

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
15. November 2012 (15.11.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/151599 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/02 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2012/050060

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Mai 2012 (04.05.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A640/2011 6. Mai 2011 (06.05.2011) AT
A1076/2011 22. Juli 2011 (22.07.2011) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN**
[AT/AT]; Karlsplatz 13, A-1040 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STICH, Karl** [AT/AT];
Gemeindeweg 4-6, A-2201 Gerasdorf (AT). **FISCHER,**
Thilo [DE/DE]; Dorfstraße 34, 85737 Ismaning (DE).
GOSCH, Christian [AT/AT]; Kopreiniggasse 25, A-8544
St. Ulrich im Greith (AT).

(74) Anwalt: **ELLMAYER, Wolfgang**; Häupl & Ellmeyer KG,
Mariahilfer Straße 50, A-1070 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz
2 Buchstabe g)

(54) Title: LAMP METHOD FOR DETECTING ERWINIA AMYLOVORA

(54) Bezeichnung : LAMP-VERFAHREN ZUM NACHWEISEN VON ERWINIA AMYLOVORA

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting *Erwinia amylovora* in a sample by amplifying one or more *Erwinia amylovora* sequences in the sample using the LAMP method by means of primers specific to said sequence(s) and optionally comparing said sequence(s) with known sequences, characterized in that the genomic sequence of bases 378996 to 1379215 of the *Erwinia amylovora* genome, which codes for the hypothetical protein AMY1267 of strain Ea273, as explained in SEQ ID NO:1, is used as a reference sequence and the set of specific LAMP primers comprising SEQ ID NOs:2 to 7 is used for amplification.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen von *Erwinia amylovora* in einer Probe, indem eine oder mehrere *Erwinia amylovora*-Sequenzen in der Probe unter Anwendung der LAMP-Methode mittels für diese Sequenz(en) spezifischer Primer amplifiziert und gegebenenfalls mit bekannten Sequenzen verglichen werden, mit dem Kennzeichen, dass als Referenzsequenz die genomische Sequenz der Basen 378996 bis 1379215 des *Erwinia amylovora*-Genoms, die für das hypothetische Protein AMY1267 des Stamms Ea273 kodiert, wie in Seq.-ID Nr. 1 dargelegt, verwendet wird und der aus den Seq.-ID Nm. 2 bis 7 bestehende Satz spezifischer LAMP-Primer zur Amplifikation eingesetzt wird.



WO 2012/151599 A2

LAMP-Verfahren zum Nachweisen von *Erwinia amylovora*

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweisen des Feuerbranderregers *Erwinia amylovora*.

5

Feuerbrand wird durch das gram-negative Bakterium *Erwinia amylovora* verursacht, das Pflanzen der Familie der Rosaceen befällt, besonders Gattungen der Unterfamilie Maloideae (Kernobstgehölze), vor allem Apfel (*Malus x domestica*), Birne (*Pyrus communis*) und Quitte (*Cydonia oblonga*). Die Infektion erfolgt in der Regel über die Blüte (primärer Feuerbrand). Im Gegensatz dazu werden Infektionen über das Laub, später in der Vegetationsperiode, als sekundärer Feuerbrand bezeichnet. Die Infektion der Blüte breitet sich über das Xylem aus und führt zu einer im Holz fortschreitenden Nekrose. Die Krankheit verursacht verheerende Schäden in Obstanlagen mit entsprechenden wirtschaftlichen Verlusten.

15

Regional können zur Blütezeit Prognosen des Feuerbrand-Infektionsrisikos z.B. nach dem Modell MARYBLYT durchgeführt werden. In diesem Modell werden aktuelle und lokale Temperatur- und Feuchtigkeitswerte in Form von kritischen Schwellenwerten und Zeitsummen während der Blüte beurteilt (Steiner 1990, Lightner und Steiner 1990, Jones 1992). Der aus der Feuerbrandsituation des Vorjahres abgeleitete vermutliche Infektionsstatus wird dabei oft auch in Betracht gezogen, kann aufgrund der hohen Bakteriendynamik allerdings ungenau sein. Am informativsten wären deshalb konkrete Testergebnisse zum aktuellen und lokalen Infektionsstatus während der Blüte. Allerdings sind Tests mit Blüten oder Blütenbüscheln mit niedrigen Zelltitern während der frühen Infektionsphase konfrontiert und müssten entsprechend sensitiv sein. Zudem ist durch die kurze Blütezeit ein sehr enger Zeitrahmen für Tests gegeben, der es in der Regel nicht erlaubt, Proben an Labore zu versenden, die Ergebnisse der Tests während der Blüte zu erhalten und gegebenenfalls auch rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergreifen zu können.

30

Ein schneller und sensitiver Test auf *Erwinia amylovora*, der auch unter Feldbedingungen oder zumindest in einfach ausgestatteten Laboren vor Ort möglich ist, wäre

aus diesen Gründen sehr wünschenswert. Ein solcher Test würde neben der MARY-BLYT-Prognose über Infektionsbedingungen die sehr wichtige Information über den aktuellen, lokalen Infektionsstatus liefern können. Dies würde eine rechtzeitige Entscheidung vor Ort über die Notwendigkeit von Gegenmaßnahmen gegen die Verbreitung des Pathogens während der Blüte ermöglichen. Die Wirtschaftlichkeit läge bei hohem Infektionsstatus selbstverständlich in der Vermeidung von Feuerbrandschäden, aber auch die nachgewiesene lokale Abwesenheit des Erregers ergäbe neben dem wirtschaftlichen Vorteil, keine unnötigen Maßnahmen ergreifen zu müssen, auch den ökologischen Vorteil eines verminderten, angepassten Pestizideinsatzes.

Tests auf mikrobielle Pathogene werden in der Regel durch selektive Kultur oder Kultur mit Indikatoren durchgeführt, oder, weniger aufwändig, durch immunologische Tests wie ELISA, oder aber durch PCR-Reaktionen auf spezifische Nukleinsäuresequenzen. Sowohl ELISA- als auch PCR-Tests auf mikrobielle Pathogene sind dabei wesentlich schneller durchzuführen als die Identifizierung mittels Kultivierung, wenn sie nicht mit Vorkulturen kombiniert werden müssen, um die Nachweisgrenze zu erreichen oder ausreichende Spezifität zu gewährleisten. Tests unter Feldbedingungen verlangen weitere methodische Vereinfachungen und schließen in der Regel die Verwendung von Thermocyclern, die für PCR-Reaktionen benötigt werden, aus. Daher werden unter Feldbedingungen oft ELISA-Tests verwendet, obwohl sie meist wesentlich unsensitiver und unspezifischer als PCR-Tests sind.

Einige neuere Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden funktionieren bei konstanter Temperatur, meist im Bereich von 60-65 °C, und umgehen damit die Notwendigkeit von Thermocyclern, erreichen aber trotzdem die Sensitivität von PCR-Reaktionen. Die wichtigsten dieser isothermalen Amplifikations-Techniken sind NASBA ("*nucleic acid sequence-based amplification*", Compton 1991), SDA ("*strand displacement amplification*", Walker et al. 1992), HRCA (Synonym: CRCA) ("*hyperbranched (oder: cascade) rolling circle amplification*", Lizardi et al. 1998, Thomas et al. 1999), HDA ("*helicase dependent amplification*", Vincent et al. 2004, An et al. 2005), LAMP ("*loop-mediated isothermal amplification of DNA*", Notomi et al. 2000, Nagamine et al. 2002) und RPA ("*recombinase polymerase amplification*", Piepenburg et al. 2006).

Generell umgehen diese Techniken das Aufschmelzen doppelsträngiger DNA (oder von DNA-RNA-Hybriden im Fall von NASBA) zur Erzeugung von Nukleinsäure-Einzelsträngen zur Hybridisierung der Primer (Startpunkte der Synthese) und als Vorlage zur Gegenstrangsynthese ("*template*").

5

Dabei werden Startpunkte der Synthese geschaffen durch Einzelstrangbrüche ("*nicks*") mittels Restriktionsenzym (SDA), durch zirkuläre Einzelstrang-DNA (CRCA), Strangtrennung in einem Promoterbereich (NASBA), sich regenerierende Haarnadelschleifen (LAMP) oder durch Rekombinase-Aktivität gebildete D-Schleifen (RPA). Die Notwendigkeit, eine Einzelstrang-Vorlage zur Synthese zu schaffen, wird in isothermalen Methoden vermieden, indem eine Strang-Verdrängungsaktivität einer DNA-Polymerase (NASBA, SDA, CRCA, LAMP, RPA) oder RNA-Polymerase (NASBA) genutzt wird; oder ein Einzelstrang wird durch eine separate Helikase-Aktivität (HDA) erzeugt; oder der Gegenstrang wird durch ein Enzym abgebaut (RNase H, NASBA).

15

Von diesen Methoden zur DNA-Diagnostik wird LAMP in weitester Verbreitung eingesetzt, da LAMP mit hoher Effizienz und Spezifität DNA amplifiziert (z.B. Gill and Ghaemi 2008, und die Zitate darin). LAMP ermöglicht es auch, die Gelelektrophorese zur Analyse der Produkte zu umgehen, da sich in positiven Reaktionen ein weißer Magnesiumpyrophosphat-Niederschlag bildet, der mit bloßem Auge sichtbar ist. Dies ermöglicht die homogene Analyse ohne weitere Handhabung und ohne erneutes Öffnen der Reaktionsgefäße, was das Risiko birgt, mit den in sehr hoher Konzentration vorliegenden Amplifikationsprodukten Arbeitsplatz, Gerätschaften und letztlich nachfolgende Reaktionsansätze zu kontaminieren. Noch praxisgerechter wird die LAMP-Reaktion durch die Zugabe des Metallionen-Indikators Hydroxynaphtholblau (HNB) als kolorimetrischer Test, bei dem bei positiver Amplifikation ein Farbumschlag von violett nach blau stattfindet (Goto et al. 2009, Hadersdorfer et al. 2011).

25

30

Eine LAMP-Methode für plasmidspezifische *Erwinia amylovora*-Sequenzen wurde kürzlich publiziert (Temple und Johnson 2011). Die Autoren haben insgesamt 45 Primer-Sets zur Amplifikation von *Erwinia amylovora*-DNA getestet, wobei der Nachweis von Plasmid-DNA konkret beschrieben, gleichzeitig aber erwähnt wird, dass

auch Tests mit chromosomaler DNA durchgeführt worden seien. Es gelang den Autoren allerdings nicht, das Bakterium zuverlässig nachzuweisen, da zahlreiche Artefakte auftraten, und zwar sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Reaktionen. Unter anderem kam es zu Verwechslungen mit dem Epiphyten *Pantoea agglomerans*, einem in Obstplantagen häufig vorkommenden Enterobakterium.

Ziel der Erfindung war daher die Entwicklung eines verbesserten LAMP-Verfahrens zur DNA-Amplifikation von *Erwinia amylovora*-Sequenzen, um so den Erreger mit erhöhter Zuverlässigkeit nachweisen zu können.

Weiters wurde festgestellt, dass bestäubende Honigbienen Überträger des Feuerbrandregers sein können (Alexandrova et al. 2006) sowie dass Honigbienen zur Überwachung der von ihnen bestäubten Pflanzen eingesetzt werden können, u.a. um *Erwinia amylovora* nachzuweisen (Sabatini et al. 2002). Zur Detektion des Bakteriums werden wiederum z.B. PCR- oder PCR-ELISA-Verfahren angewandt.

Zur Probennahme ist es bekannt, Bienen am Eingang zum Bienenstock eine Laufstrecke, wie z.B. ein Lochgitter, einen Kamm oder eine Folie, passieren zu lassen, um zu verschiedenen Zwecken Proben der von diesen angeflogenen Blüten, z.B. Nektar- oder Pollenproben, zu gewinnen, die am Lochgitter oder Kamm abgestreift werden und in einen darunter montierten Auffangbehälter fallen oder DNA-Reste an den Tarsen, die an einer Folie haften bleiben.

Um in kurzer Zeit ausreichend große Probenmengen zu erhalten, wird standardmäßig die Honigbiene als Bienenvolk für die Probennahme gewählt, die Staaten aus bis zu 80.000 Individuen bildet.

Nachteilig ist hierbei jedoch die Tatsache, dass so große Bienenpopulationen riesige Gebiete abfliegen und dabei Pollen und Nektar zahlreicher unterschiedlicher Pflanzenarten sammeln. Die Analyse von Pollen einer spezifischen Pflanzenart ist dadurch nahezu unmöglich, zumindest aber mit einem enormen Aufwand verbunden.

Weiters ist bekannt, Wildbienenstöcke zur Bestäubung von Pflanzen in einem definierten, begrenzten Areal, z.B. einer Obstplantage, einzusetzen. Wildbienen bilden, wenn überhaupt, weitaus kleinere Staaten aus wenigen tausend oder auch nur hundert Individuen, deren Fluggebiet in der Regel sehr eingeschränkt ist. Somit eignen sie sich nur bedingt zur Probennahme, da in einem bestimmten Zeitraum nur sehr geringe Probenmengen gewonnen werden könnten.

Andererseits besteht ein dringendes Interesse daran, möglichst früh über den eventuellen Befall einer Pflanzenart mit einem Erreger Bescheid zu wissen, um Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. So ist etwa der Befall von Obstpflanzen mit dem Feuerbranderreger ein stetiges Problem in der Landwirtschaft.

Die Apfel- und Birnenblüte beginnt in Mitteleuropa üblicherweise im April, in wärmeren Regionen auch Anfang April (Sabatini et al. 2002) und gelegentlich schon Ende März. Die zu dieser Zeit herrschenden Durchschnittstemperaturen sind für Honigbienen jedoch an vielen Tagen zu niedrig, um normales Flugverhalten zu zeigen.

Ein weiteres Ziel der Erfindung war vor diesem Hintergrund die Entwicklung einer Methode, wie zu einem möglichst frühen Zeitpunkt im Jahr ausreichende Informationen über einen potenziellen Befall von Nutzpflanzen mit bestimmten Erregern, insbesondere von Obstpflanzen mit *Erwinia amylovora*, erhalten werden können.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Ein Ziel wird in einem ersten Aspekt der Erfindung erreicht durch Bereitstellung eines Verfahrens zum Nachweisen von *Erwinia amylovora*-Sequenzen in einer Probe, indem eine oder mehrere *Erwinia amylovora*-Sequenzen unter Anwendung der LAMP-Methode amplifiziert und gegebenenfalls mit bekannten Sequenzen verglichen werden, wobei das Verfahren der Erfindung dadurch gekennzeichnet ist, dass einerseits als Referenzsequenz die genomische Sequenz der Basen 1378996 bis 1379215 des *Erwinia amylovora*-Genoms, die für das hypothetische Protein AMY1267 des Stamms Ea273 kodiert, wie in Seq.-ID Nr. 1 dargelegt, verwendet wird und anderer-

seits der aus den Seq.-ID Nrn. 2 bis 7 bestehende Satz spezifischer LAMP-Primer zur Amplifikation eingesetzt wird.

Die obige genomische Sequenz mit Seq.-ID Nr. 1 wurde aus den vom Sanger Institute entschlüsselt und auf dessen Website für die Öffentlichkeit bereitgestellten (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/erwinia-amylovora.html>) Daten des *Erwinia amylovora*-Genoms ausgewählt.

Ohne sich auf eine Theorie festlegen zu wollen, wird angenommen, dass die zahlreichen Artefakte beim Nachweis gemäß dem oben erwähnten Verfahren von Temple und Johnson auch daher rührten, dass als Target (zumindest vorwiegend) eine Plasmid-DNA ausgewählt wurde. Der Vorteil der (möglichen) Gegenwart von Plasmid-DNA in Mehrfachkopien, also in potenziell höherer Konzentration in der Probe, wird nach Ansicht der Erfinder dadurch zunichte gemacht, dass: a) ein bestimmtes Plasmid mitunter nicht in allen Stämmen der nachzuweisenden Spezies vorkommt (was auch Temple und Johnson bestätigt haben), b) Plasmide, z.B. durch äußere Einflüsse, vergleichsweise leicht deaktiviert werden können und c) Plasmide auf andere Spezies oder sogar Gattungen übertragen werden können.

Durch Verwendung der in Seq.-ID Nr. 1 beschriebenen genomischen DNA-Sequenz von *Erwinia amylovora* als Referenzsequenz wird gemäß vorliegender Erfindung sichergestellt, dass sämtliche bekannten Stämme der Spezies *Erwinia amylovora* erfasst und Artefakte aufgrund von Plasmid-Deaktivierung oder -Transfer wirksam vermieden werden. Falsch-negative Ergebnisse sind somit praktisch ausgeschlossen.

Die als Primer für die Amplifikationsreaktion eingesetzten LAMP-Primer der Seq.-ID Nrn. 2 bis 7 ermöglichen eine rasche und zuverlässige Amplifikation der in der Probe enthaltenen *Erwinia amylovora*-DNA. Vor allem aber ist mit diesem für Seq.-ID Nr. 1 hochspezifischen Primersatz die Amplifikation potenzieller kontaminierender DNA praktisch ausgeschlossen, weswegen im Wesentlichen keine falsch-positiven Ergebnisse, d.h. Artefakte, erhalten werden können.

Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe der Online-Software "PrimerExplorer V4" (<http://primerexplorer.jp/e/>, Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan) und durch Screenen von Datenbanken unter Verwendung von NCBI Blast auf Sequenzen möglicher Kontaminanten. Primer, die mit verfügbaren Sequenzen dieser DNA-Kontaminationsquellen zu große Sequenzähnlichkeit aufwiesen, wurden entsprechend abgeändert oder ausgeschlossen, bis schließlich ein vollständiger Primersatz ermittelt werden konnte, der in der Praxis im Wesentlichen keine Kreuzreaktionen ergeben sollte. Bei der Auswahl dieser Primer wurde insbesondere eine mögliche Kontamination durch DNA von Apfel, Birne, Biene, epiphytischen Mikroorganismen, wie z.B. *Erwinia persicina*, *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia tasmaniensis*, *Erwinia piriflorinigrans*, *Erwinia billingiae*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis subsp. Subtilis* und *Staphylococcus aureus*, aber auch durch menschliche DNA, die während der Handhabung der Probe eingeschleppt worden sein könnte, berücksichtigt. Wie die späteren Beispiele belegen, waren mit diesem Primersatz keinerlei Artefakte zu beobachten.

Für dieses Primer-Set wurde dann ein hinsichtlich relevanter Parameter, wie z.B. Temperatur, *Bst*-DNA-Polymerase-, Mg^{2+} -, HNB-, Betain- und Desoxynucleosidtriphosphat-Konzentration, absolute und relative Konzentration der Primer und Reaktionszeit, optimiertes Verfahrensprotokoll erarbeitet, wie in den Beispielen dargelegt wird.

Das so entwickelte Verfahren der vorliegenden Erfindung erlaubt die kolorimetrische Detektion bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 80 bis 100 fg DNA, was lediglich 20 bis 25 Zellen von *Erwinia amylovora* entspricht, in 45 Minuten, und das auch unter Feldbedingungen. Die Nachweisgrenze beim Einsatz von Bakterienzellen als Template in der LAMP-Reaktion liegt etwa bei 16 bis 20 Zellen in 45 Minuten. Durch die Verwendung der genomischen Zielsequenz mit Seq.-ID Nr. 1 können auch Plasmidfreie, aber trotzdem mitunter pathogene *Erwinia amylovora*-Stämme detektiert werden. Mittels Verdünnungsreihen aus den von den Proben gewonnenen *Erwinia amylovora*-Zellsuspensionen bis unter die Nachweisgrenze können die Tests zur Ermittlung semiquantitativer Ergebnisse benutzt werden.

Die Herkunft der Proben ist dabei nicht speziell eingeschränkt, und es können beispielsweise Waschwasser von mehreren oder auch nur einzelnen Blüten, Triebe, Blätter oder Laborproben eingesetzt werden, um an die erforderliche DNA zu gelangen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden jedoch von bestäubenden Bienen, noch bevorzugter Wildbienen, insbesondere Hummeln, gesammelte Proben verwendet, wie dies später im Zusammenhang mit dem zweiten Aspekt der Erfindung näher ausgeführt wird.

In bestimmten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Produkte der LAMP-Amplifikation durch Gelelektrophorese und/oder mit Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit-Thermocyclern bzw. Fluorimetern analysiert, was besonders rasche und eindeutig zuordenbare Ergebnisse liefert.

Die LAMP-Reaktion wird vorzugsweise bei 60-65 °C durchgeführt, was ausreicht, um die LAMP-Amplifikation rasch ablaufen zu lassen, aber gleichzeitig keine aufwändigen Gerätschaften erfordert. Die Wärmequellen können in diesen Fällen beispielsweise feldtaugliche, spannungsunabhängige oder Niedervolt-Wärmegeneratoren oder auch einfach Thermoskannen sein. Dies ermöglicht die Bereitstellung einer tragbaren Vorrichtung, d.h. eines Analysengeräts, das vor Ort, etwa in einer Obstplantage, problemlos betreibbar ist.

Im Hinblick auf die Durchführung solcher Analysen im Feld ist eine erfolgreiche Amplifikation der Bezugssequenz mit Seq.-ID Nr. 1 vorzugsweise durch einfache Sichtprüfung mit bloßem Auge feststellbar, z.B. weil ein Farbumschlag oder eine Trübung auftritt, was eine rasche Feststellung des Analyseergebnisses ermöglicht und darüber hinaus das Design eines oben erwähnten tragbaren Analysengeräts weiter vereinfacht. Zu diesem Zweck wird gemäß vorliegender Erfindung vorzugsweise Hydroxynaphtholblau als Indikator zur LAMP-Reaktion zugesetzt, wodurch eine erfolgreiche Amplifikation der Bezugssequenz mit Seq.-ID Nr. 1 anhand eines leicht erkennbaren Farbumschlags angezeigt wird.

In weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformen wird das Ausmaß des Farbumschlags aber auch semiquantitativ bewertet, um – mit für eine Erstbefundung ausreichender Genauigkeit – den Bakterientiter und damit das Ausmaß des Befalls (z.B. von Obstbäumen) mit dem Erreger abschätzen zu können. Hierfür kommen beispielsweise Farbskalen, Inkubations-Zeitreihen oder Verdünnungsreihen zum Einsatz.

Die mittels des Verfahrens der Erfindung gewonnenen Daten können in der Folge zur raschen Integration in Feuerbrand-Infektionsrisiko-Prognosemodelle verwendet werden, um auf diese Weise zuverlässige Aussagen bezüglich eines potenziellen Befalls einer Obstplantage mit dem Erreger treffen zu können.

In einem zweiten Aspekt der Erfindung wird, wie erwähnt, die Verwendung einer Bienenpopulation zur Gewinnung von Proben von Pflanzen, die von diesen Bienen bestäubt werden, bereitgestellt, wobei die Probengewinnung mittels einer von den Bienen zu betretenden Laufstrecke vor dem Eingang zu ihrer Behausung erfolgt und die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet ist, dass

- a) als Bienenpopulation eine oder mehrere Bienenarten eingesetzt werden, die
 - i) normalerweise Populationen aus nicht mehr als 1.000 Individuen bilden und
 - ii) deren jährliche Flugzeit im April oder früher beginnt; und
- b) die zu gewinnende Probe eine DNA-Probe, insbesondere eine Probe von *Erwinia amylovora*-DNA, ist.

Der zweite Aspekt der Erfindung betrifft somit ausschließlich Wildbienen, worunter in der weitesten Definition alle Bienenarten der Überfamilie Apoidea mit Ausnahme der Honigbiene (*Apis mellifera*) zu verstehen sind.

Auf diese Weise ist gewährleistet, dass von den Bienen ein relativ begrenztes Gebiet abgeflogen wird und dabei Pollen und Nektar von nur wenigen Pflanzenarten gesammelt werden, wodurch die DNA-Probe einen relativ geringen Verdünnungs- bzw. Kontaminationsgrad aufweist, und dass die Analyse zu einem frühen Zeitpunkt, idealerweise unmittelbar nach dem Beginn der Blüte des jeweiligen Pflanzenart, durchge-

führt werden kann. Eine solch kleine Bienenpopulation ist darüber hinaus wesentlich einfacher handzuhaben und zu transportieren.

Die eingangs erwähnte Tatsache, dass von so kleinen Bienenpopulationen in einem bestimmten Zeitraum nur sehr geringe Probenmengen gewonnen werden können, stellt für die Erfinder in bevorzugten Ausführungsformen, in denen die DNA-Probe *Erwinia amylovora*-DNA ist, keinerlei Einschränkung dar, da mittels des Verfahrens gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung sogar Probenmengen von nur 80 bis 100 fg an *Erwinia amylovora*-DNA zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen und Artefakte aufgrund von kontaminierender DNA praktisch ausgeschlossen werden können, wie dies in den Beispielen klar gezeigt wird.

Daher kann eine gemäß vorliegender Erfindung ausgewählte Bienenart auch Populationen aus nicht mehr als 500 oder sogar unter 100 Individuen bilden, ohne dass die Gefahr besteht, dass keine ausreichenden DNA-Mengen gesammelt werden können. Die Probennahme kann dabei bei beabsichtigter Weiterverwendung der Tiere mittels einer am Nesteingang angebrachten Folie erfolgen. Von dieser wird nach der Expositionszeit mittels einer Pufferlösung eine Bakteriensuspension gewonnen (abgespült), die zum eigentlichen DNA-Nachweis eingesetzt wird. Alternativ kann ein Teil der Arbeiterinnen geopfert werden, in dem ihre Honigblasen ausgedrückt werden, dies ergibt pro Arbeiterin typischerweise etwa 20 bis 30 mg Honig, der zu einer Mischprobe vereinigt wird und dann dem DNA-Nachweis dient.

Abgesehen von der Größe der Population und ihrer Flugzeit ab April oder früher sind die Bienenarten nicht speziell eingeschränkt. Unter Population ist hierin im weitesten Sinne jede Art von Bienengemeinschaft in einem begrenzten Areal zu verstehen, also sowohl entsprechend kleine "Staaten", Völker oder Kolonien in einem Bienenstock oder einem unterirdischen Nest als auch eine entsprechende Anzahl an Bienen auf einer bestimmten Bodenfläche, z.B. von einigen Quadratmetern. Theoretisch kommen daher auch Solitärbiene für die vorliegende Erfindung in Frage, d.h. Bienen, die jeweils alleine in unterirdischen Nestern oder Mauerspalten leben und dort ihre Nachkommen aufziehen, solange eine größere Anzahl von ihnen pro Quadrat-

meter anzutreffen ist. Es kann vor jedem Eingang zu ihren Behausungen eine entsprechende Laufstrecke, z.B. eine Folie, vorgesehen werden, und am Ende der Probennahme werden die mittels aller Laufstrecken gesammelten Proben einfach kombiniert.

5

Vorzugsweise werden jedoch soziale Bienenarten verwendet, die eine gemeinsame Behausung, d.h. in einem Stock oder Nest, nutzen, um die Anzahl an erforderlichen Laufstrecken gering zu halten und dennoch in kurzer Zeit die notwendige Probenmenge sammeln zu können. Gemäß der Erfindung können den Bienen auch Nisthilfen zur Verfügung gestellt werden, d.h. vorgefertigte Stöcke oder Nester, wobei unter Letzteren auch eine größere Anzahl an Niströhren für Solitärbiene auf einer Fläche von wenigen Quadratmetern zu versehen ist.

10

Der Fachmann wird ohne übermäßiges Experimentieren in der Lage sein, die für den jeweiligen Zweck am besten geeigneten Bienenarten auszuwählen, wobei vor allem die geografische Lage, das dortige Klima, die Bodenbeschaffenheit und natürlich die zu bestäubende und zu untersuchende Pflanzenart zu berücksichtigen ist. Vorzugsweise ist die Bienenart aus den Gattungen Hummel, Sandbiene und Mauerbiene ausgewählt, wobei noch bevorzugter eine Hummelart eingesetzt wird. Deren Flugzeit beginnt typischerweise im März, bei manchen Sandbienenarten sogar schon im Februar, und Hummeln sind besonders früh im Jahr unterwegs, wie nachstehend noch ausführlicher erläutert wird.

15

20

Von den zahlreichen Hummel-, Sandbienen- und Mauerbienenarten – in Mitteleuropa kommen etwa 40 Hummel-, 150 Sandbienen- und etwa 50 Mauerbienenarten vor – sind die meisten Solitärbiene. Allerdings ist auch eine soziale Lebensweise, d.h. ein gemeinsames Nest, mancher der eigentlich als Solitärbiene bekannten Bienenarten bekannt. Wird daher in einem bestimmten Gebiet, wie z.B. einer Obstplantage, ein Nest mit einer Laufstrecke am Nesteingang als Nisthilfe bereitgestellt, kann es von einer dort gezielt ausgesetzten Bienenart gemeinsam genutzt werden.

25

30

Verschiedene Hummelarten bilden allerdings auch Kolonien oder Staaten aus etwa 50 bis 600, mitunter bis zu 1.000 Tieren und einer Königin. Für Hummeln reicht bereits eine Mindesttemperatur von nur 6-9 °C aus, um ausfliegen zu können (bei Königinnen sogar nur 2 °C), da sie ein dichtes Haarkleid besitzen, vor allem aber ihre
5 Körpertemperatur durch Vibrationen der Brustmuskulatur, wobei die Flügel abgekoppelt werden, selbst erhöhen können. Diese Fähigkeit ist unter den verschiedenen Bienengattungen einzigartig. Im Vergleich dazu benötigen Honigbienen üblicherweise Außentemperaturen von 10-15 °C. Darüber hinaus sind Hummeln weitaus effizientere Bestäuber und damit Probensammler als andere Bienengattungen, insbesondere
10 als die Honigbiene. So produziert beispielsweise ein Hummelstaat bis zu 15-mal so viel Honig wie ein gleich großer bzw. kleiner Staat Honigbienen.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird zur Probengewinnung ein Stamm der roten Mauerbiene, *Osmia bicornis* (auch als *Osmia rufa* bekannt), oder der Erdhummel, *Bombus terrestris*, eingesetzt.
15

Die rote Mauerbiene zählt zu den Bauchsammlern, d.h. sie tragen Pollen an einem Haarsaum am Bauch ("Bauchbürste"), was die gesammelte Menge an Pollen bei der Probennahme mittels Laufstrecke gegenüber Beinsammlern erhöht. Sie ist allgemein
20 dicht behaart, was ihr eine hohe Temperaturreistenz verleiht als anderen Bienenarten, und in Europa weit verbreitet, von Südeuropa bis Südschweden. Ihre Flugzeit beginnt Anfang April, in wärmeren Gefilden bereits Ende März. Kaum eine andere Bienenart ist so flexibel bei der Annahme von Nistmöglichkeiten, was ihre weite Verbreitung erklärt und ihre Ansiedlung in Obstplantagen stark vereinfacht. Die rote
25 Mauerbiene lebt zwar typischerweise solitär, doch ist es möglich, eine größere Anzahl an Individuen in einem begrenzten Bereich, z.B. unter einem Reetdach, anzusiedeln. Durch Vorsehen weniger Zugangsöffnungen zu solch einem Nistbereich kann eine effiziente Beprobung erfolgen.

30 Die Erdhummel, genauer gesagt die dunkle Erdhummel, *Bombus terrestris*, ist in Europa ebenfalls weit verbreitet und beginnt – auch in Mitteleuropa – bereits im März auszufliegen. Sie bildet typischerweise Völker aus 100 bis 500 Individuen, und zwar

sowohl unter- als auch überirdisch, was sowohl ihre Ansiedlung als auch die Beprobung stark vereinfacht.

Die mittels der Wildbienen zu gewinnende DNA ist vorzugsweise Schädlings-DNA, insbesondere *Erwinia amylovora*-DNA, die dann insbesondere nach dem Verfahren gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung amplifiziert und analysiert werden kann.

In einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Set zur Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung bereit, das Folgendes umfasst:

- a) eine transportsicher verpackte Bienenpopulation wie oben beschrieben und
- b) Mittel zum Analysieren der in der zu gewinnenden Probe enthaltenen DNA.

Mittels eines solchen Sets können die von den Bienen gewonnenen DNA-Proben vor Ort, also z.B. direkt in einer Obstplantage, analysiert werden. Die Analysenmittel umfassen dabei vorzugsweise Mittel zum Amplifizieren der DNA mittels PCR- oder LAMP-Verfahren, wodurch – beispielsweise im Vergleich mit ELISA-Methoden – auch sehr geringe Probenmengen ausreichen, um die DNA zuverlässig analysieren zu können. Noch bevorzugter umfassen die Amplifikationsmittel Instrumente zur Durchführung eines LAMP-Verfahrens, da LAMP ("*loop-mediated isothermal amplification*") im Vergleich mit PCR- ("*polymerase chain reaction*") Amplifikation keine Thermocycler erfordern.

Die Analysenmittel des Sets umfassen daher vorzugsweise weiters spezifische Primer für die LAMP-Reaktion, insbesondere spezifische Primer, die die Sequenzen der Seq.-ID Nrn. 2 bis 7 aufweisen, wie oben beschrieben.

Weiters umfasst das Set gegebenenfalls eine Heizvorrichtung und/oder Mittel zur Visualisierung von Produkten oder Nebenprodukten der Amplifikation, wobei ein bevorzugtes Visualisierungsmittel der Farbindikator Hydroxynaphtholblau ist.

Die optionale Heizvorrichtung braucht dabei vorzugsweise nur eine Temperatur von 60-65 °C zu erzeugen, da dies für LAMP-Verfahren durchaus ausreicht und einen

mobilen Einsatz im Feld weiter vereinfacht: Für diese Temperaturen reicht beispielsweise auch Heißwasser in einer Thermoskanne aus, die somit ebenfalls unter die Definition der Heizvorrichtung fällt. Alternativ dazu können etwa batteriebetriebene Widerstandsheizungen, als so genannte "Taschenwärmer" bekannte Systeme, die
5 beispielsweise auf der Oxidation von auf einem Träger (z.B. Watte) fein verteiltem Eisenpulver oder auf frei werdender Kristallisationswärme nach mechanischer Auslösung beruhen, oder auch Parabolspiegel zur Bündelung von Sonnenstrahlen eingesetzt werden, oder auch spannungsunabhängige oder Niedervolt-Wärmegeneratoren, wie bereits erwähnt.

10

Hydroxynaphtholblau ist als Visualisierungsmittel bevorzugt, da in Gegenwart von Erdalkalimetallionen ein Farbumschlag von violett nach blau stattfindet, der mit bloßem Auge gut zu erkennen ist. Die Erdalkalimetallionen stammen beispielsweise von einem Magnesiumpyrophosphat-Niederschlag, der als Nebenprodukt der LAMP-Reaktion anfällt und eine Trübung verursacht, die als solche ebenfalls zur Visualisierung
15 herangezogen werden könnte. Der Farbumschlag ist jedoch schon bei geringeren Mengen an Amplifikationsprodukten gut sichtbar und daher bevorzugt.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung in ihrem dritten Aspekt
20 umfasst das Set alle notwendigen Mittel, um damit das Nachweisverfahren gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung durchführen zu können.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung bestimmter, oben definierter Wildbienenarten, einschließlich der Gattung Hummel, zur DNA-Probengewinnung von Pflanzen, insbesondere von Nutzpflanzen wie Obst- und Gemüsepflanzen, können Informationen über den Befall der jeweilige Pflanze mit einem Erreger wie etwa *Erwinia amylo-*
25 *vora* bereits kurz nach Beginn der Blütezeit erlangt werden, was mehr Zeit für eventuell erforderliche Gegenmaßnahmen zur Verfügung stellt. Vor allem bei Einsatz des Sets gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung, insbesondere in Kombination mit dem
30 oben beschriebenen spezifischen Primersatz der Seq.-ID Nrn. 2 bis 7, können auf zuverlässige Weise Informationen über die von den Wildbienen angeflogenen Pflanzen erhalten werden.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Die Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen unter Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen näher beschrieben. Diese zeigen Folgendes:

- 5 Die Fig. 1 und 2 zeigen jeweils Ergebnisse von Tests auf Kreuzreaktionen des erfindungsgemäßen Primersets durch Verifizierung der Spezifität mittels Gelelektrophorese (2 %, oben) und mittels Farbumschlag (unten).

- 10 Die Fig. 3 und 4 zeigen jeweils die Ergebnisse einer Gelelektrophorese bei Optimierungsversuchen mit den erfindungsgemäßen Primern.

- Die Fig. 5 und 6 zeigen Ergebnisse der Untersuchung der Nachweisgrenzen des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels Gelelektrophorese (2 %, oben) und Farbumschlag (unten).

15

BEISPIELE

Beispiel 1: Auswahl der Bezugssequenz und der Primer

- Als Bezugssequenz für den Nachweis des Erregers und Zielsequenz für die Entwicklung von Primern zur spezifischen Amplifikation von genomischer *E. amylovora*-DNA wurde, wie erwähnt, jener Sequenzabschnitt des hypothetischen Proteins AMY1267 des Stamms Ea273 (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/erwinia-amylovora.html>) verwendet, der in Seq.-ID Nr. 1 dargelegt ist. Sequenzinformationen von AMY1267 wurden kürzlich für die Entwicklung eines Taqman-Echtzeit-PCR-Tests auf *E. amylovora* verwendet (Gottsberger, 2010). Vergleiche der ausgewählten Zielsequenz mit Seq.-ID Nr. 1 in der NCBI Datenbank im Nucleotide Blast-Abfragemodus (www.ncbi.nlm.nih.gov) ergab keine Ähnlichkeit mit öffentlich zugänglichen Sequenzen außer mit *E. amylovora*; siehe die nachstehende Tabelle 1.
- 20
- 25

Tabelle 1

Zugriffs-Nr.	Beschreibung	Abfrage- erfassung	maximale Identität
FN434113.1	<i>Erwinia amylovora</i> CFBP1430 complete genome	100%	100%
FN666575.1	<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946 chromosomal sequence	100%	100%
FR719190.1	<i>Erwinia amylovora</i> ATCC BAA-2158, whole genome shotgun sequence, contig 10	99%	100%

Die Lage der Primerset-Sequenzen und deren Vergleich schließt theoretisch die Bildung von Artefakten durch Primerfehlpaarung aus. Das in nachfolgender Tabelle 2 aufgelistete und im Sequenzprotokoll als Seq.-ID Nr. 2 bis 7 angeführte Primerset wurde mit Hilfe der Online-Software "PrimerExplorer V4" (<http://primerexplorer.jp/e/>, Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan) generiert. Die Bezeichnungen der Primer (erste Spalte) wurden analog zu Notomi et al. (2000) und Nagamine et al. (2002) gewählt.

Tabelle 2

Bez.	Primer-Typ	Sequenz (5'-3' Orientierung)
15-F3	forward outer	CTTTTTTAAGAGAGGCAGCA
15-B3	backward outer	TTGTCTGAATCCAGATGTCT
15-FIP	forward inner	GGAGACCGATCTTTTACAGACTTTATTTCGACGAACGTTTATACGA
15-BIP	backward inner	GAGCTTCGAACATAGTCAAGGGGAAGATTTATGCCTTCCAGAAG
15-LF	loop forward	CAGAACTTACCATATAATCA
15-LB	loop backward	ACGGCGCAAAAAAT

Beispiel 2: Spezifität des Verfahrens

Die erfindungsgemäßen Primer der Seq.-ID Nrn. 2 bis 7 wurden mit 64 *E. amylovora*-Stämmen (Gottsberger, 2010), siehe nachstehende Tabelle 3, und mit 17 Proben von Fremd-DNA, siehe nachstehende Tabelle 4, auf ihre Spezifität getestet. Dabei wurde Amplifikation ausschließlich bei den *E. amylovora*-Proben beobachtet, und es wurden keinerlei Kreuzreaktionen mit Fremd-DNA festgestellt. Selbst nahe verwandte *Erwinia*-Spezies führten zu keinen Kreuzreaktionen (siehe die Ergebnisse für *E. persicina*, *E. pyrifoliae*, *E. tasmaniensis* und *E. piriflorinigrans*).

Tabelle 3

Spezies	Ursprung, Stamm/Sorte	Amplifikation
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 295/93	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 674/94	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 273/98	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 329/98	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 511/98	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 963/99	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1851/01	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 2642/01	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 855/02	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 3218/02	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 3331/02	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 3910/02	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 3962/02	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 3975/02	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1041/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1141/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1144/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1168/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1170/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1195/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 1672/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 374/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 376/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 377/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 378/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 2663/03	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 408/05	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 769/05	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 703/06	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 384/07	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 2803/07	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 3204/07	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 3392/08	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 498/09	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 568/09	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 602/09	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 603/09	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 74/10	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 313/10	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 397/10	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 398/10	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 596/10	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 628/10	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES I-284/10	+
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP 1232	+
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP 1399	+
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP 1430	+
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP 2151	+
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP 2584	+
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP 3042	+
<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP 3794	+
<i>Erwinia amylovora</i>	DSM 17948	+
<i>Erwinia amylovora</i>	GCCM 909	+
<i>Erwinia amylovora</i>	Ea12	+
<i>Erwinia amylovora</i>	115-22	+
<i>Erwinia amylovora</i>	7/74	+
<i>Erwinia amylovora</i>	IVIA 1509-B	+

<i>Erwinia amylovora</i>	IVIA 1892-1	+
<i>Erwinia amylovora</i>	NCPPB 2292	+
<i>Erwinia amylovora</i>	NCPPB 595	+
<i>Erwinia amylovora</i>	OMP BO 1204.1/94	+
<i>Erwinia amylovora</i>	AGES 681/06	+
<i>Erwinia amylovora</i> pEA29-defizient	IVIA 1596	+
<i>Erwinia amylovora</i> pEA29-defizient	IVIA 1614-2	+

Tabelle 4

Species	Ursprung, Stamm/Sorte	Amplifikation
<i>Erwinia persicina</i>	AGES 556/10	-
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	CFBP 4171	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	AGES R95-91	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	AGES 599	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	AGES 701	-
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	AGES 37/10	-
<i>Erwinia piriflorinigra</i>	CFBP 5888	-
<i>Erwinia billingiae</i>	CFBP 6830	-
<i>Malus x domestica</i>	'Rewena' DNA (Jedlersdorf 2008)	-
<i>Pyrus communis</i>	'Abbe Fetel' DNA (Jedlersdorf 2008)	-
<i>Homo sapiens</i>	DNA (Mundhöhlenabstrich 2010)	-
<i>Apis mellifera</i>	DNA (Bienen, AGES, 2010)	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	NCTC 10341	-
<i>Bacillus coagulans</i>	NCTC 10334	-
<i>Bacillus cereus</i>	NCTC 2599	-
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCTC 10315	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 65389	-

Bezugsquellen:

OMP BO	Osservatorio delle Malattie delle Piante, Bologna, Italien
CFBP	Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, Frankreich.
AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Institut für Pflanzengesundheit, Wien, Österreich.
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland.
IVIA	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada (Valencia), Spanien.
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Plant Pathology Laboratory, Harpenden, Hertfordshire, U.K.
GCCM	Greek Coordinated Collections of Microorganisms, Benaki Phytopathological Institute, Athens, Griechenland.
NCTC	National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, U.K.
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, Maryland, USA.

5

In den Fig. 1 und 2 sind jeweils die Ergebnisse von Tests auf Kreuzreaktionen des erfindungsgemäßen Primersets durch Verifizierung der Spezifität mittels Gelelektrophorese (2 %, oben) und Farbumschlag (unten) dargestellt. Ganz links werden als Positivkontrollen die Ergebnisse die Reaktion von *E. amylovora*-DNA gezeigt, und

ganz rechts ("M") jene des DNA-Markers Lambda Eco47I. Dazwischen finden sich Ergebnisse der ersten 8 (Fig. 1) bzw. der letzteren 9 (Fig. 2) Fremd-DNA-Proben aus Tabelle 4. Es ist deutlich zu erkennen, dass Fremd-DNA durchwegs eindeutig negative Ergebnisse lieferte.

5

Beispiel 3: Optimierung hinsichtlich Amplifikationseffizienz

Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten (Betain, MgSO_4 , Primer FIP, BIP, F3, B3, LF, LB, Desoxynucleosidtriphosphate, Hydroxynaphtholblau, *Bst*-DNA-Polymerase) und die Reaktionstemperatur des Verfahrens der Erfindung wurden hinsichtlich Amplifikationseffizienz optimiert. Generell verlief die Amplifikation über einen breiten Konzentrations- sowie Temperaturbereich zufrieden stellend. Die maximale Amplifikation wurde mit folgenden Bedingungen in 25 μl Reaktionsvolumen erreicht: 1 x Reaktionspuffer (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland; 20 mM Tris-HCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0,1 % Triton X-100, pH 8,8), 8 IE *Bst*-DNA-Polymerase, 8 mM zusätzliches MgSO_4 (10 mM Endkonzentration), 0,7 M Betain, 0,18 μM 15-F3 und 15-B3 Primer, 1,62 μM 15-FIP und 15-BIP Primer, 4,2 μM 15-LF und 15-LB Loop Primer, 1,6 mM Desoxynucleosidtriphosphate, 120 μM Hydroxynaphtholblau. Inkubation bei 63 °C für 30 min (Amplifikation) und bei 80 °C für 3 min (Enzym-Inaktivierung) in einem Eppendorf EP Gradient Thermocycler.

20

In Fig. 3 ist exemplarisch ein Beispiel für einen Optimierungsschritt gezeigt. Mit 1 und 2 sind die Gelelektrophorese (2 %) unterzogenen LAMP-Produkte einer nicht optimierten (1) bzw. einer optimierten (2) Reaktion gekennzeichnet. "M" bezeichnet erneut den DNA-Marker Lambda Eco47I.

25

Fig. 4 stellt die Ergebnisse einer Gelelektrophorese (2 %) von Produkten der Optimierung des Primerverhältnisses dar. Gezeigt werden mehrere Verhältnisse der Primer 15-F3, 15-B3 : 15-FIP, 15-BIP in ganzzahligen Schritten von 1:7 bis 1:11. Wie klar zu erkennen ist, lag das Optimum bei einem Verhältnis von 1:9. Wiederum bezeichnet "M" den DNA-Marker Lambda Eco47I.

30

Beispiel 4 - Adaptierung des Verfahrens bezüglich des Farbumschlags

Für den Praxiseinsatz ist aus obigen Gründen ein möglichst kontrastreicher Farbumschlag der Reaktion anzustreben. Da die Anfangskonzentrationen der Mg^{2+} -Ionen und Desoxynucleosidtriphosphate die Färbung mit Hydroxynaphtholblau (HNB) beeinflussen, wurde das optimierte Verfahren an den Praxiseinsatz angepasst. Dazu wurde die Endkonzentration von $MgSO_4$ von 10 mM auf 9 mM und jene der Desoxynucleosidtriphosphate von 1,6 mM auf 1,2 mM verringert. Durch diese Anpassungen konnte ein optimal erkennbarer Farbumschlag bei gleichzeitig noch sehr guter Amplifikationsrate erreicht werden.

Beispiel 5 – Empfindlichkeit des Verfahrens

Zur Überprüfung der Nachweisgrenzen wurden *E. amylovora*-DNA-Verdünnungsreihen bzw. Verdünnungen von Bakterienzellen hergestellt und im Verfahren der Erfindung eingesetzt. Dabei konnten bei einer Inkubationsdauer von 45 min in einem 25- μ l-Reaktionsansatz noch 80 bis 100 fg DNA zuverlässig nachgewiesen werden, wie dies in Fig. 5 gezeigt wird. Dies entspricht rechnerisch bei einer Genomgröße von *E. amylovora* von $3,9053 \times 10^{-9}$ μ g etwa 20 bis 25 Bakterienzellen. Unter denselben Reaktionsbedingungen konnten etwa 16 bis 20 Bakterienzellen im Ansatz zuverlässig nachgewiesen werden, wie in Fig. 6 gezeigt wird. Gelegentlich, aber nicht zuverlässig reproduzierbar konnte selbst 1 einzige Bakterienzelle bzw. 1 ag DNA pro Reaktionsansatz nachgewiesen werden. Für die Infektion von Apfelblüten im Freiland sind etwa 10^5 - 10^6 Bakterien/Blüte (Taylor et al., 2003) nötig. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können somit im Praxiseinsatz durch Farbumschlag Bakterientiter weit unterhalb der Infektionsschwelle nachgewiesen werden.

In den Fig. 5 und 6 werden die Ergebnisse der Verifizierung der Amplifikation mittels Gelelektrophorese (2 %, oben) und Farbumschlag (unten) gezeigt. In Fig. 5 sind von links nach rechts die Ergebnisse für 100, 80, 60, 40, 20 und 0 fg an isolierter *E. amylovora*-DNA dargestellt und in Fig. 6 jene für 20, 18, 16, 14, 12, 10 und 0 KBE von *E. amylovora*. "M" bezeichnet erneut den DNA-Marker Lambda Eco47I.

Literatur

An, L., Tang, W., Ranalli, T.A., Kim, H.J., Wytiaz, J., Kong, H., *Characterization of a thermostable helicase and its participation in helicase-dependent amplification*, J. Biol. Chem. 280, 28952-28958 (2005).

Compton, J., *Nucleic acid sequence-based amplification*, Nature 350, 91-92 (1991).

Gill, P., Ghaemi, A., *Nucleic acid isothermal amplification technologies*, Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids 27, 224-243 (2008).

Gottsberger, R.A., *Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of Erwinia amylovora*, Letters in Applied Microbiology 51, 285-292 (2010).

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K.-I., *Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue*, Biotechniques 46, 167-172 (2009).

Hadersdorfer, J., Neumüller, M., Treutter, D., Fischer, T.C., *Fast and reliable detection of Plum pox virus in woody Sharka host plants using the Blue LAMP protocol*, 2010 eingereicht bei Annals of Applied Biology (2011).

Jones, A.L., *Evaluation of the computer model MARYBLTY for predicting fire blight blossom infection on apple in Michigan*, Plant Dis. 76, 344-347 (1992).

Lightner, G.W., Steiner, P.W., *Computerization of blossom blight prediction model*, Acta Hort. (ISHS) 273, 159-162 (1990).

Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., David, C., Thomas, D.C., Ward, D.C., *Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification*, Nature Genetics 19, 225-232 (1998).

Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T., *Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers*, Molecular and Cellular Probes 16, 223-229 (2002).

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*, Nucleic Acids Res. 28, E63 (2000).

Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., Armes, N.A., *DNA detection using recombination proteins*, PLoS Biol. 4(7), E204 (2006).
DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204

Steiner, P.W., *Predicting apple blossom infections by Erwinia amylovora using the MARYBLTY model*, Acta Hort. (ISHS) 273, 139-148 (1990).

- Taylor, R.K., Hale, C.N., Henshall, W.R., Armstrong, J.L., Marshall, J.W., *Effect of inoculum dose on infection of apple (Malus domestica) flowers by Erwinia amylovora*, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 31, 325-333 (2003).
- 5 Temple, T.N., Johnson, K., *Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Erwinia amylovora on Pear and Apple Fruit Flowers*, Plant Dis. 95(4), 423-430 (2011).
- 10 Thomas, D., Nardone, G., Randall, S., *Amplification of Padlock Probes for DNA Diagnostics by Cascade Rolling Circle Amplification or the Polymerase Chain Reaction*, Archives of Pathology and Laboratory Medicine 123, 1170-1176 (1999).
- Vincent, M., Xu, Y., Kong, H., *Helicase-dependent isothermal DNA amplification*, EMBO Reports 5, 795-800 (2004).
- 15 Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., Malinowski, D.P., *Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique*, Nucleic Acids Res. 20, 1691-1696 (1992).
- 20 Alexandrova, M., Cimini, B., Bazzi, C., Carpana, E., Massi, S., Sabatini, A.G., *The Role of Honeybees in Spreading Erwinia amylovora*, Acta Hort. (ISHS) 590, 55-60 (2006).
- 25 Sabatini, A.G., Alexandrova, M., Carpana, E., Ghini, S., Girotti, S., *Relationships between Apis mellifera and Erwinia amylovora: Bioindication, Bacterium Dispersal and Quarantine Procedures*, Acta Hort. (ISHS) 704, 155-162 (2002).

SEQUENZPROTOKOLL

	<110>	Technische Universität Wien						
5	<120>	LAMP-Verfahren zum Nachweisen von <i>Erwinia amylovora</i>						
	<130>	111794						
	<160>	7						
10	<170>	NCBI Blast						
	<210>	1						
	<211>	220						
15	<212>	DNA						
	<213>	Erwinia amylovora						
	<220>							
	<221>	CDS						
20	<222>	(1) ... (220)						
	<223>	Kodierende Sequenz für das hypothetische Protein AMY1267 von Stamm Ea273						
	<400>	1						
25		ttgtctgaat	ccagatgtct	cttttttaga	agatttatgc	cttccagaag	gtcattttta	60
		tcagcatgaa	taactathtt	ttgcgcgcgc	cccttgacta	tggtcgaagc	tctcattgcc	120
		gtggagaccg	atcttttaca	gactttaata	tcagaactta	ccatataatc	ataaatgagt	180
		tcgtataaac	gttcgtcgaa	tgctgcctct	cttaaaaaag			220
	<210>	2						
30	<211>	20						
	<212>	DNA						
	<213>	Künstliche Sequenz						
	<220>							
35	<223>	LAMP-Primer						
	<400>	2						
		CTTTTTTAAG	AGAGGCAGCA					20
40	<210>	3						
	<211>	20						
	<212>	DNA						
	<213>	Künstliche Sequenz						
	<220>							
45	<223>	LAMP-Primer						
	<400>	3						
		TTGTCTGAAT	CCAGATGTCT					20
50	<210>	4						
	<211>	45						
	<212>	DNA						
	<213>	Künstliche Sequenz						

	<220>					
	<223>	LAMP-Primer				
5	<400>	4				
	GGAGACCGAT	CTTTTACAGA	CTTTATTCTGA	CGAACGTTTA	40	
	TACGA				45	
10	<210>	5				
	<211>	44				
	<212>	DNA				
	<213>	Künstliche Sequenz				
15	<220>					
	<223>	LAMP-Primer				
	<400>	5				
	GAGCTTCGAA	CATAGTCAAG	GGGAAGATTT	ATGCCTTCCA	40	
20	GAAG				44	
	<210>	6				
	<211>	20				
	<212>	DNA				
	<213>	Künstliche Sequenz				
25	<220>					
	<223>	LAMP-Primer				
	<400>	6				
30	CAGAACTTAC	CATATAATCA			20	
	<210>	7				
	<211>	14				
	<212>	DNA				
35	<213>	Künstliche Sequenz				
	<220>					
	<223>	LAMP-Primer				
40	<400>	7				
	ACGGCGCAAA	AAAT			14	

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweisen von *Erwinia amylovora* in einer Probe, indem eine oder mehrere *Erwinia amylovora*-Sequenzen in der Probe unter Anwendung der LAMP-Methode mittels für diese Sequenz(en) spezifischer Primer amplifiziert und gegebenenfalls mit bekannten Sequenzen verglichen werden,
5 **dadurch gekennzeichnet, dass** als Referenzsequenz die genomische Sequenz der Basen 1378996 bis 1379215 des *Erwinia amylovora*-Genoms, die für das hypothetische Protein AMY1267 des Stamms Ea273 kodiert, wie in Seq.-ID Nr. 1 dargelegt, verwendet wird und der aus den Seq.-ID Nrn. 2 bis 7 bestehende Satz spezifischer LAMP-Primer zur Amplifikation eingesetzt wird.
10
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Produkte der LAMP-Amplifikation durch Gelelektrophorese und/oder mit Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit-Thermocyclern bzw. Fluorimetern analysiert werden.
15
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die LAMP-Reaktion bei 60-65 °C durchgeführt wird.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass eine erfolgreiche Amplifikation der Bezugssequenz mit Seq.-ID Nr. 1 durch Sichtprüfung mit bloßem Auge festgestellt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Hydroxynaphtholblau als Indikator zur LAMP-Reaktion zugesetzt wird und eine erfolgreiche Amplifikation der Bezugssequenz mit Seq.-ID Nr. 1 durch einen Farbumschlag angezeigt wird.
25
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Ausmaß des Farbumschlags semiquantitativ bewertet wird.
- 30 7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe von Bienen gewonnen wird.

8. Verwendung einer Bienenpopulation zur Gewinnung von Proben von Pflanzen, die von diesen Bienen bestäubt werden, wobei die Probengewinnung mittels einer von den Bienen zu betretenden Laufstrecke vor dem Eingang zu ihrer Behausung erfolgt,

5 **dadurch gekennzeichnet, dass**

- a) als Bienenpopulation eine oder mehrere Bienenarten eingesetzt werden, die
 - i) normalerweise Populationen aus nicht mehr als 1.000 Individuen bilden und
 - ii) deren jährliche Flugzeit im April oder früher beginnt; und
- b) die zu gewinnende Probe eine DNA-Probe ist.

10

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die zu gewinnende DNA-Probe eine Schädlings-DNA ist.

15

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die zu gewinnende DNA-Probe *Erwinia amylovora*-DNA ist.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Bienenart Populationen aus nicht mehr als 500 Individuen bildet.

20

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Bienenart Populationen aus nicht mehr als 100 Individuen bildet.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Flugzeit der Bienenart bereits im März oder früher beginnt.

25

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere aus den Gattungen Hummel, Sandbiene und Mauerbiene ausgewählte Bienenart eingesetzt werden.

30

15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Hummelarten eingesetzt werden.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass ein Stamm der roten Mauerbiene, *Osmia bicornis* bzw. *rufa*, oder der Erdhummel, *Bombus terrestris*, eingesetzt wird.

5 17. Set zur Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 16, Folgendes umfassend:

a) eine transportsicher verpackte Bienenpopulation wie in einem der Ansprüche 8 bis 16 definiert und

b) Mittel zum Analysieren der in der zu gewinnenden Probe enthaltenen DNA.

10

18. Set nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel Mittel zum Amplifizieren der DNA mittels PCR- oder LAMP-Verfahren umfassen.

15 19. Set nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationsmittel Instrumente zur Durchführung eines LAMP-Verfahrens umfassen.

20. Set nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel weiters spezifische Primer für die LAMP-Amplifikation umfassen.

20 21. Set nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die spezifischen Primer die Sequenzen der Seq.-ID Nrn. 2 bis 7 aufweisen.

22. Set nach einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel eine Heizvorrichtung umfassen.

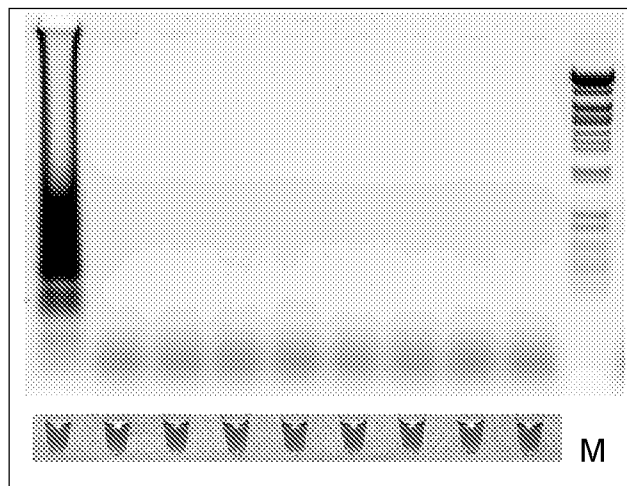
25

23. Set nach einem der Ansprüche 17 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel weiters Mittel zur Visualisierung von Produkten oder Nebenprodukten der Amplifikation umfassen.

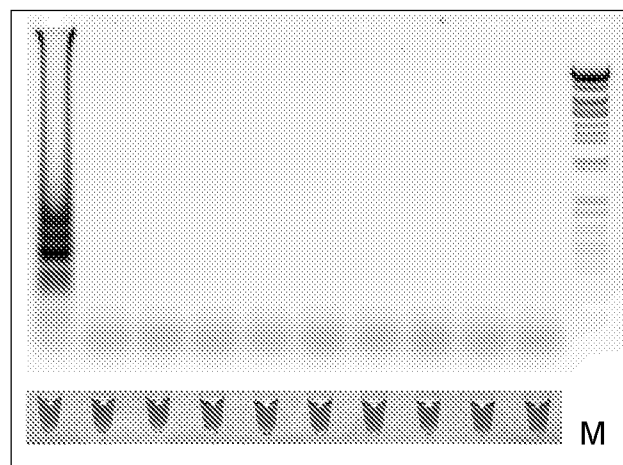
30 24. Set nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass ein Visualisierungsmittel der Farbindikator Hydroxynaphtholblau ist.

25. Set nach einem der Ansprüche 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Set zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dient.

1/6

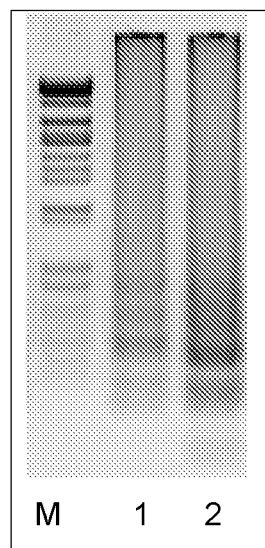


Figur 1



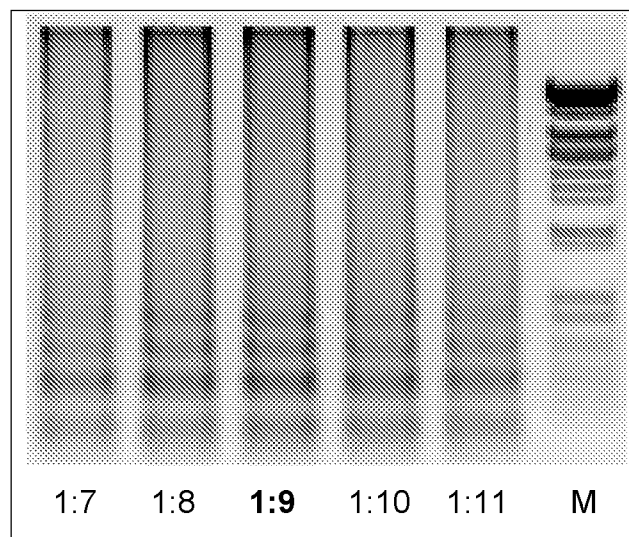
Figur 2

3/6

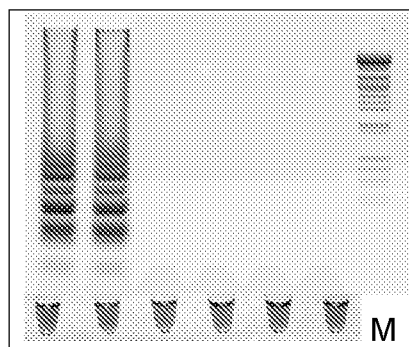


Figur 3

4/6

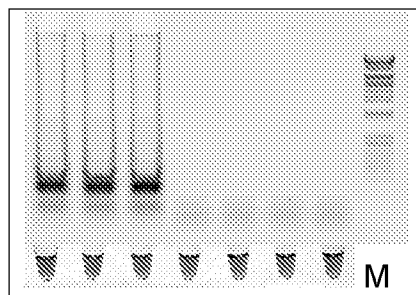
**Figur 4**

5/6



Figur 5

6/6



Figur 6