

Diagnose von Viruskrankheiten im Rahmen der Anerkennung von Anbaumaterial von Kernobst und Entwicklung von Verfahren zur Gesunderhaltung von zertifiziertem Material in Reiser Muttergärten und Unterlagenbaumschulen

Diagnosis of virus diseases within certification of pome fruit and development of strategies for maintaining the health status of certified basic material and rootstocks

FKZ: 12NA019

Projektnehmer:

Julius Kühn-Institut
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/ow/

Autoren:

Jakovljevic, Vladimir; 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.

Julius Kühn Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau
Schwabenheimer Str. 101
69221 Dossenheim

An: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

51168 Bonn

Abschlussbericht des Projekts:

Diagnose von Viruskrankheiten im Rahmen der Anerkennung von Anbaumaterial von Kernobst und Entwicklung von Verfahren zur Gesunderhaltung von zertifiziertem Material in Reiser Muttergärten und Unterlagenbaumschulen

Förderkennzeichen:

2812NA019 (JKI Dossenheim)

und

2812NA049 (LTZ Karlsruhe)

Inhalt

1. Einführung	3
1.1. Gegenstand des Vorhabens	3
1.2. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	3
1.3. Planung und Ablauf des Projektes	3
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	4
3. Material und Methoden	6
3.1. Apfelproben zur Total-RNA Ekstraktion (ARW Untersuchung)	6
3.2. Apfelproben zur dsRNA Extraktion(Untersuchung latenter Apfelviren)	6
3.3. Total RNA Extraktion für RNA-Seq	6
3.4. dsRNA Extraktion	7
3.5. cDNA Bibliothekenherstellung aus Total- und kleinen RNAs (ARW Untersuchung)	7
3.6. cDNA Bibliothekherstellung aus dsRNA und Hochdurchsatzsequenzierung	8
3.7. Bioinformatische Analyse von RNA-Seq (ARW Analyse)	8
3.8. Bioinformatische Analyse von NGS latenter Apfelviren	10
3.9. Phylogenetische Analyse	10
3.10. Genexpressionsanalyse	10
3.11. Fourier-Transform Infrarote (FT-IR) Imaging	10
4. Ergebnisse	12
4.1. Untersuchungen von Gummiholzkrankheit an Apfel (ARW)	12
4.1.1 RNA-Seq von ARW	12
4.1.1.1. Transcriptomeanalyse von ARW Probe	12
4.1.1.2. Blastn Analyse	14
4.1.1.3. Blastx Analyse	16
4.1.1.4. Trankriptomanalyse mit Golden Delicious Apfelgenom als Referenz	17
4.1.1.5. Plant Virus/Viroid Coverage	18
4.1.1.6. Genexpressionsanalyse des of the genes involved in lignin synthesis	19
4.1.2. NGS von kleinen RNAs (siRNA)	20
4.1.3. Analyse der ARW Sequenzdaten aus NGS im Rahmen der Deutsch-Kanadischen Zusammenarbeit in der Agrarforschung	
4.1.3. Fourier-Transform infrarote (FT-IR) Spektroskopie von ARW Proben	22
4.2. NGS latenter Apfelviren	23

4.2.1. NGS und Qualitätskontrolle von Daten	23
4.2.2. Filterung von nicht-Apfel Reads	24
4.2.3. <i>De novo</i> Assembly	26
4.2.4 Phylogenetische Analyse von längsten <i>de novo</i> assemblierten Contigs	27
4.2.4.1 ASPV Contigs	27
4.2.4.2. ACLSV Contigs	28
4.2.4.3. ASGV Contigs	28
4.2.5. Nachweis von <i>de novo</i> assemblierten Contigs mittels PCR	30
5. Diskussion der Ergebnisse	30
6. Angaben zu voraussichliche Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse	32
7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	33
8. Zusammenfassung	35
9. Literaturverzeichnis	36
10. Übersicht über alle in Berichzeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt	

1. Einführung

1.1. Gegenstand des Vorhabens

Gegenstand des Vorhabens waren Forschungsarbeiten an Viren und Phytoplasmen im Hinblick auf die Herstellung von virusfreiem Vermehrungsmaterial, mit Fokus auf die in Deutschland vorhandenen Reiser Muttergärten und Unterlagenbaumschulen. Aufgrund von Befallsproblematiken mit Phytoplasmen in den verbliebenen Reiserschnittgärten für Basis- bzw. zertifiziertes Material sollten Konzepte zur Risikominimierung des Befalls mit Viren und Phytoplasmen bereitgestellt werden. Die Resultate aus dem BÖLN Forschungsvorhaben sollten Entscheidungen bei einem Neuaufbau von Reiserschnittgärten positiv beeinflussen und die Wettbewerbsfähigkeit der Schnittgärten langfristig fördern. Hierzu wurden im Teilprojekt **2812NA019** vorrangig Versuche zur Aufklärung der Ursachen von Fruchtvirose sowie der Gummiholzkrankheit an Apfel und Untersuchungen zu Schadwirkungen der sog. latenten Apfelvirose ASPV, ASGV und ACLSV vorgenommen. Krankheitsausprägungen wurden mittels gezielter Einzel- und Mischinfektionen einschließlich durch infektiöse cDNA Klone untersucht. Hochdurchsatzsequenzierungen (NGS) und deren Analyse erfolgten in Hinblick auf Virusvariabilität (Quasispecies) und zur Auffindung unbekannter Viren, u.a. im Zusammenhang mit der Gummiholzkrankheit. Im Teilprojekt **2812NA049** wurden Versuche zur Bodenübertragung, zur jahreszeitlichen Nachweisbarkeit der Apfelviren ACLSV, ApMV, ASGV und ApMV, der Eintragung dieser Viren und Phytoplasmen mit Pflanzmaterial in einen Reiserschnittgarten sowie zur Methodenoptimierung zum Nachweis des Birnenverfalleregens durchgeführt.

1.2. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts.

Zwei Versuchungsschwerpunkte wurden in Projekt 512-06.01-2812NA019 geplant und ausgeführt:

1. Die Aufklärung der Ursachen von Fruchtvirose und Gummiholzkrankheit an Apfel, mit dem Ziel einer schnelleren Diagnosemöglichkeit.
2. Untersuchungen zur Schadwirkungen der sog. latenten Apfelvirose ASPV, ASGV und ACLSV, einschließlich ihrer verschiedenen Isolate bedingten Krankheitsausprägungen mittels gezielter Einzel- und Mischinfektionen durch infektiöse cDNA Klone und nach Analyse von Hochdurchsatzsequenzierungen (NGS) in Hinblick auf Virusvariabilität (Quasispecies).

Vier Versuchsschwerpunkte wurden im Projekt 512-06.01-2812NA049 geplant und ausgeführt (vgl. hierzu den separaten Abschlussbericht):

3. Ermittlung der Bedeutung einer abiotischen Bodenübertragung latenter Viren bei verschiedenen Unterlagen
4. Ermittlung möglicher Probenahmezeitpunkte und Nachweismöglichkeiten für ein Kontrollscreening
5. Die Identifizierung der Eintragungsquellen latenter Apfelviren in Reiser Muttergärten
6. Die Untersuchung des jahreszeitlichen Verlaufs der Nachweismöglichkeit des Birnenverfalls.

1.3. Planung und Ablauf des Projektes 2812NA019

In der ersten Phase des Projektes (s. Zwischenbericht 2013) wurden die möglichen Strategien und Arten von Hochdurchsatzsequenzierung ("Deep Sequencing" oder "Next Generation Sequencing [NGS]") von Gummiholz- (auch als Apple Rubbery Wood genannt, im weiteren Text als ARW bezeichnet) erarbeitet. Die Techniken zur Herstellung von Vollängen-Klonen (ACLSV und ASPV) wurden weiter verbessert. Als Grundlage der Anwendungen von NGS in Auftragssequenzierungen mittels Illumina HiSeq wurden zwei verschiedene Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren als Strategie verfolgt:

a) Im Falle von ARW wurde für NGS total-RNA (auch als Transkriptom oder RNA-Seq genannt) verwendet

b) Im Falle der latenten Apfleviren wurde NGS mittels doppelsträngiger RNA (dsRNA) durchgeführt

Zu Klonierung infektiöser Klone latenter Apfleviren wurden verschiedene Klonierungsmethoden getestet (z.B. seamless Cloning).

In der zweiten Phase des Projektes (s. Zwischenbericht 2014) wurde RNA-Seq einer Gummiholzprobe sowie einer gesunden Kontrolle ausgeführt. Die vorläufige bioinformatische Analyse konnte kein potentiell Pathogen nachweisen. Allerdings wurden unterschiedliche Verhältnisse von spezifischen kleinen RNAs (miRNAs) zwischen der Gummiholz- und der gesunden Probe festgestellt. Gleichzeitig wurden Vollängen Klone von ACLSV Isolaten konstruiert.

Im Verlauf des zweiten Projektjahres wurden auch Protokolle zur Isolierung von dsRNAs optimiert und NGS von dsRNAs aus Mischinfektionen latenter Apfleviren durchgeführt (Zwischenbericht 2015). Komplette genomische Sequenzen von ASPV, ASGV und ACLSV wurden *de novo* assembliert und phylogenetische Analysen durchgeführt. Eine Zusammenarbeit wurde innerhalb des JKI (Institut ÖPV in Berlin) begonnen. Ziel war die Analyse struktureller Änderungen an Gummiholz infizierten Pflanzenzellen mittels infrarote Spektroskopie.

NGS von weiteren Nukleinsäureextrakten unbekannter Krankheiten (z.B. Russet Ring und Rauhschaligkeit) wurden im dritten Projektjahr und im Verlängerungszeitraum durchgeführt. Die Zusammenarbeit mit dem JKI in Berlin wurde fortgesetzt. Ausführliche bioinformatische Analysen von ARW Sequenzen führten zu Entdeckung potentieller Kandidat(en)viren. Bioinformatische Analysen der mit der Synthese von Lignin verbundenen Gene ergaben Unterschiede in der Expression zwischen gesunden und ARW infizierter Apfelproben. Eine Veröffentlichung zu NGS von Gummiholz wurde beim European Journal of Plant Pathology veröffentlicht.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Viele Krankheiten an Kern- und Steinobst mit unbekannter Ätiologie sind schwer zu diagnostizieren. Dies ist oftmals nur mit empfindlich reagierenden Indikatorpflanzen möglich. NGS umfasst verschiedene Sequenzierungstechniken von Nukleinsäuren die in der letzten Dekade weiter entwickelt wurden. Gemeinsam für alle NGS Methoden ist die Herstellung einer hohen Anzahl von kurzen (50-250 nt) Sequenzen mittels PCR, auch "reads" genannt. Mit einer so großen Zahl von Reads ist es möglich geworden preisgünstiger und in kürzerer Zeit längere Sequenzen als mit klassischer (Sanger) Sequenzierung zu bestimmen. Es gibt zwei Möglichkeiten für die Zusammensetzung (Assembly) von NGS Reads: 1) der Vergleich mit einer bekannten Sequenz (Referenz) oder 2) ohne Referenz, auch als "*de novo* Assembly" bezeichnet. In den letzten Jahren ist NGS ein wichtiges Werkzeug für die Diagnose unbekannter Pflanzenkrankheiten, einschließlich Pflanzenviren,

geworden. Generell, gibt es drei verschiedene NGS Vorgehen zur Entdeckung neuer Pflanzenkrankheiten: 1) NGS totaler RNA (RNA-Seq); 2) NGS kleiner RNAs (sRNA); 3) NGS doppelsträngiger RNAs (dsRNA). Variante 1 ist für alle RNA Transkripte geeignet. Varianten 2 und 3 sind besonders zur Analyse von Pflanzenviren geeignet (Barba et al., 2014; Studholme et al., 2011).

ARW und Flat Limb (im weiteren Text als FL bezeichnet) sind zwei vegetativ (mit Pfropfung) übertragbare Krankheiten die ungewöhnliche Elastizität oder ungleiche Verdickung an der Äste verursachen. Unter Belastung von Früchten beugen sich Äste kranker Pflanzen oder brechen. Befall mit ARW führt zu Ertragsverlusten. ARW und FL sind oft zusammen mit latenten Apfelviren gefunden worden. Ein unbekannter viraler Erreger wurde als Verursacher der Krankheit vermutet (Crane, 1945), konnte aber bis heute nicht nachgewiesen werden. Die einzig verfügbare Nachweismethode liegt in der Anwendung holziger Indikatorpflanzen mit einem Beobachtungszeitraum im Freiland von drei bis fünf Jahren (EPPO, 1999).

Latente Apfelviren verursachen i.d.R. keine Symptome an Kultursorten von Apfel, führen aber zur Reduktion von Ertrag- und Fruchtqualität. Zu den latenten Apfelviren zählen *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV) und *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). Sehr hohe Ertragsverluste wurden bei der Mischinfektionen mit ASPV, ASGV und ACLSV in Japan und Indien berichtet (Brakta et al., 2013; Yanase et al., 1979).

Infektiöse virale cDNA Klone sind aufgrund ihrer Rückführung auf ein definiertes Virusisolat ein präzises Hilfsmittel um Untersuchungen zur Schadwirkung und zur Symptomatologie nach Infektion von Wirtspflanzen durchzuführen. Obgleich die Herstellung für eine große Anzahl verschiedener Viren gelungen ist, sind Klonierungen großer DNA Fragmente (>ca 5 kb) technisch nach wie vor sehr aufwendig. Zudem können nach Insertion der vollständigen Virus cDNA in Plasmide Instabilitäten bei ihrer Replikation in *Escherichia coli* Bakterien auftreten. Verschiedene Strategien der Synthese von Vollängen cDNA mittels PCR und ihrer Klonierung wurden untersucht und optimiert.

3. Material und Methoden

3.1. Extraktion von Total-RNA aus Apfelproben (ARW Untersuchung):

Die ARW Proben und die gesunde Kontrolle waren zweijährige Apfelbäume der Sorte Lord Lambourne, die von kranken oder gesunden Bäume aus dem Versuchsfeld des Julius Kühn-Instituts in Dossenheim über Pfropfung angezogen wurden (Isolatname ARW 63/87). Die RNA Extraktion erfolgte von Pflanzen, welche mittels PCR auf Abwesenheit der latenten Apfelviren *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) getestet waren. Die Pflanzen wiesen typische ARW Symptome auf.

3.2. Apfelproben zur dsRNA Extraktion (Untersuchung latenter Apfelviren):

Folgende Bäume wurden aus dem Versuchsfeld des Julius Kühn-Instituts in Dossenheim zur dsRNA Extraktion, gefolgt von NGS Analyse ausgewählt:

- 1) Isolat 35/88: Jahrgang 1988; ursprünglich als ARW Quelle aus dem Alten Land (Jork) erhalten und PCR-positiv getestet für ASPV, ASGV und ACLSV.
- 2) Isolat 40/87: Jahrgang 1987; ursprünglich als flat limb (FL) und ARW Quelle aus Neustadt erhalten und PCR-positiv getestet für ASPV, ASGV und ACLSV.
- 3) Isolat 44/87: Jahrgang 1987; ursprünglich erhalten aus der Baumschule Uhl in Kummerfeld und PCR-positiv getestet für ASPV, ASGV und ACLSV.

3.3. Total RNA Extraktion für RNA-Seq

Total RNA wurde aus 15-20cm langen Apfeltrieben extrahiert, einschließlich Stamm, Blätter, Blätterstiele und Rinde. Die Proben wurden dann mittels einer mit Trockeneis gekühlten Pflanzenmühle (Retsh ZM200) pulverisiert. Pulverisierte Pflanzenmaterialien wurden sofort weiter verarbeitet oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gefroren. Die RNA wurde mit der CTAB Methode extrahiert. Angewendet wurde eine modifizierte Version eines Protokolls für die Extraktion niedermolekulargewichtiger RNAs aus Polysaccharid-reichen Pflanzen (Carra et al., 2007).

In Kürze: 1 g pulverisierten Apfel Materials wurde mit 10 ml CTAB Extraktionspuffer (2% CTAB, 2% Polyvinylpyrrolidone PVP 40, 100 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 2 M NaCl, 0,05% spermidine in HCL, pH 8) gemischt, gevortexed, 5 Min bei 60°C inkubiert und in ein 30 ml Polypropylen Tube übertragen. Chloroform-isoamyl alcohol (1:24) wurde mit Extrakt gemischt (1:1 v/v), 2-3 min geschüttelt, zentrifugiert bei 10000 rpm/10 min / 4°C und die obere Schicht in neue 30 ml Polypropylen Tube überführt. Die Chloroform-isoamyl Alcohol Extraktion wurde wiederholt und die obere Schicht in neue 15 ml (Falcon) Tubes übertragen (ca 7-9 ml). 1ml Aliquots des Extracts wurden zu 2 ml Tubes mit 800 μl kalten Isopropanol übertragen und über Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ ausgefällt. Am folgenden Tag wurden die Proben bei 13000 rpm /30 min/ 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen, die Tubes 3-5 min luftgetrocknet und die Pellets aus allen Tubes in 180 μl Wasser aufgelöst. Nach Bestimmung von DNA Konzentration (Qubit, 2.0 Fluorometer, ThermoFischer Scientific, U.S.A.), wurde mit 10 Units DNase I (ThermoFischer Scientific, U.S.A.) auf 37°C , 30 min

verdaut. Die Proben wurden dann noch zweimal Phenol-chloroform/isoamyl alcohol (24:1 ChCl₃-IAA , 1:1 P-C/I) extrahiert, bei 13000 rpm /2 min/4°C zentrifugiert und die obere Schicht (ca 150-170 µl) in neue Tubes übertragen. Die RNA wurde mit 15 µl Natriumacetat und 375 µl Ethanol auf +4°C über Nacht ausgefällt. Nach 13000 rpm /30 min/4°C Zentrifugation wurde 2x mit 70% Ethanol gewaschen. Die Pellets wurden kurz luftgetrocknet und in 100 µl Wasser aufgelöst. Die Integrität und Qualität von RNA wurde mittels Agarosegel und Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, U.S.A.) geprüft.

3.4. dsRNA Extraktion

dsRNA wurde aus 20g Apfelblätter nach dem Protokoll von Thompson et al. (2002) isoliert.

3.5. cDNA Bibliothekerstellung aus Total- und kleinen RNAs (ARW Untersuchung)

Zur Sequenzierung von Total-RNA für virale und Messenger RNA wurden ribosomale RNAs mittels Ribo-Zero Plant Kit (Illumina, CA, U.S.A.) aus den RNA Extrakten nach Angaben des Herstellers entfernt. Aufgereinigte RNAs wurden benutzt um cDNA Bibliotheken mittels TrueSeq RNA Sample Präparation kit v2 (Illumina, CA, U.S.A.) herzustellen. Die Proben wurden mittels HiSeq 2000 (Illumina, CA, U.S.A.) sequenziert. Dies mit 100 bp paired-end Reads als Ausgangsformat. Zur Herstellung von cDNA Bibliotheken von kleinen RNAs (sRNAs, miRNAs) wurden Inserte zwischen 20-25bp ausgewählt und 50bp single Reads als Ausgangsformat benutzt. Die Herstellung von cDNA Bibliotheken und Illumina Sequenzierung wurde von FASTERIS SA (Plan-les-Ouates, Switzerland) durchgeführt.

3.6. cDNA Bibliothekherstellung aus dsRNA und Hochdurchsatzsequenzierung

Extrahierte dsRNA wurde 2 Min in kochendem Wasser denaturiert und schnell auf Eis gekühlt. Die cDNA Bibliothek wurde mittels TrueSeq Kit V2 (Illumina, CA, USA) erstellt. Nach der Herstellung der Bibliotheken wurde die DNA Konzentration mittels Qubit Fluorimeter (Life Technologies, CA, USA) sowie die Größe von Fragmenten mittels Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) bestimmt. Probenkonzentration wurden auf 10 mol eingestellt und jede Probe mit 16 µl TE Puffer und 2 µl 1M NaOH gemischt und 5 Min denaturiert. Schließlich wurde die Proben auf 10 pmol mit Illumina Hybridisationspuffer verdünnt, Clusters mittels Illumina cBot generiert und zur Sequenzierung auf ein Illumina HiSeq2000 Gerät als 50bp paired-end Reads eingereicht. Die Herstellung von cDNA Bibliotheken und Illumina Sequenzierungen wurden von EMBL Genecore Facility, Heidelberg, durchgeführt.

3.7. Bioinformatische Analyse von RNA-Seq (ARW Analyse)

De novo Transkriptomte wurden mittels Velvet v1.2.07 (Zerbino and Birney, 2008) Algorithmus assembliert. Assemblierte Sequenzen wurden mittels Oases v.0.2.08 (Schulz et al., 2012) Algorithmus weiter verarbeitet. Oases nutzt Paarungs-Möglichkeiten von Sequenzen um Isoformen von Transkripten zu lösen und mehrfache Assemblies zu verbinden. Standard minimale Contig-Länge war

100 bp. Um Assemblies zu validieren wurde eine Million gepaarte Reads (d.H. zwei Millionen nicht-gepaarten Reads) aus der Probenbibliothek auf alle Contigs und Scaffold Datensätze mittels Burrows-Wheeler Assembly tool v. 0.59 (BWA) (Li and Durbin, 2009) gemapped. SAMTOOLS v.0.1.18 (Li et al., 2009) wurde für Nachverarbeitung von gemappten (oder zu Referenz nicht-gemappten Reads) benutzt.

3.8. Bioinformatische Analyse von NGS latenter Apfelviren

Paired end RNASeq Reads wurden gegen ganze Apfelgenome abgeglichen, einschließlich Mitochondrien und Chloroplasten Sequenzen von *Malus x domestica* Borkh. (Velasco et al., 2010). Reads wurden mittels Bowtie, einen Kurz-Read Aligner (Langmead et al., 2009) abgeglichen. Die Anzahl von abgeglichenen Reads wurde mittels Samtools (Li et al., 2009) bestimmt. Reads wurden mittels Trinity Applikation in Contigs assembliert (Grabherr et al., 2011).

Contigs wurden mittels blast Algorithmus (Altschul et al., 1990) gegenüber Genbank verglichen. Die Blast Suche wurde mit niedriger Stringenz (low-Stringency) durchgeführt und bekannte virale Sequenzen wurden dann aus den Blast Treffern gesucht. Nur virale Sequenzen mit vier oder mehr gleichen Treffern als beste (höchste E-Werte) von mindestens fünf Contigs wurden ausgewählt. Die ausgewählten Treffer wurden weiter untersucht um die längsten Contigs zu finden. Diese Contigs dienen als Basis für weitere Untersuchungen (in der PCR) um nach Kandidatenviren in Pflanzenproben zu suchen.

3.9. Phylogenetische Analysen

Phylogenetische und molekulare Evolutionsanalysen wurden mittels MEGA Version 6 (Tamura et al., 2013) durchgeführt. Phylogenetische Distanzen wurden mittels der Bootstrap-Methode mit 1000 Wiederholungen und maximalen Wahrscheinlichkeiten berechnet. Phylogenetische Bäume wurden mittels der Neighbour-Joining Method und Bootstrap mit 1000 Wiederholungen berechnet.

3.10. Genexpressionsanalyse:

Die Analyse von Genexpression wurde mittels DESEQ2 Pipeline (Love et al., 2014) ausgeführt. Genexpressionen des Kandidatengens wurden aufgrund der Anzahl gemappter Reads auf ARW und gegenüber der Kontrolle bestimmt. Gene ohne Expressionsdifferenz zwischen ARW und Kontrolle dienten als Referenz.

3.11. Fourier-transform Infrarot (FT-IR) Imaging

FT-IR wurden an Dünnschnitten (8 μm , Kryostat CM1100, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) der Holzproben (gesund und krank) mit einem Varian 4100 FT-IR-Spektrometer gekoppelt mit einem FT-IR-Mikroskop UMA 600 (Agilent Technologies, Waldbronn, ehemals Varian Deutschland GmbH, Deutschland) und ausgestattet mit einem 32 x 32 FPA (focal plane array) Detektor aufgenommen. 32 Scans je Spektrum wurden akkumuliert im Bereich von 4.000-950 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 8 cm^{-1} . Images wurden erzeugt durch Integration entsprechender spektraler Bereiche unter Verwendung der geräteeigenen Software Resolution Pro 4.1 sowie einer eigens programmierten K-Mean-Clusterung mittels MatLab.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen von Gummiholzkrankheit an Apfel (ARW)

4.1.1 RNA-Seq von ARW

Ein pflanzlich übertragbarer Erreger als Ursache von ARW an Apfel sowie die Lokalisation im Wirtsgewebe ist nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde das Apfeltranskriptom mit dem Ziel untersucht ARW-spezifische Sequenzen von Transkripten oder genomischer RNA zu entdecken.

4.1.1.1. Transcriptomanalyse der ARW Probe

Total-RNA wurde aus der Indikator-Apfelsorte für ARW Lord Lambourne isoliert und mittels Illumina HiSeq 2000 mit 2x100bp paired-End Format sequenziert. Die Vorgehensweise einschließlich bioinformatischer Datenanalyse ist in Abb. 1 dargestellt.

Reads aus gesundem Apfel wurden mittels Velvet und Oases Algorithmen *de novo* assembliert und das beste Assembly als Referenz für den nächsten Schritt benutzt. Beste Assemblies wurden aufgrund der Assemblyparameter (N50, Contigzahl, Contiglänge) und Mappierungstatistik (Anzahl von gemapten Reads, Anzahl von korrekt gepaarten Reads) selektiert. Eine Statistik der vier besten *de novo* Assemblies ist in Tabelle 1 gezeigt. Das beste Oases Assembly der Kontrollprobe (h69) hat 90219 Contigs und eine minimale Contiglänge von 100bp sowie eine durchschnittliche Länge von 865 Basen. 81,8% Reads mappten auf dieses Assembly, davon 73,6% gepaarte. Dieses Assembly (h69) wurde als Referenz für die Analyse der ARW Probe benutzt.

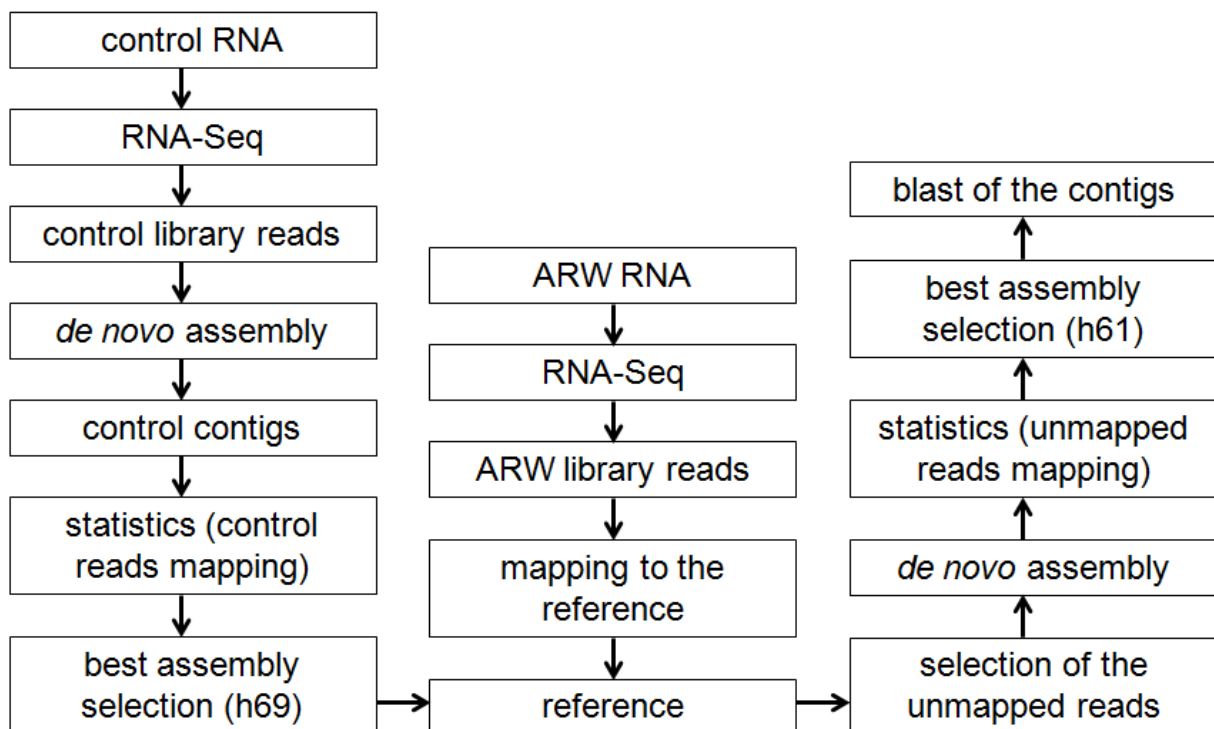


Abb. 1 Ablauf von NGS und bioinformatischer Datenanalyse von ARW. Control-RNA - Total-RNA aus gesundem zweijährigen Lord Lambourne Apfel; ARW RNA -Total-RNA aus zweijährigen ARW-infizierten Lord Lambourne Äpfeln (Isolate 63/87); h69 und h61 - Namen von zwei statistisch als beste ausgewertete Oases *de novo* Sequenzassemblies von NGS Reads.

Table 1. NGS statistics for the Oases *de novo* assembly of the control sample (healthy apple)*

Oases assemblies	h73	h71	h69	h65
Total length raw	64210402	71091249	78142810	92425549
Sum of contig length	64202018	71077384	78128281	92407688
Number of contigs	78958	84777	90219	101874
Undetermined Bases	272	471	704	1024
Breaks	79043	84909	90437	102175
Ambiguous Bases	0	0	0	0
N50	1281	1347	1420	1519
Counts to reach N50	14877	15870	16677	18653
Average length	813	838	865	907
Maximum length	33628	27144	48122	28252
Number of mapped reads	1675837	1628405	1635649	1582614
% Mapped reads	83,8	81,4	81,8	79,1
Number of properly paired	1409596	1388622	1471812	1305114
% Properly paired	70,5	69,4	73,6	65,3

*- Best assembly is marked in grey

Im nächsten Schritt wurden die NGS Reads der ARW Apfelprobe auf die h69 Referenz gemappt. Ungemappte Reads (17,7%) wurden Selektiert und mit derselben Methode wie die Kontrolle wieder *de novo* assembliert. Das beste Oases Ergebnis aus diesem *de novo* Assembly (h61) hat 90102 Contigs, davon wurden 49,2% Reads gemappt (Fig. 1, Tabelle 2). Dieses Assembly wurde weiter benutzt um nach homologen Sequenzen in den Datenbanken mittels blast Algorithmus (Altschul et al., 1990) zu suchen. Der E-Wert (die Wahrscheinlichkeit das ein Treffer zufällig ist) von zehn wurde als minimal genommen um blast-Treffer für weitere Analysen zu berücksichtigen.

Table 2. NGS statistics of the Oases *de novo* assembly of the ARW sample (infected apple)*

Oases assemblies	h65	h63	h61	h59
Total length raw	23356991	26769405	30169811	33716669
Sum of contig length	23354953	26767086	30167502	33714208
Number of contigs	72179	81480	90102	98916
Undetermined Bases	154	259	472	528
Breaks	72218	81557	90227	99049
Ambiguous Bases	0	0	0	0
N50	321	332	344	357

Counts to reach N50	24503	26788	28715	30446
Average length	323	328	334	340
Maximum length	7378	7378	7553	7378
Number of mapped reads	917284	976548	984141	940822
% Mapped reads	45,9	48,8	49,2	47

*- Best assembly is marked in grey

4.1.1.2. Blastn Analyse

Eine blastn Analyse des h61 Assembly wurde mit der NCBI nr/nt Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) und mit RefSeq- spezifischen Datenbanken mit genomischen Sequenzen von Bakterien, Viren, Pilzen und Arthropoden durchgeführt (RefSeq) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). Die Ergebnisse von blastn Suchen sind in Abb. 2 zusammengefasst.

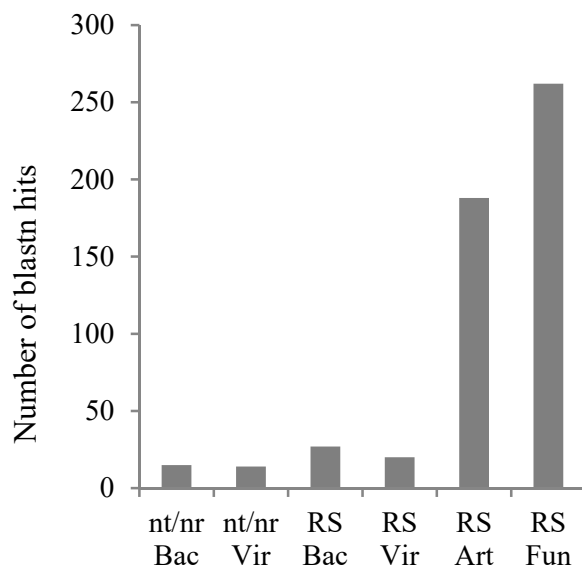


Abb. 2. Blastn Analyse von Contigs aus h61 Oases *de novo* Assembly. nt/nr - non-redundant Nucleotiddatenbank, RS - RefSeq Datenbank, Bac -Bakterien, Vir - Viren, Art - Arthropoden, Fun - Fungi.

Die Suche der blastn Ergebnisse mit "Bakterium" als Schlüsselwort in der nt/nr Datenbank hatte 15 Treffer. Kein Treffer bezog sich auf Pflanzen-assoziierte oder Pflanzen-pathogene Bakterien. Eine identische Suche mit dem Schlüsselwort "Virus" entdeckte 14 Contigs. Hiervon waren fünf homolog zu *in silico* vorhergesagten *Geminivirus* Rep-interacting Motorproteinen (XM002267174.2, AF506028.1., XM002267174.2, XM004509628.1 und XM004288463.1). Sechs andere nt/nr Datenbank Treffer waren homolog zu *Citrus tristeza virus* (CTV). Dies zu einem Resistenz-locus der trifoliolate Orange *Pontirus trifoliata* (gbAF506028.1).

Die Blastn Suche von RefSeq Bakterien ergab 27 Contigs mit Homologie zu nitrifizierenden Cyanobakterien (e.g. Gattungen *Cyanothece*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Gloeocapsa*), aquatischen Bakterien (e.g. *Caulobacter*), Parasiten-oder Mutualisten-Bakterien von Arthropoden (e.g. Gattungen

Wolbachia, *Pseudonocardia*, *Acetobacter*) und humanen Haut- oder pathogenen Bakterien (Gattungen *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*).

- Die blastn Suche von RefSeq ergab 20 Treffer bei Viren. Vorrangig wurden enterobakterielle Phagen oder humane Viren aufgelistet. Ein Treffer war das *Potato leaf roll virus* (gi 9629160). Die weitere Sequenzanalyse dieses Lokus zeigte dass 119 der Endnukleotide 94% identisch mit Chloroplasten-DNA der Familien *Roseaceae* sind. Dies ist in der Literatur beschrieben (Mayo and Jolly, 1991)
- Die blastn Suche von RefSeq ergab 188 hits bei Arthropoden. Dies waren üblicherweise mit Obst assoziierte Insekten (u.a. Gattungen *Apis*, *Drosophilla*), Blattläuse (u.a. *Acyrtosiphon*) Milben (u.a. *Metaseiulus*).
- Die blastn Suche von RefSeq ergab 262 hits bei Pilzen. Dies waren verschiedene Hefearten (u.a. *Saccharomyces*, *Pichia*, *Sordaria*), Schimmelpilze (u.a. *Penicillium*, *Aspergillus*), Boden und Mycorrhiza Spezies und sowie einige pflanzenpathogene Gattungen wie *Puccinia*, *Monoliophthora* und *Leptospaeria*.

4.1.1.3. Blastx analysis

Zur Erweiterung der blast Suche auf ARW-spezifische Sequenzen von Proteinen und Proteinmotiven wurde mittels h61 Oases Assembly eine blastx Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Statistisch signifikante Homologien zu Sequenzen von Bakterien, Pilzen oder Arthropoden wurden nicht entdeckt. 22 contigs wurden entdeckt, welche entweder Homologie zu viralen Proteinen oder zu Pflanzenproteinen, welche mit Viren interagieren, hatten. Wie in Abb. 3. Gezeigt, wurden die Treffer in vier Kategorien aufgeteilt:

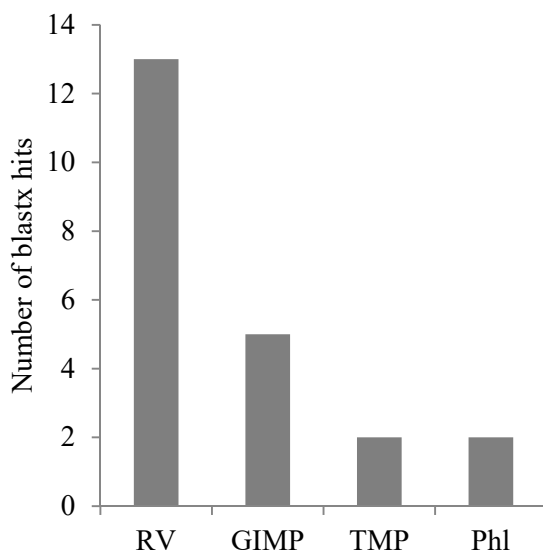


Abb. 3. Blastx Analyse von Contigs aus h61 Oases *de novo* Assembly. RV - Retrovirus-ähnlich (RV-like); GIMP - *Geminivirus* Rep - interagierendes Motorprotein; TMP - *Tobamovirus* Multiplikationsprotein; PhI - *Phlebovirus*-ähnliche Sequenzen.

1) Zu RV-like: In 13 Treffern wurden Contigs mit bester Übereinstimmung zu Retrovirus-ähnlichen (RV-like) Proteinen gefunden. Vier davon waren homolog zu Pol-Proteinen von Transposonsequenzen aus Tabak, drei zu Pol-Sequenzen aus Erdbeere und Hülsenfrüchten und sechs Contigs waren homolog zu Sequenzen von Reverse Transcriptase (RT) aus Apfel. Fünf RT-ähnliche Treffer waren homolog zu einem einzelnen Genbankeintrag (gb CBL94163.1) und ein Treffer war homolog zu einer anderen Apfelsequenz (gb AEJ72569.1). Sequenzen von Retrotransposons sind allgegenwärtig und echte Retroviren in Pflanzen sind unbekannt (Hohn and Roehle, 2013; Voytas et al., 1992). Aus diesem Grund wurden diese Sequenzen nicht weiter analysiert.

2) Zu GIMP: Vergleichbar zur blastn Analyse ergaben fünf Contigs Homologien zu *Geminivirus* Rep-interagierenden Motorproteinen (GIMP). Diese Contigs sind auch homolog zu Myosin und Kinasin Proteindomänen. Geminivirus-verwandte Sequenzen konnten aber nicht mit der RCA-Methode (rolling circle amplification) in der ARW Probe nachgewiesen werden. RCA ist eine einfach anzuwendende PRC-Methode für zirkuläre DANN-Viren, welche geeignet ist unbekannte Geminiviren in Pflanzen nachzuweisen. Aufgrund der Ergebnisse wurden die Contigs nicht weiter analysiert.

3) Zu TMP: Contigs homolog zu *Tobamovirus* Multiplikationsprotein (TMP) -ähnlichen Sequenzen wurden zweimal gefunden. Ein Contig war homolog zu einem TMP 1-like Protein aus Apfel und das zweite Contig homolog zu einem TMP 3-ähnlichen Protein aus Mais. Diese zwei Treffer wurden nur *in silico* vorhersagt. Da keine andere Tobamovirus ähnliche Sequenzen in der ARW Probe auftraten, wurden diese nicht weiter analysiert.

4) Zu PhI: Zwei weitere Contigs wurden homolog zur RNA-dependent RNA Polymerase und Nukleokapsiden der Gattung *Phlebovirus* (*Huangpi tick virus 2* and *Alenquer virus*) gefunden. Die meisten dieser Viren gehören zu Viren an Mensch oder Tier und sind mittels Zecken oder Fliegen übertragbar. Da aber auch Pflanzenviren zur Familie der *Bunyaviridae* gehören (z.B. Gattung *Tospovirus*) wurden die Sequenzen außerhalb des Projektes weiter in einer Zusammenarbeit mit einem kanadischen Wissenschaftler analysiert. Diese Ergebnisse führten außerhalb der Projektlaufzeit zur vorläufigen Charakterisierung von zwei Viren, welche vorläufig als Apple rubbery wood associated virus -1 (ARWaV-1) und ARWaV-2 bezeichnet werden. Die Sequenzen von ARWaV-2 wurden in den Daten aus Projekt 2812NA019 gefunden. Weitere Sequenzierungen in Kanada aus ARW Proben des JKI erbrachten auch Sequenzen von ARWaV-1. Diese Analysen werden in 2017 fortgesetzt. Eine Veröffentlichung ist in Vorbereitung. In dieser wird auf die Daten aus Projekt 2812NA019 hingewiesen werden.

4.1.1.4. Transkriptomanalyse mit Golden delicious Apfelgenom als Referenz

Um die Suche nach einem potentiellen ARW-Pathogen zu erweitern und die NGS Daten der Lord Lambourne ARW-Probe zu verifizieren wurde der gleiche bioinformatische Ablauf wie auf Abb. 1 mit der kompletten genomischen Sequenz von Golden delicious (Velasco et al., 2010) als Referenz anstelle der *de novo* assemblierten Transkriptome des gesunden Lord Lambourne Apfels durchgeführt. Golden delicious war zum Zeitpunkt der Untersuchungen das einzig verfügbare Apfelgenom in Genbank.

Nach *de novo* Assembly ungemappter NGS Reads aus der ARW Probe wurden die zwei besten Kandidaten-Assemblies ausgewählt: dies war mit der größten durchschnittlichen Contiglänge h97 und mit der maximalen Contiglänge h71 (vgl. Tab 3). Mit blastn wurde zwei Contigs gefunden: ein 1096 bp contig in h71 mit dem E-Wert von $9e-12$ und ein 514 bp contig in h97 mit dem E-Wert von $3e-10$. Beide waren homolog zu Nukleokapsiden von *Phleboviren* (gb ABQ23562.1). Wie in 4.1.1.3.

erwähnt hatte auch ein contig aus blastx des h69 Assembly (1099 bp long) ein Nukleokapsid aus der Gattung *Phlebovirus* als besten Treffer. Ein Alignment dieser drei Contigs zeigte eine Identität von h69 contig (1099 bp) mit h71 Contig (1096 bp) über 769 nt Länge. Das contig h97 (514 bp) war mit h71 über die gesamte Länge identisch.

Table 3. NGS statistics of the Oases *de novo* assembly of the ARW sample using Golden delicious apple genome as a reference *

Oases assemblies	h97	h95	h71	h79
Total length raw	150371	558258	19777424	22084388
Sum of contig length	148850	550253	19658715	21995157
Number of contigs	260	1161	51179	59458
Undetermined Bases	0	0	0	0
Breaks	260	1161	51179	59458
Ambiguous Bases	0	0	0	0
N50	668	469	433	424
Counts to reach N50	72	347	13596	15387
Average length	572	473	384	369
Maximum length	2720	3916	8454	8342

* - Best assemblies are marked in grey.

4.1.1.5. Vergleich der ARW Sequenzdaten mit der Datenbank DPV web

Für eine spezifische Suche nach Pflanzenviren und Viroiden wurden alle nicht assemblierte Reads von ARW- und den Kontrollproben gegen das DPV web verglichen. Dies ist eine Datenbank von 55109 Pflanzenviren, Mykoviren und Viroiden (Adams and Antoniw, 2006). Es war nach unseren Erkenntnissen die einzig verfügbare Datenbank dieser Art.

Das *Cucumber mosaic virus* (CMV) Genom wies 333 Treffer bei 44,4% Abdeckung seines Genoms in der ARW Probe bei 0% in der Kontrolle auf. Die ausführliche Untersuchung der gemappten Reads wurde mittels Interactive Genome Viewer (IGV), einen Webtool zur Visualisierung großer genomischer Daten (Robinson et al. 2011) durchgeführt. Es zeigte, dass nur zwei gemappte 100 bp Reads für die 44.4% Abdeckung von 450 bp der CMV Sequenz aus Genbank (gb X81165) ausreichten. Aus diesem Grund wurde CMV als potentieller ARW Kandidat aus weiteren Analysen ausgeschlossen.

Von weiterem Interesse bei den Treffern aus der DPV web Datenbank war das Yukatan Isolat des *Citrus exocortis viroid* (CEVd). Dieses Viroid hatte eine hohe Sequenzabdeckung mit NGS Reads (62% bis 93%) in ARW sowie in der Kontrollprobe. Aufgrund der CEVd Sequence (Genbank, gb DQ318790) wurden zwei PCR-Primerpaare konstruiert und getestet. In den Versuchen traten die erwarteten Banden in der ARW Probe sowie in der Kontrolle auf (Daten nicht gezeigt). Diese PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Die ermittelten Sequenzen zeigten 100% Nucleotid-Identität mit der 395 bp CEVd Sequenz des Yukatan Isolats über die gesamte Länge. Die folgenden Analysen der

CEVd Yukatan Sequenzen aus Genbank (FJ751925-933 und DQ318790-792) wies eine hohe Nukleotid-Identität (99%) zu mitochondrieller und bakterieller 16s RNA auf. Es mußte deshalb davon ausgegangen werden, dass diese Sequenzen pflanzlichen bzw. bakteriellen Ursprungs waren.

4.1.1.6. Expressionsanalyse von Genen des Ligninstoffwechsels

Eine veränderte Lignifizierung wurde bereits in sehr frühen Untersuchungen zur Krankheit als Ursache für unvollständige Verholzungen in den ARW Proben vorgeschlagen (Beakbane and Thompson, 1945; Waterworth, 1969). Aus diesem Grund wurden die in der Ligninbiosynthese involvierten Gene (Boerjan et al., 2003) im Apfelgenom gesucht. Vier wichtige Gene der Ligninbiosynthese wurden gefunden: 1) Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), gb AF494403; JQ248934; 2) Cynnamate 4 hydroxylase (C4H), gb JQ248935.1; 3) Cynnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), gb AF053084.1; 4) Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT), gb JX457336.1.

Die Genexpressionsanalyse dieser vier Gene in der ARW- und der Kontrollprobe ist in Abb.4 dargestellt. PAL, C4H und CCoaAOMT hatten im Vergleich zur gesunden Kontrolle eine 1,4 bis 2,3 - fach niedrigere Expression in der ARW Probe (0.5 - 1,2 log₂ Ratio). CAD war 1,6-fach (0.7 log₂) höher exprimiert. Diese Daten zeigen einen möglichen Einfluss eines mutmaßlichen ARW Pathogen auf die Expression von Genen der Ligninbiosynthese. Um eine höhere Sicherheit dieser Analysen zu erhalten ist eine größere Anzahl von Sequenzierungen ARW infizierter Pflanzen erforderlichlich.

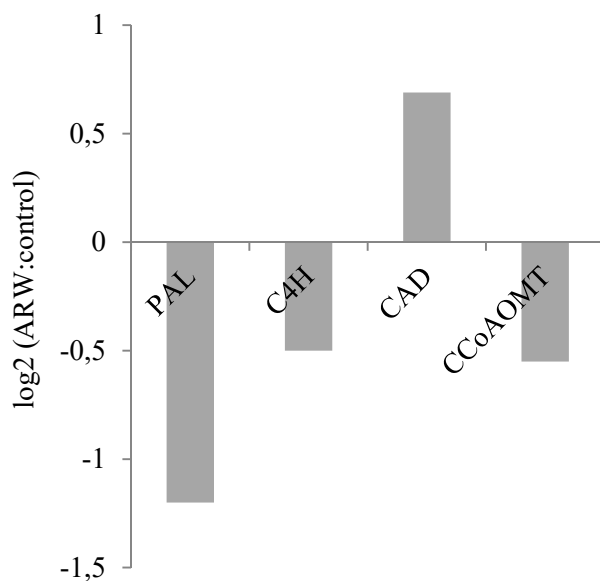


Abb. 4. Genexpression von Genen in der Ligninbiosynthese in ARW-infiziertem Apfel und der Kontrollprobe. PAL = Phenylalanine-ammonium-lyase; C4H = Cinnamate-4-hydroxylase; CAD = Cynnamyl alcohol dehydrogenase; CCoAOMT = Caffeoyl-CoA O-methyltransferase.

4.1.2. NGS Analysen von kleinen RNAs (siRNAs)

In neueren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass kleine RNAs (sRNA) als Nachweis für Pflanzenviren benutzt werden können (Kreuze et al., 2009). RNA Fragmente zwischen 20-25bp wurden aus den gleichen RNA Proben, wie diese für RNA-Seq benutzt wurden, durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) getrennt und mit Illumina Hiseq200 sequenziert. Reads aus gesundem Apfel wurden assembliert (Tabelle 4) und das beste Assembly (Tabelle 4, h15) als Referenz für den nächsten Schritt benutzt. Wie bereits mit den Daten aus RNA-Seq geschrieben, wurden auch hier die Reads aus ARW-Apfel mit der gesunden Referenz verglichen und um diese bereinigt. ARW-spezifische Reads wurden dann wieder *de novo* assembliert (Tabelle 5) und Contigs für das beste Assembly (Tabelle 5, h17) zum Abgleich mit den viralen Nukleotid- und Proteindatenbanken benutzt (blastn und blastx). Alle blastn und blastx hits zeigten nur Sequenzhomologien mit Apfel, Birne, Pflaume usw., nicht aber mit viralen Sequenzen (Daten nicht gezeigt).

Table 4. NGS statistics for the Oases *de novo* assembly of the sRNA of control sample*

Oases assemblies	h19	h17	h15	h13
Total length raw	21458	50571	80274	10841
Sum of contig length	21458	50571	80274	10841
Number of contigs	95	225	410	78
Undetermined Bases	0	4	39	0
Breaks	85	226	424	78
Ambiguous Bases	0	0	0	0
N50	258	234	179	142
Counts to reach N50	18	32	91	30
Average length	225	224	195	138
Maximum length	1962	2813	3236	246
Number of inserts	16876845	16876845	16876845	16876845
Number of mapped inserts	4260539	4857992	5233211	878016
% mapped inserts	25,2	28,9	31	5,2

*- Best assembly is marked in grey

Table 5. NGS statistics for the Oases *de novo* assembly of the sRNA of ARW sample*

Oases assemblies	h21	h19	h17	h15
Total length raw	558	5579	26527	41743
Sum of contig length	558	5579	26527	41743
Number of contigs	5	43	190	313
Undetermined Bases	0	3	6	41
Breaks	5	44	193	324
Ambiguous Bases	0	0	0	0

N50	106	126	133	125
Counts to reach N50	2	17	69	123
Average length	111	129	139	133
Maximum length	132	236	1045	565
Number of inserts	15516911	15516911	15516911	15516911
Number of mapped inserts	58543	323367	611378	468833
% mapped inserts	0,4	2,1	4	3

*- Best assembly is marked in grey

Nach *de novo* Assembly ARW-spezifischer Reads von sRNAs wurden nur 4% davon zu Contigs assembliert (s. Tabelle 5). Die Analyse der unassemblierten sRNAs entdeckte Sequenzen von micro-RNAs (miRNAs), welche eine wichtige Rolle in der Genregulation und der Antwort von Pflanzen auf Stress (z.B. Pathogene, extreme Umweltbedingungen) haben (Sunkar et al., 2012). Die Sequenzen von sRNAs von ARW- und der Kontrollprobe wurden mit einer miRNA Datenbank verglichen (<http://www.mirbase.org/>). Die häufigsten Reads von verschiedenen miRNA Typen wurden gezählt und wie in Abb. 5 zwischen ARW und Kontrolle verglichen.

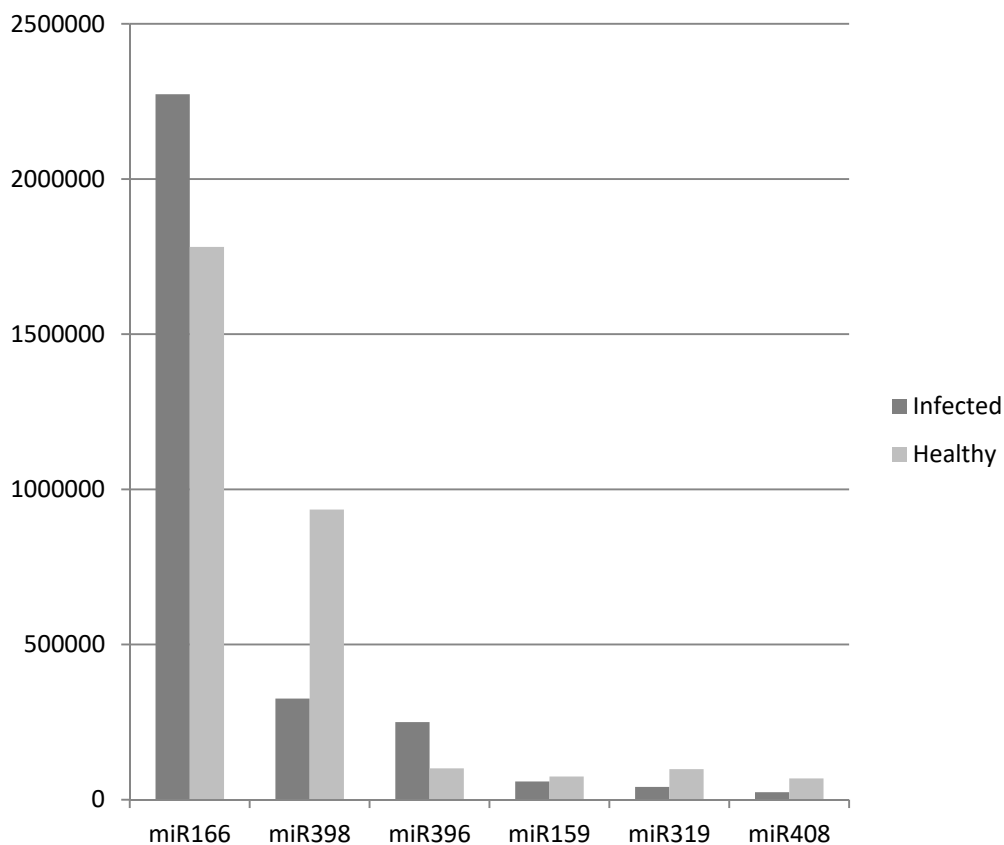


Abb. 5. Anzahl der sechs häufigsten miRNA Sequenzen Reads. Dunkelgrau = ARW Probe; Hellgrau = Kontrolle.

Die Untersuchungen mittels Hochdurchsatzsequenzierung zur Ermittlung eines Erregers der Gummiholzkrankheit an Apfel im Rahmen des Projektes wurden im European Journal of Plant Pathology veröffentlicht (Manuscript in Anlage):

Analysis of the apple rubbery wood disease by next generation sequencing of total RNA
V. Jakovljevic & P. Otten & C. Berwarth & W. Jelkmann. European Journal of Plant Pathology, 2017.
DOI 10.1007/s10658-016-1119-z

4.1.3. Analyse der ARW Sequenzdaten aus NGS im Rahmen der Deutsch-Kanadischen Zusammenarbeit in der Agrarforschung

Die NGS Daten aus dem Projekt wurden im Rahmen der Deutsch-Kanadischen Zusammenarbeit in der Agrarforschung im Labor von Dr. M. Rott (Canadian Food Inspection Agency Centre for Plant Health (CFIA), Sidney B.C.) weiter analysiert. Es konnte ein neues negative strand RNA virus gefunden werden. Dieses hatte M. Rott gleichzeitig in eigenen Proben entdeckt, welche ebenso mit ARW infiziert waren. Zunächst hatte er dem Ergebnis keine Bedeutung zugemessen, da es sich um ein Insektenvirus zu handeln schien. Erst die Auffindung in den Proben aus Kanada sowie Deutschland ließ das Ergebnis in anderem Licht erscheinen. In den verschiedenen sequenzierten Proben wurden zwei stark voneinander abweichende Varianten des Virus gefunden. Diese wurden mit ARWaV-1 und ARVaV-2 bezeichnet. Die Viren gehören der Familie der Bunyaviridae an. Zu den Viren gibt es keinerlei Homologien in den der Öffentlichkeit zugänglichen Datenbanken. Dies war auch Grund, warum die Viren nicht aus dem Material von FASTERIS per BLAST Analysen aufgefunden werden konnten. Im Labor bei CFIA wurden die Viren mit dort neu in der Entwicklung befindlicher Software sowie eigenen nicht öffentlich zugänglichen Datenbanken aufgefunden.

Zu Ende der Projektlaufzeit wurden in beiden Laboratorien verschiedene PCR-Primer für die Viren ARWaV-1 und ARVaV-2 entwickelt und getestet. Hierbei ergab sich keine eindeutige Zuordnung zu den als infiziert (per Bioindikator) angesehenen Apfelproben. Hierzu ist zu sagen, dass die Indikation mit der empfindlichen Sorte Lord Lambourne von der Beurteilung subjektiv ist und somit nicht eindeutig sein kann. Folgearbeiten im JKI und im CFIA Labor sind darauf ausgerichtet beide Viren vollständig zu sequenzieren. Hierzu müssen noch fehlende terminale Enden mit weiteren Methoden (5' und 3' RACE) ermittelt werden.

Um die bisher vorliegenden Sequenz- und PCR-Daten mit dem Krankheitsbild ARW an der Indikatorsorte Lord Lambourne unter gleichen natürlichen Bedingungen in den Folgejahren zu testen, wurden neun in der CFIA Sammlung unterhaltene Isolate von ARW in Form von Reisern an das JKI überführt. Der Versuch wird ab Frühjahr 2017 begonnen.

4.1.4. Fourier-Transform Infrarot (FT-IR) Spektroskopie von ARW Proben

Um mögliche strukturelle Änderungen zwischen ARW und gesunden Proben zu untersuchen wurden Dünnschnitte (ca. 10 µM) vorbereitet. In Zusammenarbeit mit dem JKI Institut ÖPV in Berlin wurden die Proben mittels FT-IR Spektroskopie analysiert (vgl. Zwischenberichte vom 28.02.14, 28.02.15 und 30.06.16). Die FT-IR Spektren zeigten große Unterschiede zwischen gesunden und ARW kranken Holz.

Dies nicht im Gehalt sondern sehr deutlich in der Struktur, welche von Lignin und Cellulose gebildet wird (Abb. 6). Zudem wurde Raman Spektroskopie Messungen mit viel geringerer Auflösung als FT-IR durchgeführt. Hierbei konnte kein geringerer Lignin-Gehalt nachgewiesen werden, wie dies aufgrund veröffentlichter Studien (Waterworth 1969) erwartet wurde.

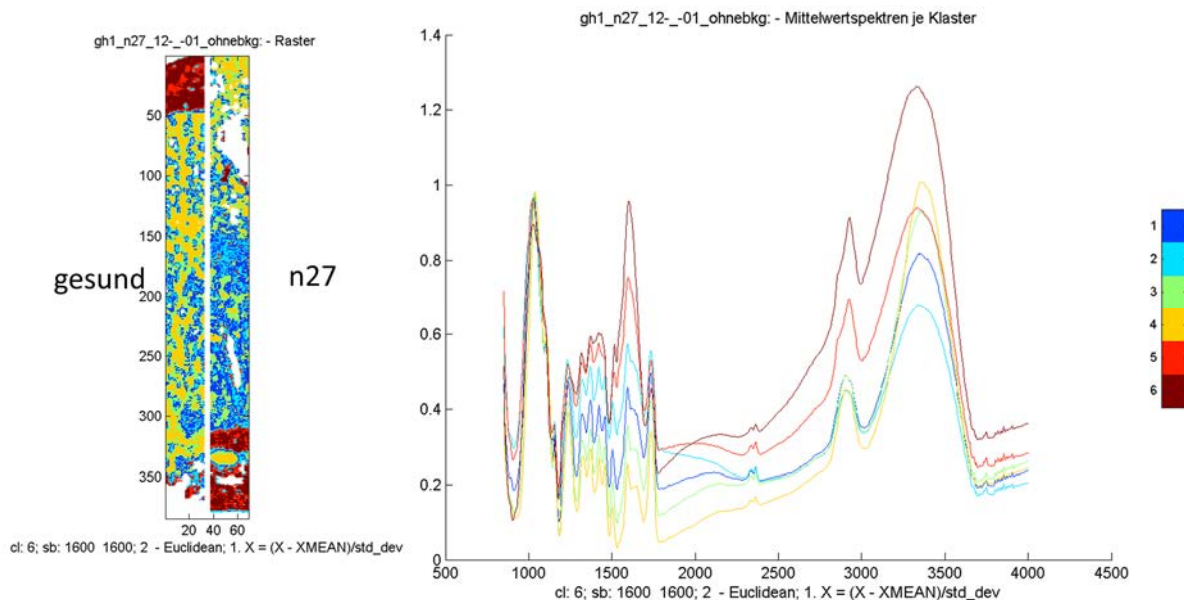


Abb 6. FT-IR Spektroskopie. Links – Querschnittsaktionen von gesundem und ARW krankem Apfel (n27). Rechts – FT-IR Spektren.

4.2. NGS latenter Apfelviren

4.2.1. NGS und Qualitätskontrolle von Daten

dsRNA wurde aus frischen Blättern von drei mischinfizierten Apfelbäumen extrahiert: 1) **4487**: ASPV, ASGV, ACLSV und ApmV positiv mit PCR getestet; 2) **3588**: als ARW bezeichnet und PCR positiv auf ASPV, ASGV, ACLSV; 3) **4087**: als FL und ARW bezeichnet und ASPV, ASGV, ACLSV PCR positiv. Die Extraktion von dsRNA, die Herstellung von cDNA Bibliotheken und Illumina NGS erfolgte wie in den Methoden sowie im Zwischenbericht vom 28.02.15 beschrieben.

Im ersten Schritt der Analyse wurden die nicht assemblierten paired-end Reads der drei Viren ASPV, ASGV und ACLSV mit bekannten genomischen Sequenzen dieser Viren aus Datenbankeinträgen verglichen. Alle drei Proben enthielten Reads die mit den ausgewählten Genomen von ASPV (FR694186.1), ASGV (D14995.2) und ACLSV (AJ243438.1) übereinstimmten (Tab 6). Die Alignments deckten trotz hoher Anzahl von Reads die Genome der Viren nicht vollständig ab. Eine nahezu vollständige Abdeckung lag nur beim ASGV Isolat AC (JX080201.1) vor.

Table 6. Number of aligned NGS reads to three selected genomes of apple latent viruses

genome	3588	4087	4487
ASPV Palampur, FR694186.1	2881	8613	1085
ASGV Yoshikawa, D14995.2	748	630	53
ACLSV Jelkmann, AJ243438.1	39	53	93

4.2.2. Filterung von nicht-Apfel Reads

Im nächsten Schritt wurden alle nicht assemblierten Reads zur DPV web Datenbank (vgl. 4.1.1.5.) mit 55109 Pflanzenviren und Viroiden (Adams and Antoniw, 2006) verglichen. Zur Bestimmung der Anzahl von Apfel spezifischen Sequenzen wurde ein Abgleich mit dem Genom von *Malus domestica x Borkh.*, cv. Golden delicious (Velasco *et al.* 2010) vorgenommen. Wie in Abb. 7 gezeigt waren für die drei Proben 61-71% gesamten Reads spezifisch zum Apfelgenom. Dies schloss Alignments zu DNA von Chloroplasten und Mitochondria mit ein. Nur 1-2% gesamten Reads je Probe waren virus-spezifisch.

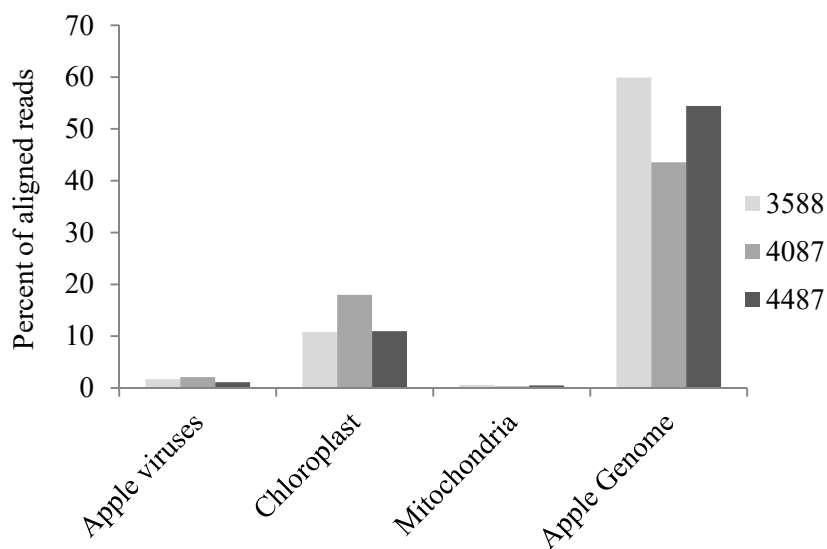


Abb. 7. Alignment von unassemblierten NGS reads der drei mischinfizierten Proben (vg. 4.2.1.). Chloroplasten, Mitochondrien und das Apfelgenom sind Sequenzen aus dem Genom von *Malus domestica x Borkh.*, cv. Golden Delicious (Velasco *et al.*, 2010).

Um Anzahl und Art von Sequenzen latenter Apfelviren in den drei Mischinfektionen zu bestimmen, wurden 100 filtrierte nicht-Apfel Treffer mit der höchsten Anzahl von angeordneten Reads

ausgewählt und gruppiert. Wie in die Tabelle 7 gezeigt ist eine Mehrheit von Reads jeder Probe spezifisch zu einem latenten Apfelmavirus (ASGV, ASPV, AGcV, ACLSV) oder zum *Citrus exocortis viroid*, (CEVd, isolate Yukatan, gb DQ318790).

Table 7. Alignment of non-apple reads to the DPV web plant virus database. 100 blast hits with highest number of aligned reads were selected and grouped by type of virus.

Virus	3588	4087	4487
ASGV	48	47	19
ASPV	28	22	10
AGcV	1	1	1
CEVd	16	16	8
ACLSV	2	6	5

4.2.3. *De novo* Assembly

Im folgenden Schritt wurde ein *de novo* assembly von NGS Reads durchgeführt und mittels blastn assemblierte Contigs mit einer Nukleotidendatenbank (nt/nr) verglichen. Um die Anzahl von blastn Treffer zu reduzieren wurden nur die Treffer, welche als die vier besten von mindestens fünf Contigs erschienen, als repräsentativ für die Probe ausgewählt (Abb. 8). Vergleichbar zu den nicht-assemblierten Reads waren alle Proben in 52-62% Treffer homolog zu pflanzenspezifischen Sequenzen. Die Proben 3588 und 4087 wiesen in 16,9-17% der Fälle Treffer zu Apfelmaviren auf. Die Probe 4087 war nur zu 4,79% spezifisch zu Apfelmaviren. Weitere Homologien ergaben sich zu pflanzenpathogenen- oder pflanzenassoziierten Bakterien. Mittels PCR verliefen aber die Überprüfungen auf pflanzenpathogene Bakterien negativ (Daten nicht gezeigt).

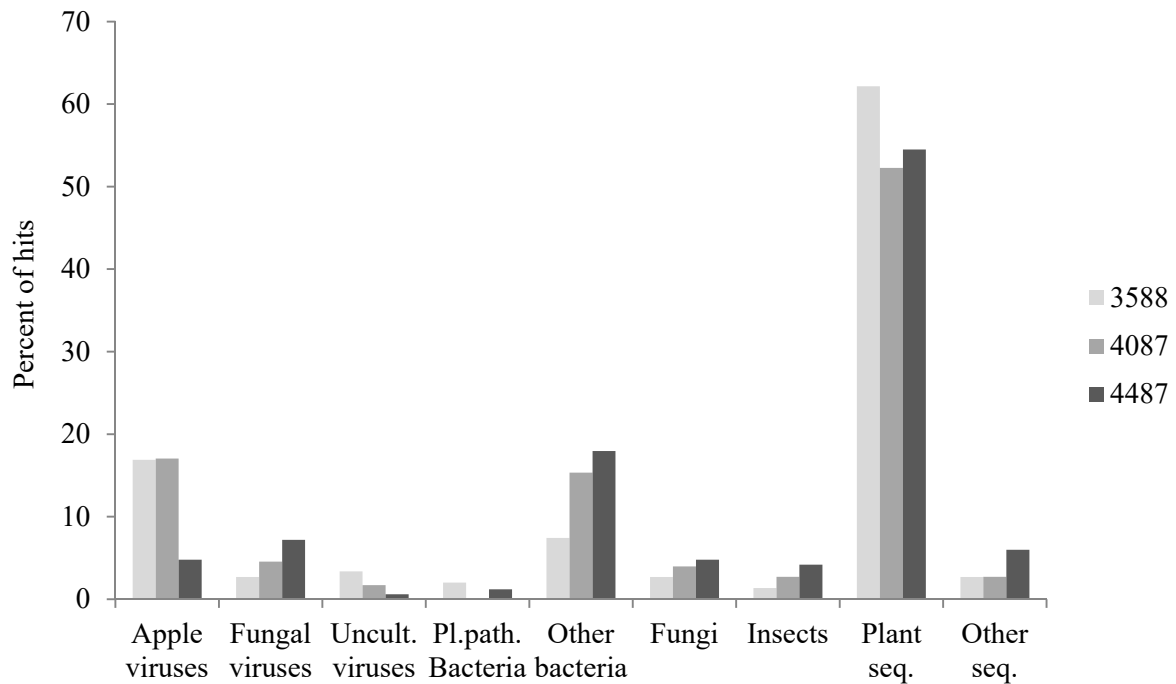


Abb. 8. *de novo* Assembly von NGS Reads latenter Apfeldviren. Das Diagramm zeigt blastn Treffer der genannten Organismen. Abkürzungen: Uncult. = nicht kultivierbar; Pl. Path. = pflanzenpathogen, seq. = Sequenzen.

Mehrere Contigs in jeder Probe hatten mehrfach Treffer zu ASPV, ASGV, ACLSV und AGcV. Die längsten Contigs entsprachen den vollständigen oder nahe vollständigen Genomen von ASPV, ASGV, ASPV und AGcV. Die zwei längsten Contigs von Probe 4487 konnten ACLSV (ca. 7,5 kB) und AGcV (ca. 9.1kB) nicht vollständig abdecken (Tab 8).

Table 8. Contigs from *de novo* assembly matching latent apple viruses in blastn analysis

Virus	Sample	blastn hits	Nr. contigs	Nr. complete genomes	Longest contig (bp)
ACLSV	3588	60	65	12	7552
	4487	50	78	12	5572
	4087	31	31	9	7566
ASPV	3588	181	437	6	9117
	4487	145	366	7	9317
	4087	13	15	3	9373
AGcV	3588	1	145	1	9117

	4487	1	127	1	4112
	4087	1	6	1	9373
ASGV	3588	3	1	3	6521
	4487	3	1	3	6474
	4087	3	1	3	6516

4.2.4 Phylogenetische Analyse der längsten *de novo* assemblierten Contigs

Um die längsten *de novo* assemblierten Contigs weiter zu charakterisieren wurden sie mit anderen in den Datenbanken verfügbaren kompletten Genomen von ASPV, ASGV und ACLSV verglichen und phylogenetisch analysiert.

4.2.4.1 ASPV Contigs

Wie in Abb. 9a gezeigt hatten aus der ASPV Probe 3588 die Contigs 9317 nt, 9373 nt und 9352 nt mit 77-87 % die höchste Identität zum ASPV Stamm PB66 (JKI Dossenheim, gb KF321966). Die Contigs 9317 nt von Probe 4087 sowie 9293 nt und 9014 nt von Probe 4487 hatten die höchste Identität mit 73-84% zu ASPV Stamm PM8 (gb 319056). Das Contig 9316 von Probe 4487 wies 84% Identität zu ASPV Stamm Hannover (gb 321967) auf.

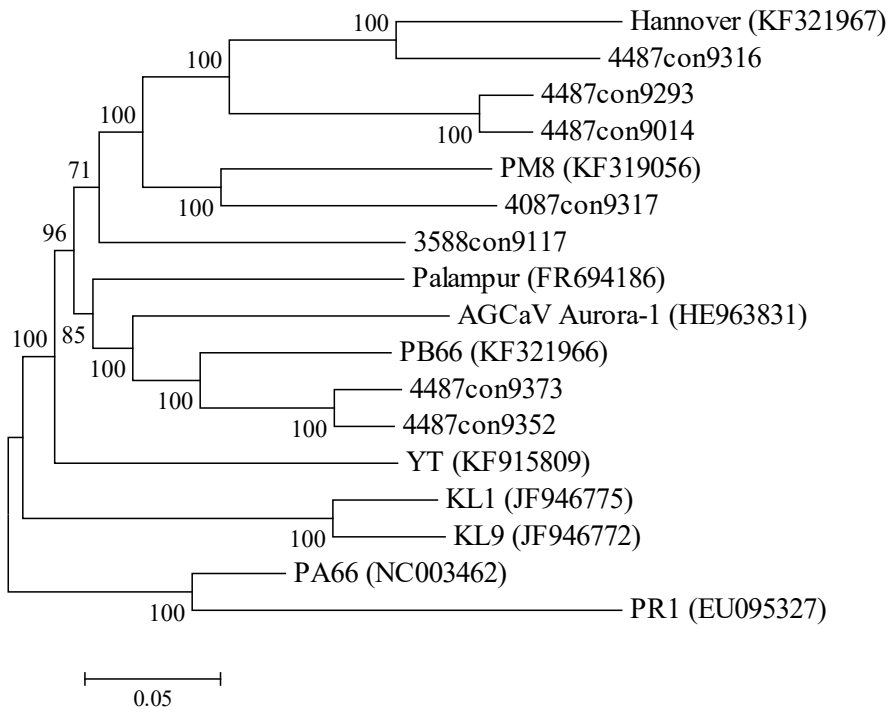
4.2.4.2. ACLSV Contigs

Das ACLSV Contig 7552 nt der Probe 3588 war 87% identisch zum QD13 Stamm aus China (gb KJ522693) und Contig 7566 nt von Probe 4487 war 78% identisch zum AC Stamm aus Indien (gb HE980332) (Abb. 9b).

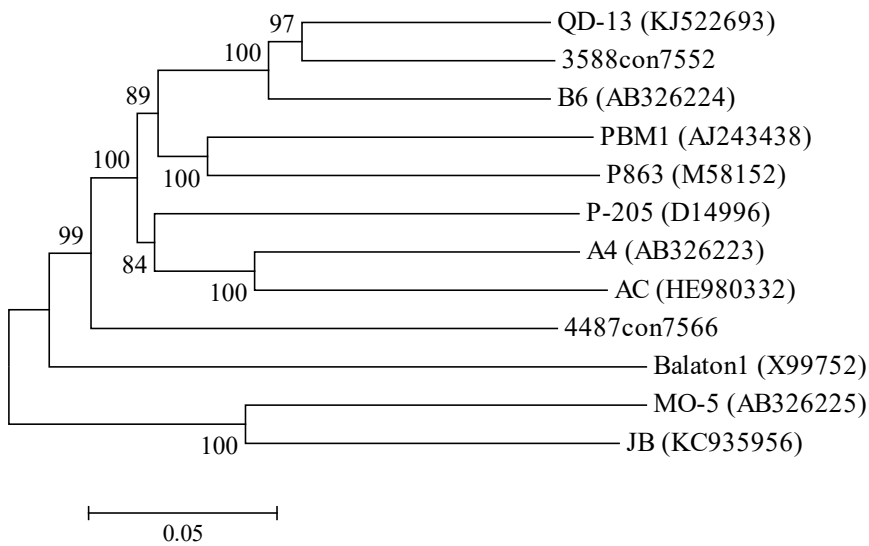
4.2.4.3. ASGV Contigs

Die ASGV Contigs der drei Proben waren zu 98% miteinander sowie mit dem AC Stamm aus Neustadt (mutmaßliche Herkunft Versuchfeld des JKI Dossenheim) (gb JX080201) identisch (Abb 9c).

a) ASPV



b) ACLSV



c) ASGV

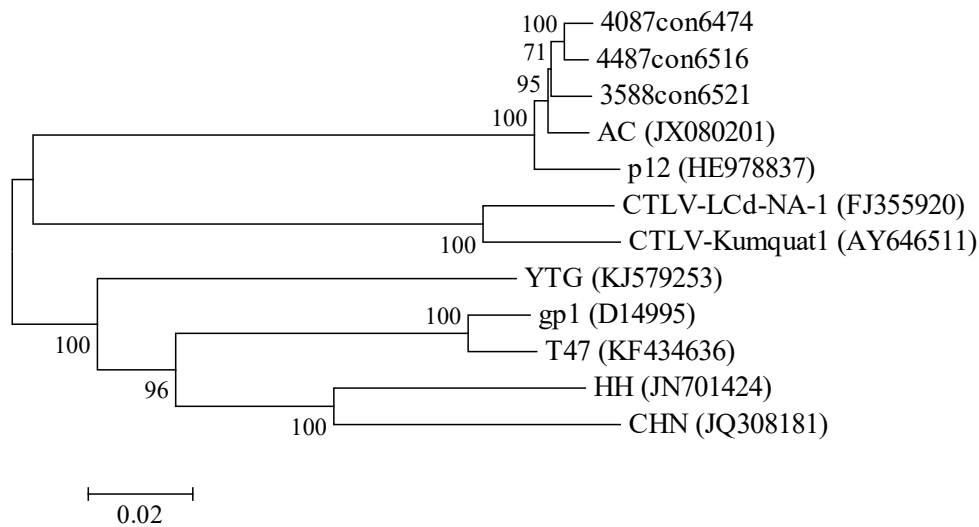


Abb 9. Phylogenetische Stämme von *de novo* assemblierten Contigs mit voller Genomabdeckung von drei latenten Apfelviren. a) ACLSV; b) ASPV c) ASGV. Abkürzungen: AGCaV- *Apple green crinkle virus*; ApLV-*Apricot latent virus*, CTLV-*Citrus tatter leaf virus*.

4.2.5. Nachweis von *de novo* assemblierten Contigs mittels PCR

Die drei mischinfizierten Pflanzenproben wurde alle mit spezifischen Primerpaaren der verschiedenen Contigs von ASPV, ASGV und ACLV (aus den *de novo* assemblierten Contigs) mittels PCR getestet. Wie in Tabelle 9 gezeigt wurde nur das ASPV Contig 9317 nt in allen drei Proben positiv getestet. Das ASPV Contig 9316 nt wurde in Probe 4487 gefunden, ebenso das ACLSV Contig 7566 nt. Weitere PCR Untersuchungen sind erforderlich um die *de novo* Contigs *in vivo* zu überprüfen.

Table 9. PCR to test presence of *de novo* assembled contigs in dsRNA extracts

Probe/Contig	dsRNA sample		
	3588	4087	4487
3588/9117	-	-	-
4087/9317	+	+	+
4487/9316	-	-	+
3588/7552			
4487/7566	-	-	+
3588/6521	-	-	-

5. Diskussion der Ergebnisse

Im Projekt wurden bioinformatische Abläufe beschrieben, welche zur Analyse von Nukleotid- und Proteinsequenzen unbekannter Pflanzenpathogene aus NGS Daten geeignet sind. Zwei Abläufe wurden entwickelt: in einem Ablauf wurde nach einem pfropfübertragbaren Pathogen als Verursacher von ARW gesucht; in einem zweiten Ablauf wurden Mischpopulation latenter Apfelviren analysiert. Im Fall von ARW mit einem unbekanntem potentiellen Pathogen wurde das gesamte Apfeltranskriptom *de novo* assembliert und auf mögliche Erreger untersucht. Da es sich um ein pfropfübertragbares Agens handelt, lag der Focus auf der Suche nach Viren bzw. Viroiden.

Latente Apfelviren wurden mittels NGS aus dsRNA analysiert. Im Gegensatz zu den Arbeiten bei ARW, bei denen eine Kontrolle der Indikatorsorte Lord Lambourne sequenziert wurde, diente das Genom von Golden Delicious als Referenz. Die bioinformatischen Werkzeuge waren entweder Velvet/Oasis oder Trinity Applikation.

In beiden NGS Datensätzen wurden hohe Kontaminationen mit pflanzlichen Sequenzen festgestellt. Dies obgleich ribosomale RNAs mittels RiboZero Kit (Illumina, CA, U.S.A.) entfernt worden waren.

Die Blastn und RefSeq Suche von ARW Reads entdeckte viele Sequenzen von Bakterien, Pilzen, Viren und Arthropoden. Keine davon war unmittelbar Pflanzenpathogenen zuzuordnen. Mit BlastX wurden einige virale Proteine entdeckt. Hiervon gehörten zwei zu *Phleboviren*, einer Gattung von Viren, der keine Pflanzenviren angehören. Allerdings gehören diese Viren in die Familie der *Bunyaviridae*, zu welcher die Gattung der Tospoviren gehört. Letztere sind die einzigen Pflanzenviren in der Familie. Außerhalb des Projektes wurde im Rahmen der Deutsch-Kanadischen Zusammenarbeit in der Agrarforschung ein neues negative strand RNA Virus in zwei Varianten gefunden. Dies sowohl in Kanada als auch in den NGS Proben des Projektes. Die Viren wurden vorläufig mit ARWaV-1 und ARVaV-2 bezeichnet. PCR Versuche werden derzeit im JKI und beim CFIA in Kanada mit dem Ziel durchgeführt diese beiden Viren als potentielle ARW-Pathogene weiter zu untersuchen.

Die bioinformatische Analyse von NGS Reads wies auch auf einige generelle Probleme hin: Zunächst wurden irreführende Sequenzeinträge in der Datenbank entdeckt, z.B. pflanzliche Genabschnitte, welche pflanzenvirale Sequenzen enthielten. So erschienen in Alignments falsch positive Ergebnisse zu *Cucumber mosaic virus*. Nicht zutreffend hinterlegte Datenbankeinträge führten ebenso zu falsch positiven Ergebnissen, z.B. mit der als Yukatan Isolat von *Citrus exocortis viroid* (CEVd) hinterlegten Sequenz.

Die NGS Untersuchungen zu latenten Apfelviren in Mischinfektionen wiesen bis auf ASGV eine nahezu vollständige Abdeckung auf. Die Ergebnisse wiesen durch neu entdeckte Stämme von ASPV, ACLSV und ASGV auf eine hohe Variabilität der Viren hin.

In der Literatur vorliegende Daten weisen auf eine Verminderung von Lignin in ARW infizierten Proben durch eine veränderte Ligninbiosynthese hin (Beakbane and Thompson, 1945; Waterworth, 1969). Die Analyse der Expression mit der Synthese von Lignin verbundener Gene ergab Unterschiede zwischen gesunden und ARW infizierter Apfelproben. Gefunden wurde eine geringere Genexpression in drei von vier untersuchten Genen und die Erhöhung bei einem Gen. Strukturelle Analysen mittels FT-IR von ARW Proben zeigten irreguläre Muster von Lignin und Zellulose im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Um aussagefähigere Daten zu erhalten werden die Arbeiten in Zusammenarbeit mit dem ÖPV Institut des JKI in Berlin fortgesetzt.

6. Angaben zu voraussichtliche Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse

Ein Schwerpunkt des Projektes waren Untersuchungen zu einer zuverlässigen Diagnose von bekannten latenten Apfelviren (ASPV; ASGV; ACLSV) sowie die Charakterisierung eines unbekanntem pflanzübertragbaren Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW) an Apfel, gefolgt von der Entwicklung einer Labordiagnose. Folgende Ergebnisse sind relevant für diagnostische Zwecke:

a) Optimierung neuer Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren: Protokolle zur Total-RNA- und dsRNA-Extraktion wurden erfolgreich optimiert.

b) Entwicklung bioinformatischer Abläufe mit Filterung von pathogenen von nicht-pathogenen Sequenzen aus NGS Daten. Zwei verschiedene bioinformatische Abläufe wurden entwickelt: 1) für *de novo* Assembly des Transkriptoms aus total RNA und 2) für *de novo* Assembly für NGS Daten aus dsRNA.

c) Aus den Versuchen zur Charakterisierung eines unbekanntem pflanzübertragbaren Erregers der Gummiholzkrankheit (ARW) ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang mit einem Erreger der Gattung *Phlebovirus* in der Familie der *Bunyaviridae*. Die zwei Viren, welche vorläufig als Apple rubbery wood associated virus -1 (ARWaV-1) und ARWaV-2 bezeichnet werden, konnten per PCR in verschiedenen mittels biologischer Indikatoren als ARW erkrankt angesehener Herkünfte aus Deutschland sowie Kanada gefunden werden. Diese Analysen werden in 2017 in Zusammenarbeit mit den Bundesländern fortgesetzt. Ziel ist möglichst kurzfristig eine PCR Diagnose bereitzustellen.

d) Die umfangreichen Sequenzdaten aus den total RNA Extraktionen von Lord Lambourne, infiziert mit der Gummiholzkrankheit (ARW) sowie der positiven Kontrolle stehen für weitergehende bioinformatische Zwecke zur Verfügung. Hierauf erfolgte ein Hinweis in der Publikation aus dem Projekt: Analysis of the apple rubbery wood disease by next generation sequencing of total RNA

V. Jakovljevic & P. Otten & C. Berwarth & W. Jelkmann. European Journal of Plant Pathology, 2017. DOI 10.1007/s10658-016-1119-z

e) Die neu bestimmten Sequenzen der latenten Apfelviren ASPV, ASGV und ACLSV vergrößern die Datenbasis für diese hoch variablen Viren und erlauben mit den in Datenbanken hinterlegten Sequenzen eine verbesserte PCR Diagnostik.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

	ursprünglich geplant	Stand der Arbeiten und Ergebnisse
1	Übertragungsversuche des ARW Erregers mit verschiedenen <i>Cuscuta</i> -Arten von Apfelbäumen auf krautige Wirtspflanzen, u.a. <i>Nicotiana occidentalis</i> .	Die Übertragungen wurden durchgeführt. Es konnte kein Pathogen auf den Testpflanzen (<i>N. occidentalis</i>) nachgewiesen werden. Die PCR Versuche auf Apple rubbery wood associated virus -1 (ARWaV-1) und ARWaV-2 blieben negativ.
2	DNA Extraktionen aus Gewebe von Apfelpflanzen, <i>Cuscuta</i> und krautigen Wirtspflanzen	Alle Methoden wurden bearbeitet, optimiert und werden weiter eingesetzt.
3	Versuche und Optimierungen zu Rolling circle Amplifikation für die verschiedenen Einzel- und Doppelstrang-DNA Viren	Die Methode wurde an vorliegenden Kontrollorganismen aus Citruspflanzen erfolgreich erprobt und bei Apfel angewendet. Es ergab sich kein Hinweis auf ein Virus, welches auf einen Nachweis mit der Methode reagiert.
4	NGS von klonierter dsRNA aus krautigen Wirtspflanzen nach <i>Cuscuta</i> -Übertragungen von ARW-infizierten Pflanzen einschließlich von Extraktionen aus den Ausgangspflanzen	NGS wurden umfangreich durchgeführt und bioinformatisch bearbeitet. Aus diesen Versuchen konnte kein Pathogen ermittelt werden. Differentielle Expressionen von Genen sind feststellbar beim Vergleich von gesunden und kranken Pflanzen. Daten aus NGS (u.a. ARW- Genexpression, miRNAs), sollen weiter analysiert werden.
5	Charakterisierung der gefundenen Viren und Entwicklung von PCR- Schnelltests für den Erreger des ARWs	Mittels Bioinformatik (außerhalb des Projektes in internationaler Zusammenarbeit in der Agrarforschung mit Kanada) ergab sich erstmals ein Hinweis auf Viren, assoziiert mit der Gummiholzkrankheit (ARW). Derzeit werden diese Viren (ARWaV-1 und ARWaV-2) mittels PCR in Dossenheim und bei CFIA in British Columbia, Kanada) getestet.
6	Entwicklung einer full-length PCR Methode für verschiedene Isolate des Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)	Full-length PCR Produkte konnten erstellt werden und können erfolgreich auf verschiedene Isolate angewendet werden.

7	Klonierung von ACLSV full-length PCR Fragmenten mittels Fusions-PCR in Plasmidvektoren und Transformation von Agrobakterium	Die Klonierungen erfolgten und werden im Rahmen einer Dissertation weiter bearbeitet.
8	Herstellung weiterer infektiöser cDNA Klone von Apple stem grooving virus (ASGV) sowie Apple stem pitting virus (ASPV), dies aus Apfel, Birne und Quitten vor dem Hintergrund verschiedener Symptomausprägungen, u.a. bei ASPV von Steinfrüchtigkeit bei der Birne	Die Klonierungen waren für das ASPV erfolgreich und werden im Rahmen einer Dissertation weiter bearbeitet.
9.	Entwicklung von Inokulationstechniken für infektiöse cDNA-Klone an Apfelsämlingen mittels „Biolistic Delivery System Helios Gene Gun“ sowie Agroinokulation	Anstelle der beabsichtigten Inokulationstechnik mittels Gene Gun wurde eine Infiltrationstechnik erfolgreich entwickelt. Es gelang im Rahmen einer das Projekt erweiternden Dissertationsarbeit neben <i>N. occidentalis</i> auch holzige Pflanzen (Apfel) mittels Agroinokulation zu infizieren. Eine Publikation ist in Vorbereitung. Die neue Technik hat weitreichende positive Auswirkungen auf die künftigen Arbeiten mit viralen infektiösen Klonen an Obstarten, soweit diese Infektionen bislang nur an krautigen Indikatorpflanzen möglich waren.
10.	Herstellung von Mischinfektionen der o.g. Viren durch Pfropfung nach Einzelinokulation mittels „Gene Gun“ einschließlich Kontrollen aus den Ausgangspflanzen aus denen full-length PCR's generiert wurden	Mischinfektionen wurden durch Pfropfung erstellt und wurden bonitiert. Die erfolgreichen Infektionen der Apfelsämlinge sind bislang auf Einzelinfektionen beschränkt.
11.	Hochdurchsatzsequenzierungen (NGS) aus mischinfizierten Pflanzen zur Ermittlung der Virusvariabilität	NGS wurde erfolgreich aus Mischinfektionen über dsRNA durchgeführt und bioinformatisch ausgewertet. Dies in Zusammenarbeit mit EMBL Heidelberg. Neue Stämme von ASPV, ASGV und ACLSV wurden <i>in silico</i> gefunden.
12.	Analyse der Fruchtsymptome auslösenden Isolate im Hinblick auf ihre Erfassung mittels in der Literatur publizierter Primer für ASPV, ASGV, ACLSV	PCR Testen konnten nicht in allen Fällen die neue Stämme nachweisen und weitere PCR Tests sind erforderlich.

8. Zusammenfassung

Im Projekt wurden verschiedene Methoden getestet um Fruchtvirose und mit Apple rubbery wood (ARW) bzw. die Gummiholzkrankheit an Apfel und anderem Kernobst zu entdecken und mittels Labortests zu diagnostizieren. Hierzu wurden mit Kleeseide-Arten (*Cuscuta*) Übertragungsversuche auf krautige Pflanzen (*N. occidentalis*) durchgeführt. Hierbei konnten weder Symptome auf *N. occidentalis* beobachtet werden, noch gelang es pathogenspezifische Nukleinsäuren zu ermitteln. Negativ verliefen auch Versuche zum unspezifischem Nachweis von zirkulären DNA Viren mittels Rolling circle amplification. Da diese Versuche keinen Hinweis auf ein mögliches Pathogen ergaben, wurden erhebliche Teile der weiteren Arbeiten auf Hochdurchsatzsequenzierung (NGS) von ARW und zu Mischinfektionen latenter Apfelviren durchgeführt. Hierbei wurden neue Protokolle zur Extraktion von Nukleinsäuren im Rahmen der Optimierung von NGS Probenvorbereitungen etabliert.

In NGS von ARW Proben wurden zu Ende des Projektes und in internationaler Zusammenarbeit mit einem Wissenschaftler der CFIA in Kanada zwei den Phleboviren nahe Verwandte Viren der Familie der *Bunyaviridae* als potenzielle ARW-assoziierte Viren aufgefunden. Diese Viren wurden vorläufig als ARWaV-1 und ARWaV-2 bezeichnet. Umfangreiche PCR Tests laufen derzeit in Dossenheim und bei CFIA in British Columbia, Kanada, um die Assoziation mit der ARW zu verifizieren und geeignete Primer zu entwickeln. Zudem werden ab 2017 in Dossenheim umfangreiche Indikatortests im Freiland mit ARW Quellen aus Europa und Kanda aufgenommen.

NGS Datenanalysen zeigten Änderungen in der Expression von Genen für die Ligninbiosynthese und von einigen miRNAs mit genregulatorischer Funktion. Um eine Verbindung dieser Änderungen in der Genexpression zu ARW Pathogenese zu prüfen, sind weitere Analysen mit mehreren ARW Isolaten erforderlich. Die bioinformatischen Analysen von NGS Daten aus Mischinfektionen latenter Apfelviren identifizierten eine hohe Variabilität sowie neue Stämme von ASPV, ASGV und ACLSV. Einige dieser Stämme konnten mittels PCR nachgewiesen werden. Weitere Verbesserungen an PCR-basierten diagnostischen Arbeiten sind erforderlich.

Versuche zur Optimierung der Kloningstechniken für infektiöse Vollängenklone wurden mit *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) erfolgreich fortgesetzt. Mit Vakuumfiltration konnte eine kostengünstige neue Methode zur Inokulation von Apfelsämlingen mit viralen infektiösen ACLSV cDNA Klonen entwickelt werden.

9. Literaturverzeichnis

Adams, M.J., Antoniw, J.F., 2006. DPVweb: a comprehensive database of plant and fungal virus genes and genomes. *Nucleic acids research* 34, D382-385.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.

Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A., 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6, 106-136.

Beakbane, A., Thompson, E., 1945. Abnormal Lignification in the Wood of Some Apple Trees. *Nature* 156, 145-146.

- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology* 54, 519-546.
- Brakta, A., Thakur, P.D., Handa, A., 2013. First Report of Apple Top Working Disease Caused by Viruses (Apple stem grooving virus, Apple chlorotic leaf spot virus, and Apple stem pitting virus) in Apple in India. *Plant Disease* 97, 1001-1002.
- Carra, A., Gambino, G., Schubert, A., 2007. A cetyltrimethylammonium bromide-based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. *Analytical biochemistry* 360, 318-320.
- Crane, M.B., 1945. Origin of Viruses. *Nature* 155, 115-116.
- EPPO, 1999. Certification schemes, pathogene-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. *EPPO Bulletin* 29, 239-252.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29, 644-652.
- Hohn, T., Rothnie, H., 2013. Plant pararetroviruses: replication and expression. *Current opinion in virology* 3, 621-628.
- Kreuze, J.F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., Simon, R., 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388, 1-7.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 10, R25.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., Genome Project Data Processing, S., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15.
- Mayo, M.A., Jolly, C.A., 1991. The 5'-terminal sequence of potato leafroll virus RNA: evidence of recombination between virus and host RNA. *J Gen Virol* 72 (Pt 10), 2591-2595.
- Schulz, M.H., Zerbino, D.R., Vingron, M., Birney, E., 2012. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics* 28, 1086-1092.
- Studholme, D.J., Glover, R.H., Boonham, N., 2011. Application of High-Throughput DNA Sequencing in Phytopathology. *Annu Rev Phytopathol* 49, 87-105.

Sunkar, R., Li, Y.F., Jagadeeswaran, G., 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in plant science* 17, 196-203.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30, 2725-2729.

Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagne, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouze, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R., 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature genetics* 42, 833-839.

Voytas, D.F., Cummings, M.P., Konieczny, A., Ausubel, F.M., Rodermel, S.R., 1992. Copia-Like Retrotransposons Are Ubiquitous among Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7124-7128.

Waterworth, H., 1969. Comparing Lignin-Staining Procedures for Detecting Apple Rubbery Wood Virus in Apple Cv Lambourne, Lord Trees under High Summer Temperatures. *J Horticult Sci Biotech* 44, 363-&.

Yanase, H., Yamaguchi, A., Mink, G.J., Sawamura, K., 1979. Back transmission of Apple chlorotic leaf spot virus (type strain) to apple and production of apple topworking disease symptoms in Maruba kaido (*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami). *Ann. Phytopathological Soc. Jpn.*, 369-374.

Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research* 18, 821-829.

10. Übersicht über alle in Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

2013

23. Arbeitstagung der Fachreferenten für Pflanzenschutz im Obstbau, Dienstleistungszentren Ländlicher Raum, Rheinland-Pfalz, Bad Kreuznach - Vortrag

45. Tagung des DPG-Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen; Julius-Kühn Institut, Braunschweig - Vortrag

2014

45. Tagung des DPG-Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen, Siebeldingen - Poster und Vortrag

59. Deutschen Pflanzenschutztagung, Albert-Ludwigs Universität Freiburg, Freiburg - Poster

2015

47. Tagung des DPG-Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen, Julius-Kühn Institut, Berlin - Poster und Vortrag

23. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Morioka, Japan - Vortrag

2016

48. Tagung des DPG-Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover - Poster und Vortrag

59. Deutschen Pflanzenschutztagung, Martin-Luther Universität Halle, Halle - Poster

Manuskript mit dem Titel: "Analysis of the apple rubbery wood disease by next generation sequencing of total RNA" wurde bei European Journal of Plant Pathology eingereicht.

Manuskript mit dem Titel: "Next generation sequencing analysis of mixed infection with apple latent viruses reveals new strains of *Betaflexiviridae*" ist in Vorbereitung zu Einreichung.

V. Jakovljevic & P. Otten & C. Berwarth & W. Jelkmann. European Journal of Plant Pathology, 2017. DOI 10.1007/s10658-016-1119-z