

29-4 - Entwicklung eines Nachweisverfahrens für Pflanzenviren mittels Luminex xTAG[®] Technologie am Beispiel von Tospoviren und Cucumber mosaic virus

Development of a detection method for plant viruses like tospoviruses and Cucumber mosaic virus using the Luminex xTAG[®] Technology

Niklas Bald, Jan Bergervoet², Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, Deutschland

²Wageningen UR, Plant Research International, Biointeractions and Plant Health, Droevendaalsesteeg 1, 6708PB Wageningen, Netherlands

Es wird ein nukleinsäure-basierter Test für den Nachweis von Pflanzenviren entwickelt, der die Luminex xTAG[®] Technologie nutzt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass gleichzeitig bis zu 100 verschiedene Ziele nachgewiesen werden können (Dunbar 2006). Virale RNA wird in DNA transkribiert und mittels PCR vervielfältigt, während virale DNA direkt amplifiziert wird. In einer zweiten PCR wird biotinyliertes dCTP in die DNA eingebaut und es werden spezifische Primer verwendet, die Tags aus Oligonukleotiden an ihrem 5'-Ende tragen. Diese Tags sind komplementär zu Anti-Tags auf der Oberfläche von MagPlex-TAG[™] Mikrokugeln, die mit unterschiedlichen Farbstoffen gefüllt sind. Die amplifizierte Ziel-DNA hybridisiert an eine bestimmte Mikrokugel über eine Interaktion des Tags mit dem Anti-Tag. Das Reporterprotein Streptavidin-R-Phycoerythrin bindet an das eingebaute Biotin in der DNA. Im Analyseinstrument regt ein roter Laser den Mikrokugelfarbstoff und ein grüner Laser das Reporterprotein zum Fluoreszieren an, was zusammen einen Nachweis für das Vorhandensein von Ziel-Nukleinsäuren ergibt. Im humanmedizinischen Bereich wurde diese Methode für den Nachweis verschiedener respiratorischer Viren benutzt (Mahony et al. 2007) und im phytopathologischen Sektor wurde sie für die Detektion von Begomoviren wie *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) und ihren Vektor *Bemisia tabaci* eingesetzt (van Brunshot et al. 2014).

Dieses Verfahren soll benutzt werden, um Cucumber mosaic virus (CMV) und die fünf Tospoviren Tomato spotted wilt virus (TSWV), Capsicum chlorosis virus (CaCV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Iris yellow spot virus (IYSV) und Wassermelone silver mottle virus (WSMoV) nachzuweisen. CMV ist ein ökonomisch bedeutsamer Krankheitserreger und weist mit mehr als 1200 Arten in über 100 Familien das größte Wirtsspektrum bei Pflanzenviren auf (Edwards & Christie 1991). Tospoviren sind allgemein von zunehmender Relevanz, da sie sich zusammen mit ihren Vektoren (Thripsen) weltweit ausbreiten (Prins & Goldbach 1998) und zu erheblichen Schäden an Kulturpflanzen führen können. Die fünf hier erwähnten Tospoviren sind im Gartenbau von Bedeutung, stellen aber nur eine erste Auswahl dar. Der Test soll später weitere Tospoviren umfassen. Bei Luminex-Tests konnten mit generischen CMV-Primern alle 22 getesteten CMV-Isolate der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in inokulierten Pflanzen nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Tospoviren wurden Primer erstellt, die alle 13 Tospoviren bzw. Tospovirus-Isolate der DSMZ erkannten oder spezifisch für eines der fünf oben aufgeführten Tospoviren waren. Diese Primer werden nun in Luminex-Tests eingesetzt.

Literatur

DUNBAR, S. A., 2006: Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin. Chim. Acta* **363** (1-2), 71-82.

EDWARDS, J. R., R. G. CHRISTIE: *CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes*. Boca Raton, CRC Press, 294-303.

MAHONY, J., S. CHONG, F. MERANTE, S. YAGHOUBIAN, T. SINHA, C. LISLE, R. JANECZKO: Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay. *J. Clin. Microbiol.* **45** (9), 2965-2970.

PRINS, M., R. GOLDBACH, 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiol.* **6** (1), 31-35.

van Brunshot, S. L., J. H. W. Bergervoet, D. E. Pagendam, M. de Weerd, A. D. W. Geering, A. Drenth, R. A. A. van der Vlugt, 2014. A bead-based suspension array for the multiplexed detection of begomoviruses and their whitefly vectors. *J. Virol. Methods* **198**, 86-94.