

# Detectie van tabaksratelvirus en aardappelzwabbertopvirus in pootaardappelen

G.W. van den Bovenkamp en E.G. de Haan

Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van Landbouwgewassen (NAK), Emmeloord, gbovenkamp@nak.nl

Het Tabaksratelvirus (TRV), onder meer veroorzaker van stengelbont (plant) en kringrigheid (knol) bij aardappelen, is een tobavirus dat reeds lang in Nederland is gevestigd. Toch is TRV, bij de teelt van pootaardappelen, tijdens de veldkeuring zelden aanleiding tot declassering (figuur 1). Ook partijen pootaardappelen met in- of uitwendige knolsymptomen (necroses) ten gevolge van TRV zijn in veel jaren schaars. Mogelijk komt dit door het vroegtijdig doodmaken van het loof. TRV in aardappelen kan, vanwege het optreden van virusstammen zonder eiwitmantel, niet betrouwbaar serologisch worden aangetoond.

Vermeldingen van het Aardappelzwabbertopvirus (PMTV) in Nederland zijn zeldzaam (*Anonymus*, 1969; van Hoof & Rozenaal, 1969; Cuperus & de Bokx, 1990) en wetenschappelijk niet afdoende gedocumenteerd. In tegenstelling tot wat in sommige handboeken wordt gesteld, zijn beide virussen op basis van knolnecroses niet betrouwbaar visueel van elkaar, en van fysiologische verschijnselen c.q. gebreksziekten, te onderscheiden. De NAK toetst knollen met necroses dan ook op TRV met een reverse transcription (RT-)PCR (Cornelissen *et al.*, 1986) en – indien TRV-negatief – op PMTV met een Elisa-test. PMTV is binnen de EU geen quarantaine organisme. Noch tijdens een landelijke NAK-survey naar planten met stengelbontachtige symptomen (1999; n=41), noch tijdens een vergelijkbare survey in partijen pootaardappelen met knolnecroses (1999; n = 30), werd PMTV aangetroffen.

## **Multiplex real-time PCR**

De publicatie van een multiplex real-time TaqMan® PCR (Mumford *et al.*, 2000) brengt een methode binnen handbereik waarbij plant- of knolmateriaal in één bewerking gelijktijdig op beide virussen kan worden getoetst.

De Taqman-methodiek combineert een gelabelde probe met

de 5'-exonuclease activiteit van Taq-polymerase. De probe is gelabeld met een reporter-fluorofoor en een 'quencher' (dimmer), en bindt aan het doel-RNA. Zolang de probe intact is wordt fluorescentie van het reportergedeelte gedoofd door de quencher. Tijdens de amplificatie wordt de probe gesplitst, de afstand tussen reporter en quencher neemt toe en de fluorescentie wordt, onder invloed van de hoeveelheid geamplifi-

ceerd product, meetbaar. De toename van de reporterfluorescentie tijdens de amplificatie wordt constant gemeten en rechtstreeks (real-time) zichtbaar gemaakt via een ABI PRISM 7000® detectiesysteem. Na de PCR-stap zijn dus geen verdere handelingen nodig: het betreft een gelvrij systeem. Dit laatste, plus het feit dat op beide virussen in één keer, en in één reactievatje (single tube reaction), getoetst kan worden behoort tot de belangrijkste voordelen van de methodiek.

Het aantal PCR-cycli dat nodig is om virusdetectie significant meetbaar te maken, wordt uitgedrukt in een zogenaamde Ct-waarde. Lage Ct-waarden duiden op grotere hoeveelheden van het doelorganisme, hoge Ct-waarden op geringere hoeveelheden. PCR-cycli en fluorescentie worden real-time tegen elkaar uitgezet in een grafiek. Het aantal PCR-cycli waarna de ingestelde drempelwaarde wordt overschreden (Ct), plus de vorm van de grafiek (logaritmische toename van de fluorescentie), geven extra inzicht in het verloop en de specificiteit van de reactie. Een Taqman-PCR is vaak specifiekier dan een normale RT-PCR omdat, naast de specifieke primers, ook nog eens gebruik gemaakt wordt van een specifieke probe.

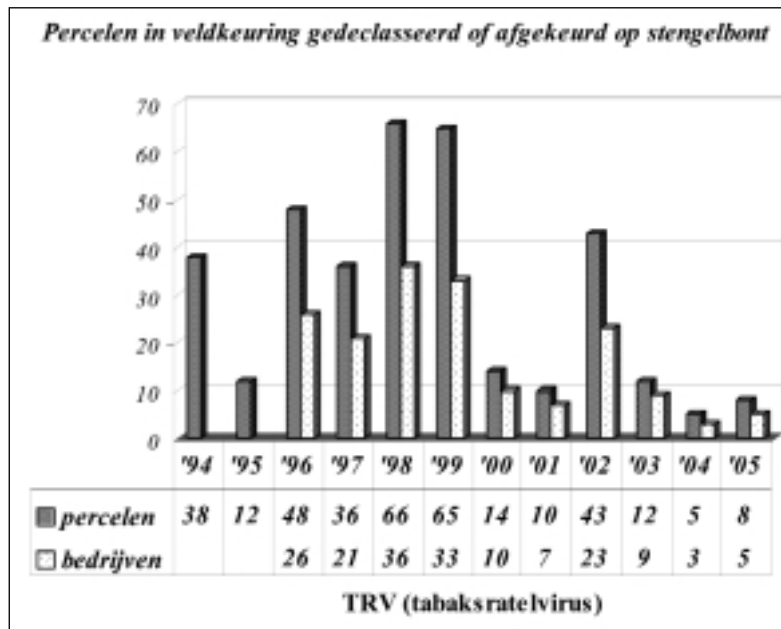
ARTIKEL

Bij implementatie van de methodiek bij de NAK is voornamelijk gebruik gemaakt van Nederlandse partijen aardappelen met TRV en van materiaal met PMTV uit Denemarken en Schotland.

## Resultaten

Handmatige RNA-extractie met een gemodificeerde zout-precipitatie methode gaf voor beide virussen lagere Ct-waarden, en dus een hogere RNA-opbrengst, dan geautomatiseerde extractie met mag-nobeads. Zoals ook elders beschreven, bleken beide virussen erg onregelmatig in knol en plant verdeeld. Het samenvoegen van meerdere knollen uit een partij met kringrigheid, en van alle stengels per stengelbontplant, wordt voor diagnostische doeleinden door ons aanbevolen. Ook in volstrekt symptoomloze knollen uit een besmette partij kon soms TRV worden aangetoond.

Vanwege het uitgebreide werk van Mumford *et al.* werd een nieuw specificiteitonderzoek niet noodzakelijk geacht. Uit validatie-experimenten aan praktijkmonsters (rechtstreeks verdund plant- en knolsap) bleek dat de multiplex real-time Taqman PCR voor beide pathogenen, in onze handen, 10 tot 100 keer gevoeliger was dan de tot dan gebruikte Elisa-toets (PMTV; figuur 2) en de standaard RT-PCR (TRV; figuur 3). Op basis van de verkregen resultaten kon een beslissingsmatrix worden opgesteld (positief /negatief) voor materiaal met en zonder symptomen. Hoewel in het necrotische knolweefsel stoffen voorkomen die de PCR-reactie – vooral tijdens de latere cycli – remmen, bleek bemonstering direct naast de inwendige necrose



Figuur 1. Aantallen Nederlandse percelen pootaardappelen, gedeclasseerd of afgekeurd tijdens de veldkeuring op basis van stengelbontsymptomen (TRV). Gemiddeld jaarlijks in keuring: 29.000 percelen.

Monster nr. Verdunning knolsap	10		28		22	
	ELISA (ex100)	Taqman (Ct)	ELISA (ex100)	Taqman (Ct)	ELISA (ex100)	Taqman (Ct)
10 <sup>0</sup>	69	25.82	147	22.61	145	20.11
10 <sup>-1</sup>	16	27.75	212	4.97	105	23.48
10 <sup>-2</sup>	10	40	10	29.61	18	27.54
10 <sup>-3</sup>	10	40	9	40	10	40
10 <sup>-4</sup>	10	40	9	40	9	40

Figuur 2. Vergelijking Elisa (extinctiewaarden x 100) en Taqman PCR voor PMTV in aardappelknollen met inwendige necroses. Elisa-waarden zijn niet geblankt. Positieve uitslagen vet en cursief. Bij de Taqman PCR geldt: hoe meer virus, hoe lager de Ct-waarde.

Ct categorie	Taqman PCR aantal monsters in Ct-categorie	standaard PT-PCR aantal monsters positief op gel
Ct<20	5	5
Ct 20-25	5	4
Ct25-30	5	2
Ct 20-35	5	1
Ct 35-39	4	0

Figuur 3. Vergelijking Taqman PCR en standaard PT-PCR voor 24 mei met TRV (inwendige necroses) besmette knolmonsters. Positieve reacties (Ct-waarden in combinatie met real-time monitoring van de PCR-amplificatie) vet en cursief

optimaal. Uiteindelijk bleek de Taqman PCR zelfs minder gevoelig voor remmende stoffen dan de standaard-PCR (data niet getoond). Dit komt omdat

bij deze nieuwe methode productaccumulatie, tijdens de latere PCR-cycli, voor detectie niet echt noodzakelijk is. Het wegvallen van een PCR-reactie

bij een knolsapverdunding van  $10^{-3}$  (figuur 2) sluit echter enige vorm van inhibitie, ook in het geval van de Taqman PCR, niet uit.

TRV kon met de Taqman PCR nog aangetoond worden in monsters knol- en plantsap die 5 jaar bewaard waren bij -80°C.

Tijdens een survey in praktijkmonsters pootaardappelen met inwendige necroses (2005, n=15) bleek TRV goed te onderscheiden van 'roestvlekken' ten gevolge van fysiologische oorzaken. De Taqman PCR werd daarbij ingezet naast andere diagnostische hulpmiddelen die verwarring met het aardappelvirus Y (met name PVY<sup>NTN</sup>), het aardappelaucubamozaïekvirus (PAMV) en het

tabaksnecrosevirus (TNV) moeten uitsluiten.

## Samenvatting

Met de door Mumford *et al.* beschreven multiplex real-time Taqman PCR kunnen planten en knollen met TRV en PMTV snel van elkaar, en van fysiologische oorzaken, worden onderscheiden. Opnieuw bleek dat in- en uitwendige necroses bij aardappelen alleen op basis van een laboratoriumtoets betrouwbaar zijn te diagnosticeren. Experimenten met praktijkmateriaal lieten zien dat de nieuwe combitest gevoeliger, robuuster en goedkoper is dan de tot nu toe door de NAK gehanteerde methodieken. De

methode wordt door de NAK ingezet om onderzoek te doen naar de status van TRV en PMTV in Nederland.

## Literatuur

- Anonymus (1969) 'Mop top'virus van aardappel. In: Jaarverslag IPO 1969, 92
- Cornelissen, B.J.C., Linthorst, H.J.M., Brederode, F.T. & Bol, J.F. (1986) Analysis of the genome structure of tobacco rattle virus strain PSG. *Nucleic Acids Research* **14**: 2157-2169
- Cuperus, C. en de Bokx, J.A. (1990) Chemische middelen en bodemvirussen bij de pootgoedteelt. *Aardappelwereld*, september 1990 (3): 31-34
- Hoof, H.A. van & Rozendaal, A. (1969) Het voorkomen van 'potato mop top virus' in Nederland. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **75**: 275
- Mumford, R.A., Walsh, K., Barker, I. & Boonham, N. (2000) Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology* **90**: 448-453