

FTA-Karten zur Probenaufbereitung von mikrobiellen Pflanzenpathogenen für die PCR und RT-PCR

Elisabeth Grund, Omar Darissa und Günter Adam

Einleitung

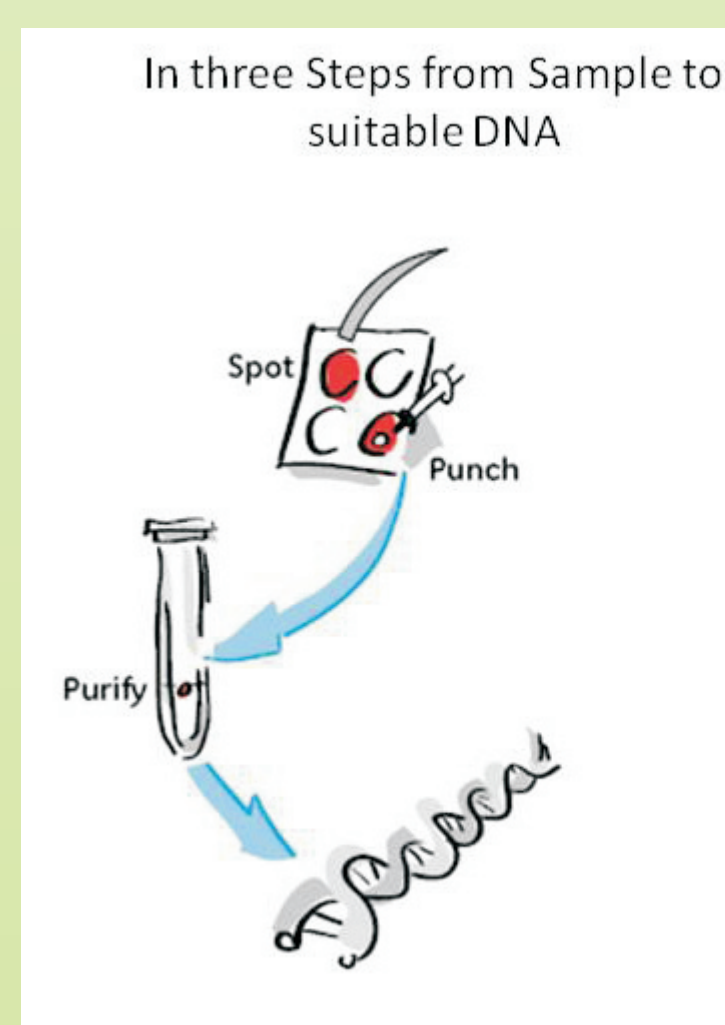
PCR- basierte Nachweisverfahren gewinnen zunehmend an Bedeutung, auch für den Nachweis von phytopathogenen Krankheitserregern. Dadurch werden an die Probennahme, die Probenaufbereitung und die Lagerung des isolierten Probenmaterials neue Anforderungen gestellt, insbesondere wenn es sich um ein Routinetestlabor handelt, aber auch, wenn die Probennahme zeitlich und räumlich von der Durchführung der Diagnostik getrennt sind. Dabei haben in letzter Zeit sogenannte „Archiving-“ oder „SamplingCards“ zunehmend an Bedeutung gewonnen, nicht zuletzt wegen der geringen Gefahr bei Transport bzw. Versand, der Möglichkeit der ungekühlten Aufbewahrung, jedenfalls bei DNA-Proben und der einfachen Probenaufbereitung ohne gefährliche Chemikalien. Sie werden mittlerweile von verschiedensten Herstellern angeboten.

Wir haben Karten der Firma Whatman, sogenannte FTA-Cards, für unterschiedliche mikrobielle Pflanzenpathogene mit verschiedener genomischer Nucleinsäure angewandt, um die Methode auf breiter Basis zu testen. Verwendet wurden Viroid, Viren mit ss+ und -RNA, ds RNA und ssDNA, Bakterien, sowie höhere und niedere Pilze. Zum Vergleich wurden klassische Methoden der Nucleinsäureextraktion eingesetzt.

Nucleic Acid- Typ	Pathogen		Propagation hosts or Propagation method
	Acronym	Name	
Circular ssDNA	WmCSV	Watermelon chlorotic stunt virus	Citrus lanatus
dsRNA	Mycovirus	China 9	Fusarium graminearum
(-)ssRNA	TSWV	Tomato spotted wilt virus	Nicotiana rustica; N. benthamiana
(+)ssRNA	TMV	Tobacco mosaic virus	N. tabacum, Samsun nn
	CMV	Cucumber mosaic virus	N. glutinosa
	LChV 1	Little cherry virus 1	Prunus avium
	LChV 2	Little cherry virus 2	
circular ssRNA	PSTVd	Potato spindle tuber viroid	Solanum esculentum
dsDNA		Acidovorax valerianellae	agarplates
dsDNA		Agrobacterium tumefaciens	agarplates
dsDNA		Ralstonia solanacearum	agarplates
dsDNA		Fusarium graminearum	agarplates
dsDNA		Phytophthora ramorum	agarplates/Rhododendron spec

Pathogene, ihr NS-Typ und Vermehrungsart für Tests

Material und Methoden



DNA-Pathogene

- Sample application**
Press plant tissue onto the card or apply homogenate. Allow to dry completely.
- Disk removal**
Punch a disk out of the FTA matrix impregnated with plant material.
- FTA Purification Reagent washes**
Place the disk in PCR tube and wash twice with FTA Purification Reagent. Discard used reagent after each wash.
- TE-1 Rinses**
Wash twice with TE-1 buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) and discard used buffer after each wash.
- Drying Step**
Dry disk in PCR tube.
- Direct to PCR**
Add PCR master mix directly to the disk and amplify.

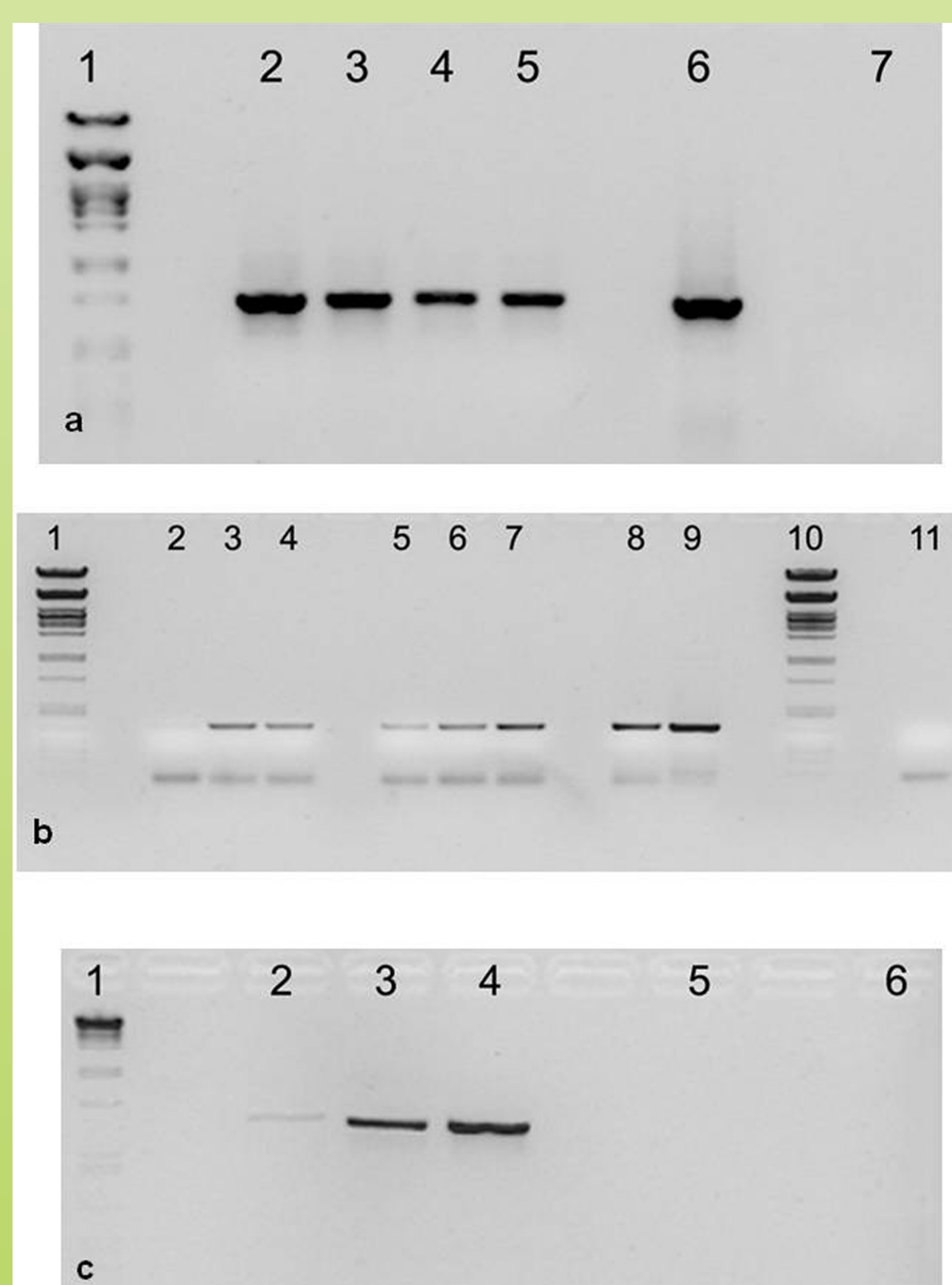
RNA-Pathogene

- RNA-Extraction**
RNA-Extraction with 400 µl extraction buffer per 2mm plug 15 min with shaking.
- Plug removal and RNA precipitation**
- Centrifugation to pellet RNA**
- Redissolve RNA**
Redissolve RNA in 50 µl appropriate solution.



Resultate

Pathogene mit ssRNA

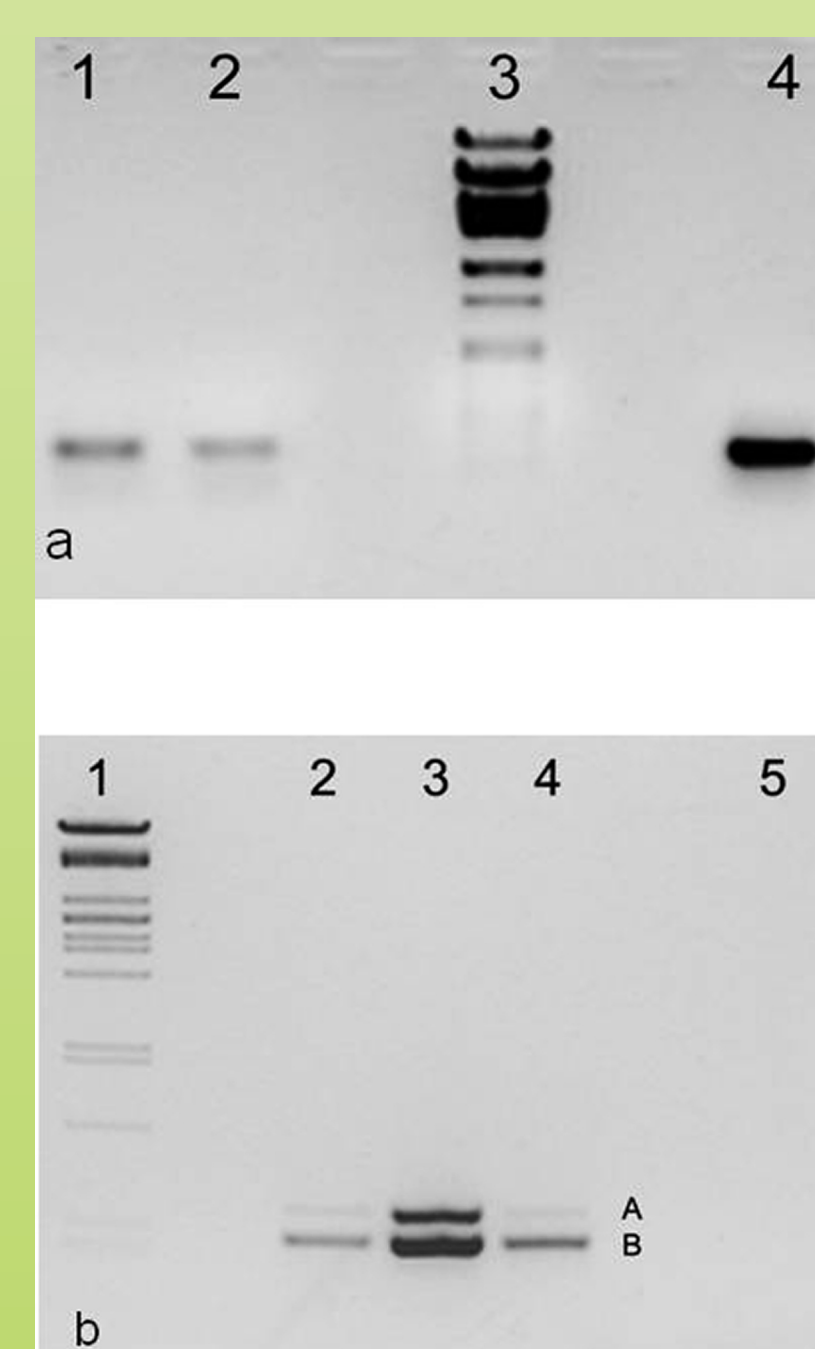


(a) CMV von infizierten Tabakpflanzen, RT-PCR.
 2 + 3 RNA von FTA-Card nach „direkt print“.
 4 + 5 RNA von FTA-Card mit 100µl Blatthomogenat 1:10
 6 Silika-extrahierte RNA
 7 negative Kontrolle

(b) PSTV infizierte Tomatenblätter, RT-PCR.
 2 - 4 FTA-Card 1 „direct print“, 1, 2 & 3µl cDNA
 5 - 7 FTA-Card 2 „direct print“, 1, 2 & 3 µl cDNA
 8 + 9 Silicaextrakt, 1µl cDNA

(c) TSWV infizierte Tabakpflanze, nested RT-PCR.
 2 FTA-Card „direct print“
 3 Silicaextrakt
 4 Positivkontrolle PCR
 5 Wasserkontrollen der 1. und 2. PCR

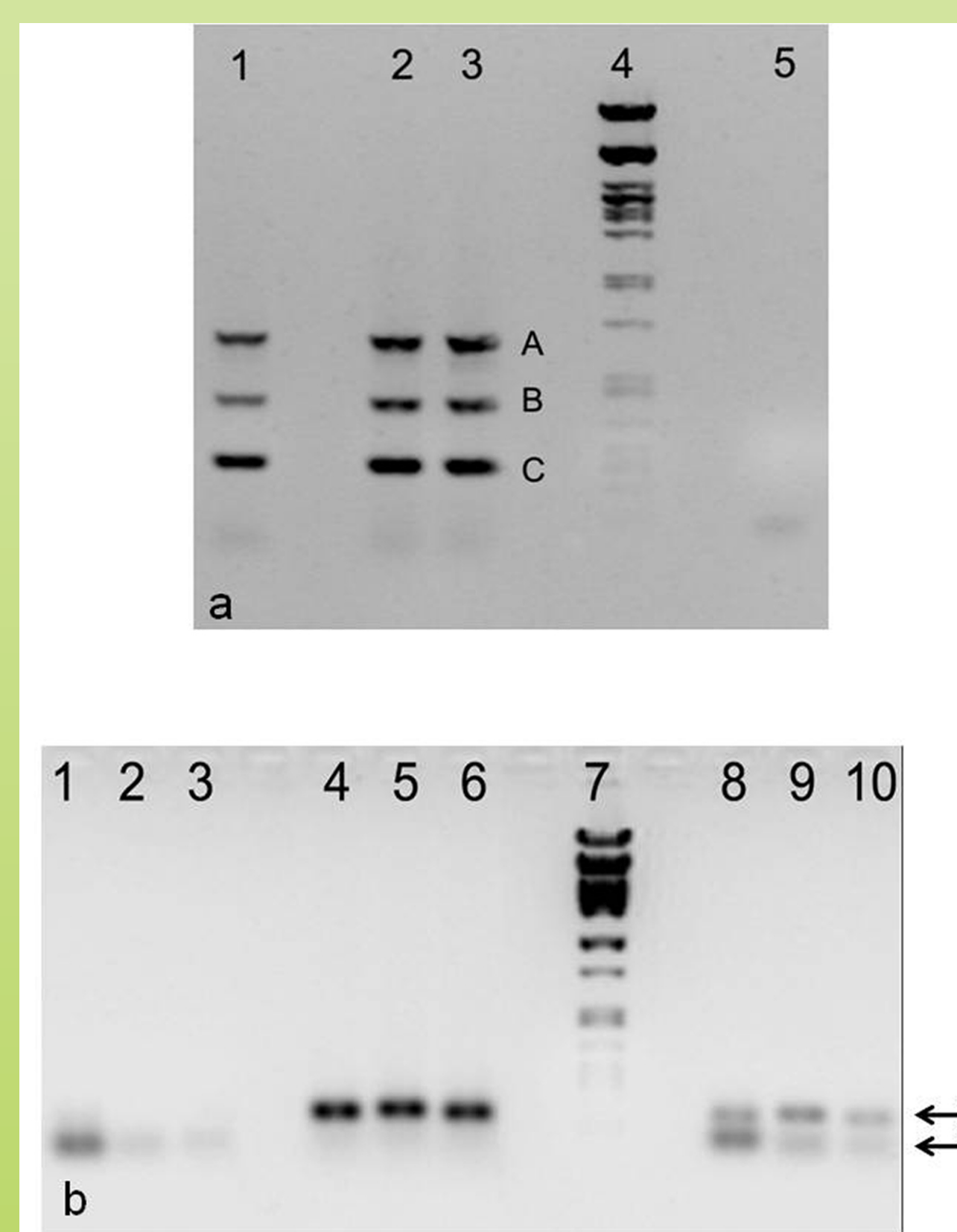
Pathogene mit dsRNA und ssDNA



(a) dsRNA Mycovirus von Fusarium graminearum, RT-PCR.
 1 FTA-Card, RNA isoliert in TE-Puffer und RT-PCR
 2 FTA-Card gewaschen, wie DNA und RT-mit 2 mm Plug
 4 Phenol-extrahierte total NS für RT-PCR

(b) Watermelon chlorotic stunt Virus von inf. Citrullus lanatus Blättern, duplex PCR.
 2 FTA-Card „direct press“ 2mm Plug
 3 + 4 NS-Silicaextrakt 2 & 3 µl NS als Template.
 A & B bezeichnen die beiden Amplicons der genomischen Segmente

Pathogene mit dsDNA



(a) Agrobacterium tumefaciens von Agarplatte, multiplex PCR.
 1 FTA-Card, PCR mit 2 mm Plug
 2 Kolonie-PCR ohne Vorbehandlung
 3 Kolonie-PCR nach Hitzebehandlung
 5 Wasserkontrolle
 A= Amplicon von vir-Primern; B=Amplicon von Cytokin-Primern;
 C=Amplicon von virD-Primern

(b) Fusarium graminearum genomische PCR.
 1 - 3 Wasserkontrollen für Tri4, 5 & 6 Gene
 4 - 6 Phenol-extrahierte NS für Tri4, 5 & 6 Gene
 8 - 10 FTA-Plugs für Tri4, 5 & 6 Gene

1=spezifische Amplicons; 2=Primerbanden

Empfohlene Anwendung von FTA-Cards

Pathogen Typ und Quelle	Extraktions Methode		Klassische Methode
	Direct	FTA cards*	
Pilze (DNA)			
Höhere Pilze von Agarplatte	ND	+	+++ ¹
Niedere Pilze von Agarplatte	+ ^b	ND	ND
Niedere Pilze von inf. Blättern	- ^c	ND	ND
Bakterien (DNA)			
Von Agarplatte		+++ ^d	+++ ²
Aus Flüssigkultur		+++ ^e	+++ ²
Viren			
ssDNA: WmCSV von inf. Blatt	+ ^f	ND	+ to +++ ³
dsRNA: Mycovirus von inf. Mycel	ND	+ ^g	+++ ¹
ss(-)RNA: TSWV enveloped	+ ^f	ND	+++ ³
ss(-)RNA: (hoher Titer): TMV von Pflanze	+++ ^f	++ ^h	+++ ³
CMV von Pflanze		ND	+ ³
ss(-)RNA (niedriger Titer): LChV1, LChV2	- ^f		
Viroid			
Zirkuläre ssRNA: PSTV _d von Pflanze	+ ^f	ND	+ ³

*Vorbehandlung für PCR: 2mm Plugs, Waschen in Reinigungslösung und TE Puffer, Trocknen.

- :kein Produkt, +: schwache Bande, ++: intensive Bande, +++: sehr intensive Bande, ND: nicht durchgeführt.

1: Homogenisiert in Flüssigstickstoff, extrahiert mit Phenol-Chloroform. 2: Hitzedenaturiert, Verdünnt und in PCR eingesetzt. 3: Isoliert mit standard Silica- Methode.

a: homogenisiert in Flüssigstickstoff, resuspendiert in Puffer, auf Karte aufgetragen. b: Mycelium in Puffer suspendiert und auf Karte aufgetragen c: Presse infiziertes Blatt auf Karte. d: Resuspendiere in Puffer, heat shock und Applikation auf Karte. e: heat shock und Applikation auf Karte. f: wie c: aber Extraktion der RNA vom Plug und Lösen in 50µl Puffer und dann mit 2-3µl Reverse Transkription, mit 2-3µl cDNA anschließend PCR. g: Homogenisiere Mycelium wie in a: und Applikation auf Karte. Zwei mm Plug behandeln wie für PCR und danach Plug direct in RT-Reaktion oder Eluiere die dsRNA wie ssRNA aus dem Plug und mache damit die RT-PCR. h: Homogenisiere infiziertes Blatt in Puffer 1:10 (w/v) und appliziere es auf die Karte.