

Kasia Gaszczyk,
Els Verstappen,
Odette Mendes,
Cor Schoen &
Peter Bonants

PRI, Wageningen

Een op padlock probe gebaseerde universele micro-array-detectie methode voor meerdere *Phytophthora*-soorten

Detectie van *Phytophthora* speelt een belangrijke rol in het internationale handelsverkeer, maar ook in het openbaar groen. Er worden steeds meer *Phytophthora*-soorten beschreven. Hiervoor zijn nog geen goede detectiemethoden ontwikkeld. Voor de wel beschreven *Phytophthora*-soorten zijn veelal wel beschreven, maar het betreft in alle gevallen individuele testen. Binnen dit project is een diagnostische methode ontwikkeld die toe te passen is *in planta*, en die ook de meest recent beschreven (quarantaine-) soorten omvat. Ook worden meerdere *Phytophthora*-soorten tegelijkertijd gedetecteerd. De ontwikkelde methode omvat een generieke *Phytophthora*-TaqMan PCR gevolgd door een specifieke padlock probe-ligatie in combinatie met een micro-array-detectie. Op basis van DNA-sequentiegegevens (verkregen in WP2 van

het FES-programma Plantgezondheid en beschikbaar in internationale databases) is een generieke TaqMan-PCR-test voor *Phytophthora* ontwikkeld en gevalideerd. Op basis van sequentiever verschillen zijn vervolgens padlock probes (PLPs) voor 15-20 voor Nederland relevante *Phytophthora*-soorten ontwikkeld. De lijst is samengesteld in nauw overleg met CBS en nVWA. Deze PLPs worden vervolgens geligeerd op de TaqMan-PCR-amplicons. Na ligatie worden de niet-geligeerde PLPs afgebroken m.b.v. exo-nuclease. De geligeerde PLPs worden in een SYBRGreen-PCR geamplificeerd en de geamplificeerde PLPs worden tenslotte gehybridiseerd op een micro-array platform en gevisualiseerd. De methode is uitgetest op DNA-preparaten van verschillende *Phytophthora*-soorten met positieve resultaten. Elke *Phytophthora*-soort geeft een *signature* op de micro-array te zien. Ook DNA-monsters afkomstig van de nVWA en PRI vanuit eerdere monitoringsexperimenten laten zien dat meerdere *Phytophthora*-soorten tegelijkertijd met grote gevoeligheid gedetecteerd kunnen worden. De methode is derhalve goed inzetbaar voor diagnostische doeleinden.