

Consultancy

Ontwikkeling van een PCR voor de detectie van CChMVd in chrysant



November 2010

**Ellis Meekes, Rien Hooftman
Naktuinbouw**

Consultancy: Ontwikkeling van een PCR voor de detectie van CChMVd in chryasant

Opdrachtgever: Productschap Tuinbouw

Looptijd project: Augustus - november 2010

Colofon:

Auteurs: E.T.M. Meekes
M. Hooftman

Adres: Naktuinbouw
Sotaweg 25
2371 GD Roelofarendsveen

Datum: 30 november 2010

Titel rapport: Consultancy: Ontwikkeling van een PCR voor de
detectie van CChMVd in chryasant

Opdrachtgever: Productschap Tuinbouw

Kernwoorden: Chryasant, CChMVd, PCR, toets

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgevers.

Inhoudsopgave

| | |
|--|----|
| Samenvatting | 4 |
| Inleiding | 5 |
| 1. Methoden en Resultaten | 6 |
| 1.1 Huidige stand van zaken | 6 |
| 1.2 Waar moet een PCR-toets aan voldoen? | 6 |
| 1.3 Ontwikkeling PCR | 7 |
| 1.3.1 Collectie CChMVd | 7 |
| 1.3.2 Optimalisatie | 7 |
| 1.3.3 Verschillende isolaten | 8 |
| 1.3.4 Interne controle | 8 |
| 1.3.5 Gevoeligheid | 9 |
| 2. Conclusies en aanbevelingen | 11 |
| 2.1 Conclusies | 11 |
| 2.2 Aanbevelingen | 11 |
| Bijlage 1 Literatuur | 12 |

Samenvatting

Chrysantenbontviroïde (eng: *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd) is een viroïde dat alleen in chrysant voorkomt. Geïnfecteerde chrysanten vertonen chlorotische vlekken op het blad en nieuw ontwikkeld blad kan soms zelfs compleet chlorotisch zijn. Tot voor kort kwam dit viroïde met name in de VS voor, maar is ondertussen ook in Europa gevonden. Een viroïde kan vergeleken worden met een virus, maar is veel kleiner en heeft geen eiwitmantel. Het organisme kan zich alleen in planten vermenigvuldigen. Het gevaar van CChMVd is dat het symptoomloos kan voorkomen en daardoor een sluimerend gevaar voor de chrysantenteelt vormt – symptoomexpressie vindt met name bij hogere temperaturen plaats. Bij chrysantenteelt wordt gebruik gemaakt van vegetatief vermeerderde stek, de kans op mechanische overdracht wordt daardoor alleen maar groter.

De meeste viroïden die in de tuinbouw voor problemen zorgen behoren tot de familie van de Pospiviroidae. Het CChMVd behoort echter tot de familie Avsunviroidae en wordt daarom niet door de reeds bestaande RT-PCR's (moleculaire toetsen) voor pospiviroiden opgepikt. Naktuinbouw heeft in het kader van deze consultancy een PCR (moleculaire) toets ontwikkeld.

Er is een robuuste PCR gedestilleerd uit de beschikbare informatie. Verder is gebleken dat verschillende CChMVd stammen in Nederland aanwezig zijn. Al deze stammen worden succesvol gedetecteerd met de huidige toets. De gevoeligheid van de ontwikkelde toets is dusdanig dat afnemers meerdere monsters kunnen samen voegen. Hierdoor is de toets betaalbaar voor de eindgebruiker.

In het project is de viroïdeconcentratie gedurende het jaar heen niet meegenomen. Het vermoeden is dat de concentraties van het viroïde in de plant in de winter lager zullen zijn dan in de zomer. De aankomende tijd zal Naktuinbouw de toets verder optimaliseren. Aspecten waar nader onderzoek op plaats zal vinden zijn:

- Het combineren van de toets met de detectie van chrysantendwerggroeiviroïde (*Chrysanthemum stunt viroid* CSVd)
- Variatie van viroïdeconcentratie in de plant in de seizoenen
- Automatisering van de toets.

Inleiding

Viroïden zijn 's werelds kleinste ziekteverwekkers en komen alleen in planten voor. Een viroïde kan vergeleken worden met een virus, maar is veel kleiner en heeft geen eiwitmantel. Sommige viroïden komen in verschillende gewassen voor, maar Chrysantenbontviroïde (eng: Chrysanthemum chlorotic mottle viroid, CChMVd) komt alleen in chrysant voor. Viroïden worden meestal mechanisch, d.w.z. met geïnfecteerd sap, overgedragen.

CChMVd is voor het eerst waargenomen in 1967 in de buurt van New York. Tot voor kort kwam dit viroïde met name in de VS voor, maar er zijn ook meldingen uit Denemarken, Frankrijk en India (Horst & Nelson, 1997). Sinds een aantal jaar wordt er ook melding gemaakt van ernstige problemen in chrysant met CChMVd in Japan. Het viroïde is ondertussen ook in Nederland gevonden.

Geïnfecteerde chrysanten vertonen chlorotische vlekken op het blad en nieuw ontwikkeld blad kan soms zelfs compleet chlorotisch zijn. In enkele gevallen is dwerggroei van blad, bloem of hele plant bekend. Onder normale omstandigheden kan de chlorose van het blad makkelijk verward worden met voedingsgebrek. Symptomen komen het best tot uiting onder lage lichtintensiteit en een temperatuur tussen 24-27°C (Horst & Nelson, 1997). Het gevaar van CChMVd is dat het symptoomloos kan voorkomen en daardoor een sluimerend gevaar voor de chrysantenteelt vormt – symptoomexpressie vindt met name bij hogere temperaturen plaats. Daarnaast wordt bij chrysantenteelt gebruik gemaakt van vegetatief vermeerderde stek, de kans op mechanische overdracht wordt daardoor alleen maar groter.

De meeste viroïden die in de tuinbouw voor problemen zorgen behoren tot de familie van de Pospiviroidae. Het CChMVd behoort echter tot de familie Avsunviroidae en wordt daarom niet door de reeds bestaande RT-PCR's voor pospiviroïden opgepikt. Theoretisch zou een toetsplantenonderzoek geschikt zijn om dit viroïde aan te tonen, maar deze methode is arbeidsintensief. De eerste symptomen ontwikkelen zich pas na 8 dagen en kunnen verward worden met voedingsstoffengebrek. Op dit moment wordt er in een aantal landen stekmateriaal van chrysant visueel beoordeeld op CChMVd. Nederlandse bedrijven hebben moeite met de geloofwaardigheid van een visuele vaststelling en zoeken daarom naar een toetsmethode waarbij het tegendeel bewezen kan worden. Op dit moment wordt alleen door een Amerikaans bedrijf een toets aangeboden; dit is de zgn. hybridisatietoets. Een nadeel is dat de voorbereiding van de monsters arbeidsintensief is en altijd een heel membraan moet worden ingestuurd, ongeacht kleine aantallen monsters. Hybridisatietechnieken zijn in het algemeen ook minder gevoelig dan bijv. RT-PCR. CChMVd komt in lage concentraties voor en wordt daarom ook niet door een algemene R-PAGE aangetoond, waarmee veel pospiviroïden wel aangetoond kunnen worden (mits de concentratie hoog genoeg is). Ontwikkeling van een gevoelige RT-PCR zou uitkomst kunnen bieden.

1. Methoden en Resultaten

1.1 Huidige stand van zaken

In Spanje (R. Flores en collega's) wordt al jaren aan CChMVd verwerkt, daarnaast is ook in Japan (Hosokawa en collega's) onderzoek gedaan en daardoor is internationaal veel genetische informatie over CChMVd beschikbaar. Deze informatie is op internet te vinden (NCBI Gago et al., 2009, e.a). Verder zijn er ook verschillende toetsen (PCR's) beschreven die in dit onderzoek worden meegenomen (Dufour et al., 2009, Gago et al., 2009, Hosokawa et al., 2005). Ondanks al deze info is er tot op heden geen moleculaire toets beschikbaar voor de sector.

1.2 Waar moet een PCR-toets aan voldoen?

Voordat allerlei aspecten van een toets nader bekeken wordt, wordt gezocht naar de optimale omstandigheden waaronder de toets zo goed mogelijk verloopt. Daarnaast probeert men veiligheden in te bouwen om te controleren of de toets altijd naar behoren verloopt.

Deze veiligheden zijn:

- Binnen een reeks monsters altijd een extra positief monster mee laten lopen om te laten zien dat de toets een positief monster kan detecteren
- Een interne controle mee laten lopen (zie verderop). Deze interne controle moet aantonen dat wanneer in het monster geen CChMVd aanwezig is, er bewijs is dat de toets toch goed verlopen is.

Er zijn verschillende aspecten waar een goede PCR-toets aan moet voldoen:

- Een toets moet specifiek zijn: daarmee wordt bedoeld dat de toets alle varianten van de soort moet detecteren, maar niet mag reageren met andere ziekten. In dit geval willen we dat alle varianten van CChMVd gedetecteerd worden, maar dat chrysantendwerggroeiviroïde (CSVd) of chrysantenvirus B niet gedetecteerd worden.
- Verder moet een toets selectief zijn. Hiermee bedoelen we dat de toets niet mag reageren met gezond materiaal, dus – in dit geval – niet met materiaal van chrysant.
- Gevoelig: hoe gevoelig is de toets eigenlijk? Hiervoor kunnen verdunningsreeksen worden gemaakt, waarmee de marge wordt aangegeven waarbinnen een toets betrouwbaar kan worden uitgevoerd. Hierbij moet in gedachten worden gehouden dat CChMVd in veel lagere concentraties voorkomt dan bijv. CSVd: de standaard methode voor detectie van viroïden – de zogenaamde R-PAGE – werkt niet voor CChMVd.

1.3 Ontwikkeling PCR

1.3.1 Collectie CChMVd

Bij de ontwikkeling van een toets is het belangrijk om alle varianten van de ziekte worden gedetecteerd, maar andere ziekten die in chryasant voorkomen niet. De variatie binnen de verschillende isolaten/ stammen is voor CChMVd extra belangrijk, omdat CChMVd van alle viroïden het makkelijkst muteert (Gago et al., 2009).

Het materiaal dat in dit project is meegenomen staat in tabel 1 beschreven. Van 6 isolaten is de genetische informatie bepaald m.b.v. sequentieanalyse en is nagegaan welke stam het hier betrof: een symptomatische of een niet-symptomatische stam. Hieruit blijkt dat de collectie bestaat uit minimaal 3 symptomatisch en 3 niet-symptomatische stammen (tabel 1)

Tabel 1: Achtergrondinformatie van het chrysantenmateriaal dat meegenomen is in dit project

| Code | Achterliggende informatie | CChMVd? | Stam ¹ | CSVd? |
|-------------------|---|---------|-------------------|-------|
| 2004-040 | Ras onbekend, ook besmet met CSVd, CChMVd besmetting bevestigd in VS (1997) | ja | S | ja |
| Spanje-S | 'Bonnie Jean', referentiemateriaal Spanje (R. Flores), symptomatische stam | ja | S | nee |
| Spanje-NS | 'Bonnie Jean', referentiemateriaal Spanje (R. Flores), niet-symptomatische stam | ja | NS | nee |
| 2010-x | 'Bonnie Jean', gezond | nee | - | nee |
| 2004-125 | 'Mistletoe', gezond? | ja | n.g. ² | nee |
| 2009-x | 'Mistletoe', besmet met CChMVd? | nee | - | nee |
| Praktijkmonster 1 | CChMVd besmetting bevestigd in VS | ja | S | nee |
| Praktijkmonster 2 | CChMVd besmetting bevestigd in VS | ja | NS | nee |
| Praktijkmonster 3 | CChMVd besmetting bevestigd in VS | ja | NS | nee |
| Praktijkmonster 4 | Elders visueel ziek bevonden | nee | - | nee |
| Praktijkmonster 5 | Elders visueel ziek bevonden | nee | - | nee |
| Praktijkmonster 6 | Elders visueel ziek bevonden | nee | - | nee |

¹: S = genetisch symptomatische stam, NS = genetisch niet-symptomatische stam

²: n.g. = niet getoetst

1.3.2 Optimalisatie

Er zijn vijf PCR's uitgetoetst met materiaal van 2004-040, op dat moment het enige besmette materiaal in ons bezit (PCR's: Dufour et al., 2009, Gago et al., 2009, Hosokawa et al., 2005). Omdat de temperatuur waarbij een PCR wordt uitgevoerd van grote invloed kan zijn op het resultaat, is er een "temperatuur gradiënt" uitgevoerd, variërend van 53°C tot 63°C. De optimale temperatuur kan afhankelijk zijn van het apparaat waarmee deze toets is uitgevoerd.

Uit dit experiment komt naar voren dat PCR's 1 en 4 een zwak signaal geven onafhankelijk van de temperatuur waarbij deze toets wordt uitgevoerd. Deze PCR's worden niet meer meegenomen in de vervolgstappen van dit project. Voor PCR's 2, 3 en 5 ligt de optimum temperatuur tussen de 57°C en 60°C.

Tabel 2: Resultaten van 5 verschillende PCR's uitgevoerd onder verschillende temperatuur regimes: 53°C – 63°C..

| gradient | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------|---|---|---|---|---|
| marker | | | | | |
| 63°C | | | | | |
| 62°C | | | | | |
| 59°C | | | | | |
| 57°C | | | | | |
| 54°C | | | | | |
| 53°C | | | | | |
| marker | | | | | |
| CChMVd | | | | | |

1.3.3 Verschillende isolaten

Vervolgens zijn zes isolaten getoetst met PCR 2, 3 en 5. Uit de resultaten in tabel 3 blijkt dat alle isolaten worden gedetecteerd door deze PCR's. Echter PCR 3 geeft een zwakkere reactie bij monster 'praktijk 1', terwijl PCR 5 zwakkere reacties vertoont bij isolaten 'praktijk 2' en 'Spanje-NS'. PCR2 geeft over de hele breedte een goed signaal, met deze PCR wordt verder gewerkt.

Tabel 3: Resultaten van 3 verschillende PCR's uitgevoerd met verschillende isolaten en stammen van CChMVd.

| isolaat | 2 | 3 | 5 |
|----------------------|---|---|---|
| marker | | | |
| Praktijk 1 | | | |
| Praktijk 2 | | | |
| Praktijk 3 | | | |
| 2004-040 | | | |
| 2004-040 | | | |
| Spanje-S | | | |
| Spanje-NS | | | |
| marker | | | |
| CChMVd (blauwe pijl) | | | |

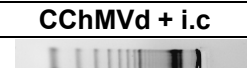
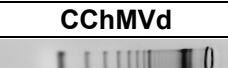

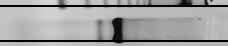
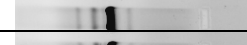
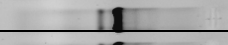
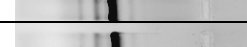

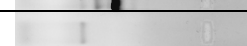

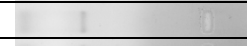
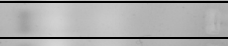




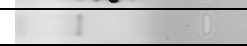
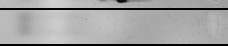
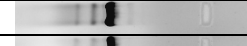
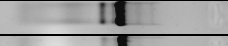

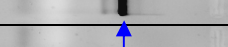
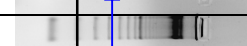
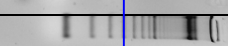

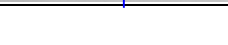
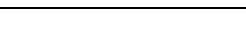
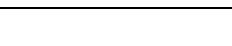


1.3.4 Interne controle

Een ander aspect wat belangrijk is voor toetsontwikkeling is een interne controle. Op het moment dat het pathogeen niet aanwezig is, zal de PCR geen

reactie geven, maar wat als er ergens in het proces wat misgegaan is en dat de oorzaak is van het ontbreken van een reactie?

Om dergelijk “vals negatieve” reacties uit te sluiten, wordt gebruikt gemaakt van een interne controle. In deze toets is dat een reactie op RNA van plantmateriaal, dat in elk monster aanwezig zal zijn (Menzel et al., 2002). Doordat er nu een “multiplex”-PCR wordt uitgevoerd: 1 reactie op het pathogeen CChMVd plus 1 reactie als interne controle (plant RNA) moet nagegaan worden of een dergelijke interne controle de detectie niet stoort. Hiervoor zijn monsters getoetst mét en zonder interne controle. Zoals uit tabel 4 blijkt heeft deze interne controle geen negatief effect op detectie van CChMVd.

Tabel 4: Resultaten van een PCR voor detectie van CChMVd met interne controle (i.c.) en een PCR zonder i.c.

| monster | CChMVd + i.c | CChMVd |
|------------------------|---|--|
| Marker |  |  |
| Praktijk 1 |  |  |
| Praktijk 2 |  |  |
| Praktijk 3 |  |  |
| 2004-040 |  |  |
| 'Mistletoe' CChMVd? |  |  |
| 'Bonnie Jean' (2010-x) |  |  |
| Praktijk 4 |  |  |
| Praktijk 5 |  |  |
| 'Mistletoe' 2004-124 |  |  |
| Praktijk 6 |  |  |
| Spanje-S |  |  |
| Spanje-NS |  |  |
| NTC |  |  |
| Marker |  |  |
| CChMVd (blauwe pijl) | i.c. | |

1.3.5 Gevoeligheid

Hoe gevoelig is de toets? Hiervoor is een positief monster doorverdund in gezond sap. Als begin concentratie is 0,5 gram besmet CChMVd chrysantenblad verdund met 5 ml buffer (onverdund). Dit besmette sap is doorverdund in stappen van 10: beginnend met 1 deel besmet sap + 9 delen gezond sap, etc. De zo ontstane verdunningsreeksen zijn vervolgens getoetst met PCR2 en PCR3.

Uit tabel 5 blijkt dat, wanneer monsters getoetst worden met PCR2 monsters 100x verdund kunnen worden, zonder de betrouwbaarheid van de detectie te beïnvloeden. Bij 1000x verdunning wordt de reactie wel dusdanig zwak dat de uitslag twijfelachtig zou zijn. Wanneer eenzelfde monster getoetst wordt met PCR 3, blijkt dat deze PCR veel minder gevoelig is, het monster kan slechts 10x doorverdund worden.

CChMVd komt in veel lagere concentraties voor dan CSVd: materiaal besmet met CSVd kan 10 000 tot 100 000x doorverdund worden, zonder dat de betrouwbaarheid van de toets beïnvloed wordt.

Tabel 5: Resultaten van een verdunningsreeks van CChMVd besmet materiaal in gezond chrysantenbladsap, getoetst met PCR2 en PCR3 (met interne controle = i.c.).

| monster | verd | PCR 2 | uitslag | PCR 3 | uitslag |
|----------------------|-------------|-------|---------|-------|---------|
| 1 | onverdund | | + | | + |
| 1 | 10x | | + | | + |
| 1 | 100x | | ± | | ± |
| 1 | 1000x | | -/± | | - |
| 1 | 10 000x | | - | | - |
| 1 | 100 000x | | - | | - |
| 1 | 1 000 000x | | - | | - |
| 1 | 10 000 000x | | - | | - |
| | marker | | | | |
| 2 | onverdund | | + | | |
| 2 | 10x | | + | | |
| 2 | 100x | | ± | | |
| 2 | 1000x | | -/± | | |
| 2 | 10 000x | | - | | |
| 2 | 100 000x | | - | | |
| 2 | 1 000 000x | | - | | |
| 2 | 10 000 000x | | - | | |
| gezond | onverdund | | - | | |
| | marker | | | | |
| CChMVd (blauwe pijl) | | i.c. | | i.c. | |

Een verdunningsreeks geeft goed de grenzen van een toets weer, maar wanneer meerdere bladeren tegelijkertijd worden getoetst, doet men feitelijk wat anders. Men neemt dan namelijk een gedeelte van elk blad en vermaalt dat in buffer. Op het zo verkregen sap wordt vervolgens de analyse uitgevoerd.

Als men bladeren samenvoegt dan is het dus belangrijk dat dat ene besmette blad nog wel gedetecteerd wordt. Er is daarom een verdunningsreeks gemaakt van 1 blad ziek plus 4, 9 of 19 bladeren gezond. Uit tabel 6 blijkt dat dit de detectie nauwelijks beïnvloed.

Tabel 6: Resultaten van een samenvoegingsreeks van CChMVd besmet materiaal met gezond blad van chryasant, getoetst met PCR2 (met interne controle = i.c.).

| Nr | gezond/ziek | PCR2 |
|----------------------|----------------------------------|------|
| 1 | Gezond blad | |
| 2 | 4 bladeren gezond + 1 blad ziek | |
| 3 | 9 bladeren gezond + 1 blad ziek | |
| 4 | 19 bladeren gezond + 1 blad ziek | |
| 5 | Ziek blad | |
| 6 | Marker | |
| CChMVd (blauwe pijl) | | i.c. |

2. Conclusies en aanbevelingen

2.1 Conclusies

Het project is succesvol afgerond:

- er is een robuuste PCR gedestilleerd uit de beschikbare informatie.
- Verder is gebleken dat verschillende CChMVd stammen in Nederland aanwezig zijn. Al deze stammen worden succesvol gedetecteerd met de huidige toets.
- Verder is de toets gevoelig genoeg om monsters voor analyse te combineren, waardoor de toets betaalbaar blijft.

2.2 Aanbevelingen

- In dit onderzoek (3 maanden) is er niet gekeken naar variatie in viroïdeconcentratie door het jaar heen. Vermoeden is dat de concentraties in de winter lager zullen zijn dan in de zomer.
- Verder optimaliseren van de toets.
 - Naktuinbouw zal aankomende tijd de toets verder optimaliseren. Ook zullen aspecten als het combineren van de toets met de detectie van chrysantendwerggroeiviroïde (*Chrysanthemum stunt viroid* CSVd); variatie in de seizoenen en automatisering van de toets worden meegenomen.

Bijlage 1 Literatuur

Dufour, D., M. de la Peña, S. Gago, R. Flores, J. Gallego (2009). Structure–function analysis of the ribozymes of chrysanthemum chlorotic mottle viroid: a loop–loop interaction motif conserved in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Research* 37: 368–381.

Gago, S., S.F. Elena, R. Flores, R. Sanjuán (2009). Extremely High Mutation Rate of a Hammerhead Viroid. *Science* 323:1380.

Horst, R.K., P.E. Nelson (1997). *Compendium of chrysanthemum diseases*. APS Press.

Hosokawa, M., Y. Masushita, K. Ohishi, S. Yasawa (2005). Elimination of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) recently detected in Japan by leaf-primordia free shoot apical meristem culture for infected cultivars. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 74: 386-391.

Menzel, W., W. Jelkmann, E. Maiss (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81-92.