

# Toetsontwikkeling op *Erwinia* bij de NAK: BioPlex real-time PCR

Eisse G. de Haan en Gé W. van den Bovenkamp

NAK, Postbus 1115, 8300 BC Emmeloord; e-mail: ehaan@nak.nl; gbovenkamp@nak.nl

## Inleiding

De Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van landbouwgewassen (NAK) houdt zich, als onafhankelijke keuringsinstelling, bezig met de kwaliteitsbewaking en certificering van zaaizaad en pootaardappelen. De belangrijkste kwaliteitsziekte bij pootaardappelen in Nederland wordt veroorzaakt door een groep bacteriën die we in dit artikel met 'Erwinia-complex' of 'Erwinia spp.' aanduiden. Oorspronkelijk betrof dit alleen *Pectobacterium atrosepticum* (voorheen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) en de bacteriën behorende tot de nieuw benoemde *Dickeya*-groep (voor aardappel voornamelijk *Dickeya dianthicola* en een recent door Slawiak *et al.* onderscheiden, afwijkende biovar 3 clade; beiden voorheen *Erwinia chrysanthemi*). Onderzoek door NAK en Plant Research International (de Haan *et al.*, 2008) liet zien dat er in West-Europa, binnen de soort *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (voorheen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) ook stammen voorkomen



Figuur 1. Zwartbenigheid in aardappel veroorzaakt door een pathogene stam van *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (verwelking, zwarte stengelvoeten).

die, na knolinoculatie, te velde dezelfde ziektesymptomen veroorzaken als *P. atrosepticum* en de in Nederland voorkomende *Dickeya* spp. (Figuur 1). Deze symptomen staan bekend als zwartbenigheid en stengelnatrot van aardappel.

## Toetsingen: heden en verleden

De NAK zet al langer knoltoetsingen in als hulpmiddel bij het beheersen van 'Erwinia spp.' In de jaren tachtig van de vorige eeuw hanteerde de NAK een verplichte, serologische nacontroletoets (ELISA) op *P. atrosepticum* voor de top van de pootgoedkolom. Daarbij werden partijen pootaardappelen met een te hoog besmettingspercentage gedeclasseerd naar die klasse waarvoor geen verplicht onderzoek was voorgeschreven. Vanwege het ontbreken van een betrouwbare toetsmethode voor *Dickeya* spp., en vanwege een statistisch te kleine monstergrootte, erodeerde het vertrouwen van de sector in de toets met als gevolg dat iedere vorm van toetsing op 'Erwinia spp.' binnen de pootaardappelkolom verdween.

In 2001 ontwikkelde de afdeling Laboratoriummethoden & Diagnostiek van de NAK een nieuwe serologische aanpak waarbij *P. atrosepticum* en *Dickeya* spp. (na verrijking in een semiselectief medium) serologisch (ELISA) kunnen worden gedetecteerd. Via het poolen van monsters (naveleinden van knollen) kan een kostenbesparing worden bereikt en kan toch een schatting worden gegeven (*most probable number*-methode) van het percentage besmette knollen in de partij. Het betreft een toetsing op vrijwillige basis.

De betrouwbaarheid van het onderzoek blijkt sterk afhankelijk van de door inzender gekozen monstergrootte: statistisch is, bij een monstergrootte van 300 knollen, de kans dat een besmetting van 1% 'Erwinia spp.' in een homogeen besmette partij wordt aangetoond 95%. De NAK adviseert de toets als aanvulling op de eigen, door de inzender eerder verzamelde informatie in te zetten. Daarbij komen vragen aan bod als "hoeveel is er in het veld door de teler geselecteerd, wat is de voorgeschiedenis

van de partij, hoe waren de oogstomstandigheden, waren er veel rotte moederknollen aanwezig tijdens de oogst, wat is de bestemming, heb ik betere partijen als alternatief” etc.

### Nieuwe ontwikkelingen

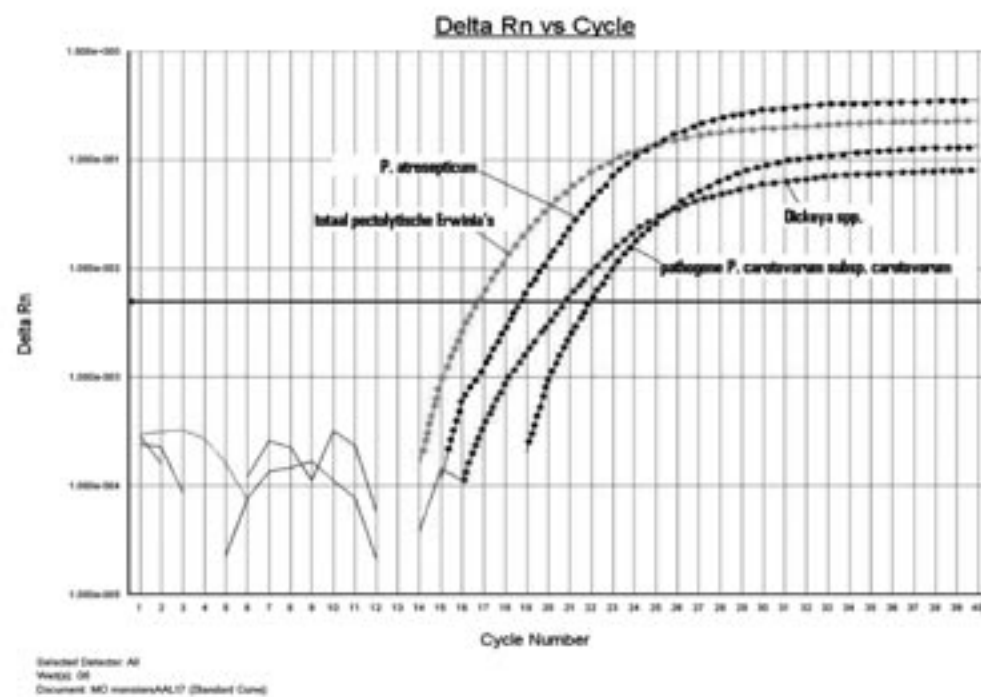
Omdat de groep pathogene *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) -stammen niet serologisch kan worden onderscheiden van niet-pathogene Pcc's, is een serologische toetsing op het complete 'Erwinia-complex' in pootaardappel niet mogelijk. Uit recent onderzoek bleek bovendien dat de beschikbare antisera tegen *P. atrosepticum* en *Dickeya* spp. kruisreageren met bepaalde pectolytische pseudomonaden en met sommige niet-pathogene Pcc's. Een oplossing dient daarom gezocht te worden in een moleculaire (DNA) benadering.

Uit een genetische karakterisering met behulp van REP-PCR (van der Wolf *et al.*, 2003) bleek bijna 90% van de pathogene Pcc's een gemeenschappelijk DNA-fragment te bezitten dat slechts incidenteel (10%) in niet virulente stammen voorkomt. Op basis van het uitgesneden en gereamplificeerde DNA-fragment zijn drie primersets ontwikkeld. Uiteindelijk heeft dit geleid tot de ontwikkeling van een primer/probe-combinatie voor een Taqman PCR.

### Multiplex PCR

In 2008 bereikte de NAK al een belangrijke doorbraak bij de ontwikkeling van *multiplex real time PCR* voor het aantonen van virussen (PVX, PVY, PVA, PLRV) rechtstreeks aan aardappelknollen. Multiplex formats zijn essentieel voor routine-onderzoek om de prijs van de toets betaalbaar te houden. Dit nieuw ontwikkelde format is nu ook toegepast voor het *Erwinia*-onderzoek. De multiplex real time PCR wordt uitgevoerd in een 'mastermix' waarmee de verschillende doelorganismen in één multiplex-reactie even efficiënt en gevoelig geamplificeerd worden als in afzonderlijke monoplex-reacties. Eerder was dit in multiplexsystemen, wegens een drastisch afnemende gevoeligheid, vaak niet mogelijk.

Met deze nieuw ontwikkelde test kunnen (flexibel) tot vier doelorganismen aangetoond worden (Figuur 2). Naast de bekende drie pathogene *Erwinia*-soorten voor aardappel kan de multiplex PCR gecompleteerd worden met een generieke (pectolytische) *Erwinia*-detectie of met een cytochroom-oxidase (COX) -test (positieve controle op een goede DNA-extractie). Het voordeel van een aanvullende, generieke *Erwinia*-detectie is dat ook alle niet-pathogene (pectolytische) *Erwinia*'s aangetoond worden. Ten aanzien van de detectie van pathogene 'Erwinia spp.' werkt de generieke *Erwinia*-detectie als een extra bevestiging.



Figuur 2. 4-plex reactie. Door toepassing van vier verschillende fluorescente reporter dyes kan in één reactie onderscheid worden gemaakt tussen de vier verschillende doelorganismen (*P. atrosepticum*, *Dickeya* spp., pathogene *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en totaal pectolytische *Erwinia*'s)

### Fluorescentiesignaal

Naast een juiste samenstelling van de mastermix, specifieke primers, de juiste primer/probe-concentraties etc., is vooral de keuze van het juiste type probes (voor elk doelorganisme verschillend) belangrijk. In dit systeem worden zgn. 'double-dye probes' toegepast. Deze double-dye probes hebben een fluorescerende reporter dye en een quencher die de fluorescentie van de dye tegengaat. Gedurende de amplificatie raakt, door exonuclease-activiteit van Taq DNA polymerase, de dye los van de quencher en begint te fluoresceren. Hoe vaker replicatie plaats vindt, des te groter de hoeveelheid reporter dye die begint te fluoresceren en hoe sterker het signaal. Via fluorescentiemeting kan het verloop van de amplificatie in de tijd gevolgd worden en kan de oorspronkelijke hoeveelheid doel-DNA worden berekend (zie ook: Roenhorst, 2006). Door een juiste combinatie van quenchers (zo weinig mogelijk achtergrond, waardoor de gevoeligheid van de test toeneemt) en dyes (geen spectrale overlap tussen de verschillende dyes) blijkt het mogelijk een multiplex PCR voor de praktijk te ontwikkelen met dezelfde kwaliteit als de afzonderlijke monoplex PCR's (Tabel 1).

### Gevoeligheid en validatie

Gemiddeld ligt de gevoeligheid van een PCR voor *Erwinia*-onderzoek in knolsap rond  $10^4$  cellen per ml. Deze gevoeligheid is voor de praktijk onvoldoende. Immers, lagere (latente) besmettingen kunnen bij uitpoten van de knollen, onder voor het pathogeen gunstige omstandigheden, tot expressie komen met als gevolg declassering of afkeuring van het perceel. Daarom wordt ook bij de nieuwe NAK-test de detectie voorafgegaan door semi-selectieve verrijking van het sap in een pectinemedium. Op deze manier kan een gevoeligheid bereikt worden van enkele cellen per ml voorafgaande aan verrijking.

Door de NAK is uitgebreid onderzoek verricht naar de complexiteit van verrijking. Bij het onderzoek worden navels (primaire invalspoort via de stoloon voor de bacterie) van tien verschillende knollen samengevoegd. Het samenvoegen van knollen, met hun natuurlijke (onbekende dichtheden) bacteriepopulaties, vergroot de kans dat er meerdere pathogene doelorganismen in het verrijkingsmedium terechtkomen. Verschillende aanvangsconcentraties van doel- en niet-doelorganismen kunnen de efficiëntie van het

**Tabel 1.** Vergelijking van twaalf verrijkte praktijkmonsters, onderzocht in een 4-plex systeem en in afzonderlijke 1(mono)-plex systemen.

De monsters variëren sterk in pathogeen-samenstelling (besmettingsgraad en aantal aanwezige pathogenen). Nrs 1, 2: Pca; nrs 3, 4: *Dickeya* spp.; nrs. 5, 7: Pca en virulente Pcc; nrs. 6, 8, 9, 11,12 Pca, *Dickeya* spp. en virulente Pcc; nr. 7 Pca en virulente Pcc. PEC = generieke reactie voor *Erwinia* spp. ntc = no template controle. De Ct-waarden (aantal cycli dat is verlopen wanneer het fluorescentiesignaal de drempelwaarde passeert; de positieve waarden zijn cursief: Ct < 40) van de nieuw ontwikkelde BioPlex PCR zijn vergelijkbaar met de waarden van de afzonderlijke 1-plex PCR-testen.

Monster	4-plex PCR (Ct-waarden)				1-plex PCR (Ct-waarden)			
	nrs.	Pca	<i>Dickeya</i>	vPcc	PEC	Pca	<i>Dickeya</i>	vPcc
1	25,74	40,00	40,00	18,29	25,64	40,00	40,00	18,23
2	24,43	40,00	40,00	23,04	24,30	40,00	40,00	22,77
3	40,00	24,13	40,00	20,50	40,00	24,27	40,00	20,31
4	40,00	20,41	40,00	16,80	40,00	20,31	40,00	16,88
5	28,45	40,00	32,77	19,53	28,24	40,00	32,63	19,48
6	24,71	33,46	35,19	23,32	24,79	32,83	33,46	23,33
7	27,55	40,00	26,73	22,08	27,83	40,00	26,72	22,19
8	32,65	35,28	31,51	23,03	32,72	33,50	31,36	22,90
9	32,77	29,95	30,41	25,45	31,94	29,98	30,37	25,44
10	40,00	30,21	31,36	26,17	40,00	30,16	31,42	26,01
11	30,44	26,72	34,21	23,24	30,11	27,09	34,31	23,25
12	20,45	22,98	22,62	18,38	20,31	22,53	22,69	18,24
ntc	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
Gem. pos.	27,47	27,89	30,60	21,65	27,32	27,58	30,37	21,59
Stdev.	0,10	0,22	0,16	0,05	0,10	0,22	0,16	0,05

verrijkingproces beïnvloeden. Door onderlinge competitie om voedingsstoffen (pectine) kan het ene pathogeen veel sneller de stationaire fase in het verrijkingproces bereiken dan het andere, en daardoor dat andere pathogeen wegdrücken. Echter, in validatie-experimenten met extracten van partijen pootaardappelen met natuurlijke besmettings- en achtergrondpopulaties (verschillende uitgangskonzentraties van de doelorganismen) is dit effect alleen in het geval van drie gelijktijdig aanwezige doelorganismen vastgesteld. Ook temperatuur speelt daarbij een belangrijke rol. Het is met name *P. atrosepticum* die bij verrijkingstemperaturen boven het optimum voor de soort soms wordt weggedrukt. Een en ander betreft overigens een zuiver verrijkingseffect en geen verdringing binnen de multiplex PCR-reactie. Uitgebreide validatie-experimenten (Elisa versus PCR) lieten overigens zien dat het optreden van drie pathogenen per samengesteld monster nauwelijks voorkomt. Bovendien is voor het routinematige kwaliteitsonderzoek de detectie van 'pathogene *Erwinia* spp.' belangrijk, en niet de exacte soortsaamenstelling.

Er is uitgebreid onderzoek verricht naar de specificiteit van de aldus ontworpen 'BioPlex PCR'. De specificiteit voor '*Erwinia* spp.' en op aardappel optredende, andere (bodembegonden) bacteriën (waaronder bekende kruisreageerders met Elisa) bleek 100%. Een uitgebreide validatie aan praktijkmonsters is opgestart.

Om de toets betaalbaar te houden wordt, naast het multiplexen en het samenvoegen van knollen, gebruik gemaakt van een DNA-extractiesysteem met hoge verwerkingscapaciteit (Kingfisher 96) en met eigen lysisbuffers. Op deze manier kunnen in 20 minuten 96 extracten worden gemaakt.

### Toepassing en verder onderzoek

Met de ontwikkelde BioPlex real-time PCR is, ten opzichte van de nu gebruikte Elisa-test, een belangrijke stap gezet naar een completere (pathogene Pcc's), specifiekere en gevoeliger test om pathogene '*Erwinia* spp.' in partijen aardappels aan te tonen. Het betreft een belangrijk hulpmiddel voor teler en handelshuis om de besmetting in een partij pootaardappels vast te stellen en daarop geëigende maatregelen te nemen. Het lopende, landelijke onderzoek naar beheersingsmogelijkheden, binnen het kader van het 'Deltaplan *Erwinia*', moet daar aanvullende handvatten voor bieden. Op dit moment wordt tevens onderzoek verricht naar

de toepasbaarheid van de nieuwe BioPlex real-time PCR bij het aantonen van *Dickeya* spp. en *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in bolgewassen.

Het ontwikkelde multiplex format wordt door de NAK voor meerdere pathoengroepen (waaronder virussen en nematoden) uitontwikkeld en toegepast. De beperkende factor is daarbij overigens de apparatuur. Met de ABI 7500 thermocycler is het mogelijk tot vijf pathogenen in één reactie te detecteren. Wanneer meer dan vijf doelorganismen in één reactie dienen te worden aangetoond, zal gekeken moeten worden naar de toepassing van andere typen thermocyclers of naar array-technologieën. De hier beschreven doorbraak in het multiplexen heeft recent bij de NAK geleid tot de opening van een groot routinelaboratorium voor moleculaire toepassingen.

### Literatuur

- de Haan EG, Dekker-Nooren CCEM, van den Bovenkamp GW, Speksnijder AGCL, van der Zouwen PS & van der Wolf JM (2008) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology* 122: 561-569
- Roehorst, JW (2006) Real-time PCR brengt routinematige toepassing van moleculair biologische technieken dichterbij. *Gewasbescherming* 37 (5) 194-197
- Ślawiak, M, van Beckhoven JRCM, Speksnijder AGCL, Czajkowski R, Grabe G, & van der Wolf JM. Biochemical and genetic analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp strains from potato in Europe *European Journal of Plant Pathology* (in druk)
- van der Wolf JM, van der Zouwen PS van der, van Beckhoven JRCM, Speksnijder AGCL, de Haan EG, Boons CGA & van den Bovenkamp GW (2003) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* als primaire veroorzaker van zwartbenigheid in de aardappel. *Plant Research International*, Wageningen Intern rapport, 38 pp