

Flowcytometrie voor detectie en sortering van plantpathogenen

Jan van der Wolf, Jeroen Peters, Jan Bergervoet

Uitgangspunt

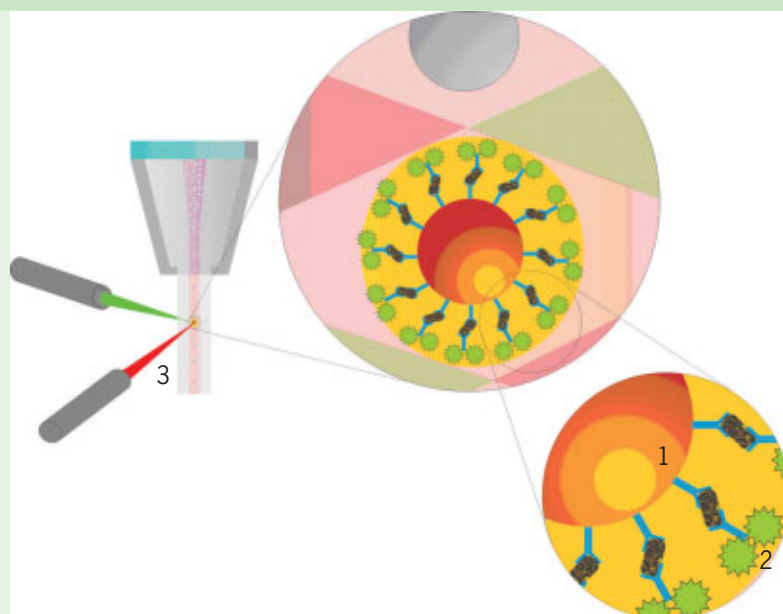
Voor flowcytometrische (FCM) detectie van plantpathogenen is gezocht naar methoden:

- die betrouwbaar, snel, kwantitatief en kosteneffectief zijn,
- die dode van levende organismen kunnen onderscheiden (vitaliteitskleuring),
- waarmee cellen en sporen gesorteerd kunnen worden voor validatie,
- waarbij meerdere pathogenen simultaan kunnen worden gedetecteerd (multiplex detectie).

Onderzoek

De volgende technieken werden geëvalueerd:

- FCM-analyse van bacteriën gekleurd met antistoffen, gemerkt met een fluorescent label (immuno-FCM).
- FCM-analyse van bacteriën en schimmelsporen na een vitaliteitskleuring met propidium jodide en SYTO9.
- Sortering van cellen na immuno-FCM.
- Multiplex detectie van virussen en bacteriën met behulp van de Luminex technologie.



Schematische weergave Luminex-detectie. 1. fluorescente beads voorzien van specifieke antistoffen reageren met bacterie- en/of virusantigenen in monstermateriaal, 2. secundaire antistoffen voorzien van Alexa532 reageren met gebonden antigenen, 3. beads worden geanalyseerd met een rode laser (beadadres) en groene laser (Alexa532).

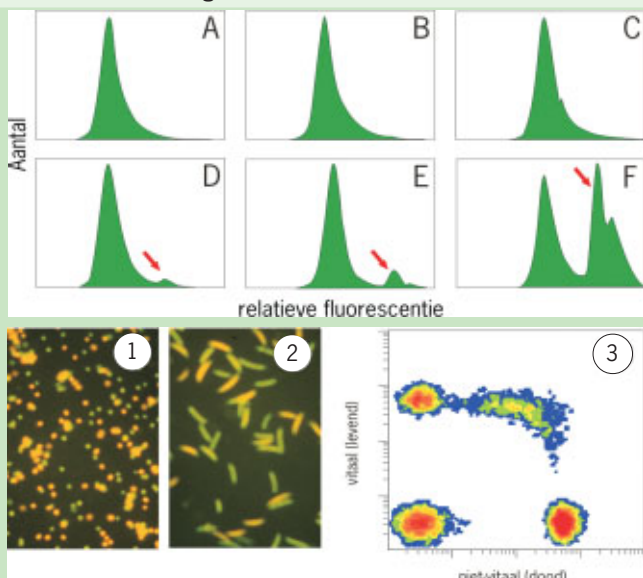
Resultaat

Effectieve flowcytometrische methoden voor:

- Immuno-FCM: detectielimiet van ca. $5 \cdot 10^4$ bacteriecellen per ml plantenextract, na een enkele filtratiestap.
- Vitaliteitskleuring: binnen 25 minuten kan de vitaliteit van cellen of sporen bepaald worden.
- Flow sorting: gesorteerde cellen kunnen gevalideerd worden door uitplaten of PCR.
- Luminex multiplex detectie: max. 100 pathogenen kunnen simultaan gedetecteerd worden; de gevoeligheid is vergelijkbaar met die van ELISA.

De praktijk

- FCM-analyse en -sortering kunnen worden gebruikt in onderzoek naar epidemiologie en beheersing van ziekten.
- De Luminex-technologie kan routinematig gebruikt worden voor snelle, kosteneffectieve en betrouwbare HTP-screening.



FCM-detectiedrempels voor *R. solanacearum* in schillextract. A) buffer, B) 10^2 , C) 10^3 , D) 10^4 , E) 10^5 en F) 10^6 cellen per ml (rode pijl is de *R. solanacearum*-populatie). Sporen van 1) *Botrytis cinerea* en 2) *Fusarium culmorum* na vitaliteitskleuring. Rood gekleurde sporen zijn niet-vitaal en de groen gekleurde sporen zijn vitaal. In densitogram 3 is de distributie van niet-vitale en vitale sporen van *Botrytis cinerea* weergegeven.

Contact: Jan van der Wolf
Plant Research International B.V.
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
T 0317 47 60 24 - F 0317 41 80 94
jan.vanderwolf@wur.nl
www.pri.wur.nl