

Levend of dood, dat is de vraag!

Theo van der Lee¹,
Gerard van Leeuwen²,
Eisse de Haan³,
Johannes Helder⁴,
Harrie Koenraad⁵
en Peter Bonants¹

¹ Plant Research
International,

Wageningen UR

² nVWA, divisie Plant

³ NAK

⁴ Wageningen University,

Wageningen UR

⁵ Naktuinbouw

Inleiding

In de literatuur zijn voor de detectie van plantenpathogenen diverse methodieken beschreven. Het betreft enerzijds biologische en morfologische methodieken zoals lokking, uitplaten en microscopie en anderzijds moleculaire methodieken zoals serologische tests en DNA-gebaseerde methoden. De biologische methodieken detecteren alleen levende organismen. Bij morfologische methodieken is het onderscheid tussen dood en levend materiaal lastig en vaak subjectief. Serologische technieken maken ook geen onderscheid tussen dood en levend of infectieus en niet infectieus. Moleculaire technieken tenslotte worden steeds meer toegepast maar maken meestal geen onderscheid tussen dood en levend. Met name voor quarantaine-organismen is het onderscheid tussen levende en dode pathogenen van essentieel belang. Binnen het FES-programma Versterking infrastructuur plantgezondheid is binnen werkpakket 3 Ontwikkeling van methoden voor het aantonen van vitaliteit van plantenpathogenen gewerkt aan de detectie van vitaliteit in nematoden, schimmels en bacteriën.

Tegenwoordig zijn detectiemethoden, gebaseerd op de DNA *polymerase chain reaction* (PCR) favoriet omdat deze methodiek:

- (i) universeel toepasbaar is, aangezien alle organismen DNA bezitten.
- (ii) bijzonder gevoelig is, door de *in vitro*-amplificatie van een bepaalde DNA-sequentie.
- (iii) generiek is, of juist een zeer hoog onderscheidend vermogen heeft, door het gebruik van meer of minder specifieke primers.
- (iv) het toelaat om testen te ontwikkelen voor een willekeurige mix van pathogenen (bacteriën, schimmels, nematoden etc.) waarbij de PCR reactie condities identiek zijn.
- (v) de mogelijkheid biedt een bepaald DNA fragment te kwantificeren wanneer de PCR-amplificaties 'real-time' (=na elke cyclus) gevolgd worden, bijvoorbeeld met behulp van een specifieke probe, zoals in een TaqMan PCR, of met behulp van SYBR green (een stof die fluoresceert indien het gebonden is aan dubbelstrengs DNA).

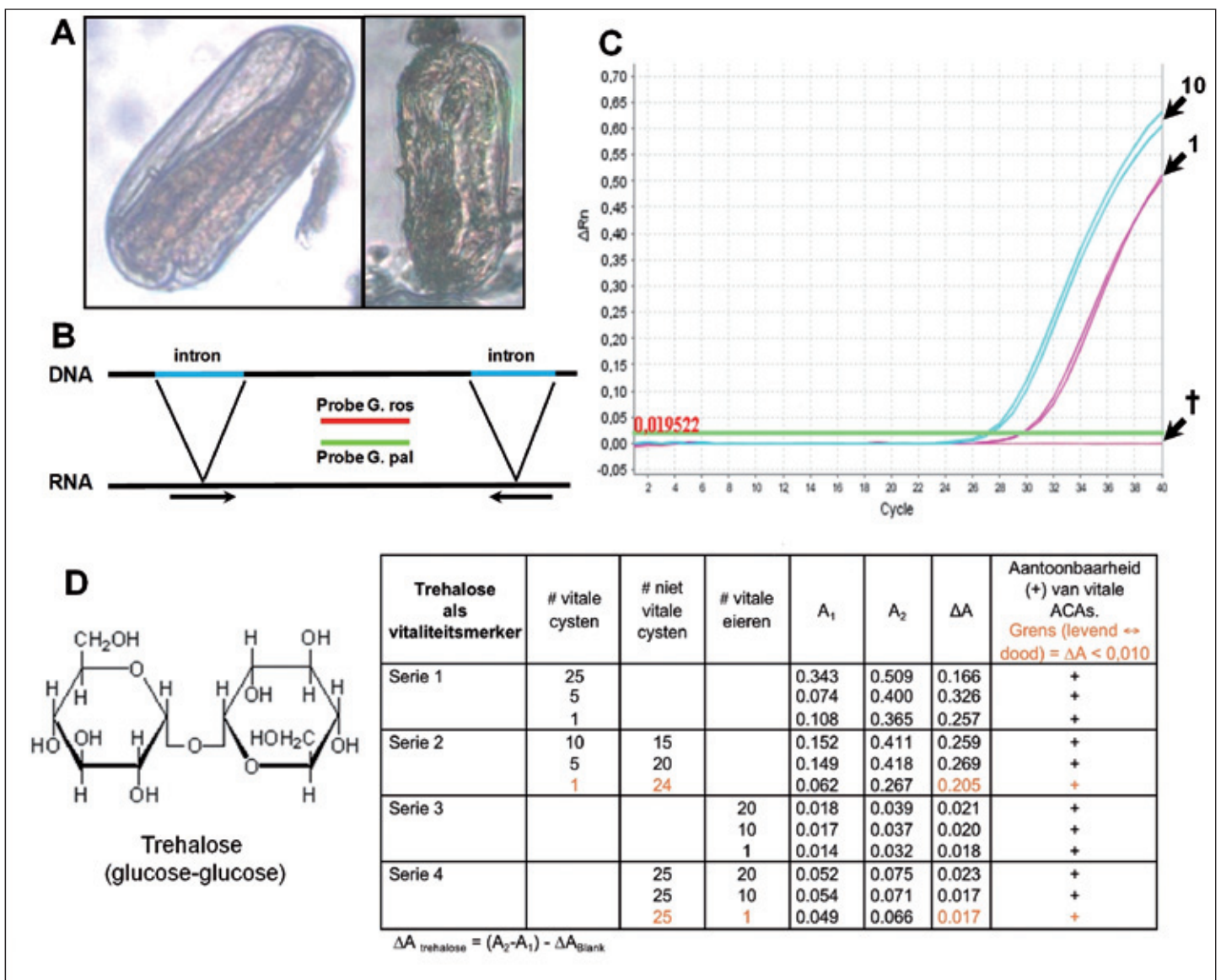
Het in de PCR gedetecteerde DNA is een stabiel molecuul dat ook na de dood van een organisme lange tijd aanwezig kan blijven. Met

behulp van DNA is dan ook wel vast te stellen of een organisme aanwezig is, maar niet of een organisme levend of dood is.

RNA als merker voor vitaliteit

Levend materiaal bevat naast DNA ook RNA. Met name mRNA is een instabiel molecuul dat in levende organismen continu aangemaakt wordt en snel weer wordt afgebroken. mRNAs zijn transcripten van specifieke gebieden van het DNA die zich daarnaast in eukaryoten qua

sequentie kunnen onderscheiden van DNA door de afwezigheid van intronen (tussenliggende stukken genetisch materiaal). De mRNAs coderen voor eiwitten. Veelvoorkomende voorbeelden hiervan zijn de elongatie-factor-1-alpha (EF1) en het glyceraldehyde-di-fosfaat dehydrogenase (GPD) die essentieel zijn in respectievelijk de eiwit- en de energieproductie via de glycolyse. De overeenkomstige mRNA-moleculen zijn dan ook in grote getale aanwezig in elke levende cel. Dit mRNA kan na een reverse transcriptase-reactie met behulp van PCR gedetecteerd worden. Na omzetting van het RNA tot cDNA heeft de



Figuur 1. Vitaliteitsbepaling van Globodera. (A) Visuele microscopische score van een vitaal ei (links) en een niet-vitaal ei (rechts). (B) Design van de RNA-specifieke TaqMan gebaseerd op de intron-grenzen. (C) Onderscheid tussen 10 vitale eieren (lichtblauwe curves), 1 vitaal ei (roze curves) en niet-vitale cysteïnehoud (rode lijn) met behulp van een op RNA gebaseerde TaqMan. De horizontale groene lijn geeft de grens aan waarboven een significante hoeveelheid fluorescentie wordt gemeten. (D) In vitale eieren liggen de juveniele aaltjes in een vloeistof met daarin een hoge concentratie trehalose. De tabel laat de aantoonbaarheid zien van vitale cysten of eieren van het aardappelpycstenaaltje (ACA) *Globodera pallida* tegen een achtergrond van niet-vitale cysten op basis van trehalose-inhoud. Een uitgebreide screening van dood en levend ACA-materiaal wees uit dat monsters met $\Delta A < 0,010$ geen vitale ACAs bevatten.

RNA-detectie dezelfde voordelen als de detectie van DNA: (i) universeel toepasbaar (ii) hoge gevoeligheid (iii) een generiek of juist zeer hoog onderscheidend vermogen (iv) mogelijkheid de hoeveelheid doel-DNA te kwantificeren. Het proces is schaalbaar van bijvoorbeeld een enkele nematode tot een populatie van cysten en het geeft ook de mogelijkheid om in gemengde populaties afzonderlijk te kijken naar de vitaliteit van bijvoorbeeld *G. pallida* en *G. rostochiensis* (beide veroorzaken aardappelmoehheid). Daarnaast is het zo dat bij de beoogde eindgebruikers de benodigde apparatuur en expertise aanwezig zijn.

Alternatieven voor de op RNA gebaseerde detectie van vitaliteit

Binnen het FES-programma 'Versterking infrastructuur plantgezondheid' (werkpakket 3) zijn naast de RNA-gebaseerde techniek ook twee alternatieve technieken om vitaliteit te meten ontwikkeld. Deze technieken zijn mogelijk goedkoper of passen wellicht beter in de huidige screeningsprocedures van de keuringsdiensten. Deze alternatieve methoden maken gebruik van het feit dat in dode organismen membranen desintegreren. Hierdoor kunnen suikers en zouten die normaal in gereguleerde concentraties in het cytoplasma voorkomen weglekken of kunnen vreemde stoffen de cel binnendringen. Het behoud van deze gereguleerde concentraties kost energie en vereist dat de membranen intact zijn. Dode organismen zijn niet in staat deze gradiëntverschillen te behouden.

1) Trehalose als merker voor vitaliteit

Aardappelcystenaaltjes overleven als cysten – pakketjes nematoden-eieren omgeven door de cuticula van het gestorven vrouwtje – in de bodem. In elk ei ligt een juveniel aaltje in een geconcentreerde suikeroplossing van 0,34 M trehalose (een glucose-glucose disaccharide, Figuur 1D). De afname van de vitaliteit van een juveniel leidt tot desintegratie van de ei-membranen en daarmee tot het vrijkomen van trehalose. Het vrijkomende trehalose is met een eenvoudige trehalose detectiekit aan te tonen na enzymatische splitsing in twee glucose eenheden. De hoeveelheid glucose wordt vervolgens spectrofotometrisch bepaald. Trehalose is niet specifiek voor afzonderlijke nematode soorten en is daarom in potentie geschikt als vitaliteitsmerker voor alle cystenvormende nematodensoorten. Het extract dat gebruikt wordt voor de trehalose

bepaling kan na de trehalose meting ook gebruikt worden voor DNA extractie en DNA detectie met een reeds gevalideerde (Q)PCR, om een soortbepaling uit te voeren.

2) Propidium monoazide opname in de cel als merker voor vitaliteit

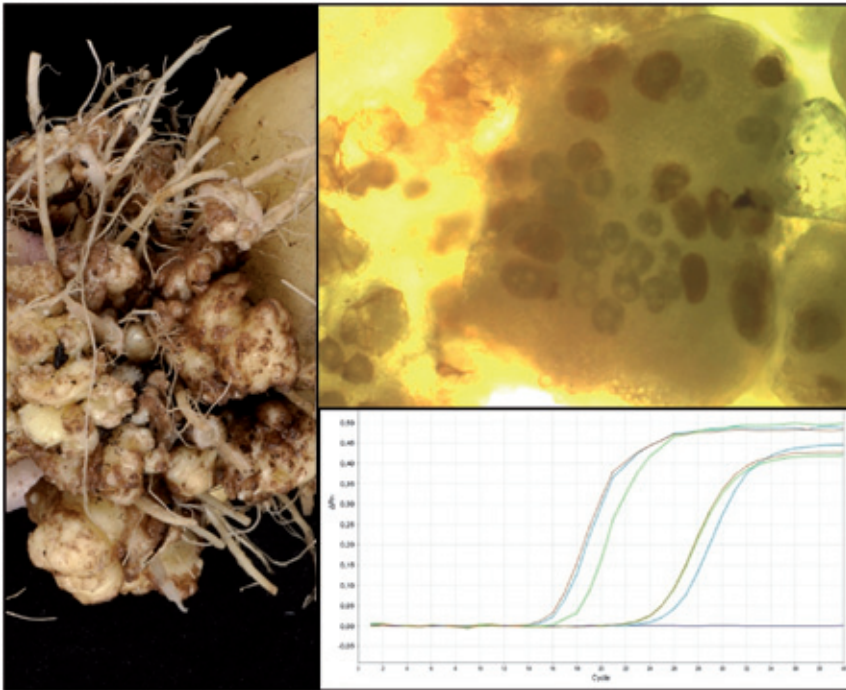
Voor bacteriën wordt gebruik gemaakt van het feit dat, als de selectief permeabele membraan desintegreert, vreemde stoffen de cel kunnen binnendringen. Aan de bacteriesuspensie wordt propidium monoazide (PMA) toegevoegd. Wanneer PMA de cellen binnendringt gaat het een reactie aan met het DNA en wordt daaraan gebonden onder invloed van licht. Het PMA-DNA-complex van de dode cellen is slecht oplosbaar na de DNA-extractie en niet geschikt voor PCR-amplificatie, zodat tijdens een TaqMan PCR-reactie alleen DNA van levende cellen wordt aangetoond.

Validatie van de moleculaire methodieken met biologische toetsen

Voor elk van de deelprojecten over nematoden, schimmels en bacteriën werden de moleculaire gegevens vergeleken met biologische vitaliteitsbepalingen. Hoewel deze biologische methodieken ook hun beperkingen kennen, zoals eerder aangegeven in de inleiding, vormen zij momenteel de gouden standaard waarmee de moleculaire methodieken zich moeten meten. Voor *Globodera* gaat het om visuele waarnemingen en loktoetsen. Voor *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* worden de biologische vitaliteitsbepaling uitgevoerd door uitplaten volgens een bij de NAK-tuinbouw uitgewerkt protocol. Het is de ambitie om een nieuwe standaard op te zetten voor (kwantitatieve) vitaliteitsbepalingen die breed toepasbaar, kostenefficiënt en gemakkelijk inpasbaar is in de huidige toetsen van de Nederlandse keuringsdiensten.

Resultaten vitaliteitsbepalingen van *G. rostochiensis* en *G. pallida*

Op basis van de DNA-sequenties van het gen voor EF1 en GPD van zowel *G. pallida*, als *G. rostochiensis* zijn primers en probes ontwikkeld die specifiek RNA amplificeren en tegelijkertijd deze soorten van elkaar kunnen onderscheiden (Figuur 1B). Met deze methode is het mogelijk een enkel levend ei aan te tonen (Figuur 1C). Parallel hieraan is een methode opgesteld waarmee de hoeveelheid trehalose (Figuur 1D) in levend



Figuur 2. Isolatie van *S. endobioticum* DNA uit aardappelwratten. (A) wratvorming op een aardappel. (B) Dwarsdoorsnede van een wrat met hierin karakteristieke wintersporen. (C) Amplificatie curven van een *S. endobioticum* specifieke TaqMan en een aardappel specifieke TaqMan laten zien dat het DNA van deze obligate biotroof nauwelijks nog verontreinigd is met aardappel DNA (≈ 8 Ct's < 0.5%)

en dood materiaal van *G. rostochiensis* en *G. pallida* kan worden bepaald. Met deze methode is het mogelijk een enkel levend ei aan te tonen in een achtergrond van 25 dode cysten (Figuur 1D). Diverse prestatiekenmerken van beide methodieken zijn inmiddels geëvalueerd waarbij de Nationale Richtlijn voor Plantpathogenen en Plaagorganismen (maart 2010) als richtlijn is gebruikt.

Genoomsequentie *Synchytrium endobioticum*

De ontwikkeling van specifieke primers m.b.t. vitaliteit voor *S. endobioticum* (de veroorzaker van wratziekte bij aardappel) is, ook na herhaalde pogingen, niet gelukt. De oorzaak is dat van dit pathogeen nauwelijks DNA-sequentiegegevens voorhanden zijn en dat de verwantschap met bekende ziekteverwekkers klein is. Daarom is in overleg met de begeleidingscommissie Versterking Infrastructuur Plantgezondheid besloten het budget dat nog beschikbaar was voor dit onderdeel te gebruiken om van *S. endobioticum* DNA te isoleren en van dit organisme de genoomsequentie te bepalen. Deze genoomsequentie dient als strategische versterking van al het onderzoek aan wratziekte

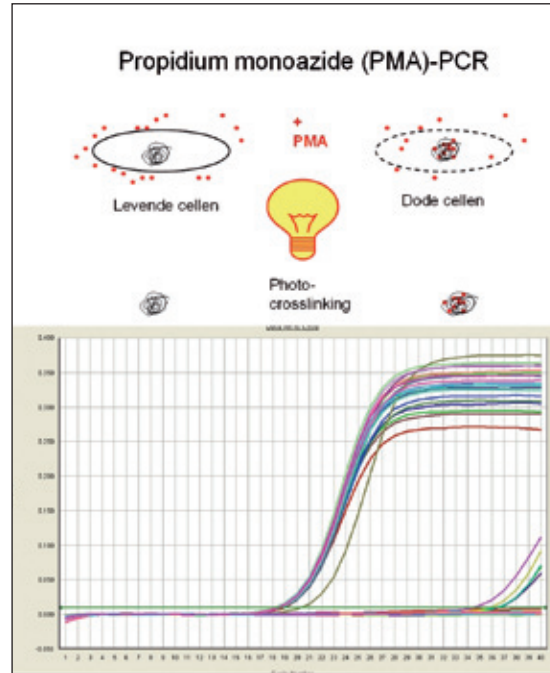
en zal binnen het FES-programma “Versterking Infrastructuur Plantgezondheid” in het onderdeel ‘Ontwikkeling van methoden voor het aantonen van vitaliteit van plantenpathogenen’ gebruikt worden voor het genereren van primers en probes op geselecteerde genen (EF1 en GPD). Additioneel wratmateriaal is door de nVWA, divisie Plant opgekweekt in het kader van een Beleids-Ondersteunend (BO) programma en is 2 september 2010 overgedragen aan Plant Research International. Van dit materiaal is inmiddels DNA geïsoleerd. Meer over de procedure is terug te vinden in een korte film op (<http://www.youtube.com/watch?v=v59uc-Vp4Kg>). Het gaat om de grootste hoeveelheid DNA en ook het zuiverste DNA dat ooit van dit pathogeen is geïsoleerd. De verontreiniging met planten-DNA is verwaarloosbaar klein (Figuur 2). Dit DNA zal gebruikt worden voor het bepalen van de genoomsequentie.

Vitaliteitsbepaling *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)

Xcc is een belangrijk zaadoverdraagbaar pathogeen en de veroorzaker van zwartnervigheid in kool. Er zijn uitgebreide toetsprogramma's opgezet om de aanwezigheid van Xcc in zaad vast te stellen. Warmwaterbehandelingen worden in de praktijk gebruikt om Xcc besmette partijen pathogeen vrij te maken. Het is essentieel om te weten of de behandeling effectief is geweest en alle pathogene bacteriën in het zaad heeft afgedood. Met behulp van de (PMA) –behandeling konden levende cellen van *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* goed worden gescheiden van dode, en vervolgens met een reeds ontwikkeld TaqMan PCR-protocol worden aangetoond (Figuur 3).

Het vervolg: de toekomstige implementatie bij de keuringsdiensten en nVWA

Binnen dit programmaonderdeel werd als uitdrukkelijke eis gesteld dat de ontwikkelde toetsen ook geïmplementeerd moesten worden bij de uiteindelijke eindgebruiker (keuringsdiensten, nVWA divisie Plant en diverse laboratoria). Hieraan is dan ook binnen de diverse projecten veel aandacht besteed. De eindgebruikers zijn in een vroeg stadium betrokken bij de te ontwikkelen methode en de validatie ervan en hebben de methoden geïmplementeerd aan de hand van de ‘Nationale richtlijn voor de validatie van detectie- en identificatiemethoden voor plant-pathogenen en plagen’.



Met dank aan:

Bart van de Vossenbergh, Linda Kox, Loes de Nijs, Patricia van Rijswijk (nVWA, divisie Plant) Jan van der Wolf, Odette Mendes, Carin van Tongeren, Jan Bergervoet, Richard van Hoof en Marga van Gent-Pelzer (Plant Research International, Wageningen UR) Renske Landeweert (BLGG AgroXpertus) Marcel Toonen (Naktuinbouw) Gé van de Bovenkamp en Toos Dekker (NAK)

Figuur 3. Gebruik van Propidium monoazide (PMA) voor de detectie van vitale cellen. (A) PMA wordt aan de cellen toegevoegd. Bij dode cellen kan het PMA de cel in en het DNA bereiken. Door een lichte behandeling bindt het PMA aan het DNA wat de oplosbaarheid en de mogelijkheid voor PCR-amplificatie verhindert. (B) Specifieke TaqMan voor Xanthomonas campestris pv. campestris die na PMA-behandeling alleen levende cellen detecteert.