

# Molekulare Hochleistungsdiagnostik zum Nachweis von Kartoffel-Viren

Olivier Schumpp, Brice Dupuis, Amanda Bréchon, Werner Wild, Peter Frei, Didier Pellet und Santiago Schaerer  
Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB, 1260 Nyon, Schweiz

Auskünfte: Olivier Schumpp, E-Mail: olivier.schumpp@agroscope.admin.ch



Entnahme der Schale beim Stolonien-Ende der Kartoffel.

## Einleitung

In allen Produktionsgebieten der Erde gibt es Viruskrankheiten der Kartoffelpflanzen, welche die Erträge und die Qualität der Kartoffelernten schwer beeinträchtigen können (Valkonen 2007). In der Schweiz verursachen hauptsächlich das Kartoffelvirus Y (PVY) und in geringerem Ausmass das Blattrollvirus (PLRV) in der Kartoffelproduktion die grössten Schäden (Steinger *et al.* 2014). Diese beiden Viren werden durch verschiedene Blattlausarten übertragen (Verbeek *et al.* 2010; Basky

2002). In der geflügelten Form sind diese Insekten sehr mobile Krankheitsvektoren und können die Viren von Pflanze zu Pflanze übertragen und verbreiten. Beim PVY handelt es sich um ein sogenannt *nichtpersistentes* Virus, das heisst die Blattläuse können das Virus von einer erkrankten Pflanze erwerben und bereits nach einigen Sekunden unmittelbar auf benachbarte Pflanzen übertragen. Wegen dieser schnellen Übertragung sind Insektizide wirkungslos, weil die Blattläuse das Virus übertragen können, bevor die Wirkung des Insektizids einsetzt (Perring *et al.* 1999). In den Sechzigerjahren wurde eine Bekämpfungsstrategie umgesetzt, die auf dem Vertrieb von gesundem und zertifiziertem Pflanzmaterial beruht. Dadurch konnte innerhalb einiger Jahre eine Steigerung des Ertrags pro Hektare um den Faktor 1,7 erreicht werden (Keller und Bérces 1966). Ursprünglich erfolgten die Tests durch die Inokulation von Indikatorpflanzen mit den zu testenden Knollen. Diese arbeitsintensive Methode wurde dann 1984 durch antikörperbasierte Tests (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) abgelöst (Gugerli und Gehriger 1980). Für den Nachweis des PVY in den Knollen unmittelbar nach der Ernte ist diese Methode jedoch zu wenig empfindlich und das allfällig in den Knollen vorhandene Virus muss vor der Analyse zur Vermehrung angeregt werden. Durch ELISA nachweisbare Virenkonzentrationen können mit zwei verschiedenen Methoden erreicht werden. Bei der ersten wird die Keimruhe der Knollen durch direkte Begasung (Rindite oder Bromethan) durchbrochen. Die zweite Methode erfordert die Kultivierung von Knollen, die mit einem flüssigen Pflanzenhormon (Gibberellinsäure) behandelt wurden. Während also bei einer Methode mit giftigen Gasen hantiert wird, die ELISA-Analyse aber direkt bei den Knollen erfolgen kann, werden die Tests bei der zweiten Methode an den Blättern junger Keimlinge durchgeführt, was mit einem beträchtlichen Arbeitsaufwand verbunden ist und grosse Treibhausflächen zur Kultivierung der Pflanzen erfordert. In beiden Fällen ist die Vermehrung des Virus ein langer Prozess und die Ergebnisse liegen erst nach vier bis acht Wochen vor.

Agroscope hat nun eine alternative Methode entwickelt, mit der ein Virus direkt bei ruhenden Knollen unmittelbar nach der Ernte nachgewiesen werden kann. Diese Methode beruht auf der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (*Real-time* RT-PCR), eine molekulare Analyse-methode, die  $10^5$  bis  $10^7$  Mal empfindlicher ist als der ELISA (Kogovsek *et al.* 2008). Diese schnelle, zuverlässige und sehr flexible Methode wurde ab 2013 entwickelt und laufend validiert. 2016 werden die gesamten in der Schweiz produzierten Posten von Pflanzkartoffeln mit *Real-time* RT-PCR analysiert. Dieser Artikel stellt die Techniken und Strategien dieses Analyseprotokolls vor, mit dem in wenigen Wochen einige Hunderttausend Knollen geprüft werden können.

## Material und Methoden

### Pflanzenmaterial

Pro analysierter Posten wurden 200 Knollen aus den Parzellen zur Vermehrung von Pflanzgut für Kartoffeln entnommen (Abb. 1). Etwa 250 mg der Schale wurden am Nabelende der ruhenden Knollen einschliesslich Stolon entnommen. Nach Vernarbung des Entnahmebereichs wurden dieselben Knollen anschliessend mit Rindite behandelt und mit dem ELISA analysiert (Gugerli und Gehriger 1980).

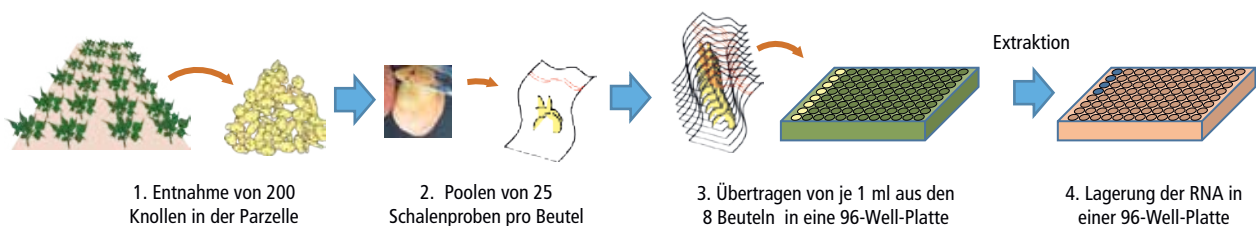
### Extraktion der Nukleinsäuren und Analyse mit *Real-time* RT-PCR

Jeweils 25 Schalenproben wurden in einem von Agroscope entwickelten und produzierten Zerkleinerungsbeutel gruppiert. Diese 24×28 cm grossen Beutel aus Kunststoff (PA/PE 70/120) enthalten eine in die Wände eingeschweisste Gase, welche die feine Zerkleinerung der Schalen durch Reibung unterstützt. Der Zerkleinerungsvorgang erfolgt mit Hilfe einer speziell dazu von Agroscope entwickelten Zylinderpresse (Abb. 2). Nach der Zerkleinerung wird die Extraktionspufferlösung (Roenhorst *et al.* 2005) hinzugefügt und die Mischung so-

### Zusammenfassung

Jedes Jahr kontrolliert Agroscope im Rahmen der Zertifizierung der Pflanzkartoffeln, die für Schweizer Produzenten vorgesehen sind, rund 300 000 Knollen, ob sie frei von Virenkrankheiten sind. Seit 2016 erfolgt diese Kontrolle durch quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (*Real-time* RT-PCR) direkt nach der Ernte auf ruhenden Knollen. Die vorgestellte Methode ermöglicht schnellere Ergebnisse ohne die Behandlung mit toxischen und umweltgefährdenden chemischen Stoffen, die üblicherweise angewendet werden, um die Keimruhe zu brechen. Das neue von Agroscope entwickelte Analyseprotokoll wurde während drei Jahren bei Dutzenden von Posten und insgesamt nahezu 15 000 Knollen validiert. Es bietet die Möglichkeit, jede Etappe der Analyse zu kontrollieren und kann leicht an den Nachweis weiterer Arten von Mikroorganismen angepasst werden, welche die Qualität der Kartoffelpflanzen beeinträchtigen können.

fort homogenisiert (Homex 6, Bioreba AG). Jeweils 1 ml Homogenat pro Beutel wird in eine 96-Well-Platte übertragen (Abb. 1). Alle nachfolgenden Schritte der RNA-Extraktion und der RT-PCR-Analyse werden mit derselben Plattenart ausgeführt. Ein KingfisherFlex-Extraktor (Thermo Fisher Scientific) wird eingesetzt, um die Nukleinsäuren ausgehend von 75  $\mu$ l Schalen-Homogenat aufzureinigen. Mit einem Extraktionskit (MagMAX Pathogen RNA/DNA, Thermo Fisher Scientific) wird die RNA in 100  $\mu$ l Verdünnungspuffer extrahiert. 3  $\mu$ l Nukleinsäuren werden direkt für die PCR in 15  $\mu$ l Reaktionsmischung (QuantiFast Pathogen, Qiagen) eingesetzt. Für den PVY und den PLRV wurde in allen Extrakten mit einem dreifachen Reaktionsansatz für die PCR gesucht, unter Verwendung von PVY-Primern (Kogovsek *et al.* 2008),



**Abb. 1** | Von der Parzelle zur RNA. Die Zertifizierung der Posten von Kartoffelpflanzen erfolgt auf der Grundlage der Analyse bei 200 Knollen, die aus der Parzelle zur Vermehrung des Pflanzguts stammen (1). Es wird eine Schalenprobe am Nabelende jedes Knollens entnommen. Je 25 Proben werden in einem Zerkleinerungsbeutel gesammelt, so dass 8 Homogenate entstehen (2). Jeweils 1 Milliliter der 8 Homogenate wird in eine 96-Well-Platte übertragen (3). Diesen Platten ermöglichen die RNA-Extraktion (4), und deren semi-automatische Analyse.

**Glossar | Die molekulare Diagnostik**

**RNA (Ribonukleinsäure)**

Die meisten Genome von Pflanzenviren, die in Blättern oder Knollen vorhanden sind, bestehen aus RNA-Molekülen. Zur Sequenz-Bestimmung muss diese RNA extrahiert (und aufgereinigt) werden.

**De-novo-Assemblierung**

Vorgang, mit dem die aus dem *Deep Sequencing* stammende Sequenzen zu Contigs zusammengesetzt werden.

**Kartierung der Sequenzen**

Die aus dem *Deep Sequencing* stammenden Sequenzen sind sehr zahlreich, aber kurz. Bei der Kartierung eines Genoms wird versucht, die Teilstücke wie bei einem Puzzle entlang eines Referenzgenoms in Übereinstimmung zu bringen. Wenn das gesamte Referenzgenom durch die Teilsequenzen abgedeckt ist, gilt das als Nachweis des entsprechenden Virus im untersuchten Extrakt. Wenn nur ein Teil des Genoms durch die Sequenzen abgedeckt wird, ist es möglich, dass das Virus irrtümlich nachgewiesen wird, zum Beispiel weil ein Bereich des Virusgenoms einer im Extrakt vorhandenen genetischen Sequenz gleicht.

**Contig**

Zusammengefügte Sequenz der aus dem *Deep Sequencing* stammenden Sequenzen. Die Sequenzen werden aufgrund überlappender Bereiche mit Übereinstimmungen zusammengefügt. Bei einer Überlappung von 10 bis 100 Nukleotiden ergeben zwei Sequenzen mit einer Länge von 100 Nukleotiden ein Contig mit 100 bis 190 Nukleotiden Länge.

**Molekulare Diagnostik**

Identifikation auf der Basis von bekannten genetischen Sequenzen, in den meisten Fällen gestützt auf PCR-Methoden oder Sequenzierung.

**PCR**

Reaktion genannt «Ketten Polymerisation». Sie multipliziert eine sehr spezifische genetische Sequenz im Milliardenbereich. Wenn die gesuchte Sequenz im Muster vorhanden ist kann sie mittels Fluoreszenz beobachtet werden.

**Genom**

Die vollständigen genetischen Informationen eines Organismus. Wie ein Text aus aufeinanderfolgenden Buchstaben besteht, setzt sich das Genom aus einer bestimmten Abfolge (Sequenz) von Nukleotiden zusammen.

**Deep Sequencing**

Sequenzierungstechnologie, mit der die genetische Sequenz mehrerer hunderttausend Millionen von RNA-Molekülen eines Extrakts in einer einzigen Reaktion bestimmt wird. Das *Deep Sequencing* kann ohne vorherige Kenntnisse zum genetischen Material des Extrakts durchgeführt werden.

**Real-time RT-PCR**

PCR-Methode mit der RNA-Moleküle nachgewiesen werden. Sie wird mit «Real Time» oder «Echtzeit» bezeichnet, weil sich das Ergebnis direkt auf einem Bildschirm ablesen lässt. Die klassische RT-PCR erfordert einen Untersuchungsvorgang am Ende der Analyse. Ihre Umsetzung ist langwieriger.

PLRV-Primern (Agindotan *et al.* 2007) sowie Primern für die interne Amplifikationskontrolle (Internal Amplification Control, Qiagen). Der Nachweis der weiteren in der Schweiz bei Kartoffeln auftretenden, aber weniger bedeutenden Virose (Tab. 1) erfolgte durch *Real-time RT-PCR* oder im Falle des PMTV (*Potato Mop-Top Virus*) durch klassische RT-PCR bei RNA-Extrakten, die nach dem nachfolgend beschriebenen Verfahren gepoolt wurden

(Abb. 3). Die gesamten Pipettier-Vorgänge erfolgten mit dem Robotersystem Biomek FX (Beckman), das über einen Arm mit acht einzeln ansteuerbaren Kanälen und einen zweiten Arm mit einem 96er-Kopf verfügt.

**Tab. 1 | Die Kartoffelviren**

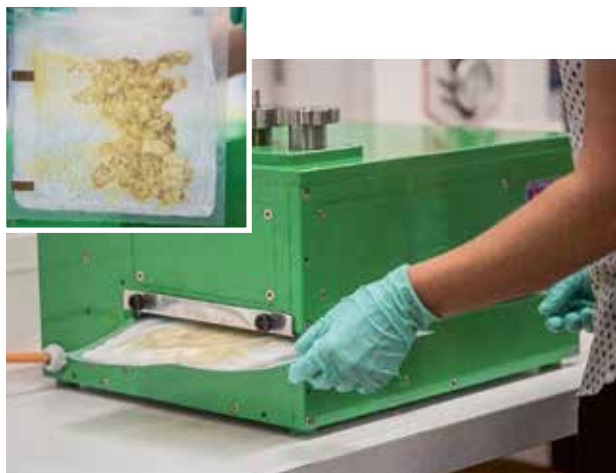
Abkürzung	Name	Folgen	Gesetzlicher Status
PVY	Kartoffelvirus Y	Schwere Beeinträchtigung von Ertrag und Knollenqualität.	Reglementierte Organismen
PLRV	Blattrollvirus		
PVA	Kartoffelvirus A	Virose geringerer Bedeutung. Ertrag beeinträchtigt. Wenig oder keine Symptome der Blätter.	
PVM	Kartoffelvirus M		
PVS	Kartoffelvirus S		
PVX	Kartoffelvirus X		
PMTV	Potato Mop-Top Virus	Knollenqualität beeinträchtigt. Keine Symptome der Blätter.	Nicht reglementierte Organismen
TRV	Tabak-Rattle-Virus		

**ELISA-Analyse**

Die ELISA-Analysen wurden wie von Gugerli und Gehrig (1980) beschrieben bei einzelnen Knollen durchgeführt.

**Deep Sequencing**

376 RNA-Extrakte wurden pyramidenartig zu einem einzigen RNA-Extrakt gepoolt (wie in Abb. 3 gezeigt), das zur Erstellung einer Bibliothek mit Sequenzen verwendet wurde. Diese Bibliothek wurde mit der Plattform Illumina HiSeq durch Sequenzierung der 125 ersten Basen von 150 Millionen RNA-Molekülen analysiert. Die Sequenzen wurden mit der Software Velvet und Oasis zu Contigs zusammengesetzt. Die Sequenz der einzelnen Contigs wurde mit Hilfe des BLAST-Programms mit den Sequenzen verglichen, die in der Datenbanken NCBI zur Verfügung stehen. Mit viralen Sequenzen homologe Contigs weisen darauf hin, dass das betreffende gesuch-



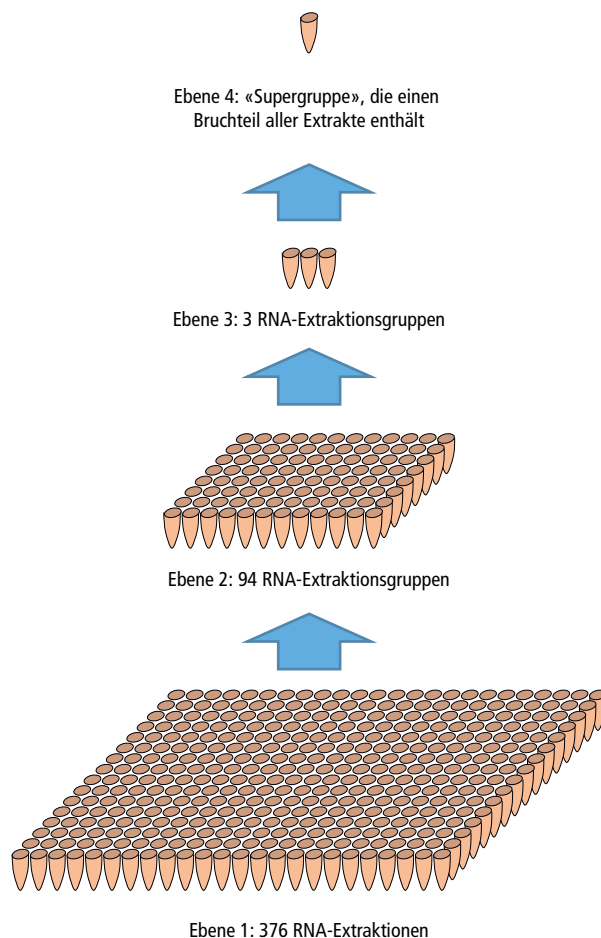
**Abb. 2 |** Zylinderpresse und Zerkleinerungsbeutel mit 25 Schalenproben. Die 25 in einem Zerkleinerungsbeutel gesammelten Schalenproben werden durch einfache Passage durch eine Zylinderpresse in einigen Sekunden zerkleinert.

te Virus (Kandidat) im RNA-Extrakt vorhanden ist. Diese Ergebnisse wurden ein erstes Mal durch Kartierung aller Illumina-Sequenzen mit Hilfe des vollständigen Genoms jedes Kandidaten-Virus validiert. Ein hoher Prozentsatz der Abdeckung des Genoms und die breite Verteilung einer grossen Zahl von Sequenzen über das gesamte Genom sind die Kriterien, welche die Wahrscheinlichkeit des Nachweises des betreffenden Virus erhöhen. Eine zweite Validierung der Kandidaten erfolgte mit *Real-time* RT-PCR, wobei die Extrakte mit den Viren identifiziert wurden.

## Resultate und Diskussion

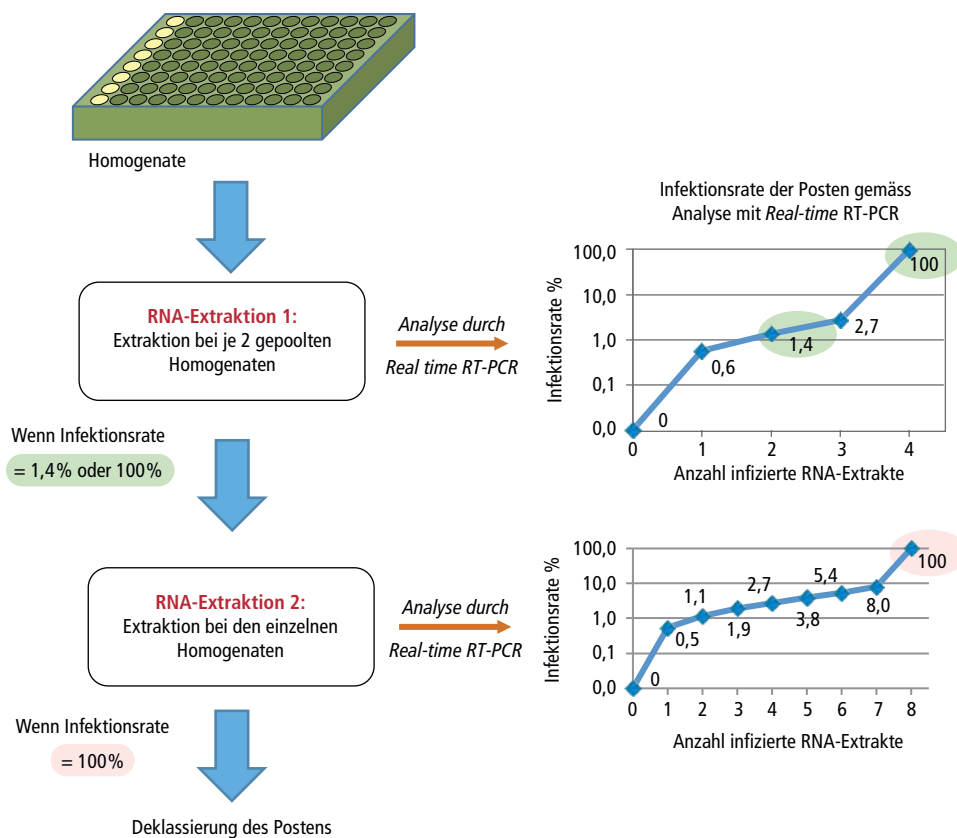
### Analyseprotokoll und Pooling-Strategie

Mit dem in diesem Artikel vorgestellten Analyseprotokoll können Viren in ruhenden Knollen molekularbiologisch nachgewiesen werden. Die Strategie, jeweils 25 Proben zusammenzufassen, und die umgesetzten Methoden sollen die Kosten optimieren und Hochdurchsatz-Analysen ermöglichen, die den vorgeschriebenen Grenzwerten für die Klassen gemäss Saat- und Pflanzgut-Verordnung des WBF (Verordnung 916.151.1) gerecht werden. Bei einer Mustergrösse von 200 Knollen pro Posten werden die entnommenen Schalen in Gruppen zu 25 zusammengefasst und zerkleinert, woraus sich pro Posten acht Pflanzenextrakte oder Homogenate ergeben. Diese Homogenate können mehrere Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ohne Degradation der Nukleinsäuren gelagert werden. Jeweils  $37,5\ \mu\text{l}$  der acht Homogenate werden vor der Extraktion der Nukleinsäuren in vier Gruppen



**Abb. 3 |** Pyramidenartiges Poolen der RNA-Extrakte. Je 20 ml aus jedem RNA-Extrakt der untersten Ebene werden für die 2. Ebene gepoolt, dann von der 2. Ebene in der 3. Ebene und schliesslich in der 4. Ebene zu einer einzigen «Supergruppe» zusammengeführt. Das im Artikel beschriebene Deep Sequencing wurde mit dieser «Supergruppe» der 4. Ebene durchgeführt. Die Analysen mit *Real-time* RT-PCR zur Identifikation der Extrakte, welche die verschiedenen Viren enthalten, werden schrittweise pro Ebene durchgeführt. Die untergeordneten Gruppen werden dabei nur einzeln analysiert, wenn die übergeordnete Gruppe, in der sie zusammengefasst sind, positiv auf ein bestimmtes Virus getestet wurde.

zu zwei Extrakten zusammengefasst. Die so erhaltenen vier Nukleinsäure-Extrakte enthalten damit die RNA der Schalen von je 50 Knollen. Sie werden mit *Real-time* RT-PCR analysiert. Durch die statistische Auswertung der Ergebnisse mit dem von der *International Seed Testing Association* (ISTA) entwickelten Anwendung *SeedCalc* ergaben sich fünf Werte für die Infektionsrate (Abb. 4). Wenn der Wert bei 1,4% liegt, werden die acht Extrakte des Postens einzeln erneut analysiert, damit die statistischen Werte im Bereich der Grenzwerte der Klasse des Basispflanzguts genauer aufgelöst werden. Wenn der Wert bei 100% liegt, also alle vier Extrakte positiv sind,



**Abb. 4 | RNA-Extraktion in zwei Etappen.** Die RNA-Extraktion erfolgt ausgehend von acht Homogenaten. Zuerst erfolgt die Extraktion und Analyse bei je zwei gepoolten Homogenaten. Wenn die Infektionsrate bei 1,4% oder 100% liegt, wird die Extraktion und Analyse ein zweites Mal, aber bei den 8 Homogenaten individuell durchgeführt. Mit diesem Vorgehen können die gesetzlich festgelegten Grenzwerte der Klassen unter Optimierung der Analysekosten ermittelt werden.

werden die acht Pflanzenextrakte des Postens ebenfalls einzeln analysiert, um die Infektionsrate im höheren Bereich feiner zu berechnen (Abb. 4).

Der Schritt der Entnahme der Proben von den Knollen erfordert einen Arbeitsaufwand der proportional zur Anzahl Knollen ist. Bei den nachfolgenden Schritten, also die Zerkleinerung der Schalen, die RNA-Extraktion und die *Real-time* RT-PCR, handelt es sich jedoch um voll oder teilweise automatisierte Verfahren. Die Verarbeitungskapazität liegt mit der gegenwärtig verfügbaren technischen Ausrüstung bei 10 000 bis 20 000 Knollen pro Tag. Die Herstellung der Homogenate erfolgt wie oben ausgeführt in einigen Sekunden mit Hilfe von Zerkleinerungsbeuteln für den Einmalgebrauch. Die extrahierte RNA lässt sich bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ohne Zeitbegrenzung für spätere Analysen oder Überprüfungen lagern.

Diese Strategie des Gruppierens von Proben ausgehend von einer Stichprobe von 200 Knollen wurde bei 76 % der Posten der 2016 in der Schweiz produzierten Pflanzkartoffeln angewendet. Der anfängliche Stichprobenumfang (d.h. die Anzahl getesteter Knollen) und das

Poolen der Schalenproben wurden bei einigen Posten nach Bedarf angepasst. Posten für Pflanzgut höherer Klassen oder weniger sensiblen Sorten wurden auf der Grundlage von 96 Knollen, aufgeteilt in acht Gruppen zu zwölf Schalenproben analysiert. Umgekehrt erfolgte die Analyse von Posten mit empfindlichen Sorten auf der Grundlage von 296 Knollen, aufgeteilt in acht Gruppen zu 37 Schalenproben.

Ausgehend von den durchschnittlichen Infektionsraten, die in der Schweiz in den vergangenen zehn Jahren beobachtet wurden, ermöglicht die Strategie einer Analyse in zwei Schritten (zuerst  $4 \times 50$  dann  $8 \times 25$  Extrakte) substantielle Einsparungen bei den Analysekosten.

#### Vergleich der Methoden ELISA und *Real-time* RT-PCR

Die Validierung der *Real-time* RT-PCR erfolgte kontinuierlich bei einer steigenden Anzahl von Posten in den Jahren 2013, 2014 und 2015. Für den Vergleich zwischen ELISA und *Real-time* RT-PCR wurde eine erste Gruppe von 600 Knollen, d.h. sechs unabhängige Posten, ana-

lysiert (Tab. 2). Jede Knolle wurde mit einer Nummer versehen und zwei Mal zufällig für eine individuelle Prüfung mit jeder der beiden Nachweismethoden (ELISA und PCR) ausgewählt. Bei fünf der sechs Posten ergab sich dieselbe Klassenzuteilung. Zwei Knollen eines Postens von cv. Alexandra wurden beim ELISA als gesund, bei der *Real-time* RT-PCR aber als infiziert diagnostiziert. Damit ergab sich eine unterschiedliche Klassierung je nach der angewendeten Methode.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Analyse durch *Real-time* RT-PCR von 47 Posten mit je 200 Knollen in Gruppen zu 25 sowie der individuellen Analyse von 9400 Knollen durch ELISA zusammengestellt. Die individuelle Analyse (wie sie beim ELISA angewendet wurde) zur Bestimmung des prozentualen Anteils der Infektionen in den 200 Knollen eines Postens liefert diskrete Prozentwerte (Vielfache von 0,5). Die statistischen Berechnungen für die Gruppen von jeweils 25 Extrakten bei den Analysen durch *Real-time* RT-PCR liefern die in Abbildung 4 angegebenen Werte, die keine Vielfachen von 0,5 sind. Aus diesem Grund führt die gleiche Anzahl infizierter Knollen je nach Analyseverfahren zu leicht unterschiedlichen Zahlenwerten für die Infektionsrate, für die Unterschiede ist aber nicht die gewählte Methode verantwortlich. Wenn dies berücksichtigt wird, ergeben 29 Posten quasi-identische Analyseresultate. Bei zwölf Posten sind die Unterschiede gering und haben keinen Einfluss auf die Klassenzuteilung und bei sechs Posten fällt die Entscheidung zur Klassenbezeichnung je nach Methode unterschiedlich aus. Die Unterschiede der nach den beiden Methoden bestimmten Infektionsrate sind gering. Wenn die Infektionsrate aber nahe am Grenzwert zwischen der letzten Klasse von Basispflanzgut und zertifiziertem

Pflanzgut (Klasse A) liegt, kann eine unterschiedliche Klasse resultieren.

Gemessen an den Tausenden von analysierten Knollen sind die Unterschiede selten und beide Verfahren erzeugen zuverlässige und sehr gut übereinstimmende Ergebnisse.

### Diagnostik von in der Schweiz seltenen Viren

Kartoffelpflanzen können durch verschiedene weitere, seltene Viren infiziert werden. Einige dieser Viren, darunter PVA, PVM, PVS und PVX, müssen vorschriftsgemäss getestet werden. Andere dieser Viren wie das TRV (*Tobacco Rattle Virus*) oder das PMTV (*Potato Mop-Top Virus*) stellen für gewisse landwirtschaftliche Sektoren eine Bedrohung dar. Schliesslich ist die Diagnostik seltener Viren für epidemiologische Untersuchungen und die Prüfung des Gesundheitszustands von Kartoffelkulturen auf gesamtschweizerischer Ebene interessant.

Um zu prüfen, ob durch *Deep Sequencing* mit der Plattform Illumina bei einem gepoolten Extrakt aus einer grossen Anzahl Posten seltene Viren treffsicher nachgewiesen werden können, wurden 376 RNA-Extrakte aus jeweils 50 Knollen analysiert, die aus 94 verschiedenen Posten zu 200 Knollen stammten. Die Extrakte wurden über verschiedene Pooling-Schritte gemäss dem Schema in Abbildung 3 zusammengestellt. Beim *Deep Sequencing* des zusammengefassten Extrakts aus 376 Ausgangsextrakten resultierten 150 Millionen Sequenzen. Durch *De-novo*-Assemblierung der Sequenzen mit der Software Velvet bzw. Oasis ergaben sich 40 000 Contigs einer durchschnittlichen Länge von 439 Basenpaaren. Beim Vergleich dieser Contigs mit den verfügbaren Sequenzen in der NCBI-Datenbank wurden fünf Viren identifiziert, die in Tabelle 4 aufgeführt sind. Die Kartierung der Illumina-Sequenzen mit Hilfe des kompletten Genoms dieser Viren ergab eine hervorragende Abdeckung von 99% beim PVY, PLRV, PVX und PVS. Die drei Bereiche des PMTV-Genoms erreichten eine schwächere Abdeckung von 96,48 und 40%.

Indem mit der *Real-time* RT-PCR in den verschiedenen gepoolten Extrakten nach den Viren gesucht wurde, die beim *Deep Sequencing* gefunden worden waren, konnte die Anzahl der Extrakte bestimmt werden, die mit dem jeweiligen Virus infiziert waren (Tab. 4). Das PVX wurde in zwei Extrakten desselben Postens nachgewiesen, das PMTV in zehn Extrakten aus fünf Posten und das PVS in 16 Extrakten aus acht Posten. Bei der systematischen Routineanalyse zum Nachweis des PVY bzw. PLRV in diesen 94 Extrakten durch *Real-time* RT-PCR wurden 131 infizierte Extrakte aus 57 Posten beziehungsweise 14 infizierte Extrakte aus zehn Posten gefunden.

**Tab. 2 | Vergleich der beiden Methoden *Real-time* RT-PCR und ELISA mit Durchführung bei einzelnen Proben. Der gesetzlich festgelegte Grenzwert für die Klasse Basispflanzgut liegt bei maximal 1,1%. Ein Posten der Sorte Alexandra wurde nach der Methode Real time RT-PCR der tieferen Klasse «Zertifiziert» zugeordnet.**

Nr. der Probe	Sorte	<i>Real-time</i> RT-PCR		Infektionsrate nach ELISA	Entscheid	
		Anz.	%		<i>Real-time</i> RT-PCR	ELISA
1	Agria	0/100	0,0%	1,0%	Basis	Basis
2	Désirée	1/100	1,0%	0,0%	Basis	Basis
3	Alexandra	3/100	3,0%	1,0%	Zertifiziert	Basis
4	Innovator	7/100	7,0%	7,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
5	Amandine	2/100	2,0%	2,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
6	Nicola	1/100	2,0%	1,0%	Basis	Basis

**Tab. 3 | Vergleich der Methoden ELISA und *Real-time* RT-PCR (mit statistischer Bearbeitung). Bei einigen Posten wurden die Homogenate ein zweites Mal analysiert, aber ungepooled, um die statistischen Werte im Bereich des Grenzwerts für die Klasse Basispflanzgut (1,1%) besser aufzulösen.**

Posten- Nummer	<i>Real-time</i> RT-PCR (Extraktion 1, siehe Abb.4)		<i>Real-time</i> RT-PCR (Extraktion 2, siehe Abb.4)		Infektionsrate ELISA	<i>Real time</i> RT-PCR	ELISA
	Anzahl	%	Anzahl	%			
1	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
2	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
3	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
4	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
5	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
6	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
7	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
8	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
9	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
10	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
11	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
12	0/4	0,0%	–	–	0,0%	Basis	Basis
13	0/4	0,0%	–	–	0,5%	Basis	Basis
14	0/4	0,0%	–	–	0,5%	Basis	Basis
15	0/4	0,0%	–	–	0,5%	Basis	Basis
16	0/4	0,0%	–	–	0,5%	Basis	Basis
17	0/4	0,0%	–	–	0,5%	Basis	Basis
18	1/4	0,6%	–	–	0,0%	Basis	Basis
19	1/4	0,6%	–	–	0,5%	Basis	Basis
20	1/4	0,6%	–	–	0,5%	Basis	Basis
21	1/4	0,6%	–	–	0,5%	Basis	Basis
22	1/4	0,6%	–	–	0,5%	Basis	Basis
23	1/4	0,6%	1/8	0,5%	0,5%	Basis	Basis
24	1/4	0,6%	1/8	0,5%	0,5%	Basis	Basis
25	1/4	0,6%	–	–	0,5%	Basis	Basis
26	1/4	0,6%	–	–	0,5%	Basis	Basis
27	1/4	0,6%	–	–	1,0%	Basis	Basis
28	1/4	0,6%	3/8	1,9%	1,5%	Zertifiziert	Zertifiziert
29	2/4	1,4%	2/8	1,1%	0,5%	Basis	Basis
30	2/4	1,4%	2/8	1,1%	1,0%	Basis	Basis
31	2/4	1,4%	2/8	1,1%	1,0%	Basis	Basis
32	2/4	1,4%	3/8	1,9%	1,5%	Zertifiziert	Zertifiziert
33	2/4	1,4%	2/8	1,1%	1,0%	Basis	Basis
34	3/4	2,7%	–	–	4,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
35	3/4	2,7%	–	–	2,5%	Zertifiziert	Zertifiziert
36	3/4	2,7%	–	–	3,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
37	3/4	2,7%	5/8	3,9%	5,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
38	3/4	2,7%	7/8	8,0%	6,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
39	4/4	> 2,7%	4/8	2,7%	2,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
40	4/4	> 2,7%	6/8	5,4%	7,5%	Zertifiziert	Zertifiziert
41	4/4	> 2,7%	7/8	8,0%	8,0%	Zertifiziert	Zertifiziert
42	1/4	0,6%	–	–	1,5%	Basis	Zertifiziert
43	1/4	0,6%	–	–	1,5%	Basis	Zertifiziert
44	2/8	1,1%	–	–	2,0%	Basis	Zertifiziert
45	2/4	1,4%	2/8	1,1%	2,0%	Basis	Zertifiziert
46	2/4	1,4%	2/8	1,1%	1,5%	Basis	Zertifiziert
47	2/4	1,4%	2/8	1,1%	1,5%	Basis	Zertifiziert

Der Nachweis des PVX, das nur gerade in zwei von 376 RNA-Extrakten vorlag (0,5%), wobei einer Abdeckung von 99,6% des Referenzgenoms erreicht wurde, zeigt, dass diese Methode für den Nachweis von Kartoffelviren ausserordentlich sensibel ist.

### Qualitätskontrolle der Routinediagnostik

Die *Real-time* RT-PCR und der ELISA sind Nachweismethoden, die auf dem *A-priori*-Prinzip beruhen: nur bekannte und ausreichend beschriebene Stämme können mit diesen beiden Methoden nachgewiesen werden. Um die Zertifizierung angesichts der ständigen Entwicklung neuer Virenstämme sicherzustellen, ist eine *A-posteriori*-Kontrolle der Laboranalysen durch Kulturen in der darauffolgenden Saison unerlässlich. Diese Kontrollen der Proben beruhen auf sichtbaren Symptomen, die in der Parzelle festgestellt werden. Die Kontrollen weisen allerdings Grenzen auf, namentlich wenn die Virosen bei den Blättern asymptomatisch verlaufen.

Das *Deep Sequencing* mit der Illumina-Plattform ermöglicht eine bessere Qualitätskontrolle der Routine-Laboranalysen. Damit lässt sich die Eignung der verwendeten Primer für den Nachweis der in den Extrakten vorhandenen Virenstämme unmittelbar nach dem Abschluss der Analysekampagne prüfen. Ausserdem erübrigt sich die Notwendigkeit der Beobachtung sichtbarer Symptome und es ist eine Kontrolle gegenüber allen bekannten Viren möglich.

Im Falle des PVY amplifizieren die verwendeten Primer die Sequenz zwischen den Positionen 8878 und 8950 des PVY-Genoms. Bei der Kontrolle zur Analyse bei den in dieser Arbeit untersuchten 94 Proben konnten 28178 Illumina-Sequenzen dieser Region zugeordnet werden. Es wurde eine einzige Substitution – Guanin anstelle von Alanin in der Position 16 der Sequenz des Primers Fw – bei 12% der kartierten Sequenzen festgestellt (Tab. 5). Diese Veränderung beeinträchtigte den Nachweis des

Virus bei unseren Analysebedingungen aber nicht. Eine identische Kontrolle beim PLRV ergab ebenfalls eine gute Übereinstimmung der Primer mit den Illumina-Sequenzen, die mit Hilfe des PLRV-Genoms kartiert wurden. Das *Deep Sequencing* bei einem gepoolten Extrakt aus den 94 analysierten Proben zeigt eine gute Übereinstimmung der verwendeten Primer mit den in diesen Proben vorhandenen Stämmen.

## Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse, die bei einer grossen Zahl unterschiedlicher und unter natürlichen Bedingungen infizierten Sorten gesammelt wurden, zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen den, auf einzelnen Knollen durchgeführten Analysen mit ELISA und den Analysen von gepoolten Proben mit *Real-time* RT-PCR.

Mit der *Real-time* RT-PCR können die Analysen bei den ruhenden Knollen erfolgen, ohne dass vorgängige Behandlungen mit toxischen und umweltgefährdenden Chemikalien oder mit Pflanzenhormonen erforderlich sind. Die Ergebnisse liegen schneller vor und sie sind sicherer, wobei gleichzeitig die Kosten denjenigen der ELISA-Methode entsprechen.

Mit der in dieser Analysemethode eingesetzten qualitativ hochstehenden RNA-Extraktion können seltene Viren in gepoolten Proben nachgewiesen werden. Die Qualität der Analysen lässt sich ausserdem über das *Deep Sequencing* mit der Illumina-Plattform prüfen. Wenn schliesslich bei der Kontrolle ein Qualitätsmangel festgestellt wird, können die bei –80 °C gelagerten RNA-Extrakte erneut analysiert werden. Mit diesem neuartigen Ansatz, der nicht auf dem *A-priori*-Prinzip beruht, lassen sich so gut wie alle bekannten Viren, ebenso wie mutante oder rekombinante Stämme, nachweisen. Dadurch wird eine qualitativ hochstehende Kontrolle der Gesundheit der Kartoffelpflanzen in der Schweiz sichergestellt. ■

Tab. 4 | In den Proben durch Deep Sequencing identifizierte Viren

Identifikator des Virus	prozent. Abdeckung	Anzahl betroffene Proben	Anzahl Extrakte	infizierte Extrakte	Anmerkungen auf der Grundlage der NCBI-Daten
NC_007289.1	99,9%	8	16	4,3%	<i>Potato virus S, complete genome</i>
NC_001747.1	99,8%	10	14	3,7%	<i>Potato leafroll virus, complete genome</i>
JNC_011620.1	99,6%	1	2	0,5%	<i>Potato virus X, complete genome</i>
NC_001616.1	99,5%	57	131	34,8%	<i>Potato virus Y, complete genome</i>
NC_003725.1	96,5%	5	10	2,7%	<i>Potato mop-top virus RNA 2, complete sequence</i>
NC_003723.1	48,1%	5	10	2,7%	<i>Potato mop-top virus RNA 1, complete sequence</i>
JNC_003724.1	40,3%	5	10	2,7%	<i>Potato mop-top virus RNA 3, complete sequence</i>



**Tab. 5 |** Analyse der Übereinstimmung zwischen den Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden und den identifizierten, mit dem Amplifikationsbereich kartierten Sequenzen. In der Tabelle sind die Basen an jeder Position der Zielregion des Referenzgenoms angegeben (Spalte 1 bzw. 2). Die Bereiche, die den beiden Primern Fw und Rev bzw. der Sonde entsprechen sind in der dritten Kolonne angegeben (Spalte 3). Jede der 28178 Illumina-Sequenzen kann eine der vier möglichen Basen aufweisen (Spalten 6 bis 9) oder diese Position gar nicht abdecken (Spalte 5). Für jede Position ist in der Tabelle der prozentuale Anteil der Sequenzen angegeben, welche dort die angegebene Base aufweisen bzw. die Position nicht abdecken. Nur bei Position 16 des Primers Fw (gelb hinterlegt) lässt sich ein Polymorphismus beobachten. Das festgestellte Alanin anstelle von Guanin an Position 16 des Primers Fw (12% der Sequenzen) führt zu keiner Beeinträchtigung der korrekten Paarung des Primers bei der PCR. Die polymorphen Sequenzen werden bei unseren Bedingungen für die Real time-RT-PCR ebenfalls gut nachgewiesen.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Position im Referenzgenom	Referenzsequenz		Position auf Primer	Position nicht abgedeckt	A	C	G	T	Position im Referenzgenom	Referenzsequenz		Position auf Primer	Position nicht abgedeckt	A	C	G	T	
8878	C	Primer Fw	1	19%	0%	81%	0%	0%	8915	C	Sonde	12	48%	0%	51%	0%	0%	
8879	A		2	19%	81%	0%	0%	0%	8916	T		13	52%	0%	0%	0%	0%	47%
8880	T		3	19%	0%	0%	0%	81%	8917	T		14	53%	0%	0%	0%	0%	47%
8881	A		4	19%	81%	0%	0%	0%	8918	A		15	52%	47%	0%	0%	0%	0%
8882	G		5	19%	0%	0%	81%	0%	8919	T		16	52%	0%	0%	0%	0%	48%
8883	G		6	23%	0%	0%	77%	0%	8920	G		17	52%	0%	0%	48%	0%	0%
8884	A		7	27%	73%	0%	0%	0%	8921	G		18	52%	0%	0%	48%	0%	0%
8885	G		8	27%	0%	0%	73%	0%	8922	T		19	52%	0%	0%	0%	0%	48%
8886	A		9	36%	64%	0%	0%	0%	8923	T		20	52%	0%	0%	0%	0%	48%
8887	A		10	36%	64%	0%	0%	0%	8924	T		21	52%	0%	0%	0%	0%	48%
8888	A		11	36%	64%	0%	0%	0%	8925	G		22	52%	0%	0%	48%	0%	0%
8889	C		12	35%	0%	65%	0%	0%	8926	G		23	52%	0%	0%	48%	0%	0%
8890	T		13	35%	0%	0%	0%	65%	8927	T		24	52%	0%	0%	0%	0%	48%
8891	G		14	34%	0%	0%	66%	0%	8928	G		25	53%	0%	0%	47%	0%	0%
8892	A		15	34%	66%	0%	0%	0%	8929	C		26	52%	0%	47%	0%	0%	0%
8893	G	16	34%	12%	0%	53%	0%	8930	A	27		52%	47%	0%	0%	0%	0%	
8894	A	17	35%	65%	0%	0%	0%	8931				53%	0%	0%	0%	0%	47%	
8895	T	18	35%	0%	0%	0%	65%	8932	T	1		52%	0%	0%	0%	0%	48%	
8896	G	19	33%	0%	0%	67%	0%	8933	G	2		52%	0%	0%	48%	0%	0%	
8897	C	20	33%	0%	67%	0%	0%	8934	A	3		52%	48%	0%	0%	0%	0%	
8898	C	21	31%	0%	69%	0%	0%	8935	A	4		52%	48%	0%	0%	0%	0%	
8899	A	22	34%	66%	0%	0%	0%	8936	A	5		52%	48%	0%	0%	0%	0%	
8900	A	23	36%	64%	0%	0%	0%	8937	A	6		52%	48%	0%	0%	0%	0%	
8901	C	24	36%	0%	64%	0%	0%	8938	T	7		51%	0%	0%	0%	0%	49%	
8902	T	25	36%	0%	0%	0%	64%	8939	G	8		51%	0%	0%	49%	0%	0%	
8903	G		35%	0%	0%	65%	0%	8940	G	9		51%	0%	0%	49%	0%	0%	
8904	T	Sonde	1	35%	0%	0%	65%	8941	A	Primer Rev		10	52%	48%	0%	0%	0%	0%
8905	G		2	35%	0%	0%	65%	0%	8942		A	11	52%	48%	0%	0%	0%	0%
8906	A		3	35%	65%	0%	0%	0%	8943		C	12	52%	0%	48%	0%	0%	0%
8907	T		4	35%	0%	0%	0%	65%	8944		C	13	52%	0%	48%	0%	0%	0%
8908	G		5	38%	0%	0%	62%	0%	8945		T	14	52%	0%	0%	0%	0%	47%
8909	A		6	39%	61%	0%	0%	0%	8946		C	15	52%	0%	48%	0%	0%	0%
8910	A		7	38%	62%	0%	0%	0%	8947		G	16	52%	0%	0%	48%	0%	0%
8911	T		8	38%	0%	0%	0%	62%	8948		C	17	53%	0%	47%	0%	0%	0%
8912	G		9	41%	0%	0%	59%	0%	8949		C	18	53%	0%	47%	0%	0%	0%
8913	G		10	43%	0%	0%	57%	0%	8950		A	19	53%	46%	0%	0%	0%	0%
8914	G		11	44%	0%	0%	56%	0%										

**Riassunto****Diagnosi molecolare ad alto rendimento per individuare le virosi delle piante di patate**

Ai fini della certificazione delle piante di patate destinate ai produttori svizzeri, ogni anno Agroscope controlla quasi 300 000 tuberi per accertare che siano esenti da virus. Dal 2016 questo controllo è effettuato su tuberi dormienti immediatamente dopo la raccolta, impiegando il metodo della PCR quantitativa o PCR *real time*. Questo progresso permette di ottenere più rapidamente dei risultati e rende superflui i trattamenti chimici tossici e inquinanti utilizzati per far uscire i tuberi dalla dormienza.

La nuova catena analitica sviluppata da Agroscope è stata convalidata su decine di lotti e quasi 15 000 tuberi per un periodo di 3 anni. Questa procedura permette di controllare che ogni fase dell'analisi sia realizzata correttamente e si presta facilmente anche a identificare altri tipi di microrganismi che possono compromettere la qualità delle piante di patate.

**Summary****High-throughput molecular diagnostics for detecting potato-plant viruses**

Every year, Agroscope inspects almost 300 000 tubers for the presence or absence of viruses in order to certify potato plants destined for Swiss producers. From 2016 onwards, this inspection has been performed using real time polymerase chain reaction (RT-PCR) on dormant tubers right after the harvest. The new method allows results to be obtained more quickly, and dispenses with the use of toxic and polluting chemical treatments for breaking dormancy.

The new analytical chain was developed by Agroscope, and validated over a period of three years on dozens of lots and almost 15,000 tubers.

Offering the means to check that each stage of the analysis has been performed correctly, it can easily be adapted to screen for other types of microorganisms likely to affect the quality of the potato plants.

**Key words:** potato viruses, certification, molecular diagnostic, real-time RT-PCR, next generation sequencing.

**Literatur**

- Agindotan B. O., Shiel P. J. & Berger P. H., 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan((R)) real-time RT-PCR. *Journal of virological methods* **142**, 1–9.
- Basky Z., 2002. The relationship between aphid dynamics and two prominent potato viruses (PVY and PLRV) in seed potatoes in Hungary. *Crop Protection* **21** (9), 823–827.
- Gugerli P. & Gehriger W., 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers after artificial break of dormancy. *Potato Research* **23**, 353–359.
- Keller E. R. & Bérces S., 1966. Check-Testing for virusy and leaf-rollin seed potatoes with particular reference to methods of increasing precision with the A6-leaf test for virus Y. *European Potato Journal* **9**, 1–14.
- Kogovsek P., Gow L., Pompe-Novak M., Gruden K., Foster G. D., Boonham N. & Ravnkar A., 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of virological methods* **149**, 1–11.
- Perring T. M., Gruenhagen N. M. & Farrar C. A., 1999. Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **44**, 457–481.
- Roenhorst J. W., Jansen C. C. C., Kox L. F. F., de Haan E. G., van den Bovenkamp G. W., Boonham N., Fisher T. & Mumford R. A., 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin* **35**, 133–140.
- Steinger T., Gilliland H. & Hebeisen T., 2014. Epidemiological analysis of risk factors for the spread of potato viruses in Switzerland. *Ann. Appl. Biol.* **164**, 200–207.
- Valkonen J. P. T., 2007. Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: Vreugdenhil D. (ed), *Potato Biology and Biotechnology*. New York, NY, USA, Elsevier, 619–641.
- Verbeek M., Piron P. G. M., Dullemans A. M., Cuperus, C. & van der Vlught R. A. A., 2010. Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN and Wilga strains of Potato virus Y. In: *Ann. Appl. Biol.*, 39–49.