

Keuringsdiensten kunnen speld in hooiberg vinden

Om een virus in de bollenteelt te bestrijden, is het noodzakelijk om te weten welk onbekend virus zich in een gewas heeft genesteld. Next Generation Sequencing is de methode waarmee de keuringsdienst de genetische code van een virus kan achterhalen, al is het een heel gepuzzel.

Tekst: Iris Stulemeijer/BKD
Fotografie: René Faas
Illustratie: Fleur Gawehns/Naktuinbouw

Door het steeds internationaler opereren van bedrijven en de schaalvergroting in de sector, komen de telers en keuringsdiensten steeds vaker in aanraking met nieuwe en onbekende ziekten en plagen. Met name de identificatie van onbekende virussen in een gewas kan erg tijdrovend zijn, waardoor soms kostbare tijd verloren gaat voordat de juiste preventieve maatregelen genomen kunnen worden. Een goed voorbeeld hiervan is *Plantago Asiatica* Mozaïek Virus (PIAMV), dat op het moment van identificatie in 2010 al was uitgegroeid tot een groot probleem voor de leliesector. Het innovatie- en demonstratiecentrum (IDC) Bollen & Vaste planten biedt de mogelijkheid aan ondernemers in de bollen- en vasteplantensector om kennis te nemen van nieuwe technologieën en innovatieve methoden via bundeling van krachten van verschillende organisaties. Een nieuwe techno-

logie die wereldwijd binnen de medische- en groensector sterk in opkomst is, is Next Generation Sequencing (NGS). Binnen een van de IDC-projecten onderzoeken de Naktuinbouw en de BKD, samen met Naturalis en het Leidse biotechnologiebedrijf Baseclear, hoe deze technologie voor de bollen- en vasteplantensector gebruikt kan worden. In dit project is de NGS-technologie geoptimaliseerd voor identificatie van bekende en onbekende virussen in diagnostiekmonsters.

GENETISCHE CODE

Genetisch materiaal bestaat uit een aaneenschakeling van bio-organische bouwstenen (nucleotiden) die samen de genetische code vormen. Het 'lezen' ofwel sequencen van de volgorde van die bouwstenen gebeurt al sinds de jaren tachtig maar is zeer tijd- en arbeidsintensief. Recente technologische ontwikkelingen hebben geleid tot de ontwikkeling van Next Generation Sequencing (NGS). Met NGS worden in korte tijd datahoeveelheden gegenereerd vergelijkbaar met 40.000 foto's, met als nadeel dat complexe analyses nodig zijn

(zie afbeelding rechts). De complexiteit van de NGS-technologie is echter ook zijn kracht. In tegenstelling tot de huidige ELISA- en PCR-toetsen die altijd virusspecifiek zijn, richt de NGS-techniek zich niet specifiek op één virus. Dit maakt NGS bij uitstek geschikt om onbekende of nieuwe ziekteverwekkers in een gewas te identificeren. Omdat de NGS-technologie zowel bekende als onbekende ziekteverwekkers aantoont, kan NGS mogelijk ook gebruikt worden om een gewas 'vrij van ziekteverwekkers' te verklaren, wat met name voor uitgangsmateriaal een waardevolle toevoeging zou zijn in de sector.

PRAKTIJKERVARINGEN

Voor optimalisatie van de NGS-technologie en het schrijven van computerscripten voor het puzzelen, zijn verschillende gewassen zoals tulp, lelie, *Zantedeschia*, dahlia, canna en freesia bemonsterd waarvan al bekend was welk virus erin aanwezig was. Na een uitgebreide optimalisatie zijn vervolgens de verwachte virussen aangetoond tussen het genetische materiaal van de plant. Deze laten zien dat de techniek toepasbaar is voor praktijkmateriaal. Naast het aantonen van bekende virussen levert de NGS-analyse ook nieuwe informatie over een bekend virus. De genetische code van een virus verandert in de loop der tijd waardoor er soms een andere bouwsteen in het genetisch materiaal zit dan in de referentiecode. Door deze veranderingen te kennen, krijgen de keuringsdiensten inzicht in hoe snel een virus verandert en wanneer er aanpassingen aan de virustoetsen nodig zijn. Dit soort kennis is cruciaal om altijd de beste toetsen beschikbaar te hebben en eventuele virusmeldingen uit het buitenland voor te blijven.

Toen NGS geschikt bleek voor virusidentificatie zijn er ook diagnostiekmonsters geanalyseerd met virussymptomen waarvan de veroorzaker niet op voorhand onderzocht was. In deze planten zijn bekende virussen, zoals Canna Yellow Streak Virus en Konjac mozaïekvirus geïdentificeerd. Ook bleek de NGS-methode geschikt voor onderzoek aan 300 jaar oud plantmateriaal. Tijdens de tulpenmanie in de zeventiende eeuw werden tulpen met gevlamde patronen op de bloem verhandeld voor enorme geldbedragen. Alles wijst erop dat deze vlampatronen werden veroorzaakt door de aanwezigheid van een mozaïekvirus. Door het genetische materiaal van een van deze tulpen uit het 'Van Royen'-herbarium (Naturalis) met NGS te analyseren, weten we nu dat er inderdaad Rembrandt-mozaïekvirus in deze 300 jaar oude tulp zat. Bovendien vertelt de genetische code van dit oude virus hoe en hoe snel dit virus veranderd is sinds de achttiende eeuw

tot nu. Dit zijn leerzame voorbeelden van de toegevoegde waarde van NGS voor de kennisontwikkeling en toetsoptimalisatie. Tenslotte is er ook een plant geanalyseerd met onbekende virussymptomen waarin geen bekend virus kon worden aangetoond. Met behulp van specifieke software en handmatige optimalisatie van de analyse zijn de viruspuzzelstukjes geïdentificeerd en aan elkaar gepuzzeld. Daarbij is een nieuw virus gevonden dat niet eerder beschreven is. De beschikbaarheid van de genetische code maakt het nu mogelijk om een PCR-toets te ontwikkelen die dit virus voortaan aan kan tonen. De analyse van enkele andere diagnostiekmonsters is nog niet afgerond, omdat virusidentificatie zonder referentie nog erg arbeidsintensief is. Bovendien kan het ook zo zijn dat er geen (bekend of nieuw) virus aanwezig is en dat de symptomen een andere, bijvoorbeeld fysiologische oorzaak hebben. In dat geval levert het puzzelen geen aanwijzing voor virus op.

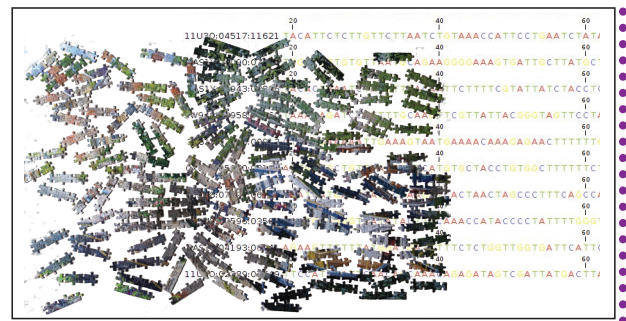
TOEKOMSTVISIE

Het is gebleken dat de NGS-technologie zeer bruikbaar is om bekende virussen in planten te identificeren. Daarbij is de beschikbaarheid, van kennis op het gebied van bioinformatica en virologie, goede software voor analyse en een goede uitgebreide virusreferentie-database van groot belang voor een vlotte identificatie van het virus. Op dit moment zijn er zo'n 1.200 referentiecodes van virussen beschikbaar maar dit aantal zal snel toenemen nu NGS wereldwijd wordt toegepast voor onderzoek en diagnostiek. NGS-technologie maakt de identificatie van onbekende virussen in planten een stuk eenvoudiger. Voor deze analyses is echter specifieke kennis van de technologie noodzakelijk voor correcte virusidentificaties. Daarbij moet bij de vondst van een nieuw virus altijd nog de correlatie gemaakt worden met de symptomen die waargenomen worden. Bovendien zorgt de complexe analyse er momenteel nog voor dat het lastig is om een plant 'vrij van virus' te verklaren, doordat lage concentraties van een onbekend virus mogelijk nog niet tot goede identificatie leiden.

De technologische ontwikkelingen met betrekking tot NGS en dataverwerking zijn in volle gang waardoor de kosten dalen en NGS steeds toegankelijker wordt voor diagnostiek en (semi-)routine-analyses. Maar om NGS breed inzetbaar te maken, moet er eerst een antwoord op een aantal vragen komen. Zo is nog onbekend of recente virusinfecties aangetoond worden en hoe gevoelig NGS is ten opzichte van ELISA- en PCR-toetsen. Daarnaast is nog onduidelijk hoe betrouwbaar de methode is bij een infectie met meer dan één virus. Tenslotte

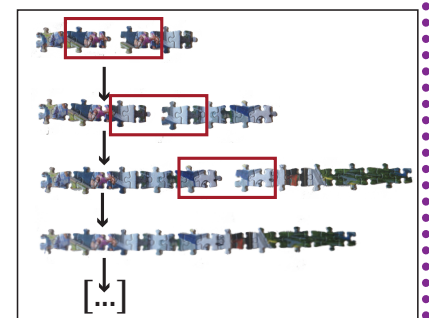
ZO WERKT HET NEXT GENERATION SEQUENCING

Met Next Generation Sequencing (NGS) wordt de bouwsteenvolgorde (A,C,T en G) van stukjes van de genetische code 'gelezen' in enkele uren tot dagen. Vervolgens worden deze stukjes sequentie, de puzzelstukjes, aan elkaar te puzzelen tot de genetische code van een organisme. Een virusgeïnfecteerde plant bevat naast het genetische materiaal van het virus ook het vele malen complexere genetisch materiaal van de plant. Hierdoor is slechts 1 op de 1.000 puzzelstukjes van het virus. Het samenstellen van de genetische puzzel van het virus is daarmee vergelijkbaar met het zoeken naar een speld in een hooiberg.



Het virus is al eerder beschreven en er is een genetische referentiecode beschikbaar. De puzzel kan nu samengesteld worden door de puzzelstukjes met deze referentiecode te vergelijken.

Het virus is onbekend en er is geen referentiecode beschikbaar. De individuele puzzelstukjes moeten stuk voor stuk aan elkaar gepuzzeld worden tot een nieuwe puzzel. Omdat slechts 1 op de 1.000 puzzelstukjes tot de 'viruspuzzel' behoren, vereist dit veel reken-capaciteit van de computer en handwerk van de onderzoeker.



De volledige genetische code is succesvol in elkaar gezet.



is een versnelde en gestandaardiseerde dataverwerking noodzakelijk voor het routinematig toepassen van NGS voor virus identificatie in diagnostiekmonsters.

Uiteindelijk zal de NGS-technologie in Nederland, alsook in het buitenland ingezet gaan worden om bekende en onbekende virussen in

gewassen op te sporen. Daarmee zal de kennis van virussen in gewassen toenemen. Hoe eerder de Nederlandse keuringsdiensten in staat zijn om voorop te lopen in deze kennisontwikkeling, hoe beter we onze exportgewassen vrij kunnen houden van virussen. Daarmee blijft de sector gezond en toonaangevend.

IDC Bollen & Vaste Planten

Onder de vlag van het Innovatie- en Demonstratie Centrum Bollen & Vaste planten zijn de afgelopen jaren tientallen activiteiten uitgevoerd voor de sector. BloembollenVisie zet in deze serie artikelen de resultaten van een aantal van deze onderzoeken op een rij. De onderzoeken staan ook op www.bloembollenweb.nl/IDC.



Een medewerker van de BKD voert onderzoek uit in het laboratorium