

DNA-extractie zonder remming

Peter Bonants
en Theo van der Lee

Plant Research
International,
Wageningen UR

Inleiding

Detectie en identificatie van plantenpathogenen met behulp van moleculaire diagnostiek heeft de laatste jaren een grote vlucht genomen. Dergelijke moleculaire methoden maken gebruik van het DNA van het te detecteren pathogeen (ziekteverwekker) en hiervoor moet dan ook dit DNA gezuiverd (geëxtraheerd) worden uit het materiaal waarin je het pathogeen wilt aantonen. In veel gevallen zijn de standaard nucleïnezuur-extractiemethoden afdoende voor het verkrijgen van schoon DNA en/of RNA noodzakelijk voor de vervolgstap nl. amplificatie van het doel-DNA / RNA. Echter, voor een aantal substraten, zoals grond, is de extractie van amplificeerbaar nucleïnezuur tot op heden nog een groot probleem. Tijdens de DNA-extractie uit sommige moeilijke substraten worden ook andere stoffen meegezuiverd, die vervolgens de PCR remmen en daarmee vals-negatieve reacties opleveren.

Onderdeel 1: Grond

Probleemstelling

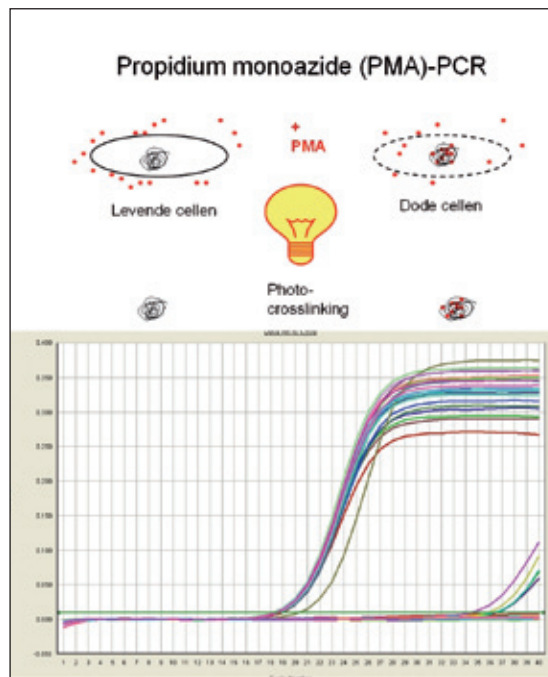
Nucleïnezuur-extractie van nematoden direct uit grond leidt tot grote variabele resultaten in kwaliteit en kwantiteit van het geëxtraheerde nucleïnezuur. De nematoden lijken schoon maar na nucleïnezuurextractie is het nucleïnezuur van

onvoldoende kwaliteit of kwantiteit voor diagnostische analyses doordat ook allerlei amplificatie-remmende stoffen (humuszuur, phenolen, etc) meegezuiverd worden. Daarom worden DNA-extracties veelal uitgevoerd op nematodensuspensies afkomstig uit grond en niet rechtstreeks op grond.

In het verleden is in een STW-project door Blgg-AgroXpertus en WUR-Nematologie een methode ontwikkeld om nucleïnezuren uit nematodensuspensies te extraheren. Deze wordt al op grote schaal toegepast. In dit projectonderdeel is deze methode vergeleken met alternatieven. Daartoe werden vele grondmonsters opgespoeld en de aanwezige nematoden verzameld. Aan deze nematodensuspensies werden één of meerdere doelorganismen (*Ditylenchus dipsaci* en *Meloidogyne chitwoodi*) toegevoegd. Ook werd aan de monsters een interne controle in de vorm van DNA toegevoegd om de extractie-efficiëntie en de mate van PCR-remming goed te kunnen bepalen. De uiteindelijke methode werd goed gevalideerd volgens het opgestelde validatieplan.

Resultaten

Op basis van het validatieplan zijn experimenten uitgevoerd om diverse prestatiekenmerken



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.*

DNA-extractie zonder remming

Peter Bonants
en Theo van der Lee

Plant Research
International,
Wageningen UR

Inleiding

Detectie en identificatie van plantenziekten met behulp van moleculaire diagnostiek heeft de laatste jaren een grote vlucht genomen. Dergelijke moleculaire methoden maken gebruik van het DNA van het te detecteren pathogeen (ziekteverwekker) en hiervoor moet dan ook dit DNA gezuiverd (geëxtraheerd) worden uit het materiaal waarin je het pathogeen wilt aantonen. In veel gevallen zijn de standaard nucleïnezuur-extractiemethoden afdoende voor het verkrijgen van schoon DNA en/of RNA noodzakelijk voor de vervolgstap nl. amplificatie van het doel-DNA / RNA. Echter, voor een aantal substraten, zoals grond, is de extractie van amplificeerbaar nucleïnezuur tot op heden nog een groot probleem. Tijdens de DNA-extractie uit sommige moeilijke substraten worden ook andere stoffen meegezuiverd, die vervolgens de PCR remmen en daarmee vals-negatieve reacties opleveren.

Onderdeel 1: Grond

Probleemstelling

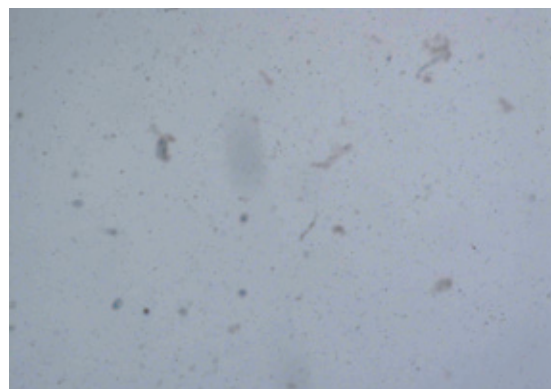
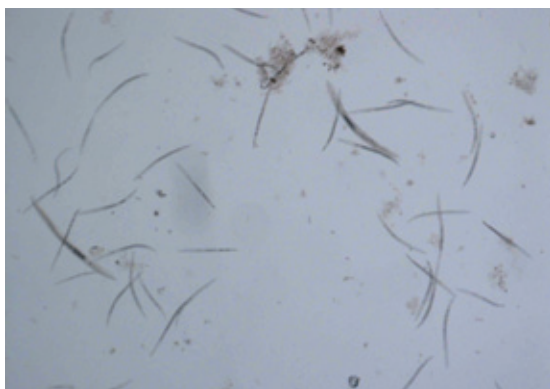
Nucleïnezuur-extractie van nematoden direct uit grond leidt tot grote variabele resultaten in kwaliteit en kwantiteit van het geëxtraheerde nucleïnezuur. De nematoden lijken schoon maar na nucleïnezuurextractie is het nucleïnezuur van

onvoldoende kwaliteit of kwantiteit voor diagnostische analyses doordat ook allerlei amplificatie-remmende stoffen (humuszuur, phenolen, etc) meegezuiverd worden. Daarom worden DNA-extracties veelal uitgevoerd op nematodensuspensies afkomstig uit grond en niet rechtstreeks op grond.

In het verleden is in een STW-project door Bgg-AgroXpertus en WUR-Nematologie een methode ontwikkeld om nucleïnezuuren uit nematodensuspensies te extraheren. Deze wordt al op grote schaal toegepast. In dit projectonderdeel is deze methode vergeleken met alternatieven. Daartoe werden vele grondmonsters opgespoeld en de aanwezige nematoden verzameld. Aan deze nematodensuspensies werden één of meerdere doelorganismen (*Ditylenchus dipsaci* en *Meloidogyne chitwoodi*) toegevoegd. Ook werd aan de monsters een interne controle in de vorm van DNA toegevoegd om de extractie-efficiëntie en de mate van PCR-remming goed te kunnen bepalen. De uiteindelijke methode werd goed gevalideerd volgens het opgestelde validatieplan.

Resultaten

Op basis van het validatieplan zijn experimenten uitgevoerd om diverse prestatiekenmerken



Figuur 1. Lysis van *Meloidogyne hapla*-nematoden na 1 min (links) en na 10 min (rechts) in lysisbuffer (foto: Hans Helder, WU-Nematologie).

(aantoonbaarheidsgrens, selectiviteit, juistheid, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid) te bepalen. De methode is in staat om één toegevoegd aaltje (*D. dipsaci* of *M. chitwoodi*) aan te tonen in een nematodensuspensie (uit diverse zand-/klei en veengronden) en is daarmee geschikt voor het gestelde doel.

Onderdeel 2: Aardappel(schil)extract en Hyacintbollen

Probleemstelling

Ook voor aardappel(schil)extracten en bollenmonsters van hyacint, geldt dat de extractie van amplificeerbaar nucleïnezuur tot op heden nog een groot probleem vormt. Voor detectie van aardappelziekten (o.a. *Erwinia* spp., nu *Dickeya* spp.) wordt in de meeste gevallen de navel van een aardappel uitgesneden en getest in een gezamenlijke batch van twintig navels. De samenstelling van deze navels is niet uniform. De grootste problemen van dit substraat voor nucleïnezuurextractie worden gevormd door de aanwezigheid van grond en zetmeel in het extract. Een bijkomend probleem is dat het perssap van de navelbatches eerst in een zogenaamd verrijkmingsmedium geïncubeerd moet worden om het doelorganisme te vermeerderen. Aanwezige saprophyten kunnen deze verrijking belemmeren. Ook voor detectie van *Dickeya* spp. in bollenmonsters van hyacint worden (delen van) de bollen, na verrijking, in een batch getest. De samenstelling van de bollen varieert van droog tot slijmerig, met veel tot weinig grond. Daardoor is de kwaliteit en de hoeveelheid nucleïnezuur te laag voor (kwantitatieve) moleculaire diagnostische analyses.

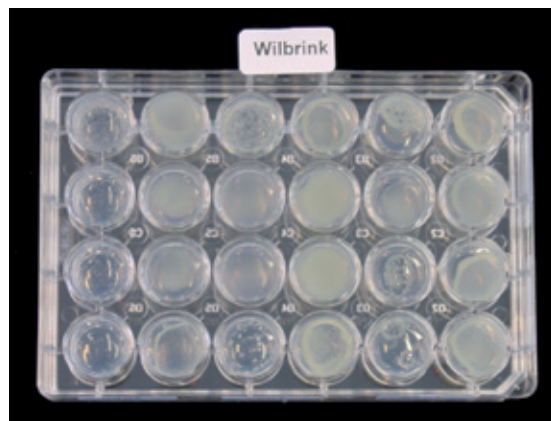
Een betrouwbare DNA/RNA-extractie is hiervoor vereist. Handmatige DNA/RNA-extractie is arbeidsintensief. Semi-geautomatiseerde

extractie m.b.v. magnetische silica krijgt steeds meer de voorkeur. Echter, vanwege het slijmerige karakter van vermalen hyacintbollen zijn gangbare extractiemethoden niet functioneel. De verrijkingstap bij hyacinten resulteert door de bacteriegroei in een visceuze oplossing die niet optimaal verwerkt kan worden met semi-geautomatiseerde extractie. In een later stadium van het project is de doelstelling verder aangepast richting verrijking van het doelorganisme d.m.v. een verbetering van het medium.

Resultaten

Aardappelschilextract

Ter verbetering van het groeimedium voor *Dickeya*-soorten zijn door PRI diverse antibiotica uitgetest. Uiteindelijk zijn er twee antibiotica (sulfomethoxazol en crystal violet) geselecteerd waarvoor alle getoetste *Dickeya* (14x), *Pectobacterium atrosepticum* (3x) en *Pectobacterium carotovorum* (8x) -stammen relatief ongevoelig zijn, wanneer toegevoegd aan TSB-groeimedium en gekweekt onder aerobe



Figuur 2. Groei van bacteriën op het (semi-) selectieve medium Wilbrink (foto: Jan van der Wolf, PRI).

¹ Spiken

Het bewust toevoegen van het organisme om het later in het substraat na verrijking weer te detecteren.

omstandigheden. Het effect van de antibiotica, ook in verschillende verhoudingen, is met behulp van TaqMan PCR onderzocht op de groei van *Dickeya* / *Pectobacterium* toegevoegd aan drie aardappel-extracten. Verrijking in gespiked¹ aardappelsap liet echter een sterke achteruitgang van de detecteerbaarheid van de doelorganismen zien in de aanwezigheid van de betrokken antibiotica. Daarmee vormt het nieuwe verrijkingsmedium geen verbetering ten opzichte van het oude.

Hyacintbollen

Op basis van het verbeterde *Dickeya*-medium zijn er door PPO-BBF experimenten in hyacintbollen uitgevoerd. Er is een werkprotocol geschreven, waarbij na voorkeek van hyacintenweefsel in verrijkingsmedium, het DNA van *Dickeya*-bacteriën met behulp van reagentia van het merk AGOWA wordt geëxtraheerd. De semi-automatische DNA-extractie vindt plaats met behulp van een Thermo Kingfisher-systeem. De validatie van de methode heeft aangetoond dat de methode voldoet aan alle vooraf gestelde criteria voor juistheid, meetbereik & aantoonbaarheids grens, selectiviteit, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en robuustheid. Het meetbereik voor *D. solani* na verrijking heeft een ondergrens $>10^5$ en een bovengrens van $\leq 10^8$ bacteriën. Het meetbereik voor *D. dadantii* na verrijking heeft een ondergrens $>10^4$ en een bovengrens van $\leq 10^8$ bacteriën.

Onderdeel 3: Nucleïnezuur extractie uit zaad

Probleemstelling

Ook voor de extractie van amplificeerbaar nucleïnezuur uit zaad vormt tot op heden een groot probleem. Vaak zijn zaadbacteriën gelokaliseerd onder de zaadhuid, waardoor ze beschermd worden voor behandelingen en ontsmetting en niet kunnen worden verwijderd. Voor detectie van de bacteriële zaadpathogenen (*Clavibacter* spp. en *Xanthomonas* spp.) wordt in de meeste gevallen het zaad eerst batchgewijs vermalen om vervolgens een nucleïnezuur-extractie uit te voeren op het materiaal. Probleem hierbij is dat in zaad extreem hoge concentraties van reservestoffen zoals oliën en polysacchariden (waaronder zetmeel) kunnen voorkomen, die bekende remmers van de PCR-reactie zijn. De toepassing van commerciële DNA-extractiekits leidt hierdoor tot nucleïnezuur van lage kwaliteit en kwantiteit, onbruikbaar voor (kwantitatieve) moleculaire

diagnostische analyses. Het doel van dit onderdeel was dan ook de extractiemethode te verbeteren.

Resultaten

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

Een representatieve collectie van twintig Xcc-stammen (collectie Naktuinbouw) werd door PRI getoetst voor gevoeligheid voor acht antibiotica in vloeibaar mCS20ABN voedingsmedium. De antibiotica waren geselecteerd op basis van literatuurgegevens en oriënterend onderzoek met drie Xcc-stammen. Gentamycine, metronidazole en bacitracine gaven geen groeiremming bij de gebruikte concentratie. Cephalaxine en tobramycine gaven slechts remming bij een van de twintig stammen. Het effect van de antibiotica op de groei van Xcc toegevoegd aan twee zaadextracten, wordt verder onderzocht met behulp van TaqMan PCR.

Op basis van de resultaten is nu een verbeterd medium beschikbaar, dat binnenkort wordt geëvalueerd bij de Naktuinbouw waarbij zaadpartijen met verschillende microbiologische achtergrond gebruikt zullen worden. Het medium zal zo nodig verder aangepast worden wanneer de groei van Xcc onvoldoende is.

Detectie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomatenzaad.

Door de Naktuinbouw werd een protocol ontwikkeld om Cmm in zaad aan te tonen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een gemerkte interne controle op basis van *Clavibacter michiganensis* subsp. *tesselarius* (Cmt) die visueel onderscheidbaar is van de klassieke Cmm-spike. Er is ook een specifieke Cmt-TaqMan PCR ontwikkeld die onderscheid kan maken tussen Cmt en Cmm. Cmm kan na vóórverrijking met het nieuwe protocol goed aangetoond worden met de Cmm-specifieke TaqMan PCR in relatief schone partijen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een AGOWA-DNA-extractiekit. Bij het parallel toetsen van relatief vieze saprofyt-rijke partijen met de klassieke toets en de nieuwe PCR bleek er echter onvoldoende vermeerdering te zijn van Cmm en Cmt waardoor de nieuwe toets nog onvoldoende betrouwbaar is. Verdere optimalisering van de voorverrijking is noodzakelijk voordat begonnen kan worden met de validatiefase van de toets. Hierbij wordt nagegaan of parallelle vermeerdering van het doelpathogeen en de spike in media met en zonder antibiotica tot een betrouwbaardere toets kunnen leiden.

Validatie en implementatie

Validatie van methoden en implementatie bij de eindgebruikers vormt een integraal onderdeel uit van dit project. Validatie wordt net als bij identificatie en detectie uitgevoerd volgens een vooropgesteld plan met het bepalen van een aantal prestatiekenmerken. Hoewel een aantal prestatiekenmerken voor DNA-extractie moeilijk te bepalen zijn, hebben alle betrokkenen validatieplannen opgesteld en deze zijn na goedkeuring door de nVWA uitgevoerd. Doordat de eindgebruikers ook participeren als partner/ onderaannemer in het onderzoek, is een optimale afstemming gegarandeerd en vindt de methode zijn weg naar de praktijk.

Met dank aan:

Loes den Nijs, Ilse Heurneman, Bart van de Vossenbergh en Linda Kox (Nationaal Referentie Centrum, nVWA, divisie Plant)
Maarten de Kock en Robert Dees (PPO-BBF)
Richard van Hoof, Marjon Krijger en Jan van der Wolf (PRI)
Hans Helder (WU-Nematologie)
Ellis Meekes, Harry Koenraadt en Marcel Toonen (Naktuinbouw)
Toos Dekker, Eisse de Haan en Gé van den Bovenkamp (NAK)
Renske Landeweert en Peter Veenhuizen (Blgg-AgroXpertus)

Digitale sleutels en visuele hulpmiddelen ter herkenning van invasieve plantensoorten

Leni Duistermaat¹,
Johan van Valkenburg²,
Roelf Pot³
en Edu Boer¹

¹ NCB Naturalis, sectie
Nationaal Herbarium
Nederland, Postbus
9514, 2300 RA Leiden;
e-mail: duistermaat@nhn.
leidenuniv.nl;
e.boer@minlnv.nl

² Nieuwe Voedsel en Waren
Autoriteit, divisie Plant,
Postbus 9102, 6700 HC
Wageningen; e-mail:
j.l.c.h.van.valkenburg@
minlnv.nl

³ Roelf Pot onderzoek- en
adviesbureau, Pandijk 2,
7861 TE Oosterhesselen;
e-mail: roelfpot@wxs.nl

Elders in dit nummer is de opzet beschreven van een informatiesysteem over invasieve plantensoorten dat is ontwikkeld door het Uitvoeringsconsortium Invasieve Plantensoorten. Voor het herkennen van invasieve plantensoorten moeten instrumenten ontwikkeld worden die door zowel inspecteurs als onderzoekers en andere geïnteresseerden gebruikt kunnen worden. De ontwikkeling hiervan vindt plaats in het werkpakket 3 van het FES-programma 'Versterking infrastructuur plantgezondheid'. De instrumenten die ontwikkeld worden, zijn gevalideerde digitale identificatiesleutels naar (groepen van) potentieel invasieve plantensoorten en hun gelijkende verwanten, en visuele hulpmiddelen in de vorm van kenniskaarten per soort en soortgroep. Hieronder worden de werkzaamheden beschreven en enkele van de producten getoond.

De werkzaamheden vallen uiteen in de volgende onderdelen:

1. Ontwikkeling
2. Validatie
3. Kennisoverdracht en implementatie bij de gebruikers.

Ontwikkeling

De ontwikkeling van de digitale sleutels gebeurt in het softwarepakket Lucid <http://www.lucidcentral.org/>. De sleutels zijn uitermate

gebruikersvriendelijk, omdat ze intuïtief in gebruik zijn, sterk visueel werken en het gebruik van technische termen zoveel mogelijk vermijden. Het zijn 'multiple entry keys', met andere woorden een sleutel die de gebruiker niet van begin tot einde hoeft te doorlopen, maar waar de gebruiker kenmerken, die worden waargenomen direct kan invullen en waar ook het resultaat direct duidelijk wordt. Met deze software kunnen sleutels worden aangemaakt, waarvoor de gebruiker alleen een internetbrowser nodig heeft. De sleutels zijn vrij toegankelijk. Op dit moment zijn er reeds twee in concept beschikbaar op www.q-bank.eu/Plants/ onder het kopje *Identification*.

We ontwikkelen de volgende sleutels:

- a. voor zaden ten behoeve van besmetting in 'diverse producten' (beschikbaar op Q-bank; zie Figuur 1);
- b. voor kiemplanten van soorten die in dat stadium aangetroffen kunnen worden (onkruiden in potplanten bij import en export; in Nederland ingeburgerde en inburgerende soorten);
- c. voor lastige onkruiden die vaak voorkomen in 'Bonsai' (eerder aangetroffen risicosoorten) (beschikbaar op Q-bank; zie Figuur 2);
- d. voor in de handel zijnde waterplanten (groot risico voor de Nederlandse situatie);
- e. voor niet-inheemse water- en oeverplanten in Nederland.

Tevens maken we een totale sleutel voor alle soorten die in tenminste een van de