
ENTWICKLUNG EINES PRAXISTAUGLICHEN DIAGNOSEVERFAHRENS FÜR *TOBACCO RATTLE VIRUS* IN KARTOFFEL (TRV2GO)

Lena Freund, Jost Muth, Stefanie Hartje, Hans Reinhard Hofferbert

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Tobacco Rattle Virus (TRV)

Die durch TRV verursachte **viröse Eisenfleckigkeit** der Kartoffel wird zunehmend zu einem Problem. Die entstehenden Knollenmängel können nicht nur zu Annahmeverweigerung ganzer Partien führen, sondern sortenabhängig eine Verzögerung des Auflaufens der Pflanzen und Ertragseinbußen bis zu 62% bewirken.

Da bisher keine absoluten Resistenzen bekannt sind, ist die **frühe und sichere Diagnose** infizierter Kartoffelpflanzen essentiell für die Bekämpfung des Virus.

Während das antiserumbasierte Nachweisverfahren (ELISA) lediglich das Hüllprotein des Virus nachweist, kann der Nachweis der Virus RNA mittels RT-PCR auch Hüllprotein-freie Infektionen detektieren (NM-Typ). Da diese Methode technisch sehr aufwendig ist, setzt sie ein Labor mit Fachpersonal und modernen Analysegeräten voraus.

Im Projekt TRV2GO wurde daher ein **einfaches, praxistaugliches Verfahren** für die *point-of-care* Diagnose für TRV in Kartoffeln entwickelt.



Abb. 1: Symptomausprägung bei TRV-Befall

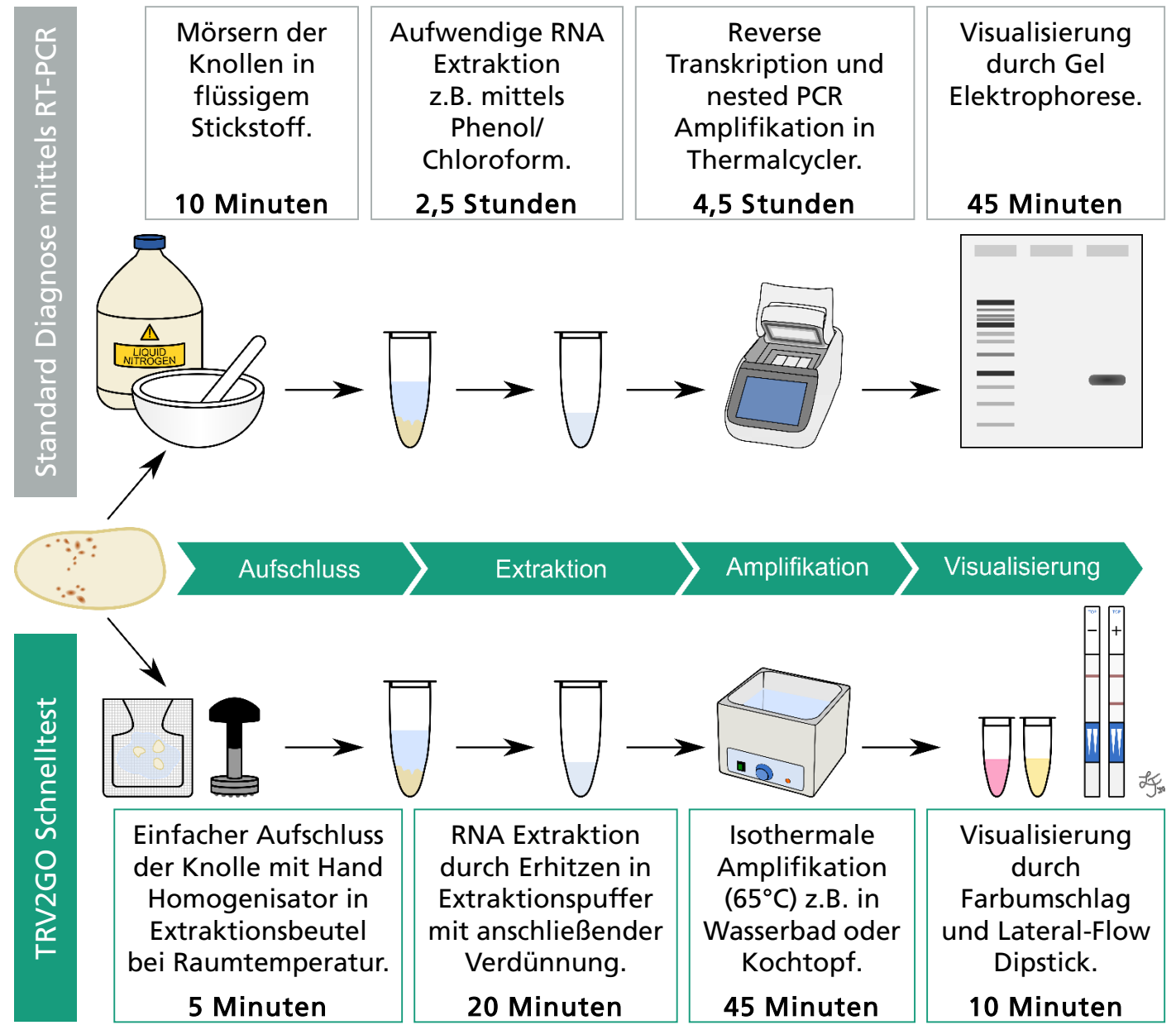
Häufig ist der Befall erst nach dem Durchschneiden der Knollen sichtbar: ring- oder bogenförmige, korkartige, rotbraune Stellen. Bei Speise- und Veredelungskartoffeln ist dies ein entscheidender Qualitätsmangel, wodurch die Marktfähigkeit der Partien herabgesetzt wird.

TRV Diagnoseverfahren

Im TRV2GO Schnelltest kommt eine isothermale Amplifikation zum Einsatz:

die Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). Diese benötigt im Gegensatz zur klassischen RT-PCR keine gereinigte RNA und kann bei konstanter Temperatur (60-65°C) ohne teure Laborgeräte durchgeführt werden. Durch den Einsatz von markierten Detektionssonden, kann das Produkt nach der Amplifikation auf einem Lateral-Flow Dipstick (ähnlich einem Schwangerschaftstest) spezifisch nach-gewiesen werden.

Abb. 2: Vergleich des Standard TRV Diagnoseverfahrens mit dem TRV2GO Schnelltest.



TRV2GO Schnelltest

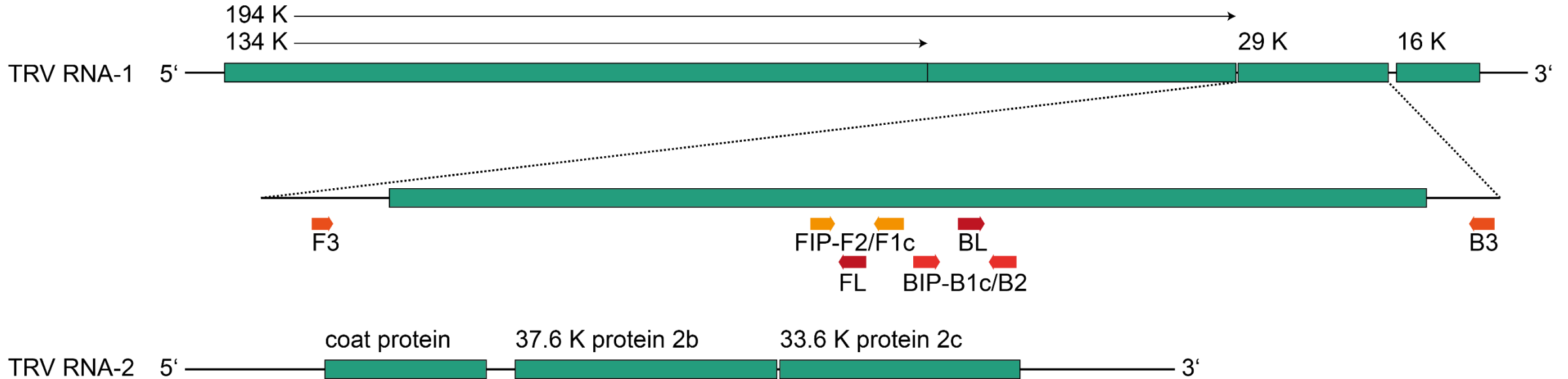


Abb. 3: Tobacco Rattle Virus (TRV) Genom

Schematische Darstellung des TRV Genoms des Isolats MI-1 bestehend aus RNA-1 und RNA-2. Offene Leseraster (ORFs) sind als Vierecke dargestellt und die Proteingrößen in kDa durch K gekennzeichnet. In der Vergrößerung des 29 K Transport Proteins sind die Positionen der 6 für die RT-LAMP verwendeten Primer eingezeichnet.

Während bei der klassischen PCR nur 2 genspezifische Primer eingesetzt werden, benötigt die LAMP Reaktion 4-6 Primer, die spezifisch an 6-8 Zielregionen binden.

TRV2GO Schnelltest

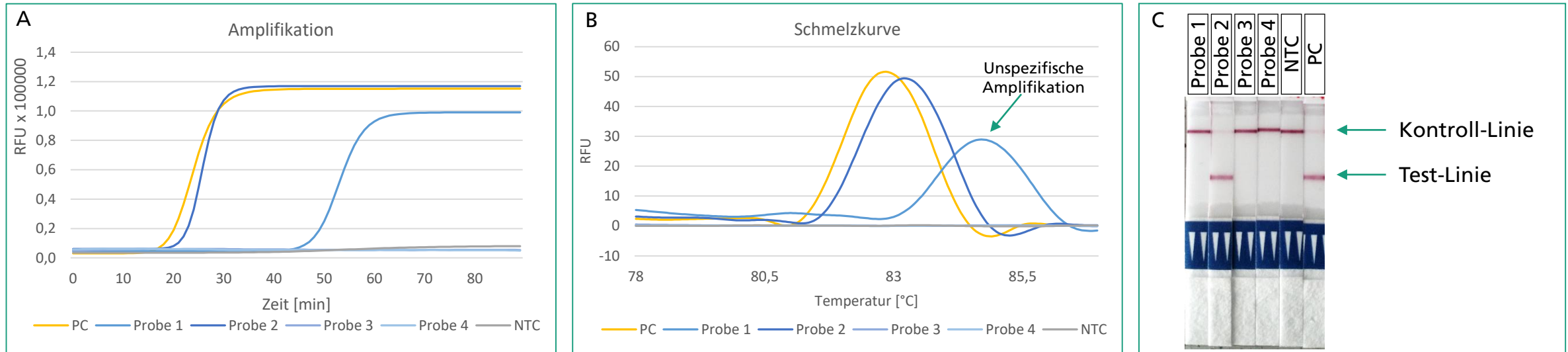


Abb. 4: Beispiel einer RT-LAMP mit Lateral-Flow Dipstick Analyse.

A: RT-LAMP Amplifikation ausgewählter TRV positiver und negativer Knollenproben. B: Schmelzkurvenanalyse mit spezifischen und unspezifischen Amplifikationen. C: Lateral-Flow Dipstick Analyse unterscheidet erfolgreich zwischen spezifischer und unspezifischer Amplifikation.

Ein Nachteil isothermaler Methoden sind unspezifische Amplifikationen, die vor allem bei einfachen Extrakten als Template auftreten. Durch die nachgeschaltete Dipstick Analyse können diese aber von spezifischen Amplifikationen unterschieden werden, was den TRV2GO Schnelltest als *point-of-care* Diagnostik einsetzbar macht.

Bei einem Vergleich des Schnelltests mit der Standard RT-PCR Analytik zeigte sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse von über 90%.

Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe der neuen TRV Diagnosetechnik ist eine **schnelle, einfache und robuste Untersuchung von Knollen** möglich, ohne die Notwendigkeit einer labortechnischen Ausstattung oder von ausgebildetem Fachpersonal. Der Schnelltest ermöglicht den TRV Nachweis **direkt vor Ort bei Züchter oder Landwirt** und kann so zu einer höheren Qualität der Ware führen, da schneller auf einen Befall reagiert werden kann.

Nach der erfolgreichen Etablierung des TRV2GO Schnelltests, könnte diese Methode auch für **andere Pflanzenpathogene** weiterentwickelt werden. Da die LAMP Reaktion und der nachgeschaltete Dipstick multiplexfähig sind, das heißt mehrere Pathogene können in einer Reaktion nachgewiesen werden, könnte ein **Test zur Unterscheidung zwischen Pathogenen** entwickelt werden. Insbesondere bei Pathogenen, die ein ähnliches Schadbild verursachen, wäre die Identifizierung des ursächlichen Schädlings möglich.