

# Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsting van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde

J.W. (Annelien) Roenhorst<sup>1</sup>, C.C.C. (Claudia) Jansen<sup>1</sup>, L.F.F. Kox<sup>1</sup>, E.G. (Eisse) de Haan<sup>2</sup>, G.W. (Gé) van den Bovenkamp<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, e-mail: j.w.roenhorst@minlnv.nl

<sup>2</sup>NAK, Emmeloord

**Vondsten van het aardappelspindelknolviroïde in aardappelklonen in Frankrijk in 2001 en het voorkomen van dit viroïde in landen die in 2004 zijn toegetreden tot de Europese Unie, maakten duidelijk dat er behoefte was aan een betrouwbare toetsmethode. De door Boonham et al. (2004) ontwikkelde real-time RT-PCR assay leek een veelbelovend uitgangspunt voor het opzetten van een protocol voor grootschalige toetsing. Dit artikel laat zien hoe door analyse en validatie van de verschillende stappen dit protocol tot stand is gekomen.**

## Inleiding

Het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) heeft een quarantainestatus in de Europese Unie (EU). Tot de uitbreiding van de EU in 2004 was het viroïde niet gevestigd in de EU en werd het slechts incidenteel aangetroffen in veredelingsmateriaal. De laatste melding in 2001 betrof een aardappelkloon in Frankrijk (Ollivier, 2004). In een aantal Oost-Europese landen echter, werd PSTVd in het verleden met enige regelmaat aangetroffen in de aardappelteelt. Door toetreding tot de EU maakten deze landen voortaan deel uit van de interne markt en kon het pootgoed vrij worden verhandeld. Het risico van verspreiding van PSTVd nam hierdoor toe, temeer daar grootschalige toetsing op dit viroïde niet mo-

gelijk was. Zowel de vondst in Frankrijk als het toegenomen risico van introductie vanuit de nieuwe EU-lidstaten, maakten duidelijk dat er dringend behoefte was aan een betrouwbare toetsmethode die op grote schaal zou kunnen worden ingezet.

## Potato spindle tuber viroid

PSTVd behoort tot het genus *Pospiviroid*. Het bestaat uit een enkelstrengs circulair RNA-molecule waarvan de lengte varieert tussen 356 en 361 nucleotiden. Het genoom van viroïden bevat geen coderende sequenties, hetgeen betekent dat ze voor replicatie volledig afhankelijk zijn van de gastheer-cel. Het RNA-molecule heeft een complexe secundaire struc-

tuur waardoor het viroïde ook buiten de plant zeer stabiel is.

De schade die PSTVd in aardappel veroorzaakt, hangt af van zowel het viroïde-isolaat als de aardappelcultivar. Naast opbrengstderving die kan oplopen tot 64% (Pfannestiel and Slack, 1980), is er ook sprake van kwaliteitsvermindering door misvorming van de knollen (Figuur 1). Kenmerkend zijn de spoelvormige knollen, waaraan het viroïde zijn naam te danken heeft. Daarnaast leidt de aanwezigheid van PSTVd tot economische schade als gevolg van internationale handelsbelemmeringen.

Verspreiding van PSTVd vindt plaats via de klonale lijn (vegetatieve vermeerdering), pollen, zaad en contact (machines). Daarnaast kan het worden overgebracht door bladluizen wanneer sprake is van co-infectie met het aardappelbladrolvirus (Grasmick and Slack, 1986; Salazar *et al.*, 1995).

## Toetsmethoden

In de loop der jaren zijn verschillende methoden ontwik-

ARTIKEL

keld voor de toetsing op PSTVd. De bekendste zijn 'return-polyacrylamide gel electrophoresis' (R-PAGE), nucleïnezuurhybridisatie en 'reverse-transcription polymerase chain reaction' (RT-PCR; Huttinga *et al.*, 1987; Roenhorst *et al.*, 2000; Shamloul *et al.*, 1997). Geen van deze methoden is echter geschikt voor grootschalige toepassing. De recent door Boonham *et al.* (2004) ontwikkelde 'real-time RT-PCR assay' bood daarentegen goede perspectieven. Deze methode presteerde het best tijdens een internationale ring test waarbij verschillende methoden voor de detectie van PSTVd in aardappel werden vergeleken (Jeffries and James, 2005). Real-time RT-PCR bleek de gevoeligste methode en bovendien kwamen de resultaten van de verschillende laboratoria het meest overeen. Tevens is deze methode bij uitstek geschikt voor grootschalige toepassing.

## Real-time RT-PCR

Real-time PCR combineert twee technieken: PCR en nucleïnezuurhybridisatie. Net als bij de conventionele PCR wordt gebruik gemaakt van twee specifieke primers voor de amplificatie van een klein deel van het genoom van het te detecteren organisme. Anders dan bij de conventionele PCR, waar amplicons zichtbaar worden gemaakt in ethidiumbromide-gels, resulteert amplificatie bij deze techniek in fluorescentie. Deze fluorescentie wordt per monster weergegeven in een grafiek die na afloop van de reactie wordt geanalyseerd. Nadere uitleg over de techniek is te vinden in het artikel 'Real-time PCR brengt routinematige toepassing van moleculair biologi-



Figuur 1. Typische spoelvormige aardappelknollen als gevolg van een infectie met het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*). Rechts gezonde knollen.

sche technieken dichterbij', dit nummer p.194-197.

## Protocol voor grootschalige toetsing

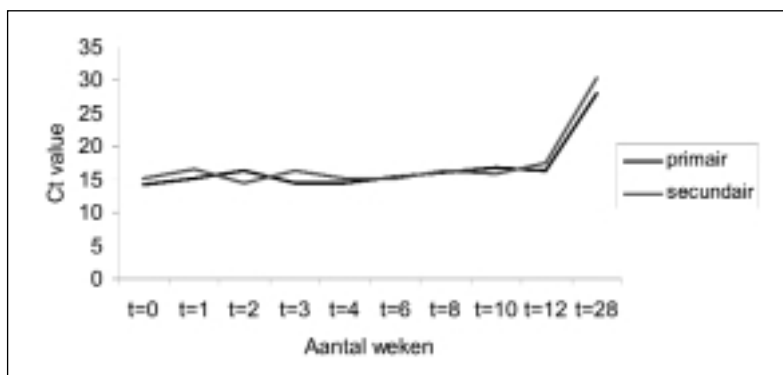
Op basis van de prestaties van real-time RT-PCR tijdens de ring test en de geschiktheid voor grootschalige toepassing, is de TaqMan assay van Boonham *et al.* (2004) gebruikt als startpunt voor de ontwikkeling van een protocol voor grootschalige toepassing. Bij de ontwikkeling van zo'n protocol is het van belang inzicht te hebben in de specificiteit en gevoeligheid van de methode. Daarnaast worden de volgende stappen onderscheiden: bemonstering, homogenisatie, nucleïnezuur-extractie en real-time RT-PCR. Verder is het van belang inzicht te hebben in de betrouwbaarheid van de toets. Hiervoor moeten verschillende typen 'controles' beschikbaar zijn zodat het verloop van de verschillende stappen kan worden gevolgd. Tenslotte zijn middelen en methoden nodig voor reiniging van materialen, onder andere om kruisbesmetting te voorkomen.

## Specificiteit

De specificiteit van de RT-PCR wordt bepaald door de mate waarin primers en probe reageren met verschillende varianten van het target organisme en met verwante organismen. Voor een screeningsmethode zoals deze voor PSTVd, is het van belang dat alle varianten (isolaten) worden gedetecteerd en dat geen reactie optreedt met andere pospiviroiden. Zowel alle door Boonham *et al.* (2004) als de door Roenhorst *et al.* (2005) getoetste isolaten van PSTVd, gaven een positieve reactie. Beide vonden een kruisreactie met een isolaat van het *Tomato chlorotic dwarf viroid*, hetgeen kon worden verklaard door de grote overeenkomst tussen de sequenties van beide viroiden. Vier andere pospiviroiden en *Hop stunt viroid* gaven geen reactie.

## Bemonstering

De betrouwbaarheid van een toetsingsprotocol wordt voor een belangrijk deel bepaald door de bemonstering. Wan-



Figuur 2. Effect van kiemrust op de detecteerbaarheid van PSTVd in knollen

Aardappelknollen van primair en secundair geïnfecteerde planten werden op verschillende tijdstippen na de oogst getoetst met real-time RT-PCR. De knollen werden bewaard bij 4°C. Tot 12 weken na de oogst neemt de hoeveelheid viroïde slechts weinig af en kan PSTVd betrouwbaar worden aangetoond in mengmonsters tot 100 knollen.

neer het te detecteren organisme niet of in onvoldoende hoeveelheid in het monster aanwezig is, kan ondanks de hoge gevoeligheid van de methode, de uitkomst fout zijn. Voor PSTVd in aardappel is gekeken naar de verdeling in planten en knollen. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen bladeren van verschillende posities in de plant. Ook de verschillen tussen topoog, midden en navel-einde van de knol waren minimaal. In deze experimenten werd geen verschil gevonden tussen primair en secundair geïnfecteerd materiaal. Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat de bemonstering niet bijzonder kritisch

is. In geval van 'jonge' primaire infecties valt in de praktijk echter een lagere concentratie te verwachten. Besloten werd om bij de toetsing van blad, een deelblaadje net onder de kop van de plant te bemonsteren en bij knollen het navel-einde te gebruiken. In geval van blad werd een ponsje met doorsnede van circa vijf millimeter per blad getoetst, bij knollen een klein stukje weefsel rond het navel-einde.

Verder is het bij de toetsing van knollen belangrijk om inzicht te hebben in de effecten van kiemrust op de toetsresultaten. Hiertoe zijn knollen van zowel primair als secundair geïnfecteerde aardappelplanten op

verschillende tijdstippen tot ruim een half jaar na de oogst getoetst op PSTVd. Figuur 2 laat zien dat de Ct-waarden in geringe mate toenemen in de tijd, hetgeen betekent dat de hoeveelheid viroïde in de knol in de tijd afneemt. Direct na de oogst liggen de Ct-waarden rond veertien. Na bewaring bij 4°C zijn de Ct-waarde toegenomen tot 18-21 na veertien weken en 28-30 na 28 weken. Deze resultaten geven aan dat PSTVd ook tijdens kiemrust betrouwbaar kan worden gedetecteerd. Wel heeft de afname van de hoeveelheid viroïde consequenties voor het kunnen samenvoegen van materiaal in mengmonsters, dit afhankelijk van de bewaarperiode. Mengmonsters tot honderd planten kunnen tot drie maanden na de oogst betrouwbaar worden getoetst.

## Homogenisatie

Om blad- en knolstukjes te kunnen toetsen, wordt het plantmateriaal vermalen in een extractiebuffer (1 g/ml). Er zijn verschillende homogenisatiemethoden met elkaar vergeleken, waarbij werd gelet op de capaciteit (hoeveelheid materiaal), de effectiviteit, mogelijkheden tot automatisering, reiniging- en ontsmetting en het risico op kruisbesmetting. Tabel 1 geeft een overzicht van de resultaten. De Homex-6 in combinatie met de vermaalzakjes van Bioreba voldeden het best aan de criteria.

## Nucleïnezuur-extractie

Verschillende methoden voor nucleïnezuur-extractie werden vergeleken op basis van opbrengst en mogelijkheid tot au-

Tabel 1. Vergelijking van verschillende homogenisatiemethoden

	Effectiviteit	Volume	Kruisbesmetting
Bead beater	-	-	•
Kleco mill	•	-	•
Pollähne pers	•	•	-
Qiagen mixer mill	-	•	•
Homex 6 (Bioreba)	•	•	•

Verschillende homogenisatiemethoden werden vergeleken op grond van de effectiviteit waarmee het materiaal werd vermalen, het maximale volume per monsters en de risico's m.b.t. het optreden van kruisbesmetting. Voor dit experiment werden 100 tot 200 bladponsjes van ca. 5 mm doorsnede vermalen in buffer. Symbolen: • goed/geschikt, - onvoldoende/niet geschikt.

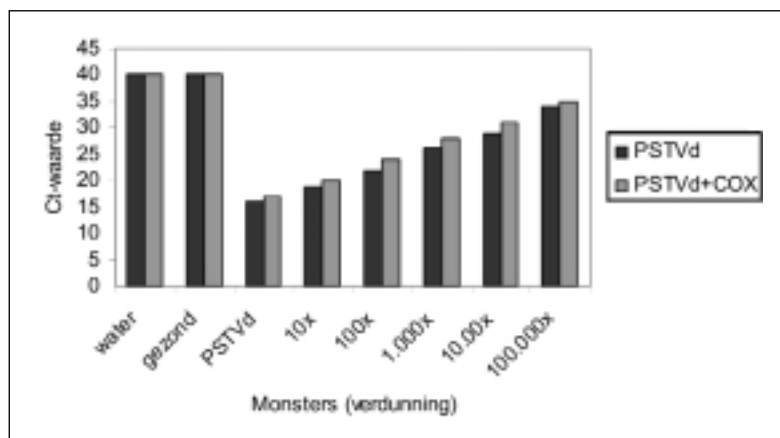
tomatiseren. De PureScript kit van Gentra gaf in het algemeen de hoogste opbrengst. Vervolgens werden kits van Toyoba en InviMag getoetst daar deze kits gebruikt kunnen worden in combinatie met de KingFisher, een apparaat waarmee nucleïnezuurextracties geautomatiseerd kunnen worden uitgevoerd. De InviMag kit was van deze twee duidelijk de beste. De opbrengsten waren vergelijkbaar met die van de handmatige uitgevoerde extracties met de PureScript kit.

## Gevoeligheid

Het belang van gevoeligheid bij een grootschalige toets vertaalt zich in het aantal monsters dat kan worden samengevoegd. In het geval van de TaqMan assay voor PSTVd, waarbij de Ct-waarden van geïnfecteerd blad- en vers knolmateriaal over het algemeen tussen de vijftien en twintig liggen, betekent dit dat verdunningen tot 100.000x nog positief reageren (Figuur 3). Daar het samenvoegen van 100.000 planten in de praktijk niet haalbaar en niet wenselijk is, is besloten om materiaal van maximaal honderd planten samen te voegen.

## Controles

Het optreden van vals positieve en negatieve resultaten bij routinematige toetsing is ongewenst. Allereerst speelt hier de invloed van de bemonstering, de steekproefgrootte in relatie tot het infectieniveau, en de plaats van bemonstering. Daarnaast kunnen ook tijdens het uitvoeren van de laboratoriumwerkzaamheden 'fouten' optreden die effect hebben op de uitkomst van de toets. Bij de real-time RT-PCR is het van be-



Figuur 3. Effect van verdunning op de detecteerbaarheid van PSTVd in blad

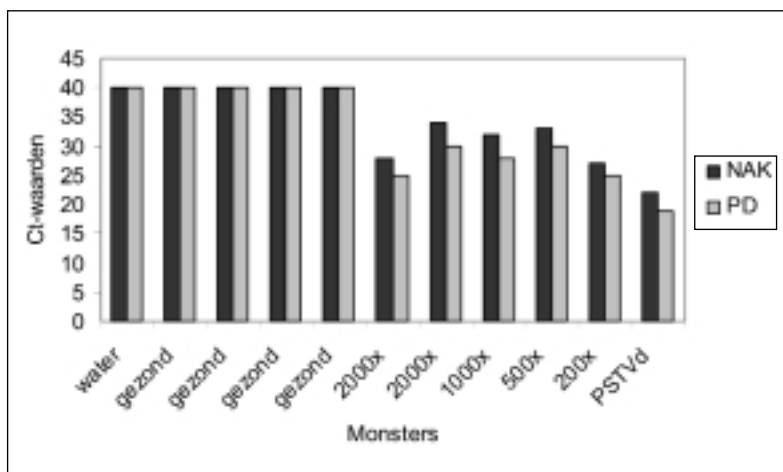
Toetsing van bladsap van PSTVd-geïnfecteerde planten in een decimale verdunningsreeks met bladsap van gezonde planten. De Ct-waarden nemen gelijkmatig toe met het toenemen van de verdunning. Bij een verdunning van 100.000x is PSTVd nog betrouwbaar te detecteren. Bij de controles is de Ct-waarde gelijk aan het aantal cycli (40) en dus onbepaald.

lang om zicht te houden op het verloop van de verschillende stappen van de toets. Hiertoe worden verschillende controles meegenomen waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen externe en interne controles (Kox *et al.*, 2005). Externe controles zijn extra 'monsters' met alleen water, gezond en ziek plantmateriaal. Hiermee kan worden aangetoond dat de uitgangsmaterialen voldoen aan de eisen voor een betrouwbaar toetsresultaat. Interne controles maken deel uit van het te toetsen monster. Hierbij wordt onder andere gecontroleerd of de nucleïnezuurextractie goed is verlopen door te toetsen op de aanwezigheid van een stukje DNA van de plant, bijvoorbeeld het cytochroomoxidasegen (COX) bij de toets van aardappel op PSTVd. Deze reactie moet zowel in de gezonde als geïnfecteerde monsters een positief resultaat geven. Tevens geeft deze controle aan wanneer in een monster sprake is van remming. Daarnaast kunnen als interne controle stukjes (gemodificeerd) target RNA aan het monster worden toegevoegd (spike) om te controle-

ren of de specifieke primers werken. Bij grootschalige toetsen worden in het algemeen per run in elk geval alle bovengenoemde externe controles meegenomen. Verder wordt meestal ook een interne controle meegenomen om te controleren of de nucleïnezuurextractie en de PCR goed zijn verlopen.

## Kruisbesmetting en reiniging

Bij zeer gevoelige toetsen zoals de real-time RT-PCR assay voor PSTVd bestaat er een groot risico op kruisbesmetting. Hoewel kruisbesmetting tijdens elke stap kan plaatsvinden, doen de grootste risico's zich echter voor tijdens de bemonstering en homogenisatie. Een strikte scheiding van verschillende monsters gedurende het gehele proces is dan ook van essentieel belang. Enerzijds vereist dit strikte procedures van handelen, anderzijds het gebruik van consumabels of effectieve reinigingsmiddelen en methoden. Voorbeelden zijn het ge-



Figuur 4. Vergelijking van de resultaten van real-time RT-PCR van twee laboratoria

Tien monsters (water, gezond blad, 2000-200x 'verdund' en PSTVd-geïnfecteerd blad) werden vermalen en vervolgens getoetst door NAK-Agro en PD. De resultaten van beide laboratoria waren vergelijkbaar, zij het dat de Ct-waarden bij de NAK in het algemeen iets hoger lagen dan die van de PD. De Ct-waarden van de COX-controle lagen tussen 22 en 25. Bij de controles is de Ct-waarde gelijk aan het aantal cycli (40) en dus onbepaald.

bruik van handschoenen tijdens het bemonsteren en wegwerpzakjes bij het vermalen en homogeniseren. Daarnaast zijn middelen en methoden nodig voor het reinigen van oppervlakten en materialen die worden hergebruikt. Vergelijking van een aantal schoonmaak- en ontsmettingsmiddelen leerde dat een oplossing van 1%-hypochloriet (viermaal verdund huishoudchlor) het effectiefst was. Bovendien bleek dit middel bij deze concentratie de PCR niet te remmen.

## Pilot

Analyse van de verschillende stappen van de toets voor grootschalige screening van aardappel op PSTVd hebben geleid tot het opstellen van een protocol. Dit protocol is gebruikt voor een pilot waarbij honderd verschillende rassen uit het bewakingsprogramma aardappel werden getoetst door NAK-Agro. Van ieder ras

werden twee planten opgekweekt, waarbij van iedere plant vijftig bladponsjes van ongeveer vijf millimeter doorsnede werden verzameld en vervolgens als mengmonster van honderd ponsjes getoetst. Tevens werden acht blinde monsters toegevoegd, gezond materiaal en gezond gemengd met verschillende hoeveelheden ziek materiaal. Alle monsters werden getoetst zowel zonder (simplex) als met de COX-controle (duplex).

In geen van de getoetste monsters werd PSTVd aangetroffen. Bij 99 monsters lag de Ct-waarde op 40, en was dus onbepaald, bij één monster bedroeg de Ct-waarde 38 in de simplexreactie. In dit laatste geval werd in de duplexreactie echter een Ct-waarde van veertig verkregen. Derhalve werd de afwijkende waarde niet als significant beschouwd.

De blinde monsters werden zowel bij NAK-Agro als bij de PD getoetst. De uitkomst van de toetsing van deze monsters

was vergelijkbaar (Figuur 4). Hoewel de Ct-waarden van de blinde monsters verschillen lieten zien, beïnvloedde dit de uitkomst van de toets niet. Hoogst waarschijnlijk hadden de verschillen te maken met het feit dat de laboratoria met een verschillend type real-time PCR apparaat werken.

Vergelijking van de Ct-waarden van de simplex- en duplexreacties tonen een geringe toename van de Ct-waarde, dus een afname van de gevoeligheid, wanneer ook op COX wordt getoetst (Figuur 3).

Wanneer in de praktijk monsters in duplo worden getoetst, is het dan ook wenselijk om één reactie in afwezigheid van COX (simplex) en een reactie in aanwezigheid van deze controle (duplex) uit te voeren. Hierbij wordt de maximale gevoeligheid gehaald en wordt tevens gecontroleerd op de betrouwbaarheid van de toets.

## Ringtest

Om meer inzicht te krijgen in de prestaties van het ontwikkelde de real-time RT-PCR protocol, werden 'identieke' blad en knolmonsters getoetst in vier laboratoria in Nederland en Engeland. De resultaten van drie laboratoria waren vergelijkbaar. Bij één laboratorium lagen de Ct-waarden significant hoger dan bij de andere drie, als gevolg van het feit dat de monsters in slechte staat waren aangekomen. De positieve monsters werden echter door alle laboratoria gedetecteerd. Dit resultaat bevestigde de conclusies van de eerder gehouden ringtest (Jeffries & James, 2005).

## Conclusies en perspectieven

Dit artikel laat zien dat een grondige analyse van de verschillende stappen nodig is voor de ontwikkeling van een protocol voor grootschalige toetsing van aardappel op PSTVd. Een dergelijk proces staat niet op zich, validatie is essentieel voor ieder protocol dat wordt ontwikkeld.

Ook de validatie van het hier beschreven protocol voor aardappel is nog niet geheel afgerond. Zo is er nog een pilot gepland voor de toetsing van knolmateriaal. Hiervoor zullen net als bij de pilot met bladmateriaal monsters uit het bewaarsprogramma aardappel door NAK-Agro worden getoetst. Met het oog op de toe-

komst zal verder worden onderzocht in hoeverre de toetsing op PSTVd gecombineerd kan worden met de toetsing op de bacterieziekten bruinrot en ringrot.

### Literatuur

- Boonham N, Gonzáles Pérez L, Mendez MS, Lilia Peralta E, Blockley A, Walsh K, Barker I & Mumford RA (2004) Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) *Journal of Virological Methods* **116**, 139-146
- Huttinga H, Mosch WHM & Treur A (1987) Comparison of bi-directional electrophoresis and molecular hybridization methods to detect potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *EPPO Bulletin* **17**, 37-43
- Jeffries C & James C (2005) Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber viroid*. *EPPO Bulletin* **35**, 125-132
- Kox LFF, Boxman ILA, Jansen CCC & Roenhorst JW (2004) Reliability of nucleic acid amplification techniques: modified target RNA as exogenous internal standard for a real-time RT-PCR for *Potato spindle tuber viroid*. *EPPO Bulletin* **35**, 117-124
- Ollivier F (2004) L'hybridation moléculaire: une technique de détection du *Potato spindle tuber viroid* adaptée aux plans de surveillance. *EPPO Bulletin* **34**, 123-126
- Pfannenstiel MA & Slack SA (1980) Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* **70**, 922-926
- Roenhorst JW, Bütot RPT, van der Heijden KA, Hooftman M & van Zaayen A (2000) Detection of *Chrysanthemum stunt viroid* and *Potato spindle tuber viroid* by return-polyacrylamide gel electrophoresis. *EPPO Bulletin* **30**, 453-456
- Roenhorst JW, Jansen CCC, Kox LFF, de Haan EG, van den Bovenkamp GW, Boonham N, Fisher T & Mumford RA (2005) Application of real-time PCR for large-scale testing of potato for *Potato spindle tuber viroid*. *EPPO Bulletin* 2005; 35:133-140 *EPPO Bulletin* **35**: 133-140
- Salazar LF, Querci M, Bartolini I & Lazarte V (1995) Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia* **30**, 56-58
- Shamloul AM, Hadidi A, Zhu SF, Singh RP & Sagredo B (1997) Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**, 89-96