

ten van de leliebollen. In de eerste proef gaven twee van de twaalf antagonisten een positief resultaat, namelijk minder hevig wortelrot. In vervolgproeven kon dit effect echter niet herhaald worden.

Het bleek mogelijk het bodemleven te verstoren. Het lijkt erop dat ook natte grondontsmetting met MetamNatrium het bodemleven dusdanig doodt dat ook ziektevering voor een groot deel wordt uitgeschakeld. Dit betekent, dat wanneer grondontsmetting wordt toegepast door de telers, het plantgoed (de leliebollen) ook vrij moet zijn van aaltjes om wortelrot schade te voorkomen.

Betekenis voor de praktijk

Als het bodemleven belangrijk is, zullen alle teeltmaatregelen die nadelig zijn voor het bodemleven, voorkomen moeten worden. Zo zal natte grondontsmetting ook een negatief effect hebben op de ziektevering. Bij herbesmetting door besmet plantmateriaal direct na op die wijze ontsmette percelen, zal al bij lagere aantallen aaltjes schade optreden dan bij herbesmetting van percelen die niet recent ontsmet zijn.

Dit onderzoek is gefinancierd door het ministerie van LNV in het programma 397-I en is nu afgesloten.

Samenvattingen van de werkgroep Identificatie en detectie 2005

Bruikbaarheid van Real-time PCR (Taqman) voor screening van pootgoed op aanwezigheid van aardappel-bruinrot

Alexander van Beuningen¹,
Konrad Gaisch¹,
Ineke van den Beld²,
Jaap Janse¹, Linda Kox²

¹Discipline Bacteriologie,

²Discipline Moleculaire Biologie van de Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

Vanaf 1995 vindt in Nederland jaarlijks een integrale toetsing van pootgoedaardappelen op het voorkomen van bruinrot (*Ralstonia solanacearum*, Ras 3, Biovar 2) plaats. Hierbij worden extracten van knollenmonsters (steekproef van tweehonderd knollen uit 20–25 ton) m.b.v. Immunofluorescentie (IF)-microscopie gescreend op de aanwezigheid van de bruinrotbacterie. De recente ontwikkelingen op het gebied van de Real-time PCR (Taqman) (Weller *et al.*, 2000) maken screening van aardappelextracten met deze techniek een serieuze optie. De probe in deze Taqman assay bestaat uit de primersequentie van de conventionele PCR (Seal *et al.*, 1993), die momenteel in ons laboratorium gebruikt wordt als één van de bevestigende toetsen. Verder hebben we gekozen voor een duplex Real-time PCR benadering, waarbij een cytochroomoxidase /primer/probe combi-

natie dient ter controle op de efficiëntie van DNA-isolatie en mogelijke remming vanuit het extract. In een laboratoriumvalidatie hebben we gekeken naar de specificiteit van deze Taqman PCR toepassing.

In de specificiteitsbepaling zijn 41 buitenlandse *Ralstonia*-isolaten uit aardappel (Ras 3, biovar 2), 10 *Ralstonia*-isolaten met afwijkend ras en biovar, en negentien kruisreagerders uit serologie en de conventionele PCR, getest. De Taqman-assay blijkt positief met alle bruinrotisolaten. Daarnaast bestaat er nog grote specificiteit voor de BLDB-bacterie en *Ralstonia solanacearum*. De laatste genoemde zijn bekende kruisreagerende bacteriën voor zowel de conventionele PCR als voor de Real-time PCR (Weller), maar komen niet op aardappel voor. Onder de negentien kruisreagerende isolaten is slechts een kruisreactie gevonden voor *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, deze heeft een hoge Ct-waarde.

De gevoeligheid van de methode in aardappelextract werd geoptimaliseerd door DNA isolatie. We hebben gekozen voor toepassing van de Quickpick kit (Bionobile) op het KingFisher (96-wells) nucleinezuurisolatiesysteem (Thermo). In pilot-experimenten was hiervan de detectielimiet in de Taqman-PCR ca. 10⁵ cfu per ml extract. De bruikbaarheid van de Taqman-PCR als mogelijk alternatief voor IF werd onderzocht met praktijkmonsters uit de integrale toetsing van seizoen 2003/2004. Hiervoor is een serie extracten samengesteld bestaande uit 480 IF-negatieve en 48 gerandomiseerde, blinde monsters die in eerdere toetsen (IF en bevestigende toetsen) positief bevonden zijn voor *Ralstonia solanacearum*. De positieve

monsters bevatten bacteriecel-aantallen variërend van 10^4 tot 10^7 cellen per ml extract (gebaseerd op microscopische tellingen). Alle 480 IF-negatieve extracten scoren negatief in Taqman-PCR. Van de positieve extracten zijn er 42 positief in Real-time PCR, de overige 6 reageren niet (ook niet na verdunning van het monster). Deze zes extracten zijn nader onderzocht met IF-microscopie en conventionele PCR. Van de zes extracten zijn er twee zowel voor IF als voor PCR negatief, 2 alleen PCR-positief en twee alleen IF-positief. Deze resultaten wijzen op afbraak van cel- en DNA-materiaal tijdens opslag van de extracten bij -20°C .

De voorlopige conclusie is dat de Taqman PCR bruikbare methode is voor de screening van aardappelextracten op aanwezigheid van *Ralstonia solanacearum*, Ras 3, Biovar 2. Toetsing van verse monsters (geen afbraak van cellen/DNA), moet al dan niet bevestigen dat de Taqman-PCR dezelfde betrouwbaarheid heeft als IF-microscopie.

Ontwikkeling van TaqMan PCR voor diverse quarantaine plantpathogenen

Peter Bonants,
Richard van Hoof,
Marga van Gent-Pelzer en
Marjon Krijger

Plant Research International,
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
tel: 00.31.317.476213,
peter.bonants@wur.nl

PRI participeert in het EU project Portcheck. Binnen dit EU project worden real-time TaqMan PCR applicaties ontwik-

keld met als doel te worden ingezet voor de diagnose van Q-organismen op importproducten op de plaats van binnenkomst in de EU (port of entry). Te denken valt met eerste instantie aan vliegvelden en havens. De gekozen targets zijn allen quarantaine organismen van de A1- of A2 lijst van de EU. PRI heeft real-time TaqMan PCR's ontwikkeld voor de pathogenen *Guignardia citricarpa*, *Synchytrium endobioticum*, *Meloïdogyne chitwoodi* en *M. fallax*, *Globodera pallida* en *G. rostochiensis*.

De veroorzaker van citrus black spot, *Guignardia citricarpa*, is visueel moeilijk te onderscheiden van de endofyt *G. mangiferae*. De specifieke TaqMan PCR maakt dit onderscheid wel. Momenteel maakt de PD al gebruik van deze TaqMan.

De veroorzaker van wratziekte, *Synchytrium endobioticum* is een obligate schimmel die op knollen, stolonen en jonge stengels wratvorming induceert. Wintersporen komen na een rottingsproces in de grond terecht. Vanuit grond monsters worden wintersporen in zeef- of spoelfracties aangetoond m.b.v. specifieke ITS-PCR. De TaqMan PCR blijkt tevens zeer bruikbaar voor detectie van wintersporen in grond vanwege zijn specificiteit en gevoeligheid.

Gebruikmakend van het ITS gebied van het wortelknobbel aaltje *Meloïdogyne* bleek de ontwikkeling van een normale TaqMan probe niet mogelijk. Voor AT-rijke gebieden zijn Minor Groove Binders gekoppeld aan de probe een uitkomst. De MGB-probes voor *Meloïdogyne chitwoodi* en *M. fallax* blijken specifiek en gevoelig. Middels additie van een niet-competatief interne amplificatie con-

trole (IAC) wordt het extract, gevriesdroogde aardappelschil, getoetst op remming.

Globodera is de veroorzaker van aardappel moeheid. Generieke primers zijn ontwikkeld in combinatie met een specifieke *G. pallida* probe en *G. rostochiensis* probe. Omdat kruisreacties ontstaan tijdens deze TaqMan PCR zijn de probes gemodificeerd. LNA's zijn ingebouwd in de probe. Deze zorgen voor een slechtere binding met de mismatch en zijn daarvoor geschikt om de probe specificiteit te verhogen.

Protocolen zijn geschreven voor de Smartcycler, een real-time PCR apparaat welke on-site kan worden ingezet, daar deze draagbaar is.

Moleculaire identificatie en detectie van *Phytophthora ramorum*

Peter Bonants¹,
Els Verstappen¹,
Ineke de Vries¹ en
Katarzyna Wiejacha¹

¹Plant Research International,
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
tel: 00.31.317.476213,
peter.bonants@wur.nl

²Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland en
Kelly Ivors, Dept. of Plant Pathology,
North Carolina State University, USA.

Het genus *Phytophthora* bevat meer dan zeventig beschreven soorten, terwijl vele nieuwe soorten recentelijk zijn gerapporteerd als gevolg van de ontdekking van voorheen niet gedetecteerde soorten of door hybridisatie van bekende soorten. *Phytophthora ramorum*, een van de nieuwe *Phy-*

tophthora soorten, wordt beschouwd als een hoog fyto-santair risico vanwege grootschalige sterfte van eiken in kustgebieden van Californie (USA).

In Europa komt de ziekte hoofdzakelijk voor in *Rhododendron*, *Viburnum* en *Camellia*, alhoewel recentelijk in openbaar groen enkele geïnfecteerde bomen van *Quercus rubra*, *Quercus falcata*, *Quercus ilex*, *Aesculus hippocastanum* en *Fagus sylvatica* zijn gerapporteerd in gebieden met eerdere meldingen van geïnfecteerde *Rhododendron* planten.

Phytophthora ramorum is een heterothallische soort en het is bekend dat het voorkomt als twee verschillende populaties, in Californie / Oregon (US) en in Europa (EU). In Europa worden hoofdzakelijk exclusief A1 mating type isolaten gevonden, terwijl in de US meestal A2 type isolaten geïdentificeerd worden. Maatregelen zijn van kracht om verspreiding van dit pathogen en ook vermenging van beide types te voorkomen. Daarvoor zijn geschikte detectie en identificatie methodes dringend gewenst.

Verschillende moleculaire technieken (ITS-PCR, Taqman-PCR, AFLP, ISSR, microsattelieten, sequentie analyse van verschillende genen en PCR-RFLP) zijn ontwikkeld voor detectie en karakterisatie van deze nieuwe *Phytophthora* soort. Moleculaire verschillen tussen US- en EU-isolaten van *P. ramorum* bestaan en kunnen worden gedemonstreerd met beschikbare technieken. Resultaten, die tot dusver verkregen zijn voor isolaten vanuit geheel Europe en ook vanuit de US zullen worden gepresenteerd en bediscussieerd.

TaqMan PCR voor detectie van pectinolytische Erwinia spp.

¹Van der Wolf, J.M.,

²J. van Arkel, ²J. van Doorn,

³J.J. van de Haar en

³H. Velvis

¹ Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen

² Praktijk Onderzoek voor Plant en Omgeving, Sector Bloembollen, Postbus 85, 2160 AB Lisse

³ HZPC Research B.V., Postbus 2, 9123 ZR Metslawier

Pectinolytische *Erwinia* spp. zorgen ieder jaar voor veel schade (meer dan twintig miljoen euro) in de teelt van vollegronds- en bloembolgewassen. Gebruik van schoon uitgangsmateriaal is essentieel voor de beheersing van *Erwinia* spp.. Detectie van *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) en *Erwinia chrysanthemi* (Ech) vindt nu plaats m.b.v. serologische toetsen. Deze methoden hebben als nadeel dat afwijkende serogroepen niet herkend worden. Verder kan *E. c.* subsp. *carotovora* door de serologische variatie niet serologisch aangetoond worden. Voor detectie van de verschillende pectinolytische *Erwinia* spp. werden TaqMan PCR assays ontwikkeld. Een Eca assay gebaseerd op de primers beschreven door De Boer & Ward (Phytopathology 85, 854) reageerde alle negentien Eca stammen afkomstig uit de aardappel uit verschillende delen van de wereld en niet met zestien andere pectinolytische *Erwinia* spp. Een Ech assay, gebaseerd op primers gericht tegen pectaat lyase genen (Nasser *et al.*, Appl. Environm. Microbiol. 62, 2228) reageerde met tien Ech stammen afkomstig uit verschillende gewassen en niet met negen andere pec-

tinolytische *Erwinia* spp.. De assay voor Ecc gebaseerd op primers beschreven door Kang *et al.* (Plant Path. 52, 127) reageerde slechts met negen van de zestien Ecc stammen en is derhalve niet specifiek genoeg. Een assay voor generieke detectie van pectinolytische *Erwinia* spp., gebaseerd op 16S rDNA primers beschreven door Toth *et al.* (J. Appl. Microbiol. 87, 158) reageerde met alle 53 *Erwinia* stammen. Een verdere evaluatie van de specificiteit en bruikbaarheid in de praktijk volgt nog.

Toepassing van padlock probes voor diagnostiek-multiplex detectie van plantenpathogenen met behulp van universele microarrays

Marianna Szemes,

Ronald van Doorn,

Peter Bonants, Els Nijhuis,

Annette Dullemans en

Cor D. Schoen

Plant Research International B.V.,

Droevendaalsesteeg 1,

6708 PB Wageningen

Tel: +31-317-476-026;

Fax: +31-317-418-094;

E-mail: cor.schoen@wur.nl

Padlock probes (PLP) zijn lange oligonucleotiden, waarvan de uiteinden complementair zijn aan aangrenzende sequenties. Na hybridisatie aan de doelwit-sequentie (target) worden de twee uiteinden met elkaar in contact gebracht waarop PLP circularisatie kan optreden via ligatie. PLPs geven extreem specifieke target herkenning, die gevolgd wordt door universele amplificatie en microarray

detectie. Daar targetherkenning gescheiden is van 'downstream processing' maakt het gebruik van PLP's de ontwikkeling mogelijk van flexibele diagnostische systemen voor detectie van verschillende organismen.

Bij toepassing van de padlock technologie voor diagnostische doeleinden hebben we het ontwerp van PLPs aangepast om een hoge specificiteit te waarborgen. Ligatie aan niet-target sequenties onder normale experimentele condi-

ties moet worden uitgesloten. We ontwierpen en testten 11 PLPs om verschillende organismen te kunnen detecteren op genus-, soort- en ondersoortniveau. Een op PLPs-gebaseerde prototype plantgezondheidschip werd ontwikkeld. Een uitstekende specificiteit werd gevonden voor het doelwit-organisme. Achtergrondreacties werden bepaald voor elke hybridisatie door niet-doelwit referentiemateriaal te gebruiken die een betrouwbare en gevoelige identificatie van positieve monsters

gaf. Een gevoeligheid van 5 pg genomisch DNA en een dynamisch detectiebereik van 100-1000 werd waargenomen. Het ontwikkelde multiplex diagnostische systeem werd gevalideerd door genomisch DNA te testen van gekarakteriseerde isolaten en kunstmatige mengsels hiervan. Het gedemonstreerde systeem kan worden aangepast aan een grote verscheidenheid van toepassingen: van ziektemanagement enerzijds tot anderzijds het gebruik voor microbiologische doeleinden.