQ3]-3') verwendet. Zur Amplifikation der virulenten Stämme wurde die Primer f460-12/93 (5'- GCCCGAAATCCCTCCAAAAA-3') und r469-12/93 (5'-AGGTGAAATTTA TATTTTTTC-3') in Kombination mit der Taqman Sonde q12_93-460 (5'-[FAM]GTTTGAAG AGGTGAAATTTATATTTTTTC[BHQ1]-3') verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 25pmol der f und r Primer verwendet, 5pmol der Taqman Sonde, 1x Reaktionspuffer, 0,2mM je Nukleotid und 0,25U hotstart Polymerase (Ampliqon). Die zugesetzte DNA Menge betrug wie oben 1µl. Die DNA wurde in einer zwei-Schritt PCR amplifiziert, wobei zur Aktivierung der Polymerase eine Erhitzung auf 95°C für 15min erfolgte. Anschließend folgten 40 Zyklen mit 95°C für 15sec. und 53°C für 1min. Die Reaktionen wurden in einem BioRad CFX96 Cyler durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die interne Software des Herstellers.

Sequenzierung und Bioinformatik. Zur Sequenzierung der Genome des Stamms 1/93 und 12/93 sowie zur Durchführung der Transkriptomanalyse wurde die Firma GATC (Konstanz) beauftragt. Beide Sequenzierungen wurden mit der Next Generation Sequencing Technologie der Firma Illumina durchgeführt. Vor der Transkriptomanalyse wurde die extrahierte RNA einer rRNA Abreicherung unterzogen. Anschließend wurde durch reverse Transkription cDNA hergestellt, die mit der obigen Technik sequenziert wurde. Alle anderen Sequenzierungen wurden durch die Firma Eurofins (Ebersberg) durchgeführt. Die Daten der Genom- und Transkriptomanalyse wurden durch die Fa. GATC bioinformatisch verarbeitet und zum download bereitgestellt. Die Genomsequenzdaten wurden zusätzlich von der Bioinformatik im JKI-Quedlinburg und Dr. M. Kube (Humboldt Universität Berlin) analysiert. Zur Analyse kleinere Datensätze wurden die Programme in dem Softwarepaket Lasergene 7 verwendet.

Klonierung und Proteinexpression. Ein 100Bp langes DNA Fragment des ATPase Gens 460 von den Stämmen 1/93 und 12/93 wurde mit spezifischen Primern amplifiziert, in den Vektor pGEM-T ligiert und anschließend in *Escherichia coli* XL1 blue transformiert. Positive Klone wurden durch blau/weiß Selektion identifiziert und das klonierte Fragment durch Kolonie PCR verifiziert. Die Plasmide positiver Klone wurden aus LB Übernachtskulturen mit einem Plasmid Extraktionskit (Fa. Qiagen) extrahiert und das offene Leseraster der klonierten Fragmente durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurden die Fragmente mit den Enzymen *NcoI/NotI* aus den pGEM-T Vektoren geschnitten, in einen modifizierten Expressionsvektor (pGEX-5-3) subkloniert und in *E. coli* BI21λDE3 Zellen transformiert. Rekombinante Proteinfragmente mit virulenzspezifischen Markern wurden in analytischen Mengen hergestellt und zur Spezifitätskontrolle der Kaninchenantisera im Western Blot verwendet.

Herstellung der Antiseren und monospezifische Reinigung der IgGs. Vier Kaninchen wurden mit synthetisch hergestellten Oligopeptiden (n=15), die an *Limulus polyphemus* Hämocyanin (LPH) gekoppelt waren und spezifische Virulenzmotive enthielten immunisiert. Die Tiere wurden viermal behandelt wobei vor dem letzten Boost eine ELISA Erfolgskontrolle durchgeführt wurde. Anschließend wurde von jedem Tier 70ml Blut entnommen und von 20ml die IgG Fraktion durch Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Um die Spezifität der Antikörperfraktionen weiter zu steigern, wurde eine monospezifische Aufreinigung der Antiseren vorgenommen. Dazu wurden die synthetisch erzeugten Oligopeptide an cyanbromid-aktivierte Sepharose gebunden und die jeweils zugehörigen Serumfraktionen aufgetragen. Die spezifisch gebundenen IgGs wurden anschließend von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der ATPasen des Stamms 1/93 und 12/93 aus pflanzlichen Extrakten wurden monospezifisch-gereinigte Antikörper an cyanbromid-aktivierte Sepharose entsprechend der Herstellerangaben kovalent gebunden.

Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe, Polyacrylamidelektrophorese und Western Blotting. Proteine wurden durch mehrere Verfahren aus phytoplasma-infizierten Pflanzen extrahiert, um die Spezifität der Kaninchenantiseren zu testen. In der einfachsten Form wurde Phloemgewebe aus infizierten und gesunden Pflanzen (Apfel, Tabak, *C. roseus*) direkt in 2 x SDS-Extraktionspuffer (0,02%SDS, 38mM Glycin, 5mM Tris) gegeben, homogenisiert, erhitzt und zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1/5 Volumen SDS-Ladepuffer (5% β -Mercaptoethanol, 0,02% Bromphenolblau, 250mM Tris-HCl (pH6.8), 10% SDS, 30% Glycerin) versetzt. Eine Anreicherung der bakteriellen Proteine wurde durch differenzielle Zentrifugation erreicht (siehe DNA Extraktion für Pulsfeldgelelektrophorese). Das zweite Hochgeschwindigkeitsspellet wurde in 2 x SDS-Extraktionspuffer aufgenommen und wie oben weiter behandelt. Zur spezifischen Anreicherung von Membranproteinen wurde das zweite Hochgeschwindigkeitsspellet in 1x PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 1,8mM KH_2PO_4) aufgenommen und mit 1/8 Volumen Triton-X114 (10% Triton-X 114 in 1xPBS) versetzt. Die Mischung wurde 1h auf Eis geschüttelt und dann mit 10000rpm bei 4°C für 10min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 5min bei 37°C inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (10min, 13000rpm, RT) wurden die Phasen getrennt, wobei sich in der unteren Triton-Phase die Membranproteine befanden, während sich in der oberen wässrigen Phase cytoplasmatische Proteine befanden. Die Proteine aus den Fraktionen wurden mit 1 Volumen kaltem Aceton gefällt, das Pellet wurde erneut mit Aceton gewaschen, getrocknet und in SDS-Extraktionspuffer resuspendiert.

Die Auftrennung der extrahierten Proteine fand durch diskontinuierliche SDS Gelelektrophorese in 10%igen Polyacrylamidgelen statt. Ein gefärbter Gewichtsstandard wurde zur Kontrolle der Proteintrennung aufgetragen. Nach Beendigung des Laufs wurden die Proteine durch Elektroblothing auf eine PVDF Membran transferiert. Die Vollständigkeit des Transfers wurde wiederum am gefärbten Gewichtsstandard kontrolliert. Die Membran wurde anschließend in 2% Magermilchpulver/1xPBS für 10min zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubiert. Anschließend wurde die Membran in ein 50ml Serumröhrchen überführt und übernacht bei 4°C mit einer 2% Magermilchpulver/1xPBS/Antikörper-Mischung unter ständiger Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5min mit 1xPBS/0,05% Tween20 gewaschen und anschließend mit einer Lösung, die den alkalische Phosphatase konjugierten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (1:10000 in 2%Magermilchpulver/1xPBS) enthielt für 1,5h inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3 x 5min mit 1xPBS/0,05% Tween20 gewaschen. Die Antigen-Antikörperreaktion wurde durch Zugabe einer NBT/BCIP Fertiglösung als bräunlicher Niederschlag sichtbar.

Einbettung von pflanzlichem Material und immunhistologische Untersuchungen. Wegen der umfassenden Methodik können die einzelnen Schritte nicht in allen Details wiedergegeben werden. Sprossproben (L, B, H; 3mm x 2mm x 2mm) von 1/93- und 12/93- infizierten *C. roseus* Pflanzen wurden in Karnovskys Lösung (4% Formaldehyd, 5% Glutaraldehyd, 0.08M Natriumphosphatpuffer, pH7,2) übernacht bei 4°C fixiert. Nach kurzem Waschen in 1xPBS wurden die Pflanzenstücke in einer ansteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 95% in 1xPBS und 100% jeweils 30min bei 4°C) entwässert. Nach einer weiteren Inkubation mit 100% EtOH wurden die Proben auf 37°C erwärmt und in eine 1:1 Mischung Ethanol/Steedmans Wachs übernacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 2 x 1h in 100% Wachs inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzenstückchen einzeln in Tröge mit frischem Wachs überführt und übernacht bei Raumtemperatur ausgehärtet. Von den Blöckchen wurden im Mikrotom Gewebedünnschnitte (20µM) angefertigt. Die Dünnschnitte wurden auf Objektträger überführt und durch Zugabe eines Tropfen Wassers gestreckt. Das Wasser und Wachs wurden anschließend durch Behandlung mit einer absteigenden Ethanolserie (3x 100%, 90% und 50% in 1xPBS) entfernt. Anschließend wurde mit 1xPBS und 100% -20°C kaltem Methanol gewaschen und die Probe mit SB Puffer (50mM PIPES, 5mM MgSO₄, 5mM EGTA; pH6,9) überschichtet. Die nun folgenden Schritte sind mit denen in der oben aufgeführten Western Blot Analyse vergleichbar. Nach Entfernung des SB Puffers wurden die Dünnschnitte mit einer Mischung aus 1xPBS/BSA (1mg/ml) und primärem Antikörper übernacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit 1xPBS/0,05%Tween20 gewaschen und der sekundäre Antikörper in 1xPBS/BSA zugegeben, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein) markiert war. Nach erneutem Waschen wurde der Gewebeschnitt mit einer Anti-Fading Lösung beträufelt und stand nun für die Fluoreszenzmikroskopie bereit. Nach der Antikörperbehandlung wurde der Gewebeschnitt noch mit einer DAPI (4',6'-Diamidin-2-Phenylindol) Lösung zur Färbung von DNA behandelt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Zeiss Axiovert Inversfluoreszenzmikroskop analysiert. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera gemacht.

4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Prämunisierung bei *Catharanthus roseus*

Das Verhalten des virulenten Stamms 12/93 und des avirulenten Stamms 1/93 wurde nach zeitlich versetzter und simultaner Inokulation in drei Versuchsserien getestet. Insgesamt wurden 55 Pflanzen über einen Zeitraum von drei Jahren beobachtet und beprobt. Die Zweitinfektion erfolgte nur dann, wenn die systemische Besiedlung durch den erstinfizierten Stamm mit PCR Analysen bestätigt wurde. Die erste Probenahme erfolgte je nach Versuch 3 bis 6 Monate nach der Zweitinfektion. Die Probenahme fand an den in Abb. 1 dargestellten Positionen statt.

Die genaue Anzahl der Pflanzen in den Versuchen I – III sind in den Tabellen 1 bis 3 aufgeführt. Es wurden nur real time PCR Werte in die Auswertung einbezogen, deren Ct Wert geringer als 35 war (der Ct Wert gibt den Punkt/Zyklus an, bei dem die Amplifikationskurve den vom System festgelegten Schwellenwert kreuzt). Die Ergebnisse wurden qualitativ (in %) aber auch quantitativ (Ø der Ct Werte) ausgewertet. Die qualitativen Angaben geben im Gegensatz zu den quantitativen Angaben die Nachweisbarkeit wieder, geben aber keine Information über den Erregertiter. In systemisch infizierten *C. roseus* Pflanzen lag bei maximaler Infektion der Ct Wert bei ca. 19, unter Berücksichtigung der in M&M angegebenen Extraktionsbedingungen. Dies entsprach einem Bakterientiter von ca. 10⁹ Bakterien pro Gramm Phloemgewebe.

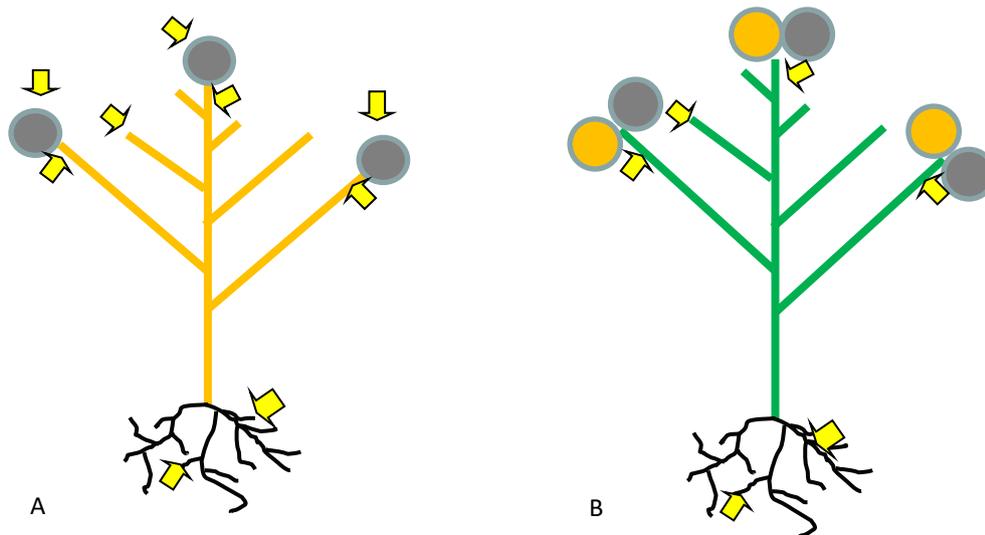


Abb. 1A und B. Schema der Probenahme bei *C. roseus* Versuchen. A, systemisch infizierte *C. roseus* Pflanzen (Stamm 1/93 oder 12/93), wurden mit dem Stamm der jeweils anderen Virulenzkategorie zweitinfiziert (graue Kreise). B, gesunde Pflanzen wurden mit beiden Stämmen simultan infiziert (graue und orange Kreise). Gelbe Pfeile verdeutlichen die Orte der Probenahme.

Die Ergebnisse aller Versuche zeigen, dass 1/93-vorinfizierte und 12/93-zweitinfizierte Pflanzen den Stamm 1/93 über die gesamte Laufzeit der Versuche zu fast 100% und in hoher Konzentration (Ct Wert 19 – 26) in Wurzel und Spross enthielten (Tabelle 1). Bereits nach wenigen Monaten war der Stamm 1/93 in den 12/93 Pfropfreisern in hoher Konzentration nachweisbar. Der Stamm 12/93 hingegen war nur sporadisch und in sehr geringer Zahl in Spross oder Wurzel vorhanden. Selbst im 12/93 Pfropfreis, in dem er anfänglich zu fast 100% vorhanden war, wurde er verdrängt und war später nur noch in wenigen Reisern nachweisbar.

Bei umgekehrter Pfropfreihenfolge ergab sich ein anderes Bild (Tabelle 2). Der Stamm 1/93 besiedelte in wenigen Monaten die Pflanze vollständig. Im oberirdischen Teil verdrängte er den Stamm 12/93 fast vollständig und eine Besiedlung des 1/93 Pfropfreises durch den Stamm 12/93 fand praktisch nicht statt. In der Wurzel koexistierten beide in ungefähr gleicher Anzahl und dies blieb bis zu Versuchsende stabil.

Bei simultaner Pfropfung, zeigte sich der Stamm 1/93, eher in der Lage die Pflanzen zu besiedeln (Tabelle 3). Im ersten und zweiten Versuch zeigten alle Proben bereits bei der ersten Probenahme einen hohen 1/93 Titer in der Wurzel. Dieser war bis zum Versuchsende stabil. Der Stamm 12/93 war zwar nachweisbar, aber in weit geringerem Titer und in deutlich weniger Proben. In den Sprossen unterhalb der Pfropfstellen und im Rest der Pflanze waren die Zahlen nicht so eindeutig. Während man im ersten Versuch einen klaren Vorteil des Stamms 1/93 im Spross erkennen konnte, waren die Zahlen im zweiten und dritten Versuch eher ausgewogen. Zum Ende der Versuche gab es bei allen Infektionsgruppen zunehmend Ausfälle durch Pilzinfektionen.

4.2 Prämunisierung bei *M. x domestica*

Wie bei *C. roseus* wurde der Infektionserfolg der ersten Inokulation bei allen Versuchspflanzen überprüft. Der Nachweis bei frisch inokulierten Apfelpflanzen war schwieriger, da eine systemische Infektion sehr viel langsamer erfolgte und auch der Phytoplasmentiter geringer war. Bäume die mehrfach negativ getestet wurden, wurden erneut infiziert. Im CP-IA Versuch wurden insgesamt 165 Apfelbäume inokuliert. 16 Individuen dienten als gesunde Kontrollen. Durch kulturtechnische Probleme kam es zu starken Verlusten bei der Unterlage Bittenfelder, so dass 143 inokulierte und 15 gesunde Pflanzen im Dezember 2012 auf Erstinfektionen überprüft werden konnten. Die hier

aufgeführten Zahlen unterscheiden sich von denen in vorherigen Zwischenberichten, da im Untersuchungsverlauf abgestorbene Bäume nicht in der Endauswertung berücksichtigt wurden. Die Ergebnisse des CP-IA sind in Tabelle 4 zusammengefasst. 96 Individuen wurden mit den avirulenten Stämmen 1/93 und 2/4 infiziert, 50 Individuen wurden mit den virulenten Typen 12/93 und 3/6 infiziert. In 89 Bäumen wurden avirulente Typen und in 49 Bäumen virulente Typen bei der ersten Kontrolle gefunden. In 9 Pflanzen, die mit avirulenten Stämmen inokuliert wurden, waren virulente oder beide Virulenztypen zu finden. Nur in einem Baum, der mit dem virulenten Stamm 3/6 infiziert war, wurde ein avirulenter Typ gefunden. Die Untersuchungen wurden mit Wurzelgewebe durchgeführt, um eine systemische Infektion sicherzustellen. Eine weitere Kontrolle wurde nach der zweiten Infektion im Dezember 2013 durchgeführt. Vierzehn 1/93-infizierte Pflanzen wurden nicht zweitinfiziert und dienten als weitere Kontrollen. In 119 Pflanzen wurden schwach virulente und in 77 Pflanzen stark virulente Typen gefunden. Die Krankheitssymptome waren während der "Topfphase" bei den meisten, der mit virulenten Stämmen infizierten Pflanzen ausgeprägt. 35 der 50 mit 3/6 oder 12/93-infizierten Pflanzen zeigten Hexenbesen. Es zeigten auch drei 1/93-infizierte Pflanzen Hexenbesen. Nach der zweiten Inokulation bestanden die Symptome am neuen Pfropfreis meist aus Hexenbesen und vergrößerten Nebenblättern. Erwähnenswert ist, dass auch bei 14 Infektionsreisern des Typs 1/93 Hexenbesen auftraten.

Nach dem ersten Standjahr wurde die Gegenwart der Virulenztypen in Spross und Wurzel untersucht. In 117 Pflanzen konnten avirulente Typen in Wurzel oder Spross nachgewiesen werden. Die virulenten Typen waren in 40 Pflanzen vorhanden. Fünf inokulierte Pflanzen waren phytoplasma-negativ. Ungeachtet der Pfropfihenfolge waren 80% aller infizierten Pflanzen durch avirulente Typen und 30% durch virulente Typen besiedelt. Der Anteil hat sich in 2015 mit 79% für die avirulenten Typen kaum verändert, bei den virulenten Typen fand eine deutliche Reduktion auf 21% statt. Symptome waren nach einem Standjahr nur bei 53 Pflanzen zu erkennen, wobei die meisten (n= 47) Individuen nur eine leichte Rotlaubigkeit aufwiesen. Eine Korrelation zur Reihenfolge, mit der die Infektionen stattfand war nicht zu erkennen. Im zweiten Standjahr waren nur bei 7 Pflanzen vergrößerte Nebenblätter und bei einer Pflanze ein Hexenbesen zu beobachten. Sieben Pflanzen zeigten einen geringen Wuchs im Vergleich zur Gruppe. Der Durchmesser der Unterlage wurde ebenfalls als Krankheitsmarker einbezogen. Alle Unterlagen zeigten mit 6 bis 10mm einen typischen Zuwachs von 2014 nach 2015. Der Durchmesser lag zwischen 15 und 27mm je nach Unterlage. Da die Größe der Fallgruppen unterschiedlich war, wurden keine statistischen Auswertungen vorgenommen. Unterlagen- oder sortenspezifische Reaktionen auf die Infektionen konnten nicht beobachtet werden. Weder in Bezug auf die Infektionsrate noch den Phytoplasmatiter zeigten sich Abweichungen zwischen den Gruppen.

Der CP-IIA Versuch wurde ein Jahr später initiiert und sollte die Ergebnisse des ersten Versuchs bestätigen. Alle Auswertungen sind zusammenfassend in Tabelle 5 dargestellt. Im Gegensatz zum CP-IA Versuch, wurde nach der Erstinfektion eine Phytoplasmakontrolle mit nicht pathogen-spezifischen Primern durchgeführt, in der insgesamt 191 von 192 infizierten Pflanzen positiv getestet wurden. Ein anschließender Test mit pathogenspezifischen Primern zeigte jedoch eine stark verminderte Anzahl positiver Individuen. In diesem Test wurde in 44 Pflanzen der avirulente Typ und in 109 Pflanzen der virulente Typ nachgewiesen. In 10 Pflanzen waren beide Typen vorhanden. Insbesondere der avirulente Typ 1/93 wies eine sehr geringe Infektionsrate auf und die Mehrzahl der Tests wies die Gegenwart eines virulenten Stamms nach. Auch beim Stamm 2/4 war die Infektionsrate unter 50%. Im Gegensatz dazu waren die Infektionen bei den virulenten Stämmen mit 93% erfolgreich. Nach der Zweitinfektion hatte sich das Verhältnis etwas zugunsten der avirulenten Stämme verschoben. Insgesamt wurden in 115 Pflanzen avirulente Stämme und in 154 Pflanzen virulente Stämme nachgewiesen. Nach dem ersten Standjahr im Feld wurden im Oktober 2015 Spross und Wurzelproben entnommen. Davon zeigten 71 Pflanzen den avirulenten und 113 Pflanzen den virulenten Typ. 40 Pflanzen waren phytoplasma-negativ. Am Ende des Beobachtungszeitraums waren bis auf 8 Pflanzen, die ein unspezifisches Kümern aufwiesen, keine Krankheitssymptome zu beobachten. Obwohl nach der

Zweitinfektion 36 mit stark virulenten Stämmen infizierte Bäume Hexenbesen aufwiesen. Zum Teil zeigten diese im Frühjahr 2015 noch vergrößerte Nebenblätter, waren jedoch im Oktober ohne spezifische Symptome.

4.3 Genomsequenzierung des avirulenten und virulenten Apfeltriebsuchtsstamms 1/93 und 12/93

Phytoplasma-DNA der *Candidatus* Phytoplasma mali Stämme 1/93 und 12/93 wurde nach präparativer DNA Extraktion aus infizierten *Nicotiana occidentalis* Pflanzen über Bisbenzimid Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Von beiden Organismen konnten ca. 10µg DNA isoliert werden (Abb. 2). Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC mit der Illumina Technik durchgeführt. Nach stringenten Qualitätskriterien wurden die Sequenzreads gefiltert und gegen eine Datenbank mit Tabaksequenzen verglichen. Alle Sequenzen die zur Wirts-DNA homolog waren, wurden aussortiert. Die Reads (ca. 5 Mio für 12/93 und 1.1 Mio. für 1/93) wurden in einem zweiten Schritt mit sich selbst verglichen, um redundante Sequenzen zu entfernen. Die verbliebenen Datensätze wurden dann mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz des Stamms AT im sogenannten "guided reference assembly"-Verfahren verglichen. Von beiden Organismen wurden zwischen 500 und 1000 Contigs (zusammengefügte Sequenzreads) generiert, die in ihrer Länge zwischen 300bp und 80000bp variierten. Eine weitere Analyse dieser großen Datenmenge war mit der Softwareausstattung und Rechenkapazität am JKI-Dossenheim nicht zu bewältigen. Daher wurde die Bioinformatik am JKI-Quedlinburg und Dr. M. Kube von der Humboldt Universität in Berlin gebeten, die weitere Analyse zu übernehmen. Dr. Kube konnte mit speziellen Programmen und im erneuten Vergleich mit dem vorhandenen Genom des Stamms AT, die Contigs beider Organismen zu jeweils 603Kbp großen Fragmenten zusammensetzen. Eine anschließende Überprüfung der generierten Genome nach *in silico* Verdauen mit Makrofragmentanalysen aus physikalischen Kartierungen (Abb. 3) ergab jedoch erhebliche Diskrepanzen in der Fragmentgröße. Die Bioinformatik in Quedlinburg konnte die Datenlage leicht verbessern, war aber nicht in der Lage die Genome zusammenzufügen. Aus PFGE Analysen war ersichtlich, dass die Stämme 1/93 und 12/93, eine zum Stamm AT unterschiedliche Genomgröße besaßen (Abb. 4). Während der Stamm 12/93 nur wenig größer war, unterschied sich der Stamm 1/93 deutlich.

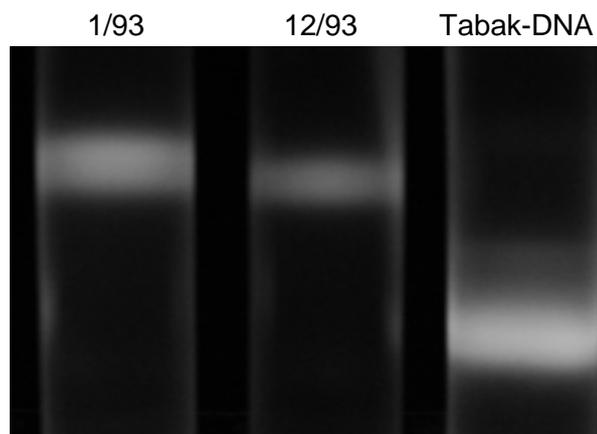


Abb. 2. Bisbenzimid CsCl Dichtegradientenzentrifugation. Rezentrifugation Hoechst gefärbter DNA zeigt eine deutliche Trennung der Wirts DNA (Tabak) und der Phytoplasma DNA.

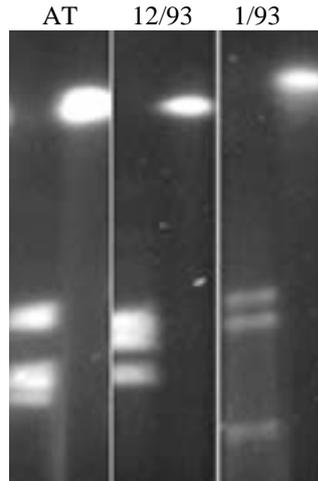


Abb. 3. Makrorestriktionsfragmentanalyse der *Ca. P. mali* Stämme AT, 12/93 und 1/93 nach I-CeuI Verdau. Parameter: 1% Agarose, 1 x TAE, 6C/cm, 14°C, 10-20sec switch time, 22h.

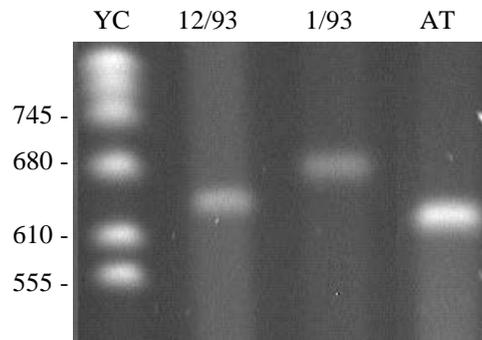


Abb. 4. PFGE Elektrophorese isolierter Genome der *Ca. P. mali* Stämme AT, 12/93 und 1/93. Parameter: 1% Agarose, 1 x TAE, 6C/cm, 14°C, 20-100sec switch time, 22h.

Die Fa. GATC wurde erneut beauftragt, die Sequenzreads bioinformatisch zu analysieren und im *de novo*-Modus zu assemblieren. Dadurch sollte erreicht werden, dass stammtypische Fragmente, die nach dem Abgleich mit dem Stamm AT möglicherweise eliminiert wurden, in die Assemblierung mit einfließen. Trotz dieses erneuten Versuchs konnten jedoch keine vollständigen Genome zusammengefügt werden. In Tabelle 6 und 7 sind Contigs aus der *de novo* Assemblierung der Stämme 1/93 und 12/93 mit den homologen Bereichen aus dem Genom des Stamms AT aufgelistet. Der direkte Vergleich der großen Contigs mit dem Gesamtgenom war schwierig, da Bereiche in den Contigs invertiert sind und auch eine andere Genabfolge zeigen. Dies wurde in Vergleichen mit dem Programm Mummer deutlich, in denen alle wesentlichen Contigs gegen das Genom des Stamms AT verglichen wurden (Abb. 5). Während der Vergleich AT und 12/93 eine Lineare über die gesamte Länge der Contigs ergab (Abb. 5B), war dies beim Vergleich AT und 1/93 nicht der Fall (Abb. 5A). Die von der Mittellinie abweichenden und in andere Richtungen deutenden Geraden (blaue Linien), symbolisieren Bereiche mit Inversionen. Hier ist die Genabfolge im Stamm 1/93 deutlich unterschiedlich zum Stamm AT. Summiert man die Länge der größten Contigs, errechnet sich beim Stamm 1/93 eine Genomgröße von ca. 590Kbp und beim Stamm 12/93 eine Genomgröße von ca. 550Kbp. Unter Einberechnung eines 42Kbp großen Fragments, das beim Stamm AT an beiden Enden des linearen Genoms vorkommt, erreicht man mit 630Kbp für den Stamm 1/93 und mit 600Kbp für den Stamm 12/93 Genomgrößen, die mit den PFGE Schätzwerten ungefähr übereinstimmen.

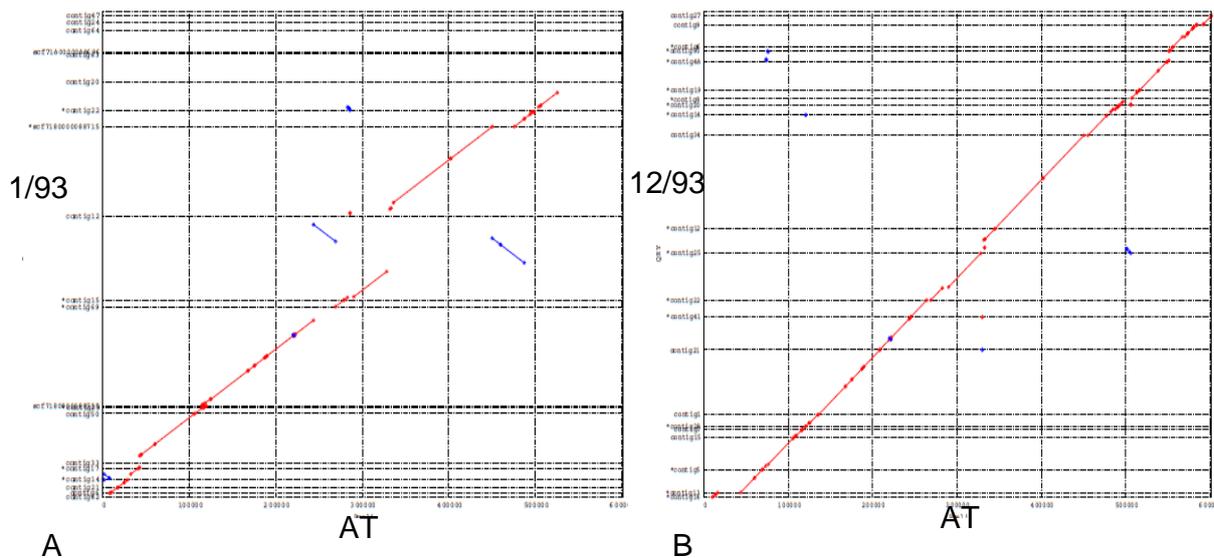


Abb. 5 A, B. Vergleich der gesamten Contigs des Stamms 1/93 und 12/93 gegen das Referenzgenom des Stamms AT. Durchgehende rote Linien verdeutlichen eine hohe Übereinstimmung und Kolinearität der Genome. Blaue Linien verdeutlichen eine Störung in der Abfolge und Inversionen von Genomsegmenten.

Um die Anordnung der Contigs zu überprüfen, wurden zwanzig endständige Primerpaare von Enden potenziell benachbarter Contigs abgeleitet. In PCR Reaktionen wurde getestet, ob DNA Fragmente gebildet wurden. Keine der Primerkombinationen führte zur Amplifikation von DNA Fragmenten. Das bedeutet, dass die Fragmente entweder keine räumliche Nähe zueinander besitzen, die Assemblierung an den Enden fehlerhaft ist, oder das Sequenzen fehlerhaft sind. Um Contigs über selten vorkommende Restriktionsschnittstellen anzuordnen, wurden PFGE Makrofragment-Restriktionsanalysen von Genomen beider Stämme durchgeführt. Die Arbeiten haben sich jedoch im Rahmen des Projekts als zu arbeitsintensiv herausgestellt.

4.4 Herstellung pathogenspezifischer Antisera zur Differenzierung der AT Stämme 1/93 und 12/93

Um die Populationsdynamik in den Siebröhren von *C. roseus* während der Prämunisierungsexperimente nicht nur mit molekularen, sondern auch mikroskopischen Techniken zu untersuchen, wurden pathogenspezifische Antikörper hergestellt. Als Zielprotein wurde die ATPase ATP460 gewählt. Frühere Untersuchungen hatten festgestellt, dass dieses Gen nur in einer Kopie im Genom der Organismen vorhanden ist. Reverse Transkriptasexperimente mit RNA Extrakten aus infizierten Pflanzen zeigten, dass dieses Gen in messenger RNA umgeschrieben wird (Abb. 6) und es somit auch potentiell translatiert wird.

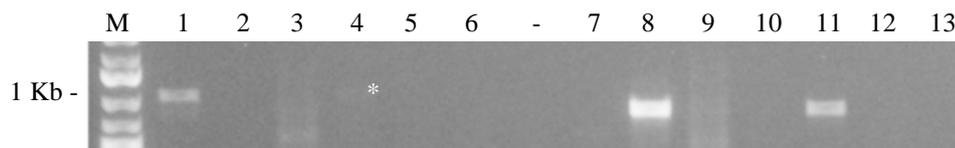


Abb. 6. DNA Synthese zum Nachweis der Transkription des ATPase Gens 460 in 1/93 infiziertem Tabak (Spur 1-3 und 7-9) und *C. roseus* (Spur 4-6 und 10-12). M, DNA Größenstandard; Spur 13, negative Kontrolle. Spur 1, 4, 7 u. 10 Ca. P. mali Stamm 1/93; Spur 2, 5, 8 u. 11 Ca. P. mali Stamm 12/93; Spur 3, 6, 9 u. 12 gesunde Kontrolle. Zur Erst- und Zweitstrangsynthese wurden unterschiedliche Primer verwendet. Das Vollängentranskript des ATPase Gens 460 des Stamms 12/93 ist kürzer als das des Stamms 1/93. *, schwache Bande.

Das Gen enthält Sequenzmotive, die virulenzkorreliert sind und sich zwischen stark virulenten und avirulenten Stämmen unterscheiden (Abb. 7). Die Region ist identisch mit der Zielregion für die Taqman Sonden im stammspezifischen real time PCR Assay. Bioinformatische Analysen ergaben, dass es sich bei den ATPasen um potenziell membranständige Proteine handelt.

```

1/93 5' -   AATGATGTTCCAAAAGAAAAAAGATAAAAATTTACCCCTTCAAAA   3'
           N D V P K E K K I K F T P S K
12/93 5' -   ACTGATGCTCCAGAAGGAAAAAATATAAATTTACCTCTTCAAAC   3'
           T D A P E G K N I N F T S S N

```

Abb. 7. Virulenzkorrelierte Region des ATPase Gens ATP460 der Stämme 1/93 und 12/93 mit der zugehörigen Peptidsequenz, die nach Konjugation an LPH zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurde. Die unterschiedlichen Positionen sind im Peptid 1/93 hervorgehoben.

Die ursprüngliche Absicht ein rekombinantes Vollängenprotein zur Immunisierung zu verwenden, wurde zugunsten einer Immunisierung mit synthetisch hergestellten und konjugierten Oligopeptiden geändert. Beide Gene sind im up- und downstream Bereich der Oligopeptidsequenz weitgehend homolog und kodieren somit für identische Proteinbereiche. Die Stammspezifität wäre bei der Verwendung längerer Proteine nicht gegeben. Parallel dazu wurde ein ca. 100bp-langes Fragment beider Stämme in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert und als positive Kontrolle für Immunoblotexperimente verwendet. Zur einfacheren Handhabung der 3-4kDa schweren Oligopeptide wurden sie als GST-Fusionsproteine exprimiert.

Die Antiseren gegen das 1/93- und 12/93 Fusionspeptid zeigten vor der letzten Immunisierung ELISA Titer von 1:200000 und verdeutlichten damit eine gute Immunantwort der Testtiere auf das Immunogen. Von vier Testtieren wurden die IgG Fraktionen gereinigt und je Tier wurden zwischen 120mg und 180mg Antikörper (ca. 12 – 18µg/µl) erhalten. Diese IgG Fraktionen waren die Basis für die folgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Western Blot Experimente.

4.5 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Western Blot Experimente

Zur pathogen-spezifischen Lokalisation der Apfeltriebsuchtstämme 1/93 und 12/93 wurden Semidünnschnitte von 1/93 und 12/93-infizierten *C. roseus* Pflanzen angefertigt. Die Experimente wurden zuerst mit den o. g. IgG Fraktionen durchgeführt. DAPI Färbungen wurden zur Kontrolle der Phytoplasma-Besiedlung und zur allgemeinen Kontrolle des Gewebezustands angefertigt (Abb. 8). Erste Experimente mit dem 12/93 Antiserum schienen eine spezifische Reaktion der Antikörper mit dem Zielprotein anzudeuten (Abb. 8). Im Vergleich zum umgebenden Gewebe erschien die grünliche Fluoreszenz in den Siebröhren konzentriert. Ein ähnliches Bild ergab sich auch in den Untersuchungen mit dem 1/93 Antiserum.

Mehrfache Wiederholungen der Experimente mit weiteren Serien eingebetteter pflanzlicher Proben konnten die ersten vielversprechenden Resultate nicht bestätigen. Da die Untersuchungen technisch aufwendig und zeitintensiv sind, wurde die Spezifität und Reaktivität der Antikörper mit pflanzlichen Proteinextrakten getestet. Dazu wurden die Antiseren zuerst an einfachen SDS-Proteinextrakten aus isoliertem Phloem infizierter Apfelpflanzen, *C. roseus* und Takak getestet. Die Antiseren zeigten in diesen Experimenten starke Kreuzreaktion mit pflanzlichen Proteinen und maskierten dadurch potentiell spezifische Reaktionen. Um die unspezifischen Antikörper zu entfernen, die mit pflanzlichen

Proteinen kreuzreagierten wurden die IgG Fraktionen mit aceton-gereinigten Proteinen gesunder Apfel, Tabak und *C. roseus* Pflanzen abgesättigt. Die Kreuzreaktionen der verbliebenen Antikörper mit pflanzlichen Proteinen waren zwar schwächer, aber phytoplasma-spezifische Reaktionen waren nicht zu erkennen.

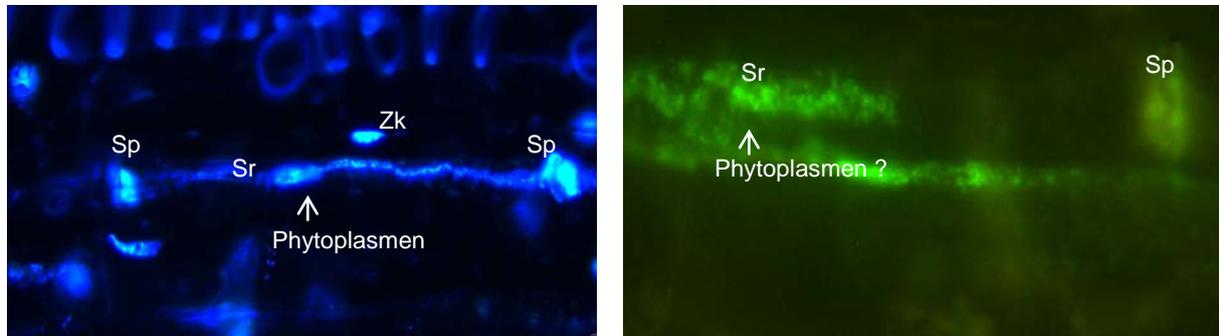


Abb. 8. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen longitudinaler Semidünnschnitte 12/93 infizierter *C. roseus* Pflanzen. Die DAPI-Färbung (links) macht DNA haltige Strukturen sichtbar. Sr, Siebröhre, Zk, Zellkern, Sp, Siebplatte. Fluorescein-Fluoreszenz (rechts) nach Antikörpermarkierung mit den monospezifisch gereinigten IgGs gegen die ATPase des Stamms 12/93.

Um die membranständigen Phytoplasmaproteine anzureichern, wurden Triton X114 Extraktionen mit Hochgeschwindigkeitspellets (siehe M&M) infizierter und gesunder *C. roseus*- und Tabakpflanzen durchgeführt. Alle Versuche die angereicherten Proteine in Western Blot Experimenten mit den kreuzabsorbierten IgG Fraktionen nachzuweisen waren negativ (Abb. 9). Zwar waren in den *C. roseus* Fraktionen Banden sichtbar, diese waren jedoch unspezifisch und immer auch in der gesunden Kontrolle vorhanden.

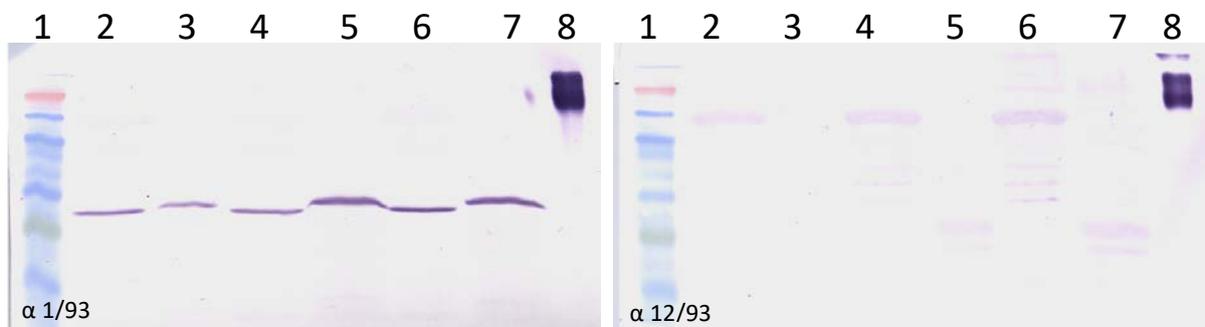


Abb. 9. Immunoblotexperimente mit Triton X114 extrahierten Proteinen und kreuzabsorbierten IgG Fraktion des 1/93- und 12/93 Antiserums. 1, Markierter Proteingrößenstandard; 2, lösliche Proteinfraction von Tabak (IP); 3, membranständige Proteinfraction Tabak (mP); 4, IP von 1/93-Tabak; 5, mP von 1/93-Tabak; 6, IP von 12/93-Tabak; 7, mP von 12/93-Tabak; 8, links positive Kontrolle für Antiserum 1/93, rechts positive Kontrolle für Antiserum 12/93

Um alle unspezifischen Pflanzenreaktionen auszuschließen, wurden die Antiseren einer weiteren Affinitätschromatographischen Aufreinigung unterzogen. Dazu wurden die 1/93- und 12/93-spezifischen Oligopeptide an cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt. Nach der Affinitätschromatographischen Bindung der Antikörper an die Matrix und der anschließenden Elution sollten nur noch hochspezifische IgGs verbleiben. Erneut wurden Western Blots angefertigt, die Proteine aus den Hochgeschwindigkeitspellets und aus den Pellets des Zentrifugationsschritts zuvor enthielten. Erneut waren Banden auf den Membranen erkennbar (Abb. 10), jedoch wesentlich schwächer als bei den Analysen zuvor. Obwohl nicht

in allen Proteinspuren gleiche Bandenmuster zu sehen waren, konnte keine Bande einer spezifischen Reaktion der Antikörper mit den ATPasen zugeordnet werden.

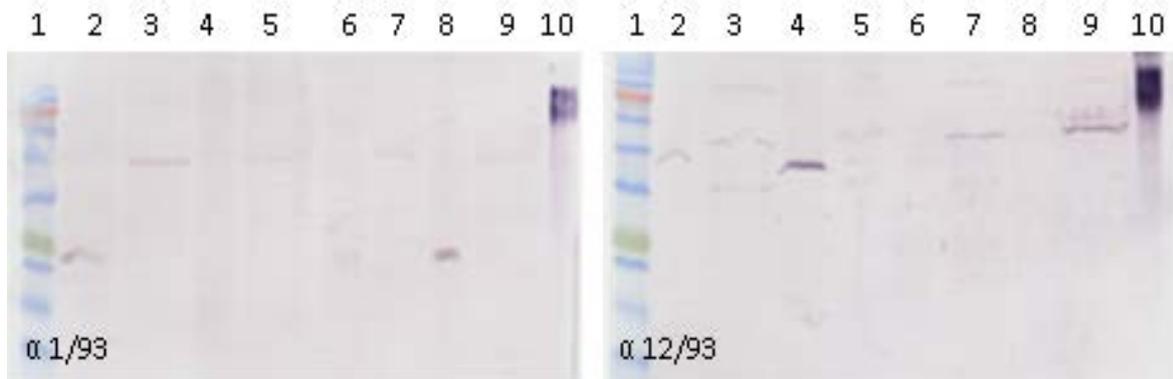


Abb. 10. links. 1, Farbmarkierter Proteinstandard; 2, membranständige Proteinfraction von 1/93 infiziertem Tabak aus dem Pellet der hochtourigen Zentrifugation (mP-hs); 3 lösliche Proteinfraction von 1/93 infiziertem Tabak aus dem Pellet der niedertourigen Zentrifugation (hP-ls); 4 und 5 wie Spur 2 und 3 nur mit dem Pellet aus niedertouriger Zentrifugation. 6 – 9, Extraktion und Auftrageschema wie bei 2 - 5 nur mit gesundem Tabak. 10, BSA mit konjugiertem 1/93 Peptid. Abb. rechts. Auftrageschema wie links. In den Spuren 2 - 5 befinden sich 12/93 Proben.

In einem weiteren affinitätschromatographischen Experiment wurden die verbliebenen monospezifisch-aufgereinigten 1/93 und 12/93 Antikörper an cyanbromid-aktivierte Sepharose gebunden, um aus einem präparativen wässrigen Proteinaufschluss infizierter Tabakpflanzen die ATPasen spezifisch zu binden. Erneut wurden Hochgeschwindigkeitspellets hergestellt und in 20ml 1xPBS/Tween20 resuspendiert. Tween20 sollte die Membranen destabilisieren und die Proteine schonend herauslösen. Die sterilfiltrierten Überstände wurden auf Säulen aufgetragen und nach mehreren Waschschritten wurden die gebundenen Proteine mit 0.2M Glycin pH2,7 eluiert und mit Aceton gefällt. Nach dem Trocknen wurden die Proteine gelelektrophoretisch getrennt und eine Western Blot Analyse wie zuvor durchgeführt. Erneut konnten keine spezifischen Reaktionen der Antikörper mit Proteinen auf den Membranen festgestellt werden.

4.6 Transkriptomanalyse 1/93-, 12/93- und nicht-infizierter Apfelpflanzen

Die *Ca. P. mali* Stämme 1/93 und 12/93 verursachen unterschiedliche Symptome in infizierten *M. x domestica* Sorten. Der Stamm 1/93 verursacht in der anfälligen Sorte Golden Delicious nach einer experimentellen Infektion vergrößerte Nebenblätter und verursacht im weiteren Verlauf der Krankheit oftmals keine weiteren sichtbaren Symptome. Der Stamm 12/93 hingegen induziert nach einer Neuinfektion starke Hexenbesenbildung und vergrößerte Nebenblätter in der Sorte Golden Delicious. In den Folgejahren kommt es immer wieder zur Bildung von Hexenbesen und vergrößerten Nebenblättern. Da nicht bekannt ist, in welchem Entwicklungsstadium diese phänotypischen Veränderungen induziert werden, wurden Pflanzenproben zu Beginn der Vegetationsperiode im März, zum Höhepunkt der Vegetationsperiode im August und beim Eintritt in die Vegetationsruhe im November gesammelt. Im März und November wurden von der nicht-infizierten, 1/93-infizierten und 12/93-infizierten Sorte Golden Delicious Sprossphloem und Knospen beprobt. Im August wurden Mittelrippen anstatt der Knospen gesammelt. Die RNA Extraktion erfolgte aus einer Mischung der zwei Gewebeprobe zu gleichen Teilen. Aus allen neun Proben wurde Gesamt-RNA in hoher Qualität und einer Menge von ca. 3 bis 5µg je Probe isoliert. Die Entfernung ribosomaler RNA, die Herstellung der c-DNA Bibliothek, die Sequenzierung sowie die bioinformatische Auswertung wurde von der Fa. GATC durchgeführt. Die Arbeitsschritte entsprachen dem in Abb. 11 wiedergegebenen Ablauf.

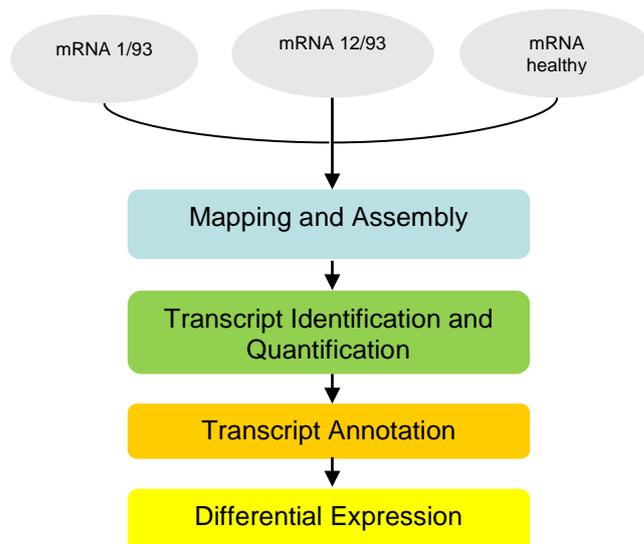


Abb. 11. Arbeitsschritte in der Transkriptomanalyse von gesundem und phytoplasma-infizierten Apfelproben.

Von den neun angefertigten cDNA Bibliotheken wurden jeweils 62 bis 69 Mio. Sequenzreads erhalten, von denen 0,4 – 0,5% nicht den Qualitätskriterien entsprachen. Im direkten Vergleich zum Referenzgenom von *Malus x domestica* cv. Golden Delicious (Velasco et al., 2010) konnten 78 bis 86% aller Sequenzen zugeordnet werden. Ein statistischer Vergleich mit Standardparametern auf signifikant unterschiedlich exprimierte Gene wurde zwischen den neun Proben durchgeführt. Die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen der gesunden und den infizierten Proben war im März und August annähernd identisch, wobei auch ein Großteil der Gene identisch war (Tabelle 8 und Tabelle 9). Nur im November unterschied sich der avirulente vom virulenten Stamm. Die Anzahl der Gene, die in den infizierten Pflanzen im Vergleich zur gesunden Kontrolle überexprimiert wurden, ist in den Augustproben mit acht von 11 Genen am höchsten. Zu allen anderen Zeitpunkten war die Expression gegenüber der nicht-infizierten gesunden Kontrolle negativ reguliert. Unter den überexprimierten Genen der infizierten Pflanzen befanden sich Transkriptionsfaktoren, Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren und microRNA, allesamt Faktoren, die an regulativen Prozessen beteiligt sind (Tabelle 9). Es wurden auch eine Reihe anderer Enzyme und Proteine identifiziert, die an der Zellwandsynthese und anderen zellulären Prozessen beteiligt sind und eher mittelbar in phytopathologischen Prozessen involviert sind. Eine Kontrolle der einzelnen Transkripte zur Bestätigung konnte aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden.

5. Diskussion der Ergebnisse

Die Schäden, die im deutschen Kernobstanbau durch die Phytoplasmakrankheiten Apfeltriebssucht und Birnenverfall entstehen, sind schwer zu beziffern. Untersuchungen haben eine flächendeckende Durchseuchung, insbesondere von Steuobstanlagen und Kernobst im Kleingartenbereich festgestellt und trotzdem hat es in Deutschland in den letzten Jahren keinem massiven Ausbruch der Krankheit gegeben. In einigen angrenzenden Ländern, wie Österreich ist die Situation gravierender. Die Omnipräsenz der Erreger in der Umgebung von Erwerbsanlagen, Reiserschnittgärten oder Vermehrungsbetrieben stellt einen andauernden Infektionsdruck dar, der im Falle der Apfeltriebssucht, wohl nur durch das recht seltene Vorkommen des Überträgers gemindert wird. Als Vektor der Apfeltriebssucht ist in Deutschland nur *Cacopsylla picta* beschrieben. Die Biologie des Vektors ist unzureichend erforscht. Ein massives Auftreten und somit die Gefahr eines verstärkten Ausbruchs der Apfeltriebssucht kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Bekämpfungsmöglichkeiten der Apfeltriebssucht sind begrenzt und beschränken sich auf die chemische Kontrolle des Vektors und die Rodung massiv befallener Bäume. Beides

Maßnahmen, die unzureichend sind. Am JKI-Dossenheim werden daher alternative und neue Strategien erprobt Apfeltriebsucht mit biologischen Verfahren zu kontrollieren. Eine der Strategien besteht in der Züchtung triebsuchtresistenter Unterlagen. Der Stand Der Forschung und die mit ihr einhergehenden Nachteile wurden im Abschnitt 2 erwähnt. Zur mittelfristigen Lösung der Apfeltriebsuchtproblematik wird jedoch eine alternative Strategie benötigt. Daher wurde im Rahmen dieses Projekts die Prämunisierung mit avirulenten Stämmen als mögliche Bekämpfungsmaßnahme untersucht. Das Phänomen, dass bestimmte Phytoplasmastämme oder Inokula einen Schutz vor anderen Stämmen bietet, wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach beobachtet. Eine plausible Erklärung wie das Phänomen zustande kommt, fehlt jedoch. Heute wissen wir, dass die meisten oder alle triebsuchtinfierten Apfelbäume durch mehrere Apfeltriebsuchtstämme besiedelt sind. Wir wissen weiterhin, dass die Populationen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen. Was wir nicht wissen ist, welchen Gesetzmäßigkeiten diese Veränderungen folgen. Um die Prämunisierung zu einem verlässlichen Verfahren zu machen, muss die Entwicklung von bestimmten zur Prämunisierung verwendeter Stämme in vorausschauender Weise vorhergesagt werden können. Daher wurden neben praktischen Inokulationsexperimenten, grundlagenorientierte molekulare und immunologische Versuche durchgeführt.

Basierend auf Beobachtungen zum Vorkommen schwach virulenter Apfeltriebsuchtstämme und den Untersuchungen in den französischen Aprikosenanlagen wurden bereits in der Vergangenheit am JKI-Dossenheim orientierende Versuche zur Prämunisierung von Apfelpflanzen durchgeführt. Der Anzahl der Testpflanzen war gering und ein real time PCR-System zur Differenzierung der Pathogenstämme fehlte. Daher wurden in diesem Projekt breit angelegte Feldversuche durchgeführt, in denen schwach bis starkwachsende Unterlagen und verschiedenen Sorten verwendet wurden, um Kombinationen zu testen, die auch im Erwerbsanbau verwendet werden.

Die Ergebnisse der zwei Feldversuche waren nicht einheitlich. Während der CP-IA Versuch erwartungsgemäß verlief und die Gegenwart einer hoher Rate schwach virulenter Stämme bei gleichzeitig abnehmender Präsenz, der virulenten Stämmen zeigte, war die Situation im CP-IIA Versuch nicht befriedigend. Hier verhielt sich das 1/93 Inokulum nicht wie im Jahr zuvor. Nur bei 40% der Individuen konnte eine Infektion mit den stamm-spezifischen Primern bestätigt werden, obwohl die PCR Ergebnisse mit den Primern fO1/rO1 in 100% der Pflanzen Erreger nachwies. Eine ähnliche Situation lag auch beim zweiten schwach virulenten Stamm 2/4 vor. Diese unterschiedliche Detektionsrate ist nur dadurch zu erklären, dass ein weiteres Phytoplasma in den Pflanzen vorkam, das nicht von den stammspezifischen Primern erkannt wurde, oder, dass die Primersysteme unterschiedliche Sensitivität besitzen. Letzteres hätte durch einen erneuten Test zu einem späteren Zeitpunkt überprüft werden müssen, was jedoch aufgrund arbeitstechnischer Umstände nicht möglich war. Viel gravierender war jedoch die Tatsache, dass von den nachzuweisenden Phytoplasmen des 1/93 Inokulums ca. 50% in die Kategorie stark virulent fielen. Dies hat sich auch bis zum Ende des Versuchs nicht geändert. Unerwartet war das geringe Auftreten spezifischer Krankheitssymptome im Freiland. Selbst Bäumen die nur mit den stark virulenten Typen 12/93 und 3/6 infiziert waren fehlten Hexenbesen. Unter Halbfreilandbedingungen im Topf war diese Situation gänzlich verschieden. Daher sind die fehlenden Krankheitssymptome wohl im Wesentlichen auf den physiologischen Zustand der Pflanzen zurückzuführen. Die Adaption des Wurzelsystems an die Bodenbedingungen, die geringere Verfügbarkeit von Wasser, die geringere Wüchsigkeit und die extremen Temperaturen sind sehr wahrscheinlich entscheidende Parameter. Dies wird auch im Vergleich der beiden Versuche und der in den Jahren herrschenden Temperaturen deutlich. Während die Pflanzen im CP-IA Versuch im ersten Standjahr, bei weniger extremen Temperaturen noch Symptome zeigten, war dies im zweiten Standjahr nicht mehr der Fall, genau wie beim CP-IIA Versuch. Die Temperaturextreme in 2015 waren sehr viel höher und zahlreicher als im Jahr 2014.

Wesentlich mehr Sorgfalt muss auf die Auswahl des avirulenten Inokulums gelegt werden. Dies hat der CP-IIA Versuch eindeutig gezeigt. Die Aufspaltung der Stämme im 1/93 Inokulum war unerwartet. Zwar war bekannt, dass in diesem Inokulum mehrere Stämme vorkommen, aber die virulenten Stämme waren stets in der Wurzel und auch da nur in sehr

geringem Umfang. Was zu diesem starken Populationsdrift geführt hat, ist unbekannt und muss weiter untersucht werden. Die Beobachtung über zwei bzw. eine Vegetationsperiode ist für das System Apfel/Triebsuchtphytoplasma zu kurz. Um stabile Trends in der Entwicklung von Populationen zu messen, sind Beobachtungen über einen längeren Zeitraum notwendig.

Im Gegensatz dazu haben die Gewächshausversuche mit *Catharanthus roseus* die erwarteten Ergebnisse erbracht. In diesem System hat sich der *C. roseus* Stamm 1/93 dem Stamm 12/93 als deutlich überlegen gezeigt. Selbst bei systemischer Besiedlung des Wirts durch den Stamm 12/93 war der Stamm 1/93 in der Lage diesen zu verdrängen, zumindest im oberirdischen Bereich. Dass der Stamm 12/93 in der Wurzel persistierte, war eine interessante Beobachtung und verdeutlicht, dass die physiologischen Verhältnisse in den unter und oberirdisch gelegenen Siebröhren grundlegend verschieden sein müssen. Eine weitere interessante Tatsache ist, dass sich der Phytoplasmatiter durch die Doppelbesiedlung in der Wurzel fast verdoppelt. Wie das möglich ist, lässt Fragen zur räumlichen und physiologischen Nutzung des Phloems offen. Bei einem positiven Verlauf hätten die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sicher interessante Resultate diesbezüglich ergeben. Die ausgeglichene und stabile Besiedlung der Wurzel durch die zwei Stämme 1/93 und 12/93 steht im Widerspruch zu den Beobachtungen im System 1/93 und Stamm AT (Schneider et al., 2014), indem auch der zuerst anwesende Stamm AT durch den Stamm 1/93 zunehmend in der Wurzel verdrängt wurde. Dies verdeutlicht, dass sich die Physiologie der Erreger und die antagonistischen Interaktionen zwischen ihnen weit stärker unterscheiden als bisher angenommen.

Um die oben erwähnte Dynamik der Phytoplasmen im Phloem genauer zu studieren wurden, pathogen-spezifischen Antikörper hergestellt. Die ATPase 460 hat sich angeboten, da sie eine virulenzspezifische Domäne mit deutlichen Sequenzunterschieden zwischen den Stämmen besitzt und das Protein aufgrund von Prädiktionsprogrammen als extrazellulär eingestuft wurde. Weiterhin haben cDNA Analysen gezeigt, dass mRNA gebildet wird und somit eine Translation der Proteine hochwahrscheinlich ist, gute Voraussetzungen für die Entwicklung von diagnostischen Antikörpern. Die Entscheidung die Antiseren durch Immunisierung synthetischer Oligopeptide zu erzeugen, sollte die Entwicklung monoklonaler Antikörper unnötig machen und Ressourcen für eine pflanzliche Transkriptomanalyse frei machen. Die Herstellung der Antiseren war problemlos und auch die Reaktivität der gereinigten IgGs gegen das synthetische Peptid hoch. Die Antiseren reagierten nicht nur gegen das Immunogen, sondern auch gegen ein kurzes rekombinant-exprimiertes Fragment der ATPasen 460 des Stamms 1/93 oder 12/93 und bewiesen somit ihre prinzipielle Funktionalität. Warum trotz alledem keine spezifischen Reaktionen mit isolierten Proteinen aus infizierten Pflanzen zu sehen war, ist unklar. Im Folgenden wurde versucht das System sowohl auf Seiten der Antisera, als auch auf der Proteinextraktionsseite zu optimieren. Auf der Antikörperseite wurden zusätzliche affinitätschromatographische Reinigungen durchgeführt um, unspezifisch Kreuzreaktionen mit Pflanzenproteinen zu eliminieren, die potenziell spezifische Reaktionen maskieren konnten. Auf Seiten der Proteinextraktion wurde Phloemgewebe infizierter Pflanzen in steigender Menge extrahiert. Weiterhin wurde über ein spezielles Zentrifugationsverfahren die Phytoplasmen angereichert und gleichzeitig pflanzliche Kontaminanten reduziert. Die so konzentrierten "Phytoplasmen" wurden einer weiteren spezifischen Anreicherung der Membranproteine durch Triton X114 Extraktionen unterzogen, wobei auch die löslichen Proteine nicht vergessen wurden, im Falle die Prädiktionsprogramme hätten die Lokalisation nicht exakt vorausgesagt. All diese Maßnahmen haben nicht zu einem positiven Ausgang der Experimente geführt.

Möglicherweise sind die ATPasen in extrem geringen Mengen vorhanden. Daher wurde in einem pull-down Verfahren versucht, mit cyanbromid-gebundenen spezifischen Antikörpern die ATPasen aus sehr verdünnten Lösungen zu binden. Auch diese Experimente verliefen negativ. Bleibt noch die Möglichkeit, dass es sich bei den ATPasen um extrem instabile Proteine handelt, die beim Zellaufschluss unmittelbar degradieren. Hier müssen die histologisch-fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen auf jeden Fall fortgeführt werden. Die Chancen sind bei diesem Verfahren hoch die Proteine in ihrer nativen Umgebung in gutem Erhaltungszustand zu konservieren und über die hochauflösende Fluoreszenz die

Proteine sensitiv zu detektieren. Unter Umständen müssen neue Antiseren gegen längere Immunogene entwickelt werden, um die Sensitivität durch einen Cocktail an Antikörpern sensitiver zu gestalten. Die Optimierungen dieser Arbeiten waren aus Zeitgründen nicht möglich.

Bis heute sind fünf vollständige Phytoplasma-Genomsequenzen in Datenbanken hinterlegt (Andersen et al., 2013). Ihr Studium hat wesentliche Einblicke in die metabolischen Fähigkeiten der Organismen ermöglicht und durch Datenbankvergleiche konnten wichtige Stoffwechselwege rekonstruiert werden. Die vergleichende Betrachtung der Phytoplasmgenome zeigt aber auch, dass eine hohe Plastizität durch große transponierbare DNA Stücke besteht. Das Genom des Apfeltriebsucherregers, *Candidatus Phytoplasma mali* Stamm AT, unterscheidet sich in wesentlichen Eigenschaften von dem der anderen. Die lineare Organisation und das Vorkommen langer sequenzidentischer invertierter Repeats an den Chromosomenenden sind nur einige der Besonderheiten. PFGE Analysen mehrerer Apfeltriebsuchstämme haben gezeigt, dass auch in dieser Gruppe die Größe zwischen 600 und 650Kbp variiert.

Während man bei anderen Phytoplasmen Virulenzfaktoren (TENGU, Sap11) gefunden hat, konnten beim Stamm AT keine identifiziert werden. Die unterschiedliche Virulenz ist sehr wahrscheinlich genetisch verankert und würde durch einen Vergleich der Genome unterschiedlich virulenter Treibsuchstämme erkennbar sein. Dies sollte in einem Vergleich vollständiger Genomsequenzen der Stämme 1/93, 12/93 und AT geschehen. Der Stamm AT ist der virulenten Kategorie zuzuordnen. Die Sequenzierungen wurden mit Cäsiumchlorid-gereinigter Phytoplasma-DNA und Illumina Technik durchgeführt. Große Datenmengen wurden generiert und stringenten Auswahlkriterien unterworfen, um kontaminierende pflanzliche Sequenzen zu eliminieren. Das Assemblieren von Genomen kann in zwei unterschiedlichen Verfahren erfolgen. Die einfachere Variante besteht in dem guided reference assembly, in dem die Sequenz eines sequenzierten Stamms als Referenz dient. In diesem Verfahren werden nur Sequenzreads verwendet, die auch im Referenzgenom vorkommen. Alle anderen werden aussortiert. Die Methode ist schnell und liefert zuverlässige Contigs, wenn sehr hohe Sequenzidentität besteht. Das zweite Verfahren besteht in einer *de novo* Assemblierung, in der nur anhand von Sequenzüberlappungen ein vollständiges Genom rekonstruiert wird. Dieses Verfahren ist bioinformatisch wesentlich aufwendiger. Aufgrund eigener Vorarbeiten wurde davon ausgegangen, dass bis auf kleinere Abweichungen kaum Unterschiede zwischen den Stämmen bestehen. Daher wurde das guided reference assembly als Methode ausgewählt. Die bioinformatische Auswertung der Fa. GATC und der Bioinformatik des JKI-Quedlinburgs konnte mit diesem Verfahren einen erheblichen Teil der Daten assemblieren und Contigs bis zu einer Größe von 80000Bp zusammensetzen. Beide Institutionen waren jedoch nicht in der Lage, die bis zu 1000 Contigs je Datensatz zu einem vollständigen Genom zusammenzufügen. Dr. Kube (Humboldt Universität) konnte mit neuen Programmen und Assemblierungsalgorithmen zwei Genome mit einer Länge von jeweils 603Kbp mit dem guided reference Verfahren zusammensetzen. Anschließende Vergleiche zwischen *in silico* Verdauen und physikalischen Verdauen der 1/93 und 12/93 Genome, haben jedoch gezeigt, dass die Zusammensetzung fehlerhaft ist. Daraufhin wurde die Fa. GATC beauftragt die gesamten Datensätze der Stämme 1/93 und 12/93 einem *de novo* assembly zu unterziehen. Die Länge der Contigs wurde dadurch erheblich vergrößert und zusammenhängende Fragmente bis 140Kbp wurden erhalten. Aber auch mit diesem Ansatz gelang es nicht, die zahlreichen Contigs miteinander zu einem vollständigen Genom zu verbinden.

Obwohl Phytoplasma-Genome klein sind (550- 1300Kbp), ist es schwierig vollständige Genome aus Sequenzdaten zu rekonstruieren. Dies liegt am hohen A und T Gehalt der Phytoplasma-DNA und dem Vorkommen langer - AT - Abfolgen, wird aber auch durch das Auftreten repetitiver Gene erschwert. In den Phytoplasma-Genomen sind HflB Gene und ATPasen in hoher Kopienzahl vorhanden. Im Genom des Stamms AT finden sich 11 Kopien beider Gene mit partiell hoher Sequenzübereinstimmung, die das richtige Zusammensetzen der Contigs erschweren. Es scheint, dass die next generation Sequenzieretechnologien nicht für die Sequenzierung von Phytoplasma-Genomen geeignet sind. Für alle bisher sequenzierten Genome wurde die klassische Sanger Sequenzierungstechnik verwendet, in

der Leselängen bis zu 1200 Basen pro Read erhalten werden. Anscheinend sind diese Leselängen nötig um Fragmente zweifelsfrei zu überlappen und eindeutig einer Position zuzuordnen. Im Moment liegen die Leselängen mit Illumina Technik bei 300 Basen und im paired-end Modus bei 600 Basen. Die enormen Datenmengen, die bei den Illumina Sequenzierungen anfielen, sollten theoretisch für eine über 1000-fache Abdeckung der kleinen Phytoplasma-Genome ausreichen. Versuche die erhaltenen Contigs über PCR Amplifikation der dazwischen liegenden Bereiche zu verbinden, schlug fehl. Die Gründe dafür können zahlreich sein. Neben Primern, die von falschen Endsequenzen abgeleitet wurden, kann auch die räumliche Entfernung für fehlende Amplifikationen verantwortlich sein.

Um die erhaltenen Contigs der Stämme 1/93 und 12/93 in die richtige Reihenfolge zu bringen und sie zu verbinden muss auf klassische Verfahren wie einer Makrorestiktionsfragmentanalyse und Southern Blot Hybridisierungen zurückgegriffen werden. Mit Makrofragmentanalysen wurde begonnen, die jedoch aus Zeitgründen nicht fortgeführt werden konnten.

In den Transkriptomanalysen 1/93-, 12/93- und nicht infizierter Pflanzen wurden interessante Daten zu den verschiedenen Expressionsmustern erhalten. Dabei war die Zahl signifikant unterschiedlich exprimierter Gene bei den März und Augustproben im Vergleich zur gesunden Kontrolle gering. Eine höhere Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene zwischen infizierten und nicht-infizierten Pflanzen wurde dagegen im November festgestellt, wobei die Anzahl in der 12/93 Probe doppelt so hoch war wie in der 1/93 Probe. Während sich die Expressionsmuster phytoplasma-infizierter Pflanzen im März und August durch eine verstärkte Expression auf Seiten der infizierten Pflanzen auszeichneten, lag die positive Expression in den Novemberproben klar auf der Seite der gesunden Pflanze. Die überexprimierten Gene in infizierten Pflanzen waren zum Teil identisch, und zwar nicht nur zwischen den Stämmen, sondern auch zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten. Unter den Genen befanden sich Transkriptionsfaktoren wie Myb 114 like protein, Aktivatoren der Transkription wie NAC domain-containing protein 100-like und microRNA, denen auch genregulatorische Funktionen zugeschrieben werden. Ob diese Faktoren für den veränderten Phänotypus infizierter Pflanzen verantwortlich sind, oder eher die Gene die nicht exprimiert werden, muss in einer detaillierten Analyse ermittelt werden. Die Daten, die im Rahmen dieses Projekts erhalten wurden, können nur einen Startpunkt darstellen. In weiterführenden Analysen muss die unterschiedliche Expression der einzelnen Gene Schritt für Schritt verifiziert werden. Anschließend müssen die Stoffwechselwege ermittelt werden in die diese Transkriptionsfaktoren, Proteine, Aktivatoren oder microRNAs eingreifen. Erst dann kann eine Aussage getroffen werden, ob sie am veränderten Phänotypus beteiligt sind.

6. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Prämunisierungsversuche im Freiland mit *M. x domestica* sind aufgepflanzt und stehen einer weiteren Beobachtung zur Verfügung. Die Pathogensituation in allen Pflanzen ist erfasst und kann mit neu gewonnenen Daten verglichen werden. Praxisrelevante Ergebnisse wurden in der Versuchsdurchführung erhalten, diese sind aber im Moment nur für interne Versuchsplanungen von Interesse. Die Untersuchungen haben jedoch klar gezeigt, dass die stringente Auswahl der Prämunisierungsquelle der wichtigste Faktor für das Gelingen des Verfahrens darstellt. Ergebnisse, die eine direkt verwertbare kommerzielle Nutzung der Prämunisierung erlauben oder für andere Versuchsansteller wichtig wären, gibt es nicht. Der Versuch benötigt einen längeren Beobachtungszeitraum, um aussagekräftig zu werden. Im Bericht der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) wird zwar der Quarantänestatus des Apfeltriebsuchterregers in Frage gestellt, eine Änderung ist jedoch noch nicht erfolgt. Daher untersagen die bestehenden gesetzlichen Regelungen das Inverkehrbringen apfeltriebsuchtinfizierter Pflanzen.

Das real time PCR Verfahren zur Unterscheidung virulenter und avirulenter Typen ist verfügbar und kann direkt für eine Charakterisierung vorkommender Treibsuchtstämme verwendet werden.

Für die weitere Forschung am Institut, sowie für andere grundlagenorientierte Projekte sind die gewonnenen Genomdaten sicher wertvoll. Zwar konnten die Genome nicht lückenlos zusammengefügt werden, aber große Sequenzbereiche sind verfügbar, die untereinander und mit dem Genom des Stamms AT verglichen werden können. Sollten Sequenz einzelner Gene für PCR Anwendungen benötigt werden, stellen die Datensätze sicher eine wertvolle Ressource dar. Gleiches gilt für die Transkriptomdaten. Auch hier können die Datensätze zum Auffinden bestimmter exprimierter Gene wertvoll sein.

7. Gegenüberstellung der ursprünglichen mit den tatsächlich erreichten Zielen. Hinweis auf weitere Fragestellungen

a) Präminisierungsversuche: In Anbetracht der wenigen Möglichkeiten, die zur Bekämpfung der Apfeltriebsucht zur Verfügung stehen, ist es nötig auch komplexere Strategien zu verfolgen. Die Bekämpfung der Triebucht durch Präminisierung mit avirulenten Stämmen ist eine komplexe Strategie. Es handelt sich um ein biologisches Verfahren, indem biotische und abiotische Faktoren eine große und größtenteils unbekannt Rolle spielen. Selbst der entscheidende Faktor, das präminisierende Agens, entzieht sich einer exakten Bestimmung. Im infektiösen Reis befindet sich eine Mischung verschiedener Stämme, die im Moment nur näherungsweise beschrieben werden kann. Solange Phytoplasmen nicht *in vitro* kultiviert und axenische Kulturen experimentell zur Infektion verwendet werden können, wird sich diese Situation nicht ändern. Was im Moment möglich ist und in diesem Projekt umgesetzt wurde, ist die Verwendung von "charakterisierten Stämmen", die über einen langen Zeitraum beobachtet, eine gewisse Populationskontinuität gezeigt haben. Dieses Inokulum war die Basis der Präminisierungsversuche. Die Freilandexperimente haben jedoch gezeigt, dass die Kontinuität der Population bei Neuinfektionen nicht garantiert ist. Gerade der Stamm 1/93, der unter langjähriger Beobachtung stand und als avirulent klassifiziert wurde, ist im zweiten Freilandversuch in die Kategorie virulent einzuordnen. Es ist abzuwarten, ob im weiteren Verlauf der Beobachtungen eine avirulente Komponente erneut die Oberhand gewinnt. Eine weitere Beobachtung ist nötig, die sich jedoch ohne finanzielle Unterstützung, nur auf eine phänotypische Bonitierung der Versuchspflanzen beschränken wird.

b) Antiserumentwicklung: Mit stamm-spezifischen Antiseren gegen die membranständigen ATPasen der Stämme 1/93 und 12/93 sollten die Pathogen in den Siebröhren lokalisiert werden. Dieses Ziel wurde nicht erreicht. Trotz erheblicher Anstrengungen war keine Reaktivität der Antiseren mit nativen Phytoplasmaproteinen festzustellen. Die Erreichung dieses Ziels wäre von besonderem Interesse gewesen, nicht nur weil die ATPase 460 als wesentliche Virulenzkomponente einen bedeutenden Forschungsschwerpunkt in einem beantragten DFG Vorhaben spielt, sondern weil das Verhalten der Phytoplasmen an der Kontaktfläche von Reis und Unterlage wissenschaftlich höchst interessant wäre. Die Herstellung eines weiteren Antiserums ist beabsichtigt. Diesmal soll jedoch das gesamte Protein zur Immunisierung verwendet werden. Dadurch soll die Sensitivität des Antiserums gesteigert werden. Es ist weiterhin beabsichtigt Mäuse anstatt Kaninchen zu immunisieren, um dadurch die Möglichkeit der Herstellung monoklonaler Antikörper zu haben.

c) Genomsequenzierung: Im Rahmen des Projekts wurden umfangreiche Sequenzdaten für die Stämme 1/93 und 12/93 generiert. Diese konnten zu größeren Contigs zusammengefügt werden. Eine Verknüpfung der Contigs zu vollständigen Genomen wurde nicht erreicht. Die Triebuchtstämme 1/93 und 12/93 stellen zentrale Untersuchungsobjekte dar. Daher ist zu erwarten, dass in zukünftigen Projekten weiter an einer Vervollständigung der Genome gearbeitet wird. Möglicherweise werden Ressourcen verfügbar, um mit anderen Sequenzieretechnologien (z.B. PacBio) die Genome zu rekonstruieren. Ein Vergleich der Triebuchtphytoplasmagenome auf Vorhandensein oder Fehlen von Genen ist nur sinnvoll, wenn alle Gene erfasst wurden.

d) Transkriptomanalyse: Die pflanzlichen Transkriptome unterschiedlich infizierter Pflanzen wurden zu verschiedenen Vegetationsperioden erfasst. Die unterschiedlich exprimierten Gene wurden identifiziert. Somit ist die Basis für spezifischere Folgeanalysen vorbereitet. Im

Rahmen des Projekts konnten jedoch keine Einzelexpressionsstudien identifizierter Gene durchgeführt werden. Die Daten würden jedoch direkt in einem Projekt zur Anwendung kommen, dass im Moment bei der BLE als Skizze zur Begutachtung vorliegt.

8. Zusammenfassung

Cross-Protection, ein Verfahren in dem Pflanzen durch Vorinfektion mit einem avirulenten Erregerstamm geschützt werden sollen, wurde als neue Methode zur Bekämpfung der Apfeltriebsucht erprobt. Gewächshausversuche mit *Catharanthus roseus* und Freilandversuche mit *Malus x domestica* wurden durchgeführt indem Versuchspflanzen zuerst mit dem avirulenten oder virulenten Stamm infiziert, und anschließend mit dem jeweils anderen Stamm zweifach infiziert wurden. Die Entwicklung der Erregerstämme wurde durch real time-PCR Analysen verfolgt. In den *C. roseus* Versuchen unterdrückte der avirulente Stamm 1/93 den virulenten Stamm 12/93, selbst wenn dieser zuerst vorhanden war. Die Ergebnisse der Freilandversuche waren nicht so einheitlich. In einem Versuch verhielten sich die avirulente Stämme ähnlich wie in den Gewächshausversuchen und konnte die virulenten Stämme unterdrücken. Im zweiten Versuch war dies nur teilweise der Fall. Hier spaltete das Inokulum des avirulenten Stamms 1/93 in avirulente, aber vorwiegend virulente Typen auf. Krankheitssymptome wie Hexenbesen und Nebenblätter waren nach der Erstinfektion mit dem virulenten Inokulum häufig, in der Feldphase jedoch nur bei wenigen Pflanzen und nur vorübergehend zu beobachten.

Im grundlagenorientierten Teil sollte die Besiedlung durch die virulenten und avirulenten Stämme in planta mit spezifischen Antisera überprüft werden. Dazu wurden stamm-spezifische Antisera gegen eine membranständige ATPase erzeugt, die virulenzkorrelierte Proteinmotive besitzt. Trotz umfangreicher Analysen konnte keine eindeutige Antigen-Antikörperreaktion identifiziert werden. Die Genome der Apfeltriebsuchtstämme 1/93 und 12/93 wurden sequenziert, um die metabolischen Fähigkeiten der Erreger zu vergleichen. Von beiden Candidatus *Phytoplasma mali* Stämmen wurden größere Contigs erhalten, aber eine vollständige Rekonstruktion der Genome war nicht möglich. Die Transkriptome von infizierten und nicht infiziertem *M. x domestica* cv. Golden Delicious wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Signifikant unterschiedliche Expressionsmuster wurden zwischen den infizierten und der nicht-infizierten Probe gefunden. Unter den bei infizierten Pflanzen überexprimierten Genen befanden sich Transkriptionsfaktoren und microRNA.

9. Literaturverzeichnis

- Andersen, M. T., Liefting, L. W., Havukkala, I., & Beever, R. E. (2013). Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of 'Candidatus *Phytoplasma australiense*' reveals genome plasticity. *BMC genomics*, 14(1), 529.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., and Hogenhout, S.A. (2006). Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188, 3682-3696.
- Bai, X., Correa, V.R., Toruno, T.Y., Ammar, D., Kamoun, S., Hogenhout, S.A. (2009). AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 18-30.
- Castelain, C., Chastellière M.G., Jullian, J.P., Morvan, G. and Lemaire J.M. (1997). La prémunition contre l'enroulement chlorotique de l'abricotier. *Phytoma* 493, 39-44.
- Castelain, C., Jullian, J.P., Lemaire, J.M. and Morvan, G. (2007). Lutte biologique contre l'ECA: la prémunition. *L'Arboriculture* 611, 33-38.
- Costa, A.S. and Muller, G.W. (1980). Tristeza control by cross-protection. *Plant Disease* 64, 538-541.
- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y. and Namba, S. (2009). A unique virulence factor for proliferation

- and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. Proceedings of the National Academy of Science USA 106, 6416-6421.
- Kunkel, L.O. (1955). Cross-protection between strains of yellows-type viruses. *Advances in Virus Research* 3, 251-273.
- Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., & Seemüller, E. (1995). Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85(7), 771-776.
- McKinney, H.H. (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Agricultural Research* 39, 557-578.
- Morvan, G. and Castelain, C. (1984). Une méthode de lutte biologique contre une maladie à mycoplasme: l'Enroulement chlorotique de l'abricotier. 4e Colloque sur les recherches fruitières, Bordeaux 93-98.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H-J., Wie, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36, 27–29.
- Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y. and Namba, S. (2011). Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS ONE* 6(8).
- Tran-Nguyen, L.T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., and Gibb, K.S. (2008). Comparative genome analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB. *J. Bacteriol.* 190, 3979-3991.
- Schneider, B., Sule, S., Jelkmann, W., & Seemüller, E. (2014). Suppression of Aggressive Strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' by Mild Strains in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana occidentalis* and Indication of Similar Action in Apple Trees. *Phytopathology*, 104(5), 453-461.
- Van Vuuren, S.P., Collins, R.P., and Da Graca, J.V. (1993). Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross-protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 77, 24-28.
- Yeh, S. D. and Gonsalves, D. (1984). Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross-protection. *Phytopathology* 74, 1086-1091.
- Yeh, S.D., Gonsalves, D., Wang, H.L., Namba, R. and Chui, R.J. (1988). Control of papaya ringspot virus by cross-protection. *Plant Disease* 72, 375-380.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., ... & Salvi, S. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus [times] domestica* Borkh.). *Nature genetics*, 42(10), 833-839.

10. Veröffentlichungen zum Projekt

Das Projekt und dessen Ergebnisse wurden bei folgenden Tagungen im Vortrag vorgestellt:

Phytobakteriologischer Arbeitskreis, Neustadt 2013

Fachreferententagung im Obstbau, Bad Kreuznach 2013

Pflanzenschutztagung, Freiburg 2014

Als Publikation erschienen:

Schneider, B., Sule, S., Jelkmann, W., & Seemüller, E. (2014). Suppression of Aggressive Strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' by Mild Strains in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana occidentalis* and Indication of Similar Action in Apple Trees. *Phytopathology*, 104(5), 453-461.

Seemüller, E., Jelkmann, W., & Schneider, B. (2014). Identification and molecular features of suppressive strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' and their effect on disease

development. *Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact*, 280.