

CSI ook in de Plantenwereld

Peter Bonants en
Theo van der Lee

Plant Research
International,
Wageningen UR

Inleiding

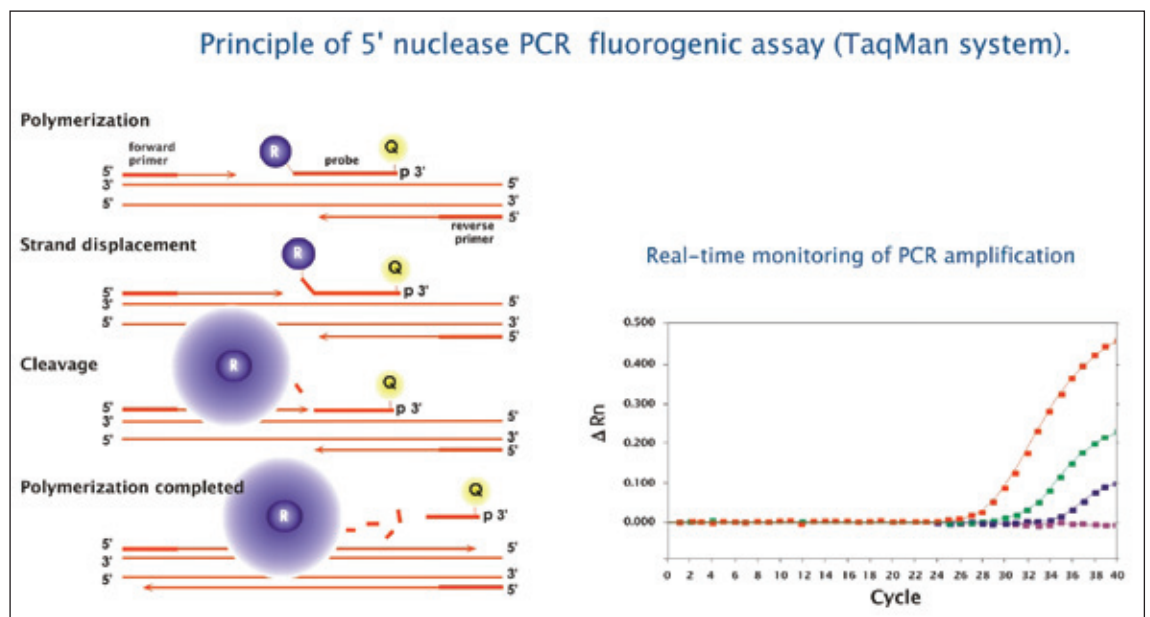
Wie kent de serie Crime Scene Investigation (CSI) niet van de televisie? Forensisch onderzoekers nemen op de plaats van het delict monsters om met de modernste DNA-methoden de dader van het delict op te sporen. Ook in de land- en tuinbouw heeft de ontwikkeling van (moleculaire) detectiemethoden van plantenpathogenen de laatste jaren een hoge vlucht genomen. Inmiddels worden deze methoden al grootschalig toegepast in de praktijk. Werd in het begin alleen conventionele polymerase chain reaction (PCR) ingezet voor moleculaire detectie, momenteel vindt ook real-time PCR meer en meer ingang.

Binnen het FES-programma 'Versterking infrastructuur plantgezondheid' zijn binnen het werkpakket 'Identificatie- en Detectiemethoden' vele projecten uitgevoerd om de 'daders' van aantastingen te kunnen identificeren. Het betreft dan een breed scala aan daders, in dit geval bacteriën, fytoplasma's, insecten, nematoden, schimmels, viroïden en virussen. De focus was hierbij gericht op gereguleerde organismen, zogenaamde quarantaineorganismen. In deze projecten werkten ontwikkelaars en eindgebruikers

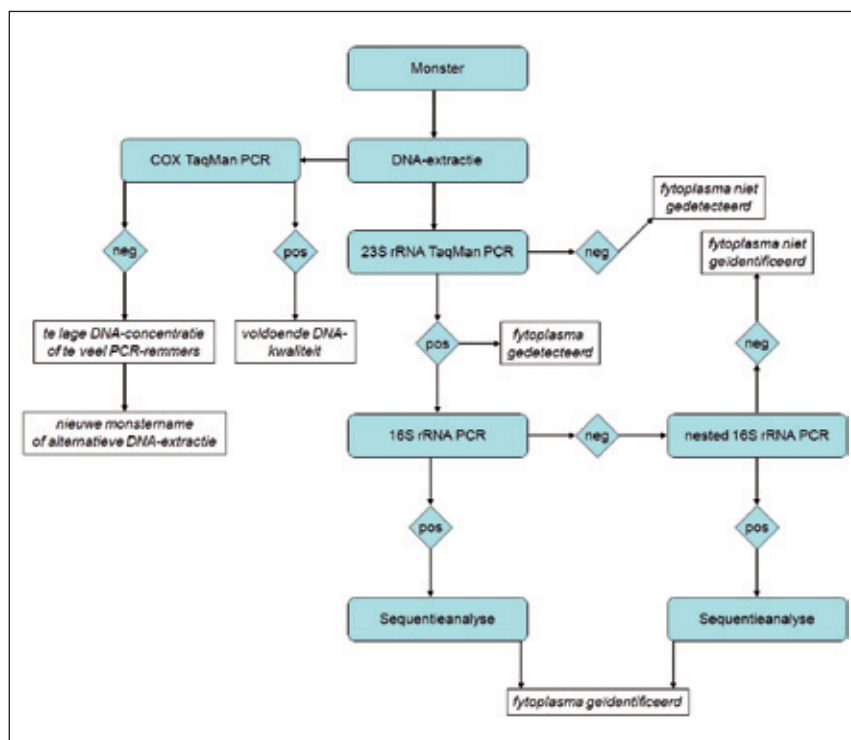
samen om de beste methode ook toegepast te krijgen in de praktijk. Plant Research International (PRI) uit Wageningen heeft als ontwikkelaar van identificatie- en detectiemethoden de trekkersrol op zich genomen. Er zijn consortia gevormd waarin de benodigde expertise bij elkaar werd gebracht voor de ontwikkeling, validatie en implementatie van methoden. Naast PRI, maakten ook eindgebruikers, zoals Nationaal Referentiecentrum (nieuwe Voedsel en Waren Autoriteit; voorheen Plantenziektenkundige Dienst), keuringsdiensten en private toetslaboratoria deel uit van deze consortia. Hierdoor werd een optimale uitwisseling van kennis en expertise op de verschillende gebieden gewaarborgd.

Kwalitatieve en kwantitatieve detectie met behulp van PCR

Waar begin je als je een bepaald organisme wilt detecteren? Allereerst wordt er materiaal verzameld van het doelorganisme en van organismen die er veel op lijken (zogenaamde *look-a-likes*). Het verzamelen van dit materiaal is tijdrovend omdat de meeste quarantaine-organismen niet of nauwelijks



Figuur 1. Principe van TaqMan real-time PCR voor kwantitatieve detectie. De probe draagt een fluorescerende groep (R) en een groep die deze fluorescentie uitdooft (Q). Wanneer een nieuwe DNA-streng wordt gemaakt (polymerisatie) wordt de probe afgebroken en komt de fluorescente groep R vrij (cleavage) van de quencher Q en kan worden waargenomen (rechts).



Figuur 2. Stroomdiagram voor detectie en identificatie van fytoplasma's, waarbij gebruik gemaakt wordt van drie of vier PCR-reacties (Maarten de Kock, PPO-BBF). Met de COX TaqMan PCR-toets wordt gecontroleerd of het DNA van voldoende kwaliteit is. 23S rRNA en 16S rRNA zijn nucleïnezuuren uit ribosomen van fytoplasma's; in deze fragmenten is binnen de soort weinig variatie. Aan- of afwezigheid van het pathogeen wordt getoetst met 23S rRNA TaqMan PCR. Daarna volgt een enkelvoudige of dubbele (nested) PCR-reactie die resulteert in een kleiner fragment. De basenvolgorde (DNA-sequentie) geeft dan aan welke soort het is.

in Europa voorkomen. Van deze organismen wordt de DNA- of RNA-sequentie van specifieke genen bepaald. Vervolgens worden diverse testen ontwikkeld op basis van sequentieovereenkomsten tussen verschillende individuen of isolaten binnen een soort en sequentieverschillen met de meestverwante soorten. De belangrijkste methode is PCR. Voor deze moleculair-biologische methode werd in 1983 de Nobelprijs voor de scheikunde toegekend. Met deze methode kunnen in een DNA-monster bepaalde specifieke sequenties exponentieel worden vermenigvuldigd, waardoor de detectiemogelijkheden toenemen. Een variant op de PCR is de *real-time* PCR. Hiermee is het mogelijk om ook de *hoeveelheid* DNA van een organisme vast te stellen. Bij *real-time* PCR wordt additioneel een probe toegevoegd aan de reactie (Figuur 1). Deze probe draagt fluorescerende moleculen die het mogelijk maken de PCR *real-time* te volgen. De meeste laboratoria die aan het project hebben meegedaan, beschikken over de faciliteiten om zowel conventionele als *real-time* PCR uit te voeren.

Perceel 1: Virussen

Onderdelen

- Ontwikkeling van een *real-time* RT-PCR gebaseerd op TaqMan-technologie voor generieke detectie van pospiviroiden
- Ontwikkeling van een PCR voor Peach rosette phytoplasma, Peach X-disease phytoplasma en Peach yellows phytoplasma
- Ontwikkeling van een PCR voor Strawberry witches' broom phytoplasma

Resultaten

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) heeft een quarantainestatus in de Europese Unie. Dit viroïde kan grote schade geven in de gewassen aardappel en tomaat. Recentelijk werd duidelijk dat ook andere viroïden uit het genus *Pospiviroid* vergelijkbare schade kunnen geven. Tevens bleken deze pospiviroiden symptomeloos voor te komen in diverse bloemisterijgewassen. Een generieke detectiemethode voor pospiviroiden was dan ook gewenst. Binnen dit project is in eerste instantie gekeken naar de bruikbaarheid van een in Engeland ontwikkelde *real-time* RT-PCR toets (reverse transcriptase-PCR). Toen deze onvoldoende gevoelig bleek, is gestart met de ontwikkeling van een nieuwe toets. Hiermee bleek het mogelijk alle pospiviroiden in één of meerdere parallele reacties te detecteren. De toets is inmiddels gevalideerd.

Diverse fytoplasma's in perzik en aardbei zijn opgenomen in de Europese lijsten voor quarantainepathogenen (EPPO/EU). Voor een aantal quarantaine fytoplasma's is detectie op dit moment niet mogelijk of moeilijk. Binnen dit project is een stroomdiagram opgesteld voor de detectie en identificatie van fytoplasma's in perzik en aardbei. Het stroomdiagram (Figuur 2) maakt gebruik van een TaqMan PCR-toets voor de detectie van fytoplasma's en een TaqMan PCR-toets als interne controle om te testen of de DNA-kwaliteit voldoende is. Aansluitend op de detectie van een fytoplasma wordt in een aparte PCR-reactie een groter DNA-fragment geproduceerd, eventueel gevolgd door een tweede (*nested*) PCR. Dit kleinere PCR-fragment of het *nested* PCR-product kan gebruikt worden voor sequentie-analyse en identificatie van het fytoplasma.

Het probleem bij aardbei is dat er een symptoom (Strawberry witches' broom phytoplasma) op de quarantainelijst staat: kleine planten, struikachtig met veel vertakte kroon; gedraaide bladstelen met kleine blaadjes; vreemd gevormde vruchten. Uit moleculair onderzoek bleek dat er meerdere



Figuur 3. Volgroeide rups van *Spodoptera litura*, één van de Q-soorten (M. v. d. Straten, nVWA, NRC).

fytoplasma's dezelfde symptomen geven. Andersom kwam het ook voor dat er verschillende namen in omloop waren voor één fytoplasma. Via een stroomdiagram (Figuur 2) wordt nu geprobeerd deze problematiek goed te beschrijven om zo voldoende handvatten te hebben om dit organisme van de quarantainelijst te krijgen.

Perceel 2: Insecten

Onderdelen

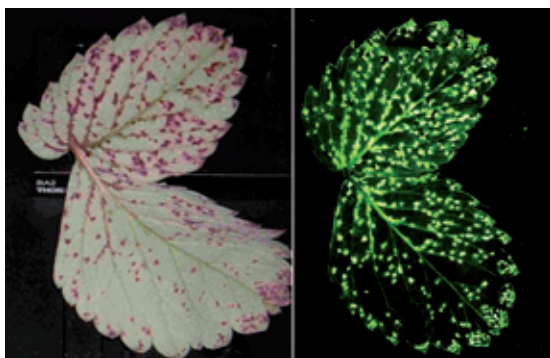
- Ontwikkeling van een identificatietoets (of kit gebaseerd op TaqMan-technologie) voor vier soorten van het geslacht *Spodoptera*
- Ontwikkeling van een *real-time* PCR (gebaseerd op TaqMan-technologie) voor detectie en identificatie van in *Bemisia tabaci* aanwezige virussen bij import
- Ontwikkeling van een identificatiekit voor *Bemisia tabaci*

Resultaten

De leerstoelgroep Biosystematiek van WUR heeft binnen het consortium Insecten DNA barcode-sequenties bepaald van vele soorten nachtvlinders (*Spodoptera*), waarvan er vier op de Q-lijst staan: *Spodoptera littoralis*, *S. litura*, *S. frugiperda* en *S. eridania*. Door hun grote reproductie (tot 2000 eieren), korte generatieduur (20-40 dagen), polyfage karakter en het vermogen om snel resistentie te verwerven tegen verschillende groepen van bestrijdings-middelen maakt

dat deze organismen een reële bedreiging vormen voor de Nederlandse en Europese (glas) tuinbouw. Een snelle en correcte identificatie van deze organismen bij importinspecties is van essentieel belang. Identificatie van adulten is voor specialisten relatief eenvoudig, maar voor larven en eipakketten, die vaak bij import worden aangetroffen, wordt het een geheel ander verhaal. Het uitkweken van eieren en larven tot adulten om de morfologische identificatie mogelijk te maken vergt een te lange doorlooptijd aangezien de ladingen, waarop deze aangetroffen worden, vaak van bederfelijke aard zijn. Op basis van de sequentieverschillen zijn er door de nVWA TaqMan PCR-toetsen ontwikkeld voor de diverse *Spodoptera*-soorten, die ook op inspectielocatie (*on-site*) kunnen worden uitgevoerd om zo sneller en adequater op te kunnen treden.

Tabakswittevlieg (*Bemisia tabaci*) is behalve een schadelijk insect vooral belangrijk als vector van veel plantenvirussen. In de EU zijn alle door *B. tabaci* overgedragen virussen gereguleerd (Directive 200/29/EC, Annex IAI). Op dit moment worden partijen plantmateriaal van niet-Europese herkomst tegengehouden wanneer *Bemisia* aanwezig is, terwijl de achterliggende reden niet het insect zelf is, maar de mogelijke aanwezigheid van virussen in het insect of het plantenmateriaal. Daarom zijn door PRI *real-time* PCR-toetsen ontwikkeld om de *B. tabaci* te toetsen op besmetting met belangrijke EU-quarantaine virussen. Er zijn nu toetsen beschikbaar voor *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) en drie virussen uit de nieuwe groep van Torradovirussen. Na validatie van deze toetsen worden ze door onder meer de keuringsdiensten ingezet in de praktijk. Parallel aan de virustoetsingen hebben WU-leerstoelgroepen Entomologie en Biosystematiek binnen het consortium Insecten een TaqMan PCR-methode ontwikkeld om verschillende typen *B. tabaci* te identificeren. Er bestaat namelijk onduidelijkheid over het mogelijk schuilgaan van meerdere soorten onder één naam. Deze worden aangeduid met de term biotypen. Met deze toets kan het B-biotype van het veel schadelijker Q-biotype worden onderscheiden. Ook is de toets onderscheidend voor een andere witte vlieg *Trialeurodes vaporariorum*. Door PRI is deze toets zodanig geoptimaliseerd dat tegelijk ook bepaald kan worden of de wittevlieg één van bovengenoemde virussen bij zich draagt. Zo worden twee verdachten in één test ontmaskerd.



Figuur 4. Fluorescent Protein Imaging voor visualisatie van GFP (green fluorescent protein) -gemarkeerde *Xanthomonas fragariae*-bacteriën in aardbeibladd met symptomatische infecties. (Jan van der Wolf, PRI)

Perceel 3: Bacteriën

Onderdelen

- PCR-toetsen voor bacteriën
- Een selectief medium voor *Xanthomonas fragariae* en ontwikkeling van een (*real-time*) PCR voor *Xanthomonas fragariae*

Resultaten

Voor een aantal belangrijke plantpathogene bacteriën met een quarantainestatus ontbreken gevalideerde detectiemethoden. Binnen onderdeel a van dit perceel zijn TaqMan PCR assays ontwikkeld en/of gevalideerd voor *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (anjer), *Erwinia stewartii* (maïs), *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (steenvruchten) en *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* (*Prunus* spp.).

Detectie van de *Xanthomonas fragariae* d.m.v. uitplaten verloopt weinig reproduceerbaar en is ook weinig gevoelig. De bacterie groeit langzaam en het aardbei-extract bevat remmende stoffen die uitgroei verhinderen. De groei van de bacterie werd gevolgd m.b.v. een GFP-mutant (Figuur 4). Voor detectie van *Xanthomonas fragariae* is binnen onderdeel b van dit perceel een beschreven TaqMan PCR-procedure gevalideerd en een groeimedium geoptimaliseerd voor gebruik in een verrijgingsprotocol.

¹ Padlock probes

Probes die door middel van ligatie een specifieke detectie mogelijk maken van de mutatie in een enkel basenpaar.

² A1 en A2

De quarantainelijst van de EU bevat A1- en A2-organismen. A1-organismen zijn in de EU niet aanwezig; A2-organismen zijn wel (beperkt) aanwezig in de EU, maar de verdere verspreiding ervan wil men beperken.

Perceel 4: Schimmels

Onderdelen:

- Detectiemethoden voor *Phytophthora*
- Detectiemethoden voor *Phoma*

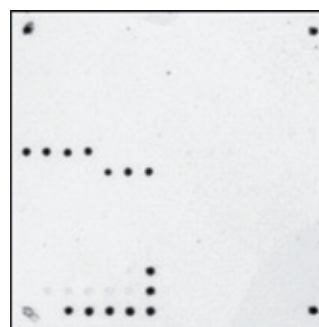
Resultaten

Detectie van *Phytophthora* speelt een belangrijke rol bij het internationale handelsverkeer, maar ook in het openbaar groen. Er worden steeds meer

Phytophthora-soorten beschreven, waarvoor nog geen goede detectiemethoden ontwikkeld zijn. Dit project heeft een diagnostische methode opgeleverd die toe te passen is *in planta*, en ook de meest recent beschreven (quarantaine-) soorten omvat. De methode betreft een generieke *Phytophthora*-methode gevolgd door een *Phytophthora*-identificatie methode. Op basis van DNA-sequentiegegevens (verkregen in WP2 van FES Schimmels en beschikbaar in internationale databases) is een generieke TaqMan PCR-test voor *Phytophthora* ontwikkeld en gevalideerd. Op basis van sequentieverschillen zijn vervolgens *padlock probes*¹ ontwikkeld voor 15-20 voor Nederland relevante *Phytophthora*-soorten. Vervolgens is een *micro-array*-platform opgezet om de individuele *Phytophthora*-specifieke *padlock probes* te identificeren (Figuur 5).

Phoma andigena is een A1-quarantaineorganisme² dat voorkomt in de Andes, het oorsprongsgebied van de aardappel. Voor snelle detectie bij eventuele vondsten buiten het oorsprongsgebied is een adequate en snelle detectiemethode noodzakelijk.

Dit is eveneens van toepassing op *Phoma crystalliniformis*, een bekend schadelijk organisme uit de Andes dat zowel aardappel als tomaat kan aantasten. Op basis van DNA-sequentieverschillen (verkregen in WP2) tussen diverse relevante *Phoma*-soorten op aardappel of herkomst (Andesgebied) zijn TaqMan PCR's ontwikkeld voor beide genoemde *Phoma*-soorten: *P. andigena* en *P. crystalliniformis*. Uit onderzoek in WP1 en 2 is voortgekomen dat beide soorten inmiddels zijn



Figuur 5. Voorbeeld van *micro-array*-detectie van *Phytophthora ramorum* met behulp van *padlock probes* (Peter Bonants, PRI). Voor 22 *Phytophthora*-soorten zijn specifieke *padlock probes* ontwikkeld en een *padlock probe* die met alle *Phytophthora*-soorten reageert. Deze zijn in zevenvoud gespot op de *micro-array*. Te zien zijn de spots voor *P. ramorum* (midden) en de spots voor *Phytophthora* spp. (onderkant) en de vier control-spots (hoekpunten *micro-array*).



Figuur 6. Aantasting van lelie, veroorzaakt door het bladaaltje *A. ritzemabosi* (Joop van Doorn, PPO-BBF).

heringedeeld in het geslacht *Stagonosporopsis* (*S. andigena* en *S. crystalliniformis*).

Ontwikkeling van detectiemethoden voor belangrijke zaadoverdraagbare *Phoma*-soorten zijn dringend gewenst. Op basis van DNA-sequentieverschillen van het actinegen (verkregen in WP2 van FES Schimmels) zijn individuele TaqMan PCR's ontwikkeld voor de zaadoverdraagbare *Phoma*-soorten *P. valerianellae*, *P. betae*, *P. lingam* en voor *Leptosphaeria biglobosa*. Deze test zal door de Naktuinbouw gebruikt worden als snelle identificatie.

Perceel 5: Nematoden

Onderdeel:

Ontwikkeling van een identificatiemethode voor *Aphelenchoides besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi*

en *A. subtenuis* als aanvulling op of als alternatief voor morfologische identificatie.

Resultaten

'Bladaaltjes' is de alledaagse benaming voor een aantal plantenparasitaire *Aphelenchoides*-soorten (Figuur 6). Het geslacht *Aphelenchoides* is soortenrijk en omvat ook een aantal schimmelelers, soorten die vanwege hun gelijkheid met plantenparasitaire *Aphelenchoides* erg gemakkelijk zouden kunnen leiden tot vals-positieve uitslagen. Neem hierbij in ogenschouw dat schimmeleterende *Aphelenchoides*-soorten in vrijwel ieder nematodenmonster worden aangetroffen. De bladaaltjes *A. fragariae* en *A. ritzemabosi*, en het krokusknolaaltje *A. subtenuis* worden regelmatig aangetroffen in o.a. bloembolgewassen; *A. besseyi* wordt echter sporadisch bij inspecties in Nederland aangetroffen en is een quarantaine-organisme. De identificatie van *Aphelenchoides*-soorten berust voornamelijk op de morfologie en de histologie van de staart en de geslachtsdelen (spicula) van volwassen mannetjes waarbij opgemerkt dient te worden dat de kenmerken variabel en gedeeltelijk overlappend zijn. Kortom, klassieke microscopische identificatie van *Aphelenchoides*-soorten is uiterst lastig en vereist specifieke expertise. De taxonomische instabiliteit van dit genus, dat op dit moment 54 soorten omvat (die veelal slecht beschreven zijn), maakt dat we ons zullen beperken tot soorten die in Europa voorkomen en soorten die op de A1 lijst van de EPPO voorkomen.

Er zijn twee nieuwe identificatie- en kwalitatieve detectiemethodes ontwikkeld. Beide methoden zijn gebaseerd op soortkenmerkende DNA sequenties zoals die gevonden zijn in het rDNA van de relevante *Aphelenchoides*-soorten en maken gebruik van real-time PCR in combinatie met SYBR Green detectie. Methode A, gebaseerd op het zogenaamde ITS-gebied, en methode B, gebaseerd op het 18S-gebied, zijn in staat om *A. ritzemabosi*, *A. fragariae*, *A. subtenuis* en *A. besseyi* te identificeren en te detecteren tegen een achtergrond van duizenden terrestrische nematodensorten.

Validatie

Validatie van methoden speelt meer en meer een belangrijke rol in detectie. Veel diagnostische methoden zijn echter niet gevalideerd. In samenwerking met alle betrokken partijen op het gebied van detectie van plantenpathogenen in Nederland is een validatiedocument opgesteld onder leiding van de nVWA divisie Plant. Dit document, 'Nationale richtlijn voor de validatie van detectie- en identificatiemethoden voor

planten-pathogenen en plagen', geeft aan hoe een methode voor detectie/identificatie van een bepaald plantenpathogeen moet worden uitgevoerd en welke prestatiekenmerken op welke manier en in hoeveel herhalingen moeten worden uitgevoerd. Prestatiekenmerken zijn o.a. gevoeligheid, meetbereik, specificiteit, selectiviteit, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, robuustheid en juistheid. Validatieplannen voor alle ontwikkelde toetsen zijn op basis van bovengenoemd document geschreven en na goedkeuring uitgevoerd.

Implementatie

Binnen dit onderdeel werd als uitdrukkelijke eis gesteld dat de ontwikkelde toets ook geïmplementeerd moest worden bij de uiteindelijke eindgebruiker (keuringsdiensten, nVWA, divisie Plant en diverse laboratoria). Hieraan is binnen de diverse projecten ook erg veel aandacht besteed. De eindgebruikers zijn in een vroeg stadium betrokken bij de ontwikkeling en validatie van de methoden en hebben de methoden inmiddels geïmplementeerd.

Met dank aan

Marleen Botermans, Hans de Gruyter, Linda Kox, Annelien Roenhorst, Bart van de Vossenberg, (Nationaal Referentie Centrum, nVWA, divisie Plant)
Khanh Pham, Maarten de Kock en Joop van Doorn (PPO-BBF)
Annette Dullemans, Antje de Bruin, Martin Verbeek, Henry van Raay, René van de Vlugt, Cor Schoen, Marjanne de Weerd, Jan van der Wolf, Lia de Haas, Pieter Kastelein, Els Verstappen, Odette Mendes en Marga van Gent-Pelzer (PRI)
Freek Bakker (WU-Biosystematiek)
Martijn Schenk (Wageningen UR Glastuinbouw)
Marcel Dicke en Patrick Verbaarschot (WU-Entomologie)
Arthur de Cock, Henk Brouwers, Maikel Aveskamp en Joyce Woudenberg (CBS)
Hans Helder (WU-Nematologie)
Renske Landeweert (Blgg-AgroXpertus)
Ellis Meekes, Harry Koenraadt en Marcel Toonen (Naktuinbouw)
Gé van de Bovenkamp (NAK)