# Schlussbericht

## zum Vorhaben „ChanGE“

**Thema:**

Charakterisierung neuer Gerstengelbmosaikvirus Varianten und Entwicklung eines variantenspezifischen molekularen Nachweises

Teilvorhaben 2: Entwicklung eines nukleinsäurebasierten Nachweises zur Differenzierung der einzelnen Gelbmosaikvirus Varianten

**Zuwendungsempfänger:**

Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Professur für Anwendungsentwicklung

Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg

**Förderkennzeichen:**

2221NR066B

**Laufzeit:**

01.02.2023 bis 30.06.2025

**Autor und Datum der Veröffentlichung:**

Christian Feuerbacher (IMTEK), 19.12.2025

Gefördert durch:

Bundesministerium
für Landwirtschaft, Ernährung
und Heimat

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat (BMLEH) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMLEH für das Förderprogramm Nachhaltige Erneuerbare Ressourcen unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorenschaft.

# Inhaltsverzeichnis

**I. Kurzbericht ..... 1**

1. Aufgabenstellung ..... 1

2. Planung und Ablauf des Vorhabens ..... 2

3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse ..... 3

a) Arbeitspakete und Meilensteine ..... 3

b) Zusammenfassung ..... 3

**II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse ..... 4**

1. Erzielte Ergebnisse ..... 4

Arbeitspaket 2.1: Singleplex RT-MP-PCR Design, Entwicklung und Optimierung für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV ..... 4

Arbeitspaket 2.2: Multiplex RT-MP-PCR Design, Entwicklung und Optimierung für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV ..... 8

Arbeitspaket 2.3: Multiplex RT-MP-PCR, Anwendung bei infizierten Pflanzenproben ..... 16

Zusammenfassung der Ergebnisse ..... 25

2. Verwertung ..... 26

a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen ..... 26

b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende ..... 26

c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende ..... 26

d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ..... 27

e) Stand der Erreichung der in der Vorhabenbeschreibung aufgeführten Verwertungsoptionen, Forschungsdaten ..... 29

3. Erkenntnisse von Dritten ..... 29

4. Veröffentlichungen ..... 29

5. Literaturverzeichnis ..... 30

# I. Kurzbericht

## 1. Aufgabenstellung

Die Gerstengelbmosaikvirose ist eine durch den bodenbürtigen Vektor *Polymixa graminis* übertragene Virusinfektion, welche bei Auftreten zu drastischen Ernteausfällen bis zu 50 % führen kann. Seit einiger Zeit häufen sich die Beobachtungen von Virussymptomen und serologische Nachweise des Virus in Pflanzen, welche Resistenzgene gegen die Gelbmosaikviren tragen, sodass die Verbreitung von neuen resistenzbrechenden Virusvarianten anzunehmen ist. Da eine direkte Bekämpfung des Virus nicht möglich ist, müssen die Varianten schnellstmöglich identifiziert und charakterisiert werden, um zum nächst möglichen Zeitpunkt die zeitintensive Züchtung neuer resistenter Sorten realisieren zu können. Ziel dieser zweijährigen Studie ist es daher durch Versuche mit Gerstensorten mit unterschiedlichen Resistenzeigenschaften eine Viruscharakterisierung durchzuführen und neue Varianten funktionell zu charakterisieren. Aufgrund der mangelnden Spezifität von Standard ELISA Assays soll ein auf Basis der hochspezifischen Mediatorsonden-Technologie basierender PCR-Assay entwickelt werden, was eine Virusdifferenzierung der bereits bekannten Virustypen und zukünftig eine Erweiterung auf neue Virustypen ermöglicht.

Die Mediatorsonden-PCR (MP-PCR) ist eine Weiterentwicklung der quantitativen Echtzeit-PCR, die auf einem zweistufigen Nachweisprinzip basiert (Abbildung 1). Zunächst bindet eine spezielle Mediator-Sonde spezifisch an die Zielsequenz. Während der Amplifikation wird dabei ein kurzes Mediator-Oligonukleotid freigesetzt. Dieses Oligo dient anschließend als Auslöser für eine sekundäre Reaktion, in der ein universeller Reporter (UR) aktiviert wird. Der Reporter erzeugt schließlich ein Fluoreszenzsignal, das detektiert und quantifiziert werden kann. Der entscheidende Vorteil dieser Technologie ist, dass Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) hochspezifisch detektiert werden können (Calabrese et al. 2023; Faltin et al. 2012; Neugebauer et al. 2024). Ebenso ist die Trennung von Target-Erkennung und Signalbildung ein wesentlicher Vorteil dieser Technologie, denn dadurch können universelle Reporter-Sonden für unterschiedliche Zielsequenzen eingesetzt werden, was die Methode besonders flexibel, spezifisch und multiplexfähig macht. Dies prädestiniert die Mediator-Sonden-PCR vor allem für Anwendungen in der klinischen Diagnostik, Pathogennachweisen und Multiplex-Analysen.

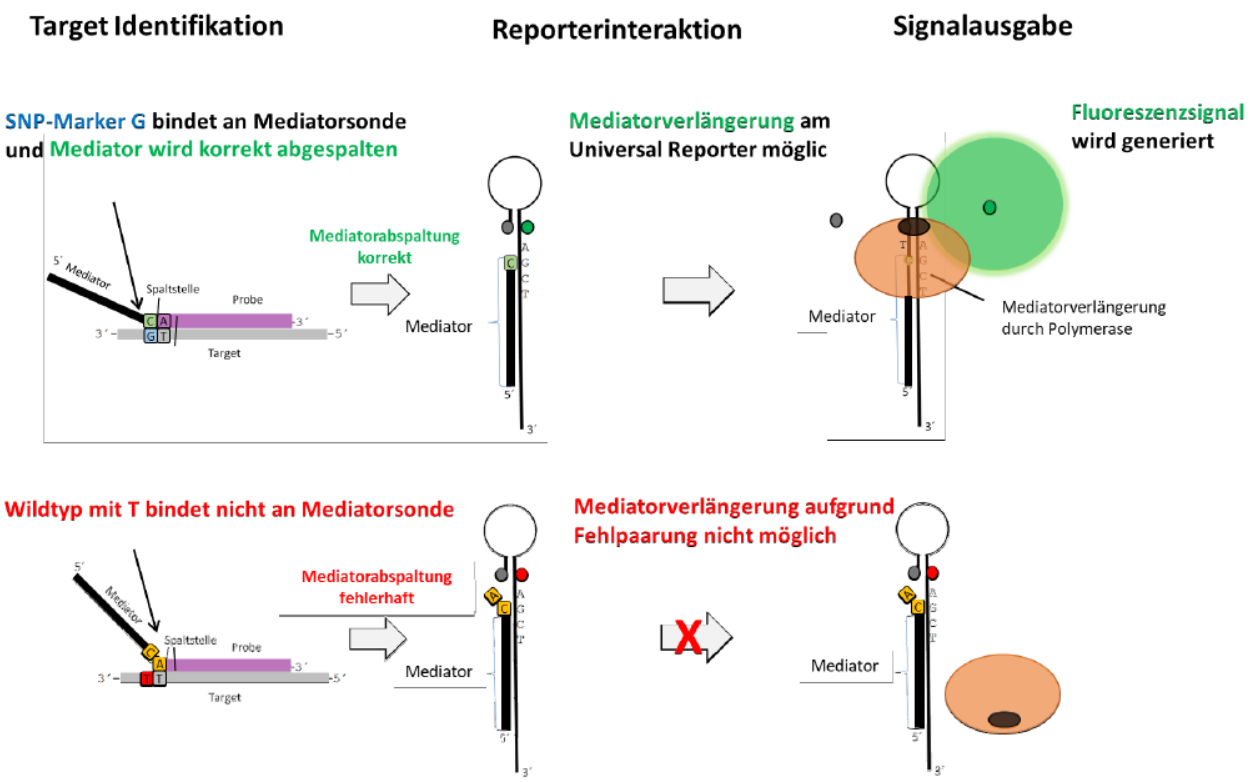


**Abbildung 1**: **Schematische Darstellung zur SNP Detektion mittels der Mediator-Sondentechnologie.** Oben: Korrekte Mediatorsondenbindung am Target. Als Folge wird die Mediatorsonde so gespalten, dass eine Signalgenerierung am UR möglich ist. Unten: Nicht korrekte Bindung der Mediatorsonde am Target, da SNP-Marker nicht vorhanden ist. Die Mediatorsonde wird nicht an der vorgesehenen Stelle gespalten, sodass es in der Folge zu keiner Signalgenerierung kommt.

## 2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Ziel dieses Forschungsvorhabens ist die Etablierung eines MP-PCR basierten Nachweisverfahren zur Differenzierung der Gelbmosaikvirus Varianten. Da sich die Varianten vermutlich nur in einzelnen Nukleotiden unterscheiden (sog. SNPs, engl. Single Nucleotide Polymorphism) bedarf es einer präzisen molekularen Nachweismethode, um diese zu detektieren. Mittels der hochspezifischen Mediator-Sonden PCR (MP-PCR) soll ein SNP basierter Multiplex Nachweis auf RNA-Ebene zur Detektion von den Gerstengelbmosaikviren (BaYMV1 & 2) und mildem Gerstenmosaikvirus (BaMMV) entwickelt werden. Aufgrund der Komplexität der genetischen Zielbereiche der RNA-Viren erfordert die Entwicklung höchste Präzision, welche mit herkömmlichen Hybridisierungsverfahren nicht erreicht werden kann. Die Zielsequenzen des viralen RNA-Genoms sollen nach erfolgter cDNA-Synthese direkt und ohne weitere Zwischenschritte amplifiziert werden. Für die SNP-Detektion werden Universal Reporter genutzt, welche zunächst im Singleplex-Ansatz zum Einzelnachweis der Virusvarianten und später in der Multiplex Reverse Transkription MP-PCR (RT-MP-PCR) eingesetzt werden. Zur späteren Erweiterung des Nachweises werden Richtlinien für das Design definiert und validiert, um auch zukünftig neue Zielsequenzen mit in den Nachweis integrieren zu können. Des Weiteren sollen Bestandsproben mittels dieses Nachweisverfahrens analysiert werden, sodass eine erste Übersicht über die Befallsrate gewonnen wird.

## 3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse

### a) Arbeitspakete und Meilensteine

| **Arbeitspakete (AP)**<br>**(lt. Planung im Antrag)** | **Bearbeitungszeitraum**<br>**(lt. Balkenplan im Antrag)** | **Zielerreichung** |
|---|---|---|
| AP 2.1<br>Singleplex RT-MP-PCR Design, Entwicklung und Optimierung für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV | 01/2023 bis 12/2023 | Die Singleplex RT-MP-PCR konnte für alle Virustypen etabliert werden. Dies konnte sowohl mit synthetischer DNA als auch mit Gerstenproben gezeigt werden. |
| AP 2.2<br>Kombination der optimierten Singleplex RT-MP-PCR -Systeme zu einer Multiplex RT-MP-PCR zum Nachweis von BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV | 01/2024 bis 10/2024 | Es konnte ein Multiplex MP-RT-PCR Assay etabliert werden, welche den Nachweis und eindeutige Differenzierung der verschiedenen Virusinfektionen ermöglichen. Dies konnte sowohl mit synthetischer DNA als auch mit Gerstenproben gezeigt werden. |
| AP 2.3<br>Analyse von Gerstenproben | 11/2024 bis 12/2024 | Es wurden neun Gerstenproben mit dem etablierten Multiplex MP-RT-PCR Assay analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die zu Projektbeginn festgelegten Zielsequenzen (BaMMV, BaYMV-Typ 1, BaYMV-Typ 2) nachgewiesen werden konnten. |

| **Meilensteine (M)**<br>**(lt. Planung im Antrag)** | **Fälligkeit**<br>**(lt. Balkenplan im Antrag)** | **Zielerreichung** |
|---|---|---|
| M 2.1<br>Singleplex-Nachweise erstellt | 12/2023 | Singleplex RT-MP-PCR erfolgreich für alle Virustypen etabliert |
| M 2.2<br>Multiplex RT-MP-PCR funktional | 10/2024 | Multiplex MP-RT-PCR Assay erfolgreich etabliert |
| M 2.3<br>Erste Anwendung der RT-MP-PCR auf Feldproben | 12/2024 | Multiplex MP-RT-PCR Assay erfolgreich an Gerstenproben getestet, weitere Feldversuche werden durchgeführt |

### b) Zusammenfassung

Zusammenfassend kann beschrieben werden, dass stabile PCR-Assays basierend auf der Mediatorsonden Technologie etabliert wurden, mit welchen sich alle für dieses Projekt relevanten Virustypen zuverlässig und hochspezifisch in Single- und Multiplex Ansätzen detektieren lassen.

## II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

### 1. Erzielte Ergebnisse

Nachfolgend werden die erzielten Ergebnisse zur Etablierung der Single- und Multiplex MP-PCR Assays im Detail aufgeführt. Hierbei wird gezeigt, dass erfolgreich ein hochspezifisches PCR-System für die Detektion aller relevanten Virusvarianten etabliert werden konnte. Zusätzlich wird gezeigt, dass dieser PCR-Assay ebenfalls funktionell für die Analyse von Gerstenproben ist.

**Arbeitspaket 2.1: Singleplex RT-MP-PCR Design, Entwicklung und Optimierung für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV**

Ziel dieses Arbeitspakets war die Etablierung und Optimierung von Singleplex-Mediatorsonden(MP)-PCR-Assays zur Identifikation und Diskriminierung von Gerstengelbmosaikvirus (BaYMV)-1, BaYMV-2 und des milden Gersten-Mosaikvirus (BaMMV). Hierfür wurden Universal Reporter, Mediatorsonden und Primer für alle Virustypen designt sowie teilweise innerhalb einer ersten Versuchsreihe experimentell getestet.

Für die Differenzierung der beiden Varianten BaYMV-1 und BaYMV-2 wurde für das MP-PCR-Design in Absprache mit den Projektpartnern des JKI die dritte Base des für die Resistenzbrechung verantwortlichen Basentripletts genutzt. Nach Rolland *et. al* 2013 ist dieses an der Position 4053-4055 in der Virussequenz lokalisiert. Für die vorliegenden Sequenzvariationen des BaYMV-1 ist die dritte Base ein Guanin. Für den Typ 2 hingegen liegt hier entweder eine Thymin- oder eine Cytosin-Base vor.

**Zielsequenzen** (Resistenzbrechendes Basentriplett rot markiert; dritte Base unterstrichen, grau markierter Bereich repräsentiert Primer Bindungsstellen)

| Bezeichnung | Sequenzausschnitt in 5‘-3‘ Richtung |
|---|---|
| BaYMV-1_G | GCTTGTTGTTGGACACCATCAGCGGAAGCTACTAGAAGAAACAGCTAATGTTGTTATCAAGGACACGAAGGGAGCTGCGCACAAGATGGAAATTTCACAGCA TGATCCAGATTTTCTGGAGCAGAATGGGTCCGGCAAAGTTGGGTATCCAGAACACCGAGGACAGTTTCGGCAGGAAGG |
| BaYMV-2_T | GCTTGTTGTTGGACACCATCAGCGGAAGCTACTAGAAGAAACAGCTAATGTTATTATCAAGGACACGAAGGGAACTGCGCACAATATGGAAATTTCGCAGCA TGATCCAGATTTTCTGAAGCAGAATGGGTCTGGCAAAGTTGGGTATCCAGAACACCGAGGACAGTTTCGGCAGGAAGG |
| BaYMV-2_C | GCTTGTTGTTGGACACCATCAGCGGAAGCTACTAGAAGAGACAGCTAATGTTATTATCAAGGACACGAAAGGAACTGCGCACCACATGGAAATCTCACAGCA TGATCCAGATTTTCTGAAGCAGAATGGGTCCGGCAAAGTTGGGTATCCAGAACACCGAGGACAGTTTCGGCAGGAAGG |
| BaMMV | TCAAAGATCTGAAGAAATATGATAGGCCACCACACGCAAATGTTTTCTGTCAGGACACACTAACCAAAGCTAAACATAAGATGATCAGCATCCTCGAGGAAG CAGGCATGGGAAGGACCCTAGTACGAACCACCGAGCAGGTCTTGCTTGACATGGCGTGGACCACCTCCGGTGGACCCT |

Entsprechend wurden Primer bestimmt, welche eine Amplikonlänge von 138 bp erzielen und in Consensus-Bereichen liegen, um eine hohe Bindungsstärke zu erzielen. Hinsichtlich der Detektion des resistenzbrechenden Basentripletts anhand der dritten Base, wurden verschiedene Mediatorsonden (MP01, MP05, MP06, MP11) mit der Software OligoPad der Herstellers GNWI

erstellt. Passende Universal Reporter-Strukturen (UR11, UR05, UR06) wurden ermittelt sowie eine Wahl für Fluorophor und Quencher entsprechend vier verschiedener Detektionskanäle getroffen.

Für die Detektion des BaMMV wurden separat Primer ermittelt in einem Bereich mit möglichst hoher Übereinstimmung der unterschiedlichen Varianten, welche vom JKI eingegrenzt wurden. Die Amplikonlänge wurde identisch zum Gelbmosaikvirus MP-PCR-Design gewählt, sodass keine der beiden Reaktionen in dem späteren Ansatz einer Multiplexdetektion bevorzugt werden sollte und die Reaktionen mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen. Für das Sondendesign wurde ebenfalls ein Universal Reporter-Typ (UR01) erstellt und eine entsprechende Mediatorsonde (MP01) designt.

**Primer und Mediatorsonden** BaYMV Typ 1 und 2 sowie BaMMV (in 5‘-3‘ Richtung)

| **Bezeichnung** | **Sequenz in 5‘-3‘ Richtung** |
|---|---|
| fwd Primer BaYMV | AGCGGAAGCTACTAGAAGA |
| rev Primer BaYMV | GGTGTTCTGGATACCCAACTT |
| MP05 BaYMV1_G (entsprechend UR05) | TCGATGTCCCAGGTGATGGAAATTTCACAGCATGATCCAGATTTTCTG |
| MP06 BaYMV2_T (entsprechend UR06) | GAAGGCAGGTAGGCTATGGAAATTTCGCAGCATGATCCAGATTTTCTG |
| MP11 BaYMV2_C (entsprechend UR11) | TTCGACGTGCTCTAGTGGTGCGCAGTTCCTTTCGTGTCCTT |
| fwd Primer BaMMV | GATAGGCCACCACACGCAA |
| rev Primer BaMMV | GTGGTCCACGCCATGTCAA |
| MP01 BaMMV (entsprechend UR01) | GTTCTGGGCTCTACGATGTTTTCTGTCAGGACACACTAACC |

## Universal Reporter-Strukturen

| **Bezeichnung** | **Sequenz in 5‘-3‘ Richtung** | **Detektionskanal** | **Farbstoff** | **Quencher** |
|---|---|---|---|---|
| UR05 | ATTCGGCTAAGACGCGCCGAA8TGTTGCACCTGGGACATCGACTAT | Green | 8 = dT-FAM | BMN-Q-535 |
| UR01 | GACCGGCCAAGACGCGCCGGT7TGTTGGTCGTAGAGCCCAGAACGA | Red | 7=dC-Atto647N | BHQ2 |
| UR11 | GAGCGGTGCAGAACCCGCT7CTAGTCCTAGAGCACGTCGAAGC | Orange | 7 = dC-Cy5.5 | BHQ2 |
| UR06 | GACGCGTAGTACAGAACGCGT7TGTTCAGTGAGCCTACCTGCCTTC | Crimson | 7 = dC-Rox | BHQ2 |

Experimentell konnte über eine Mediatorverlängerung die Aktivierung der einzelnen Reportertypen gezeigt werden. In anschließenden Singleplex-PCR real-time Ansätzen wurde die Funktionsweise der Designs für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV bestätigt. Für die Testung der Singleplex-Assays wurden die Zielsequenzen in unterschiedlichen Konzentrationsstufen eingesetzt. Die Fluoreszenzsignale wurden entsprechend dem Design in den Detektionskanälen Grün (BaYMV-1), Crimson (BaYMV-2_T), Orange (BaYMV-2_C) und Red (BaMMV) gemessen.

Die Ergebnisse sind den folgenden Abbildungen zu entnehmen. Die hieraus errechneten ct-Werte mit jeweils automatisch gesetzten Grenzwerten sowie die resultierenden Werte für die Effizienz und $R^2$ sind tabellarisch aufgeführt.

**Ergebnisse zu Abbildung 2 (Effizienz, $R^2$, gesetzter Treshold, ct-Werte)** der Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex **Singleplex-MP-PCR** für BaYMV-1 (grüner Detektionskanal), BaYMV-2_T (Crimson), BaYMV-2_C (Orange) und BaMMV (Red)

| **Zielsequenz** | **Detektions -kanal** | **Effizienz** | **$R^2$** | **Gesetzter Threshold** | **Targetkonzentration pro Reaktion** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | **0 pg (NTC)** | **100 pg** | **10 pg** | **1 pg** |
| | | | | | **Errechneter ct-Wert (bis Zyklus 30)** | | | |
| BaYMV-1 | Grün | 0,83 | 1,00 | 0,07 | - | 7,30 ± 0,02 | 11,21 ± 0,19 | 14,91 ± 0,16 |
| BaYMV-2_T | Crimson | 0,84 | 0,98 | 0,08 | - | 7,51 ± 0,22 | 11,59 ± 0,61 | 15,03 ± 0,38 |
| BaYMV-2_C | Orange | 0,78 | 0,99 | 0,023 | - | 7,50 0,16 | 11,32 0,03 | 15,48 0,51 |
| BaMMV | Red | 0,67 | 0,96 | 0,07 | - | 9,54 ± 0,52 | 13,30 ± 0,51 | 18,57 ± 1,00 |

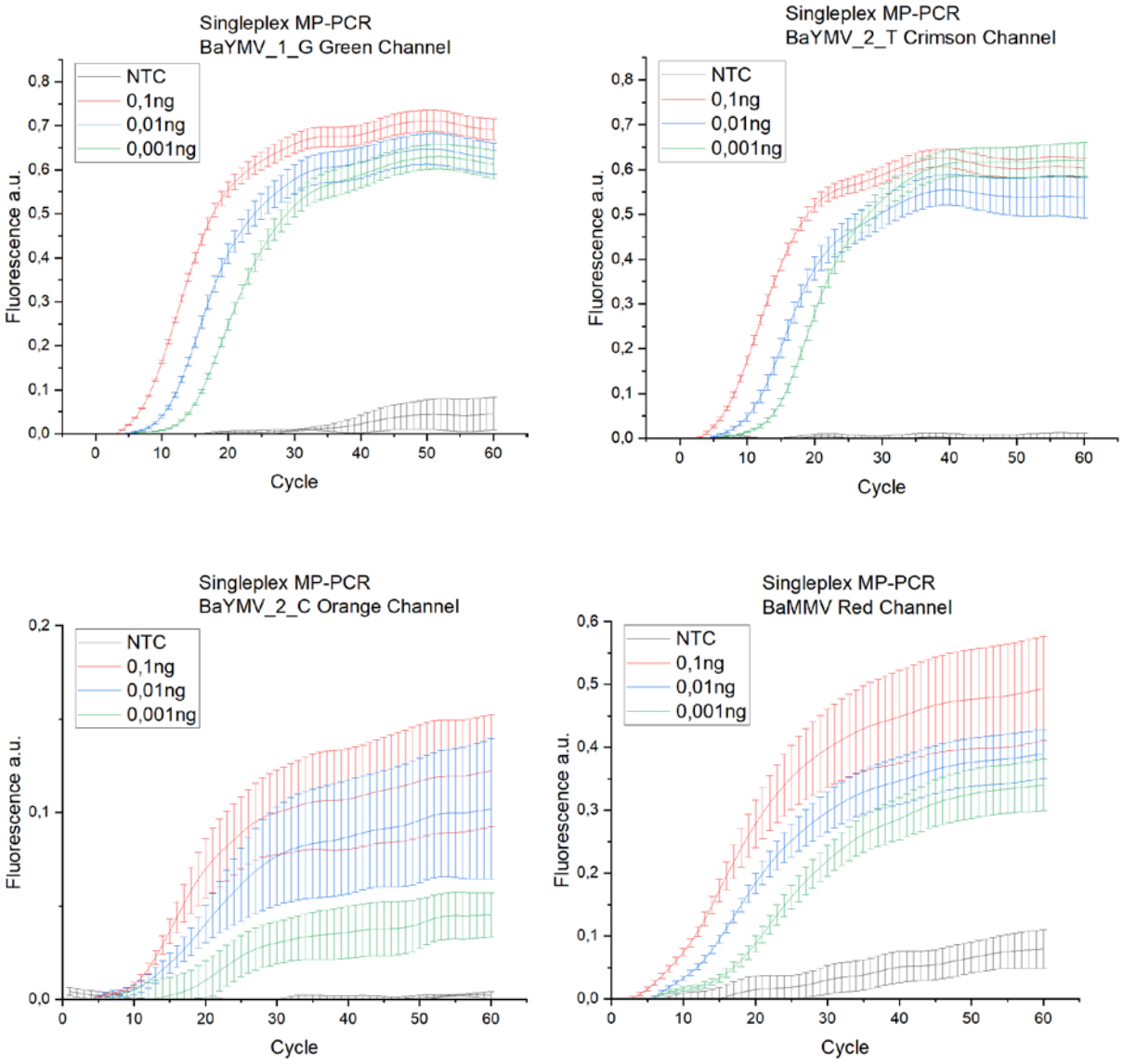


**Abbildung 2: Amplifikationskurven der Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex Singleplex-MP-PCR** für BaYMV-1 (Green), BaYMV-2_T (Crimson), BaYMV-2_C (Orange) und BaMMV (Red).

Anhand der ct-Werte, welche aus den Verdünnungsreihen hervorgehen, kann eine vergleichbare Performanz für BaYMV-1, BaYMV-2_T und BaYMV_2_C festgehalten werden. Lediglich die Werte für die Variante BaMMV zeigen eine niedrigere Effizienz, sind jedoch nach wie vor in einem signifikant höher messbaren Bereich im Vergleich zur Kontrolle (NTC).

Im Hinblick auf die Zusammenführung zu einer Multiplex-MP-PCR stellt dies, sowie die erreichten $R^2$-Werte größer 0,96 eine gute Voraussetzung für ein ausgeglichenes Assay-System dar. Dementsprechend wurde die Etablierung einer multiplex RT-MP-PCR zum Nachweis aller Zielsequenzen in einem Reaktionsansatz durchgeführt.

**Arbeitspaket 2.2: Multiplex RT-MP-PCR Design, Entwicklung und Optimierung für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV**

Um zu prüfen, ob das MP- und Primer-Design auch für multiplex Ansätze geeignet ist, wurden verschiedene Kombinationen der vorliegenden Amplikon-Zielsequenzen getestet. Hierbei wurden Duplex-, Triplex- und 4-Plex-Experimente durchgeführt.

Die nachfolgenden Ergebnisse (Tabelle, Abbildungen) zeigen die relevanten Daten der 4-Plex Experimente, welche basierend auf den Optimierungsarbeiten der Duplex und Triplex Experimente durchgeführt wurden.

**Ergebnisse zu Abbildung 3 (Effizienz, $R^2$, gesetzter Treshold, ct-Werte) der 4-Plex-MP-PCR** für BaYMV-1 (grüner Detektionskanal), BaYMV-2_T (Crimson), BaYMV-2_C (Orange) und BaMMV (Red)

| **Zielsequenz** | **Detektions -kanal** | **Effizienz** | **$R^2$** | **Gesetzter Threshold** | **Targetkonzentration pro Reaktion** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | **0 pg (NTC)** | **100 pg** | **10 pg** | **1 pg** |
| | | | | | **Errechneter ct-Wert (bis Zyklus 30)** | | | |
| BaYMV-1 | Grün | 1,26 | 0,94 | 0,07 | - | 10,40 ± 0,23 | 13,22 ± 0,82 | 16,06 ± 0,94 |
| BaYMV-2_T | Crimson | 0,94 | 0,96 | 0,09 | - | 8,54 ± 0,35 | 11,5 ± 0,92 | 17,39 ± 1,24 |
| BaYMV-2_C | Orange | 1,08 | 0,96 | 0,0098 | - | 10,92 ± 1,02 | 15,41 ± 0,52 | 20,54 ± 1,21 |
| BaMMV | Red | 1,6 | 0,83 | 0,094 | - | 13,60 ± 0,40 | 16,97 ± 1,17 | 18,41 ± 0,93 |

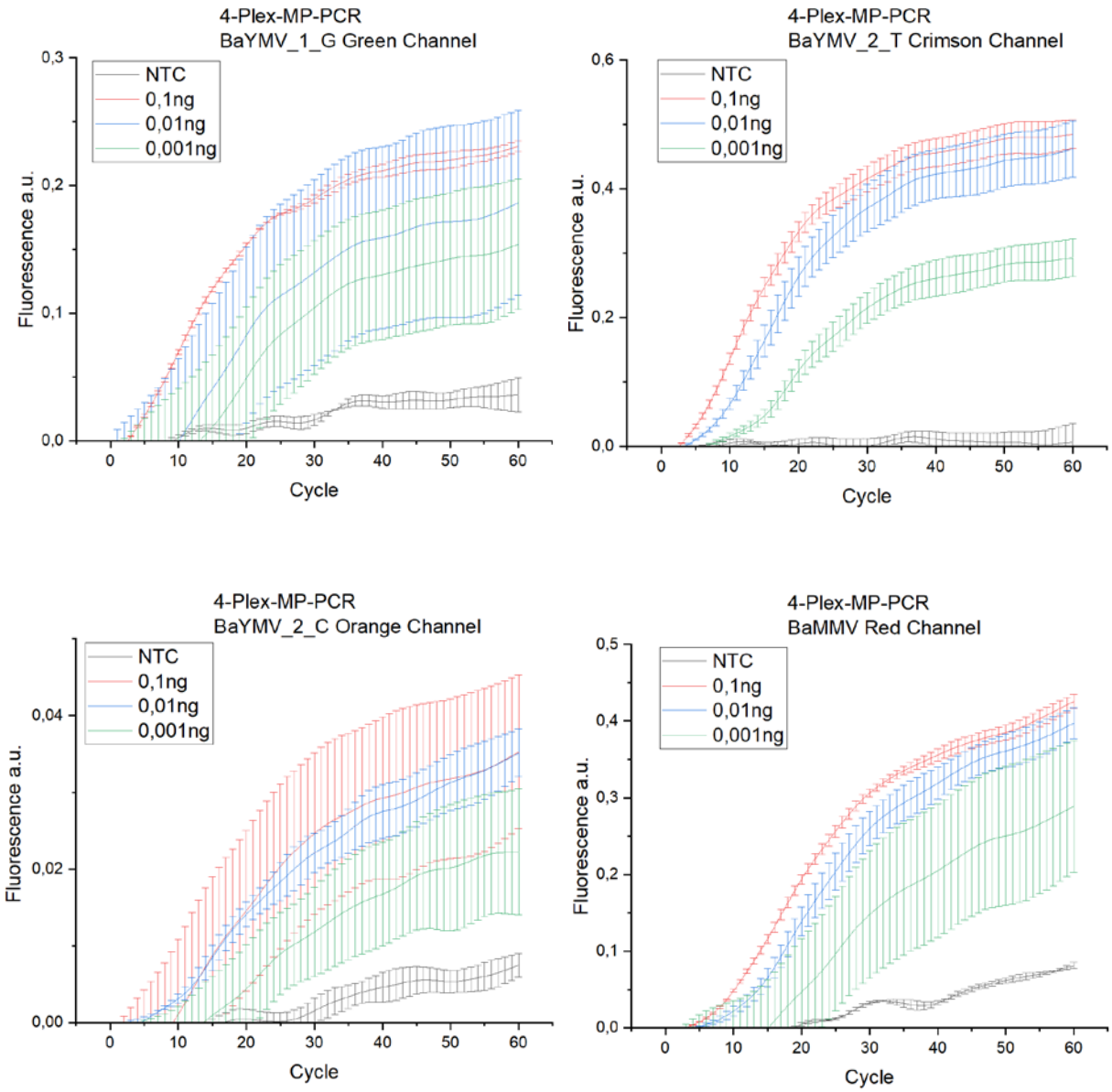


**Abbildung 3: Amplifikationskurven der 4-Plex-MP-PCR** für BaYMV-1 (Green), BaYMV-2_T (Crimson), BaYMV-2_C (Orange) und BaMMV (Red) durchgeführt im Qiagen Rotor Gene Q 6000 6 Plex.

In diesem experimentellen Ansatz wurde alle vorliegenden Zielsequenzen (BaYMV_1_G, BaYMV_2_T, BaYMV_2_C und BaMMV) in einer Reaktion nachgewiesen. Hierbei wurden drei Reaktionsansätze mit einer jeweiligen Zielsequenzkonzentration von 0.1 ng, 0.01 ng und 0.001 ng erstellt. Die Reaktionsbedingungen waren identisch zu den Singleplex Experimenten. Die Analyse der Daten zeigt, dass alle Zielsequenzen spezifisch im 4-Plex Ansatz nachgewiesen werden können. Es ist lediglich eine größere Streuung der einzelnen Amplifikationskurven zu beobachten. Mit einem durchschnittlichen $R^2$-Wert von 0,92 zeigt sich jedoch, dass die Assay-Stabilität auch in diesen Reaktionsansätzen gewährleistet und eine klare Unterscheidung der einzelnen Targets in den jeweiligen Detektionskanälen möglich ist.

AP 2.2 Multiplex MP-dPCR Design, Entwicklung und Optimierung für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV für das **QIAcuity One** System

Als zusätzliches Arbeitspaket wurde die Übertragung des real-time MP-PCR Assays auf digitale PCR (dPCR) Systeme durchgeführt. Dies ermöglicht eine absolute Quantifizierung ohne die Notwendigkeit einer Standardkurve. Zwar ist die notwendige Quantifizierung im etablierten real-time PCR Assay bereits gegeben, jedoch ließe sich mit einem dPCR Assay durch die signifikant höhere Anzahl an Replikaten (einzelne Reaktionen) noch effizienter Quantifizieren.

Die nachfolgenden Daten zeigen die Durchführung verschiedener experimenteller Ansätze im QIAcuity One System. Hierbei wurden dieselben MPs, URs und Primer wie aus dem real-time PCR Assay verwendet (Tabelle Seite 2). Aufgrund der verfügbaren Detektionskanäle des Geräts werden die URs jedoch teilweise in andere Farbkanäle detektiert als im real-time PCR-Ansatz (nachfolgende Tabelle). Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Qualität der Daten.

| **Target** | **Detektionskanal** | **Farbstoff** | **Quencher** |
|---|---|---|---|
| BaYMV_1_G | Green | 8 = dT-FAM | BMN-Q-535 |
| BaYMV_2_C | Red | 7 = dC-Rox | BMN-Q-535 |
| BaYMC_2_T | Far-red | 7 = dC-Cy5.5 | BHQ2 |
| BaMMV | Crimson | 7 = dC-Atto 647N | BHQ2 |

Die nachfolgenden Daten (Abbildung 4) zeigen einen für jede Zielsequenz durchgeführten Singleplex Ansatz sowie einen 4-Plex Assay. Die eingesetzte DNA Menge lag hierbei bei 10.000 Kopien/Reaktion. Dies entspricht bei der vorliegenden Amplikonlänge einer Konzentration von 2,5 Femtogram/Reaktion.

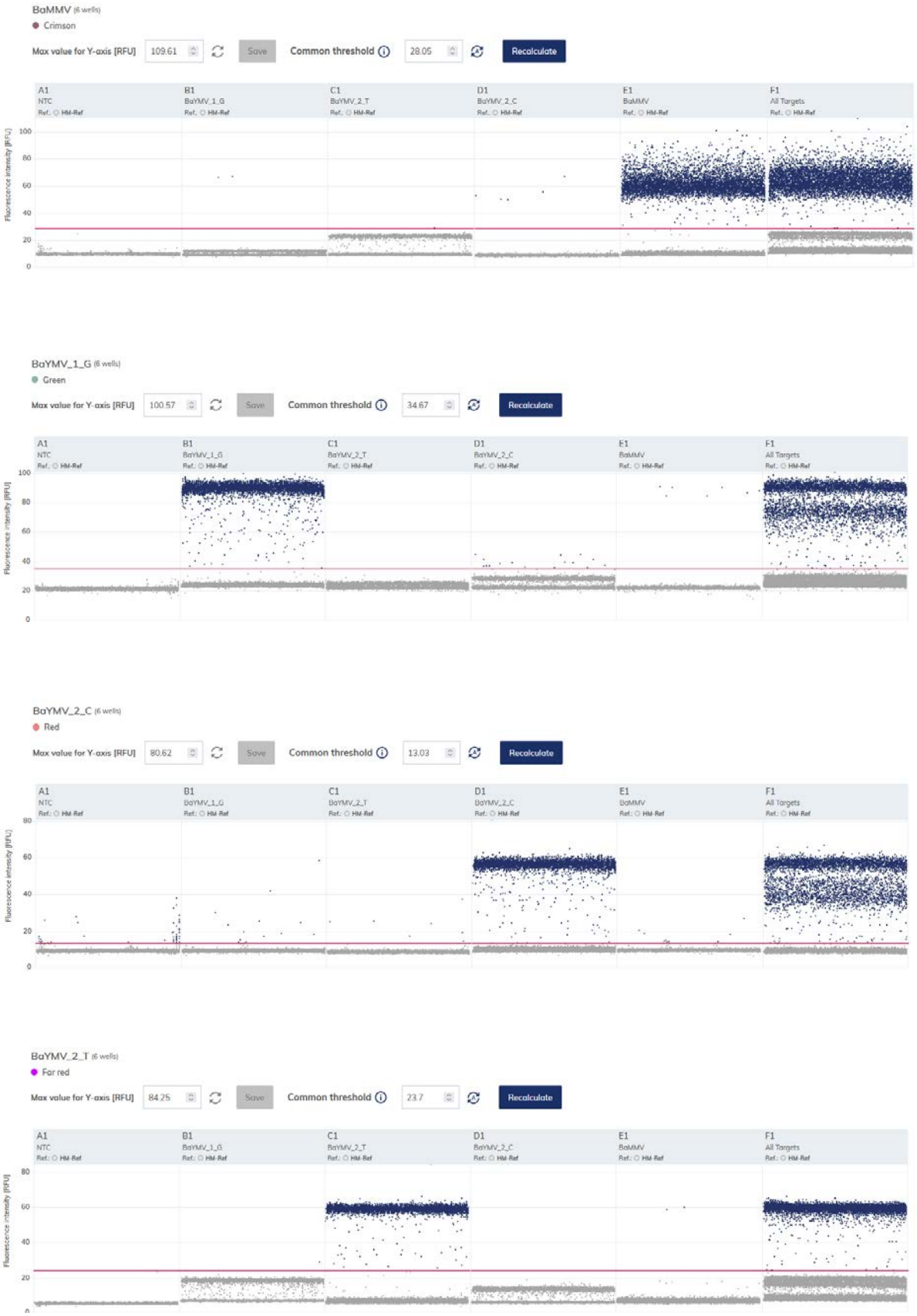


**Abbildung 4**: **Populationsplots (1-D) der Singleplex und 4-Plex-MP-dPCR** für BaYMV-1 (Green), BaYMV-2_T (Far-Red), BaYMV-2_C (Red) und BaMMV (Crimson) im **QIAcuity One** System.

Die vorliegenden Daten der durchgeführten Experimente zeigen eine spezifische Detektion der vorliegenden Targets BaYMV_1_G, BaYMV_2_T, BaYMV_2_C und BaMMV. Die Populationen in den Singleplex-Experimenten lassen sich signifikant voneinander unterscheiden und es sind vernachlässigbare Crosstalk-Signale vorhanden. Auch der 4-Plex Versuchsansatz zeigt eine eindeutige Detektion aller Targets. Demensprechend ist der designte Assay mit dem QIAcuity One kompatibel und generiert ebenfalls in der dPCR valide Datensätze.

Des Weiteren wurde diskutiert, ob es möglich ist, zwei verschiedene Targets in einem Ansatz zu detektieren, wenn große Konzentrationsunterschiede gegeben sind. Dieser Versuchsaufbau soll eine potenzielle Co-Infektion einer Pflanze mit zwei Virusvarianten simulieren. Eine solche Co-Infektion charakterisiert sich oft mit einer deutlich höheren Viruslast der einen Virusvariante im Vergleich zur anderen, was eine Detektion beider Virusvarianten mit der bisherigen Methodik als sehr schwierig gestaltet. Aufgrund dessen wurde ein experimenteller Ansatz designt, bei welchem eine hohe Konzentration der Variante BaYMV_2_T (10.000 Kopien/Reaktion) und eine 10-fach geringere Konzentration der Variante BaYMV_2_C (1.000 Kopien/Reaktion) vorliegt. Diese Kombination wurde in Rücksprache mit dem JKI gewählt, da eine solche Co-Infektion in der Wintergerste häufig beobachtet wird. Die nachfolgenden Daten zeigen die Ergebnisse dieses Assays.

**Abbildung 5: Populationsplots (1-D) der Duplex-MP-dPCR** für BaYMV-2_T (Far-Red) mit 10.000 Kopien und BaYMV-2_C (Red) mit 1.000 Kopien im **QIAcuity One** System.

Die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaus (Abbildung 5) zeigen eine erwartete schwächere aber deutlich detektierbare Population der niedrig konzentrierten BaYMV_2_C Target Sequenz sowohl im Singleplex als auch im Duplex Ansatz. Wie zu erwarten, ist die Population der höher konzentrierten BaYMV_2_C deutlich stärker. Somit zeigt dieser Versuchsaufbau, dass auch bei großen Konzentrationsunterschieden mehrere Targets verlässlich detektiert werden können. Als nächsten Schritt wird dieser Versuch nochmals wiederholt mit einem Konzentrationverhältnis von 1:100.

AP 2.2 Multiplex MP-dPCR Design, Entwicklung und Optimierung für BaYMV-1, BaYMV-2 und BaMMV für das **NiO+** System (Stilla)

Zusätzlich wurde der etablierte Assay auch auf einem NiO+ Gerät von Stilla getestet, um zu prüfen ob die für den RT-MP-PCR Assay verwendeten MPs und URs auch ohne Anpassungen hier funktional sind. Dadurch könnte der Assay direkt und ohne Anpassungen auf einem anderen System verwendet werden. Es wurden lediglich die Konzentrationen der Mediatorsonden von 10 µM auf 30 µM angepasst, gemäß den intern etablierten Protokollen. Die nachfolgenden Ergebnisse (Abbildung 6) zeigen die Populationsplots eines 4-Plex Assays mit einer DNA Input Menge von 3000 Kopien/Reaktion. Aufgrund der verbauten Detektionskanäle des Geräts emittieren die URs nochmals in andere Farbkanäle als im dPCR-Ansatz des QIAcuity One Systems (nachfolgende Tabelle).

| **Target** | **Detektionskanal** | **Farbstoff** | **Quencher** |
|---|---|---|---|
| BaYMV_1_G | Blue | 8 = dT-FAM | BMN-Q-535 |
| BaYMV_2_C | Yellow | 7 = dC-Rox | BMN-Q-535 |
| BaYMC_2_T | Far-red | 7 = dC-Cy5.5 | BHQ2 |
| BaMMV | Red | 7 = dC-Atto 647N | BHQ2 |

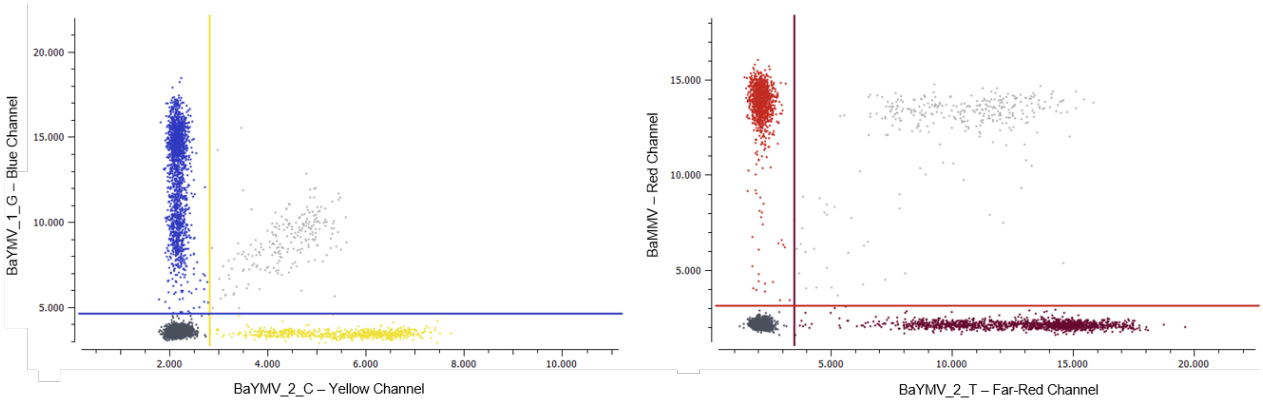


**Abbildung 6**: **Populationsplots (2-D) der 4-Plex-MP-dPCR** für BaYMV-1 (Green), BaYMV-2_T (Far-Red), BaYMV-2_C (Red) und BaMMV (Crimson) im **NiO+** System.

Die Ergebnisse der 4-Plex Experimente im NiO+ System zeigen eine deutliche Detektion aller Targets in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen. Dabei liegt die Signalstärke aller Targets zwischen 10.000 und 15.000 a.u. und grenzt sich dadurch deutlich von den negativen Populationen ab. Lediglich die Messung des Targets BaYMV_2_C im gelben Kanal zwischen 4000 und 8000 a.u. ist etwas schwächer, jedoch noch immer deutlich von der negativen Population abgegrenzt.

Zusammenfassend kann beschrieben werden, dass ein für die Detektion der verschiedenen Virusvarianten (BaMMV, BaYMV-Typ 1und BaYMV-Typ 2) spezifisches Assay System sowohl für die real-time PCR als auch die dPCR mit der Mediatorsonden Technologie etabliert wurde. In Anbetracht dessen erfolgte als letzter Projektabschnitt die Testung dieser Technologie mit Feldproben. Hierbei wurden Blattproben verschiedener Gerstenkulturen analysiert. Dies erforderte eine RNA-Extraktion aus dem Blattmaterial sowie eine cDNA Synthese gefolgt von der eigentlichen Durchführung des Assays.

**Arbeitspaket 2.3: Multiplex RT-MP-PCR, Anwendung bei infizierten Pflanzenproben**

Um zu prüfen, ob der etablierte RT-MP-PCR Assay auch für die Analyse infizierter Pflanzenproben geeignet ist, wurden Experimente mit verschiedenen Blattproben der Wintergerste durchgeführt (nachfolgende Tabelle). Zuvor wurde mittels NGS untersucht, für welche Virusvarianten die jeweiligen Proben anfällig sind und welche Infektionen tatsächlich vorlagen.

**Pflanzenproben der Wintergerste:** Auflistung aller durch den Projektpartner (Julius-Kühn-Institut) bereitgestellten Pflanzenproben. Hierbei handelt es sich um Blattproben.

| **Probe Nr.** | **Name** | **Virusinfektion** | **Feld** | **Jahr Probennahme** | **Beschreibung** |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | Healthy | No | Substrat (Greenhouse) | 03.2025 | Kontrolle Gesund |
| **2** | Sun-Jul-17 | BaMMV | Sunstedt | 03.2023 | Gerstenkultivar nur anfällig für BaMMV |
| **3** | Su-Orb-21 | BaYMV-Typ2 | Sunstedt | 03.2023 | Gerstenkultivar nur anfällig für BaYMV |
| **4** | Sun-New-10 | BaMMV/BaYMV-Typ2 | Sunstedt | 03.2023 | Gerstenkultivar anfällig für BaMMV und BaYMV-Typ 2 |
| **5** | Sch-Ava-60 | BaMMV | Schladen | 03.2023 | Gerstenkultivar nur anfällig für BaMMV |
| **6** | Sch-Orb-58 | BaYMV-Typ2 | Schladen | 03.2023 | Gerstenkultivar nur anfällig für BaYMV |
| **7** | Sch-New-56 | BaMMV/BaYMV-Typ2 | Schladen | 03.2023 | Gerstenkultivar anfällig für BaMMV und BaYMV-Typ 2 |
| **8** | Fr-Ava-6 | BaMMV | Braunschweig Frühbeet | 03.2023 | Gerstenkultivar nur anfällig für BaMMV |
| **9** | Fr-Jak-1 | BaYMV-Typ1 | Braunschweig Frühbeet | 03.2023 | Gerste auch anfällig für BaMMV, in Teilprobe jedoch kein BaMMV nachweisbar |
| **10** | Fr-Jakubus | BaMMV/BaYMV-Typ1 | Braunschweig Frühbeet | 03.2024 | Gerstenkultivar anfällig für BaMMV und BaYMV-Typ 1 |

Die nachfolgenden Ergebnisse (Tabellen, Abbildungen) zeigen die relevanten Daten der Pflanzenproben-Experimente, welche basierend auf den Optimierungsarbeiten der Multiplex RT-MP-PCR Experimente mit Amplikonsequenzen durchgeführt wurden. Zu Beginn wurde getestet, ob die Fluoreszenz-Signale bei der Analyse der gesunden Kontrolle (Probe 1) identisch zu denen der NTC ist. Die repräsentativen Ergebnisse (Abbildung 7) mehrerer Experimente konnten dies bestätigen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass bei der Analyse der gesunden Kontrolle unspezifische Signale entstehen.

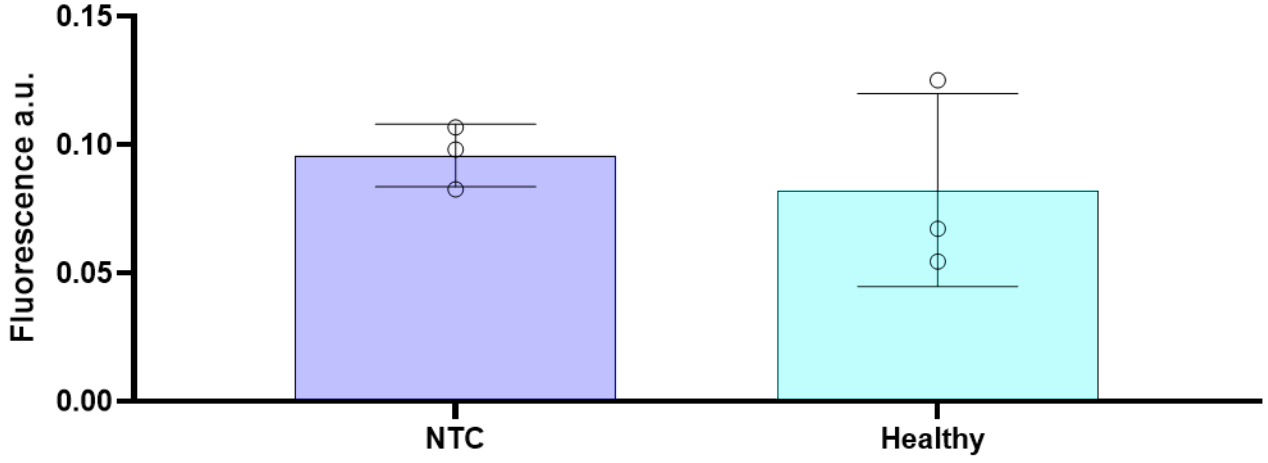


**Abbildung 7: Repräsentative Ergebnisse der Analyse der gesunden Kontrolle (Healthy) im Vergleich zur NTC.** Die dargestellten normalisierten Fluoreszenzen zeigen die Signale im 60. Zyklus der RT-MP-PCR durchgeführt im Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex. Hierbei wurden jeweils drei technische Replikate analysiert (n=3).

Nachfolgend erfolgte die Analyse zweier Gerstenproben, welche mit BaMMV infiziert sind (Probe 4 und 5). Hierbei wurde im roten Kanal zur Detektion von BaMMV gemessen (Abbildung 8).

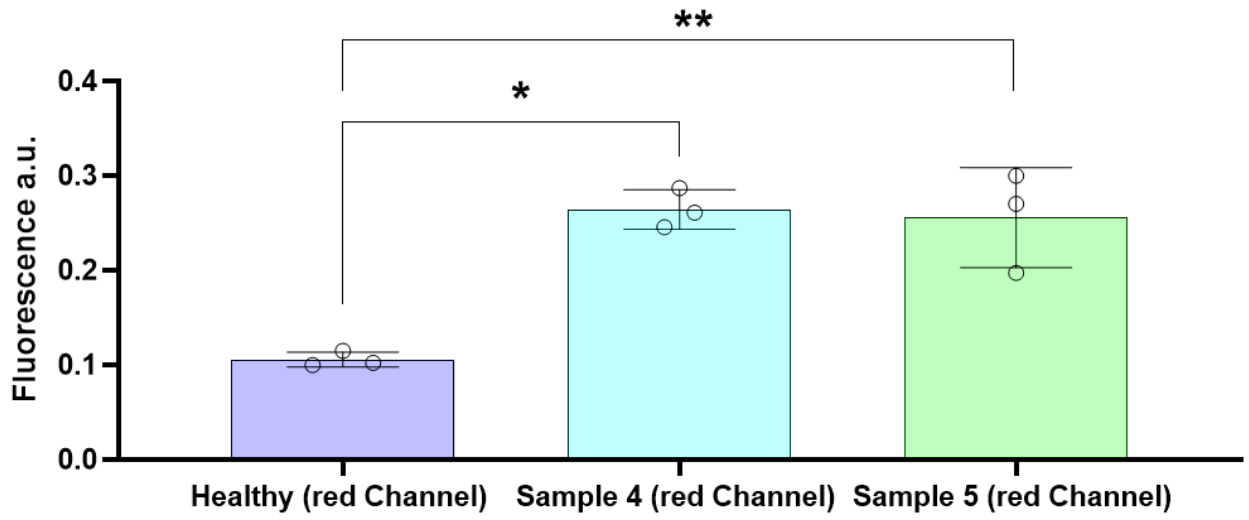


**Abbildung 8: Repräsentative Ergebnisse der Analyse von Probe 4 und 5 im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy) zur Detektion von BaMMV im roten Kanal.** Die dargestellten normalisierten Fluoreszenzsignale zeigen die Werte im 60. Zyklus der RT-MP-PCR durchgeführt im Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex. Hierbei wurden jeweils drei technische Replikate analysiert (n=3). Statistische Analyse mittels paired student t Test.

Die in Abbildung 8 aufgeführten Ergebnisse zeigen ein signifikant höheres Signal in beiden analysierten Proben im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Dies weist darauf hin, dass die Infektion der beiden Individuen mit BaMMV erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Eine Analyse der Amplifikationskurven (Abbildung 9) zeigte zusätzlich ein signifikant höheres Signal der beiden infizierten Proben (Probe 4 und 5) im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy).

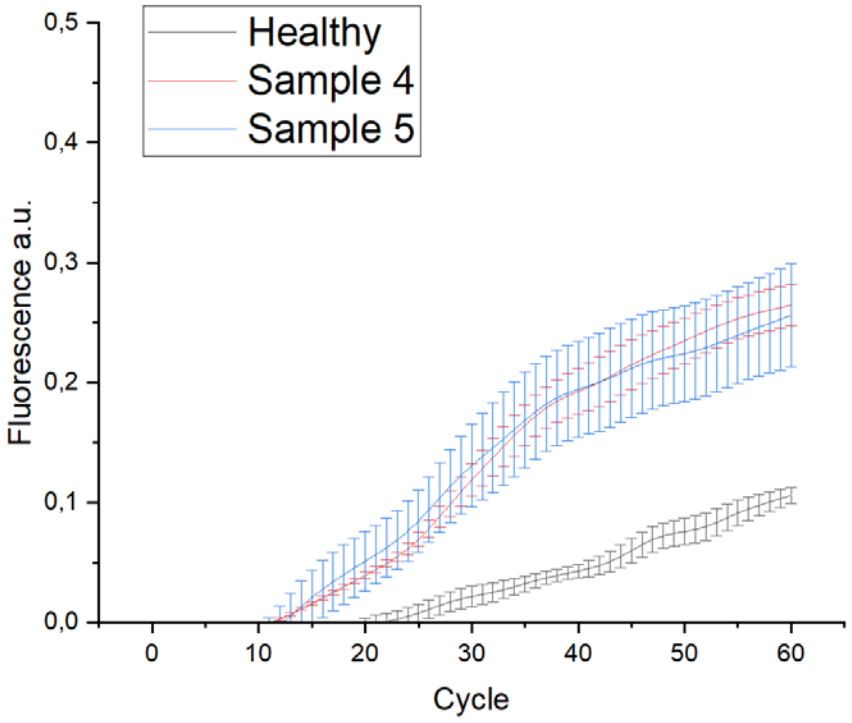


**Abbildung 9: Amplifikationskurven der Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex MP-RT-PCR zur Analyse der Gerstenproben infiziert mit BaMMV (Probe 4 und Probe 5) und der gesunden Kontrolle (Healthy).** Jede Kurve repräsentiert die Analyse drei technischer Replikate (n=3).

**Ergebnisse zu Abbildung 8 und 9 (Effizienz, $R^2$, gesetzter Treshold, ct-Werte) der MP-RT-PCR für BaMMV (Red).** Die hier aufgeführten ct-Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei technischen Replikaten.

| Probe | Detektions-Kanal | Effizienz | $R^2$ | Gesetzter Threshold | Errechneter ct-Wert bei 100 ng DNA aus Probe |
|---|---|---|---|---|---|
| Healthy | Red | - | - | 0,0628 | 45 |
| 4 (BaMMV) | Red | 0,81 | 0,86 | 0,0628 | 23,96 |
| 5 (BaMMV) | Red | 0,34 | 0,77 | 0,0432 | 18,66 |

Die Analyse der errechneten ct-Werte zeigt eine eindeutige Detektion von BaMMV in den untersuchten Proben (Probe 4 und 5) zu erkennen anhand der deutlich niedrigeren ct-Werte bei den infizierten Proben im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy). Die Effizienz zeigt einen Wert bei Probe 4 (0,81) ist jedoch bei Probe 5 mit 0,34 deutlich niedriger. Dennoch konnte dieses Experiment eine zuverlässige Detektion von BaMMV in infizierten Blattproben der Wintergerste nachweisen.

Im Anschluss an die erfolgreiche Testung der zuvor genannten Gerstenproben (Probe 4 und 5) erfolgte die Analyse zweier weiterer Gerstenproben (Probe 6 und 7) zum Nachweis ein BaMMV und BaYMV_2_T Infektion. Die Nachfolgenden Abbildungen zeigen die hierfür relevanten Daten. Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen hierbei signifikant höhere Fluoreszenzsignale bei Probe 6 und Probe 7 im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy). Diese Ergebnisse belegen damit den eindeutigen Nachweis einer Infektion der Proben mit BaMMV und BaYMV_2_T.

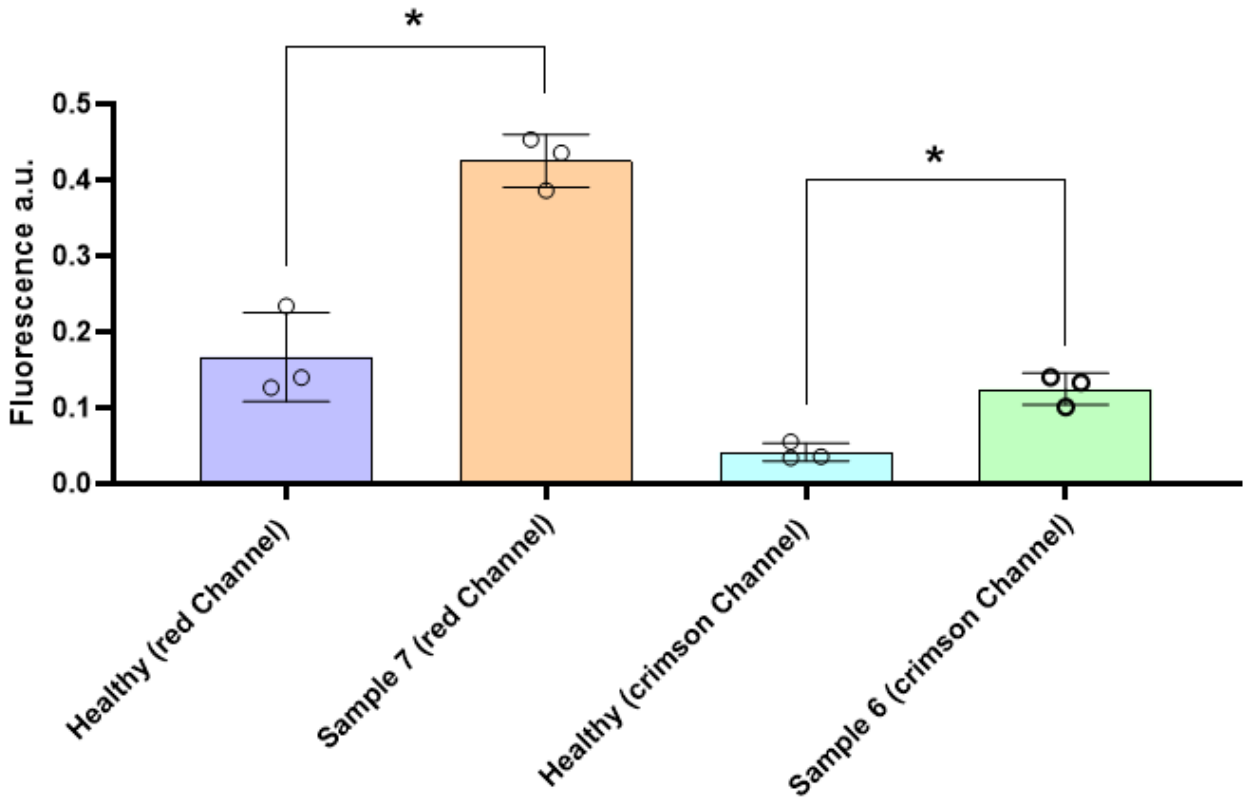


**Abbildung 10: Repräsentative Ergebnisse der Analyse von Probe 6 und 7 im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy) zur Detektion von BaMMV im roten Kanal und BaYMV_2_T im Crimson Kanal.** Die dargestellten normalisierten Fluoreszenzen zeigen die Signale im 60. Zyklus der RT-MP-PCR durchgeführt im Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex. Hierbei wurden jeweils drei technische Replikate analysiert (n=3). Statistische Analyse mittels paired student t Test.

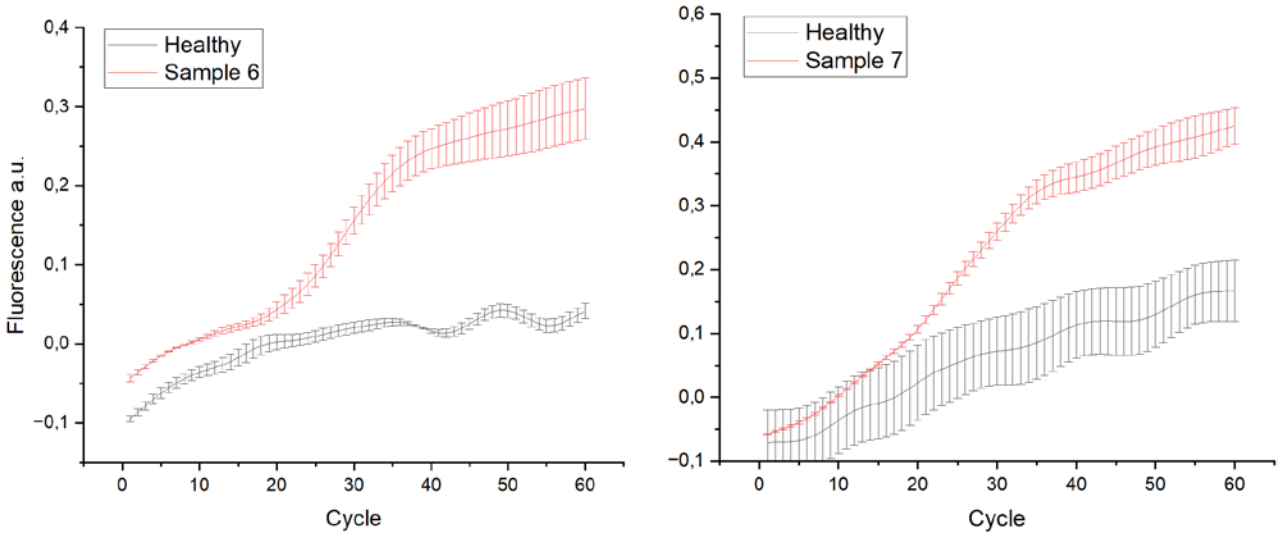


**Abbildung 11: Amplifikationskurven der MP-RT-PCR zur Analyse der Gerstenproben infiziert mit BaMMV und BaYMV_2_T (Probe 7 und 6) sowie der gesunden Kontrolle (Healthy).** Jede Kurve repräsentiert die Analyse drei technischer Replikate (n=3).

**Ergebnisse zu Abbildung 10 und 11 (Effizienz, $R^2$, gesetzter Treshold, ct-Werte) der MP-RT-PCR für BaMMV (Red) und BaYMV-Typ 2 (Crimson).** Die hier aufgeführten ct-Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei technischen Replikaten.

| Probe | Detektions-Kanal | Effizienz | $R^2$ | Gesetzter Threshold | Errechneter ct-Wert bei 100 ng DNA aus Probe |
|---|---|---|---|---|---|
| Healthy | Red/Crimson | - | - | 0,08 | 31,85 |
| 6 (BaYMV-Typ 2) | Crimson | 1,00 | 0,94 | 0,08 | 3,09 |
| 7 (BaMMV) | Red | 0,55 | 0,98 | 0,1493 | 19,84 |

Die Analyse der errechneten ct-Werte zeigt eine eindeutige Detektion von BaMMV und BaYMV_2_T in den untersuchten Proben (Probe 6 und 7), zu erkennen anhand der deutlich niedrigeren ct-Werte bei den infizierten Proben im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy). Die Effizienz zeigt einen Wert von 1,00 bei Probe 6, ist jedoch bei Probe 7 mit 0,55 deutlich niedriger. Dennoch konnte dieses Experiment eine eindeutige Detektion von BaMMV und BaYMV_2_T in infizierten Blattproben der Wintergerste nachweisen.

Zum Nachweis einer BaYMV_1_G Infektion wurden zwei weitere Gerstenproben (Probe 9 und Probe 10) getestet. Die Ergebnisse (Abbildung 12) zeigen auch hier signifikant höhere Fluoreszenzsignale im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy). Dadurch konnte gezeigt werden, dass mit dem etablierten MP-RT-PCR Assay eine Infektion mit BaYMV_1_G zuverlässig nachgewiesen werden kann. Die Analyse der Amplifikationskurven (Abbildung 13) zeigt zusätzlich einen eindeutigen Signalanstieg bei den infizierten Gerstenproben (Probe 9 und Probe 10) im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy).

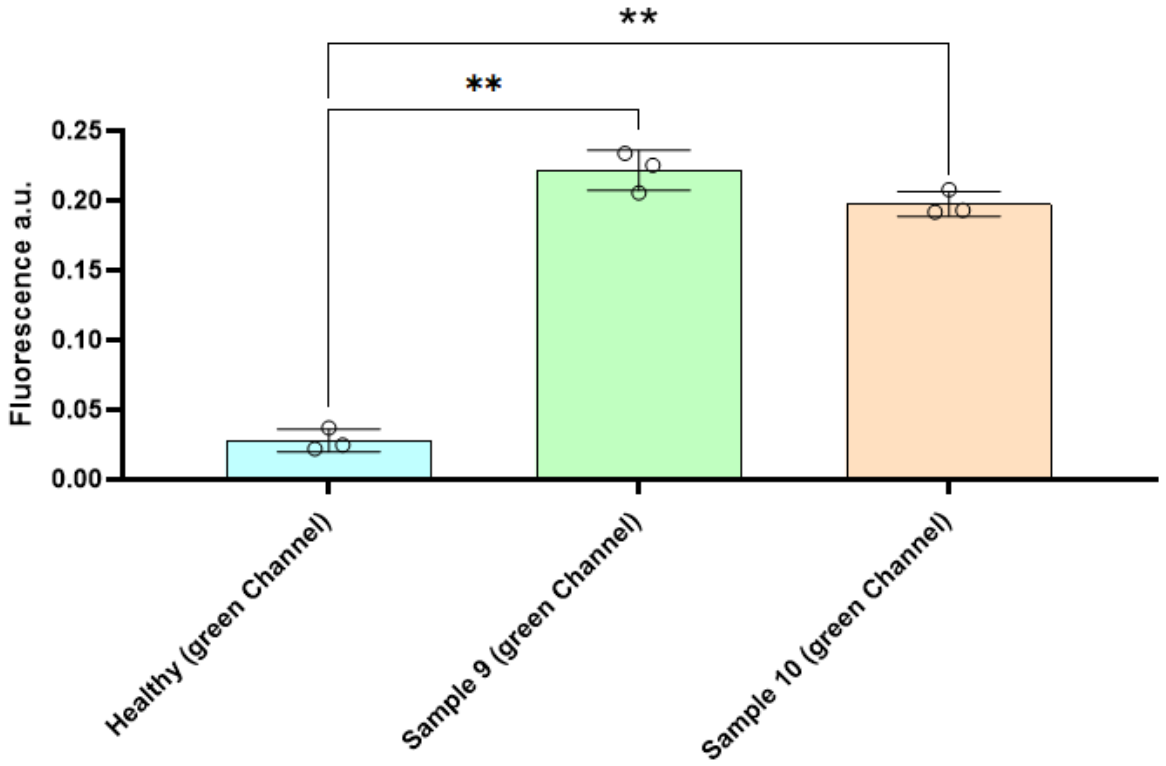


**Abbildung 12: Repräsentative Ergebnisse der Analyse von Probe 9 und Probe 10 im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy) zur Detektion von BaYMV_1_G im grünen Kanal.** Die dargestellten normalisierten Fluoreszenzen zeigen die Signale im 60. Zyklus der RT-MP-PCR durchgeführt im Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex. Hierbei wurden jeweils drei technische Replikate analysiert (n=3). Statistische Analyse mittels paired student t Test.

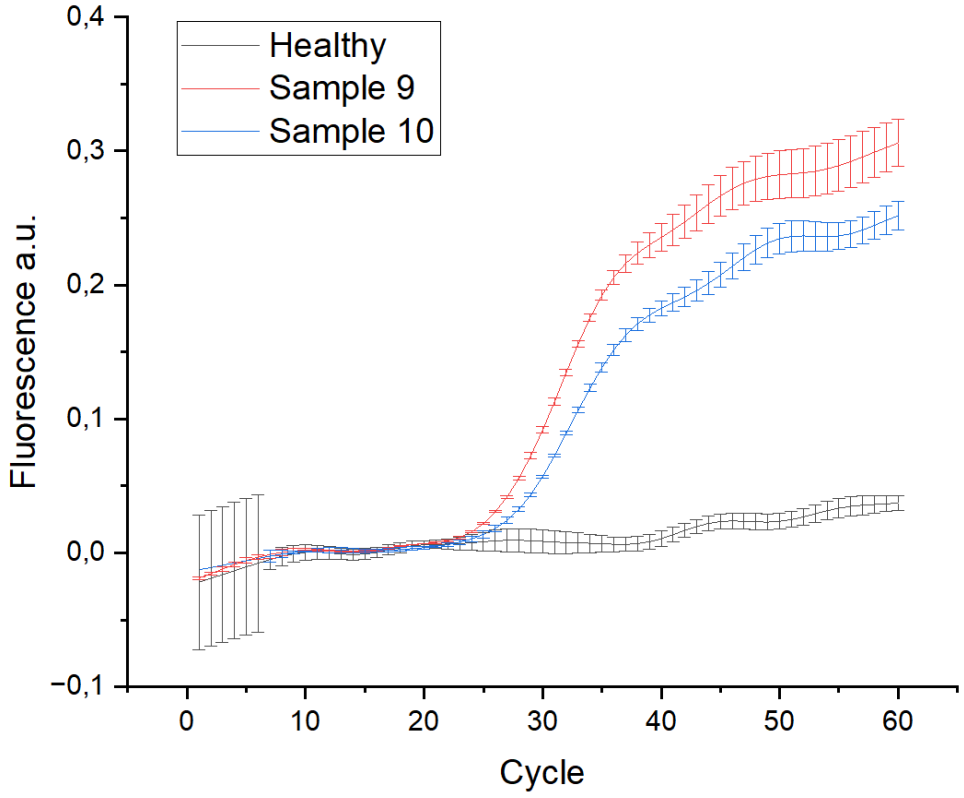


**Abbildung 13: Amplifikationskurven der MP-RT-PCR zur Analyse der Gerstenproben infiziert mit BaYMV_1_G (Probe 9 und Probe 10) sowie der gesunden Kontrolle (Healthy).** Jede Kurve repräsentiert die Analyse drei technischer Replikate (n=3).

**Ergebnisse zu Abbildung 12 und 13 (Effizienz, $R^2$, gesetzter Treshold, ct-Werte) der MP-RT-PCR für BaYMV-Typ 1 (Green).** Die hier aufgeführten ct-Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei technischen Replikaten.

| Probe | Detektions-Kanal | Effizienz | $R^2$ | Gesetzter Threshold | Errechneter ct-Wert bei 100 ng DNA aus Probe |
|---|---|---|---|---|---|
| Healthy | Green | - | - | 0,0233 | 52,84 |
| 9 (BaYMV-Typ 1) | Green | 1,03 | 0,96 | 0,0268 | 23,43 |
| 10 (BaYMV-Typ 1) | Green | 0,80 | 0,973 | 0,0189 | 23,15 |

Die Analyse der errechneten ct-Werte zeigt eine eindeutige Detektion von BaMMV und BaYMV_1_G in den untersuchten Proben (Probe 9 und 10) zu erkennen anhand der deutlich niedrigeren ct-Werte bei den infizierten Proben im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy). Für Probe 9 wurde eine Effizienz von 1,03 bestimmt, wohingegen Probe 10 einen Effizienzwert von 0,80 aufweist. Durch dieses Experiment konnte eine zuverlässige und eindeutige Identifizierung der BaYMV_1_G-Infektion in Wintergerste nachgewiesen werden.

Für den verlässlichen Nachweis einer BaYMV_2_T Infektion in zwei Gerstenproben (Probe 3 und Probe 4) wurde eine optimierte cDNA-synthese durchgeführt bei welcher spezifische Primer verwendet wurden, da die vorherige Standard cDNA-Synthese keine Detektion von BaYMV_2_T in diesen beiden Proben ermöglichte. Im Anschluss wurde die etablierte MP-RT-PCR Analyse durchgeführt, um eine Infektion in diesen Gerstenproben nachweisen zu können. Die Analyse der Fluoreszenzsignale (Abbildung 14, a) zeigte ein signifikant höheres Signal bei Probe 3 im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy). Bei der Analyse von Probe 4 konnte ein leicht erhöhtes jedoch nicht signifikant höheres Signal detektiert werden (Abbildung 14, b). Dies war ebenfalls bei der Analyse der Amplifikationskurven sichtbar (Abbildung 15).

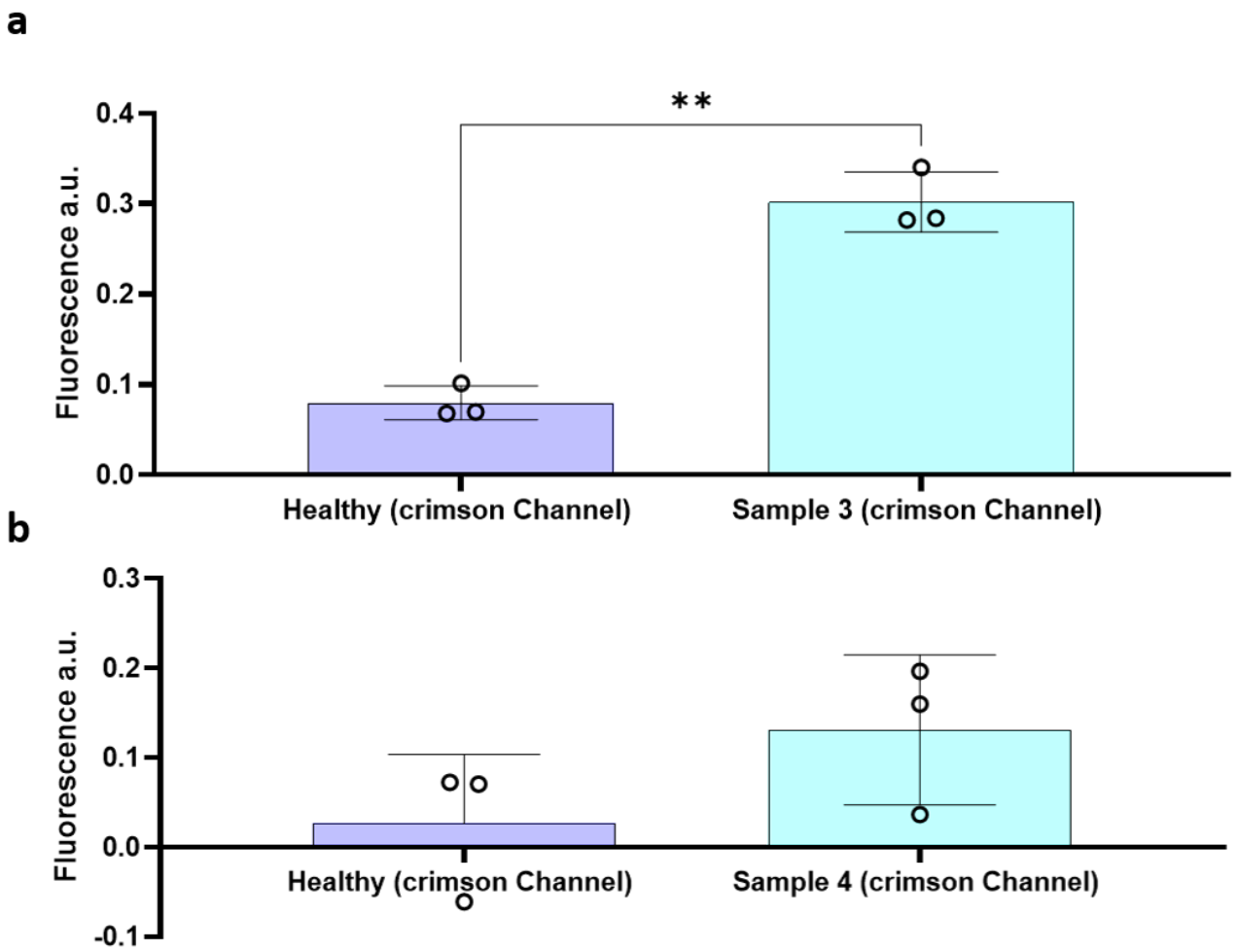


**Abbildung 14: Repräsentative Ergebnisse der Analyse von Probe 3 (a) und Probe 4 (b) im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Healthy) zur Detektion von BaYMV_2_T im Crimson Kanal.** Die dargestellten normalisierten Fluoreszenzwerten zeigen die Signale im 60. Zyklus der RT-MP-PCR durchgeführt im Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex. Hierbei wurden jeweils drei technische Replikate analysiert (n=3). Statistische Analyse mittels paired student t Test.

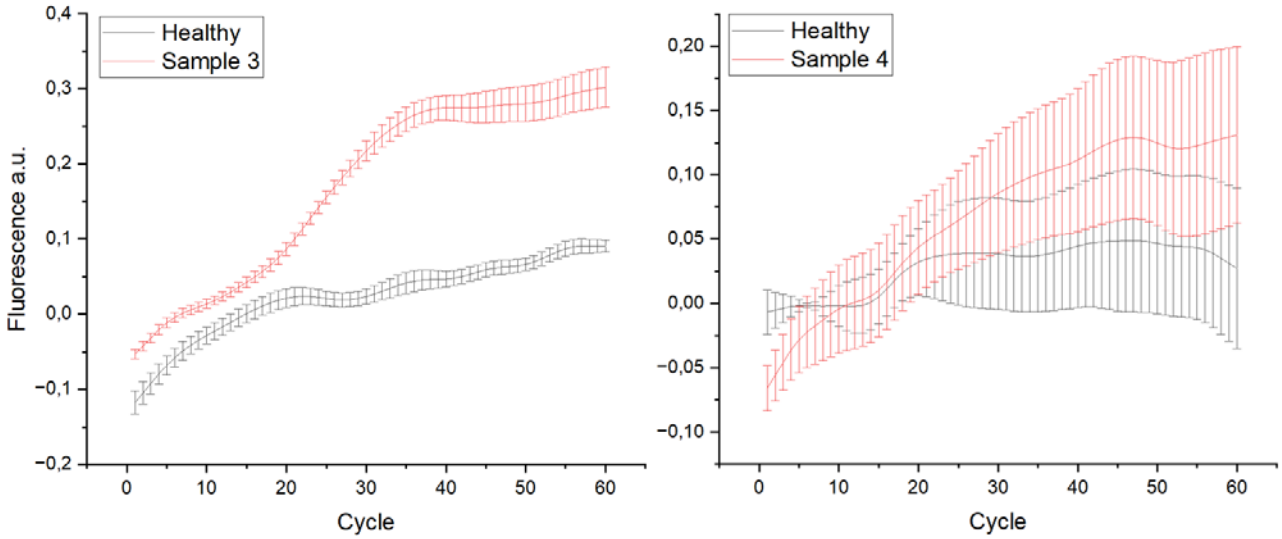


**Abbildung 15: Amplifikationskurven der Qiagen Rotor-Gene Q 6000-6-Plex MP-RT-PCR zur Analyse der Gerstenproben infiziert mit BaYMV_2_T (Probe 3 und Probe 4) sowie der gesunden Kontrolle (Healthy).** Jede Kurve repräsentiert die Analyse drei technischer Replikate (n=3).

**Ergebnisse zu Abbildung 14 und 15 (Effizienz, $R^2$, gesetzter Treshold, ct-Werte) der MP-RT-PCR für BaYMV-Typ 2 (Crimson).** Die hier aufgeführten ct-Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei technischen Replikaten.

| Probe | Detektions-Kanal | Effizienz | $R^2$ | Gesetzter Threshold | Errechneter ct-Wert bei 100 ng DNA aus Probe |
|---|---|---|---|---|---|
| Healthy | Crimson | - | - | 0,11 | - |
| 3 (BaYMV-Typ 2) | Crimson | 0,59 | 0,122 | 0,11 | 5,05 |
| 4 (BaYMV-Typ 2) | Crimson | 0,65 | 0,052 | 0,07 | 11,16 |

Die Analyse der errechneten ct-Werte zeigt eine eindeutige Detektion BaYMV_2_T in den untersuchten Proben (Probe 3 und 4), zu erkennen anhand der ct-Werte bei den infizierten Proben. Für die gesunde Kontrolle (Healthy) konnte in diesem Experiment kein ct-Wert ermittelt werden. Für Probe 3 wurde eine Effizienz von 0,59 bestimmt, wohingegen Probe 4 einen Effizienzwert von 0,65 aufweist. Die Effizienten liegen damit vergleichsweise in deutlich niedrigeren Bereichen als in den vorherigen Experimenten. Jedoch führte hier die Anwendung einer optimierten cDNA-Synthese zu deutlich höheren Fluoreszenzsignalen als in den vorherigen Ansätzen.

**Zusammenfassung der Ergebnisse**

Zusammenfassend kann beschrieben werden, dass ein hochspezifisches RT-MP-PCR System etabliert wurde, welches es ermöglicht alle relevanten Infektionen (BaMMV, BaYMV Typ I und Typ II) nachzuweisen. Der hier etablierte Assay ermöglicht zudem den Nachweis mehrerer Infektionen in einem Individuum beziehungsweise in einer Probe. Zusätzlich wurde der Assay außerdem auf zwei dPCR Systeme übertragen, was eine bessere Quantifizierung ermöglicht.

Da sich alle Virusvarianten durch den in diesem Projekt etablierten Assay eindeutig detektieren und unterscheiden lassen, kann die hier entwickelte Technologie folglich für Feldversuche in Betracht gezogen werden. Dadurch kann das in diesem Projekt angestrebte Ziel, die Etablierung eines PCR basierten Nachweisverfahren zur Differenzierung der Gelbmosaikvirus-Varianten, als erfolgreich abgeschlossen betrachtet werden. Der hier etablierte Assay kann zudem für die Detektion anderer Virusinfektion in Pflanzen verwendet werden und ermöglicht dadurch ein kostengünstiges und effizientes Monitoring von Nutzpflanzen.

## 2. Verwertung

### a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen

Die MP-PCR wurde von der Universität Freiburg entwickelt (Faltin et al. 2012; doi: 10.1373/clinchem.2012.186734) und patentiert [WO2013079307].

### b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Ziel dieser Studie ist es, durch Einsatz der hoch spezifischen RT-MP-PCR, die verschiedenen Virusvarianten (BaMMV, BaYMV-Typ 1und BaYMV-Typ 2) in der Wintergerste nachzuweisen. Mit der Entwicklung einer RT-MP-PCR soll eine Basistechnologie entwickelt werden, welche in Zukunft auf neue Virustypen direkt erweiterbar ist. Diese dient so als Monitoring-Werkzeug, um Verbreitungsmuster weiterer Virusvarianten schnell zu ermitteln und landwirtschaftlichen Schaden abzuwenden.

Durch die spezifischen Eigenschaften der MP-PCR im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Nachweisverfahren wird die Detektion von Punktmutationen (wie zur Unterscheidung von BaYMV-1 und BaYMV-2) wesentlich verbessert und es können Multiplex-Panels zur Identifizierung und Quantifizierung verschiedener Viren innerhalb einer Analyse bereitgestellt werden. Züchtern und Pflanzenschutzstellen kann so ein effektives Werkzeug für Züchtungsprogramme für neue resistente Sorten sowie die frühzeitige Charakterisierung neuer Erreger bereitgestellt werden. In Bezug auf dieses Projekt bedeutet dies konkret, dass verlässlich, schnell und kostengünstig Wintergerstenkulturen auf Virusinfektionen untersucht werden können, was eine präzise und effektive Identifizierung der Virenart mit sich bringt und letztendlich dazu führt, dass schneller und effektiver Maßnahmen ergriffen werden können. In Anbetracht dessen könnte die in diesem Projekt etablierte Technologie für die Implementierung eines Kits zur kommerziellen Verwendung in Betracht gezogen werden. Zudem könnte die Technologie für Landesmonitoringprogramme eingesetzt werden.

### c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Durch die Veröffentlichung der Forschungsergebnisse werden die Projektpartner ihre Stellung bei der Erforschung von Pflanzenviren und der von ihnen verursachten Krankheiten weiter ausbauen und sich als kompetente Partner für Kooperationen im europäischen Raum und international präsentieren können. Ein Manuskript hierfür ist in Arbeit und soll publiziert werden.

Optimierte Universal Reporter-Sequenzen und die präzise Signalgenerierung der MP-PCR können die Detektion von Punktmutationen wesentlich vereinfachen. Die Technologie kann somit auf weitere Anwendungsfelder insbesondere auch im Bereich des Genom-Editing in der Pflanzenzucht angewendet werden.

### d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die im Projekt etablierten Protokolle zur Entwickelung einer Multiplex RT-MP-PCR sollen auch nach Projektabschluss dem Projektpartner und der internationalen Community zur Verfügung stehen, um eine schnelle Integration neuer Virustypen in den bestehenden Nachweis zu ermöglichen.

Die erforschten Nachweisreaktionen werden als Basis weiterer Projekte im Bereich der Agrardiagnostik genutzt. Hierdurch soll die eigene Expertise in diesem Bereich ausgebaut und die MP-PCR als Analysemethode bei Anwendern etabliert werden. Durch Veröffentlichung der Projektergebnisse und Kontakte zu Landwirten, Züchterverbänden, Züchterhäusern und Pflanzenschutzstellen (in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner JKI) könnte sich die Technologie im Bereich der Agrardiagnostik verbreiten und in zukünftige Kooperation von öffentlich geförderten Forschungsprojekten münden.

**Tabellarischer Verwertungsplan**

| **Wirtschaftliche Erfolgsaussichten der Verwertung** | | |
|---|---|---|
| **Verwertung** | **Instrumente** | **Zeithorizont** |
| Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit durch Erhöhung des Bekanntheitsgrades der MP-PCR – Technologie. | Die Präsentation des Projektes auf der IMTEK-Website ist erfolgt | Kurzfristig |
| | Präsentationen der Projektergebnisse im Rahmen von Konferenzen (z.B. EUDIP) / Netzwerktreffen nach erfolgter Publikation | Mittelfristig bis langfristig |
| Auslizenzierung der MP-PCR-Technologie auf Basis bestehender Schutzrechte nach erfolgreicher Entwicklung | Die MP-PCR-Basistechnologie ist bereits patentrechtlich geschützt. Nach erfolgreicher Entwicklung könnten Lizenzen an Dritte vergeben werden. | Langfristig |

| Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten der Verwertung | | |
|---|---|---|
| **Verwertung** | **Instrumente** | **Zeithorizont** |
| Die in ChanGE entwickelte RT-MP-PCR zum Nachweis der Gelbmosaikviren stellt eine wichtige technische Weiterentwicklung dar. Sie erlaubt es den Anwendern Pathogene präzise zu bestimmen, wodurch die Kultivierung der Agrarprodukte in Zukunft effizient und nachhaltig gestaltet werden kann. Die Projektergebnisse, insbesondere die Leitlinien zum Design für die Multiplex RT-MP-PCR, werden der Öffentlichkeit entsprechend durch Open Access Dokumente zugängig gemacht. | Veröffentlichung der Ergebnisse als Open Access Publikation durch das IMTEK<br>Implementierung der Technologie durch Anwender | Mittelfristig<br>Langfristig |
| Das Projekt wird die Sichtbarkeit und Expertise von IMTEK auf nationaler und internationaler Ebene, in Bezug auf molekulare Pflanzendiagnostik steigern. | Die Präsentation des Projektes auf der IMTEK-Website ist erfolgt<br>Präsentationen im Rahmen von Onlinekonferenzen und Netzwerktreffen nach erfolgter Publikation | Kurzfristig<br>Langfristig |

### e) Stand der Erreichung der in der Vorhabenbeschreibung aufgeführten Verwertungsoptionen, Forschungsdaten

Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Identifikation und Detektion verschiedener Varianten der Gelbmosaikviren sowie die Erkennung vorherrschender Virusvarianten durch einen Molekularen Nachweis (MP-PCR). Dies ermöglicht die gezielte Auswahl adäquater resistenter Gerstensorten, wodurch der Ertrag je Fläche aufrechterhalten werden kann. Der hier etablierte Assay stellt somit die Basis zur Erkennung neuer Gelbmosaikvirusvarianten. Als Ergebnis dieses Vorhabens könnten gezielt neue Resistenzzüchtungen initiiert und folglich die Sortenwahl für kontaminierte Felder optimiert werden. Die notwendige Differenzierung der Erreger kann nun mittels des neu entwickelten molekularen Nachweises ermöglicht werden. Die Erweiterbarkeit des Nachweises stellt zudem sicher, dass neue Virusvarianten integriert werden können und stellt somit langfristig die Basis für ein solides molekulares Monitoringwerkzeug.

## 3. Erkenntnisse von Dritten

Es sind uns keine neuen Ergebnisse von dritter Seite bekannt, die für das Teilvorhaben relevant sind. Bekannte Patente Dritter werden gemeinsam mit den Patentanwälten der Universität Freiburg analysiert und die Relevanz dieser für die Verwertung der Ergebnisse des Forschungsvorhaben evaluiert.

## 4. Veröffentlichungen

Geplant ist die Veröffentlichung der Ergebnisse als Open Access Publikation durch das IMTEK (Manuskript in Arbeit) sowie die Vorstellung der Ergebnisse in Form einer Präsentation auf einer wissenschaftlichen Konferenz.

## 5. Literaturverzeichnis

Calabrese, Silvia; Markl, Anja M.; Neugebauer, Maximilian; Krauth, Stefanie J.; Borst, Nadine; Stetten, Felix von; Lehnert, Michael (2023): Reporter emission multiplexing in digital PCRs (REM-dPCRs): direct quantification of multiple target sequences per detection channel by population specific reporters. In: *The Analyst* 148 (20), S. 5243–5254. DOI: 10.1039/d3an00191a.

Faltin, Bernd; Wadle, Simon; Roth, Günter; Zengerle, Roland; Stetten, Felix von (2012): Mediator probe PCR: a novel approach for detection of real-time PCR based on label-free primary probes and standardized secondary universal fluorogenic reporters. In: *Clinical chemistry* 58 (11), S. 1546–1556. DOI: 10.1373/clinchem.2012.186734.

Neugebauer, Maximilian; Calabrese, Silvia; Müller, Sarah; Truong, Truong-Tu; Juelg, Peter; Borst, Nadine et al. (2024): Generic Reporter Sets for Colorimetric Multiplex dPCR Demonstrated with 6-Plex SNP Quantification Panels. In: *International journal of molecular sciences* 25 (16). DOI: 10.3390/ijms25168968.