

Kijken met je pipet: moderne methoden voor detectie van wortelknobbelaaltjes

Carolien Zijlstra & Richard van Hoof

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen. e-mail: carolien.zijlstra@wur.nl

Onder detectie wordt verstaan het vaststellen van de aanwezigheid van iets. Dit impliceert dat men weet waarnaar men op zoek is. Voor detectie van wortelknobbelaaltjes moet je specifieke kenmerken van dit aaltje kennen voordat je kunt gaan detecteren. Specifieke kenmerken van wortelknobbelaaltjesoorten kunnen morfologische of morfometrische kenmerken zijn die men via het oog herkent, maar ook biochemische of moleculaire eigenschappen die men via experimenten in het laboratorium kan aantonen. In min of meer chronologische volgorde wordt in dit artikel een overzicht gegeven van ontwikkelde moleculaire toetsen voor detectie van wortelknobbelaaltjes. Vervolgens worden de voordelen ervan belicht en worden criteria gegeven welke de keuze voor een bepaalde moleculaire detectietechniek kunnen bepalen.

Inleiding

De behoefte aan snelle, eenduidige technieken voor detectie van *Meloidogyne* soorten neemt toe. Dergelijke technieken zijn nodig voor het goed kunnen uitvoeren van onderzoek, resistentie-management, ontwerp van vruchtwisselingschema's en voor inspectie van geoogste gewassen en grondmonsters. Herkenning van *Meloidogyne* soorten op grond van morfologische kenmerken (Hart-

man & Sasser, 1985) vereist veel expertise en is vaak niet eenduidig als slechts enkele individuen aanwezig zijn. Vaak moeten meerdere ontwikkelingsstadia bekeken worden om een oordeel te kunnen vellen. Isozym-analyse is een toegankelijke methode om wortelknobbelaaltjesoorten te kunnen detecteren (Esbenshade & Triantaphyllou, 1990). Echter, voor duidelijke, betrouwbare resultaten kan de isozym-analyse uitsluitend worden uitgevoerd met wijfjes in een bepaald ontwikkelingsstadium. DNA technieken bieden aantrekkelijke oplossingen voor de problemen die met eiwittechnieken samenhangen: ze zijn relatief snel, zijn onafhankelijk van effecten van omgevingsfactoren en/of ontwikkelingsstadium op het aaltje en zijn erg betrouwbaar. Bovendien vereisen ze geen diepgaande nematologische expertise.

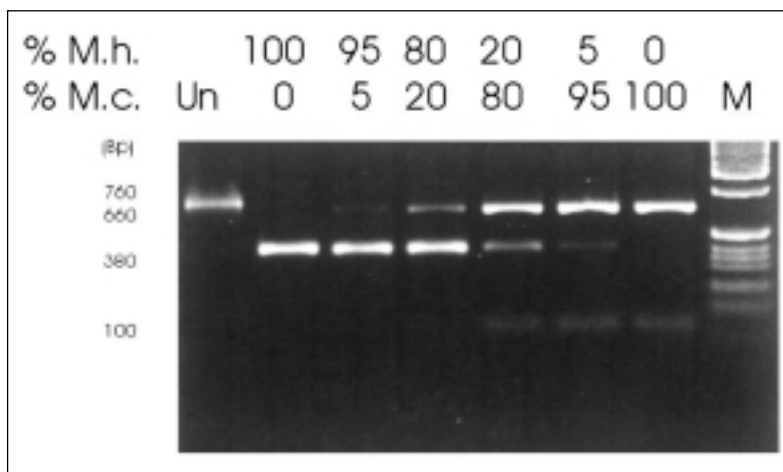
DNA methoden uit de beginperiode

De eerste DNA methoden voor detectie van *Meloidogyne* soorten maakten gebruik van restrictie fragment lengte polymorfismen (RFLPs) van totaal of mitochondriaal DNA (Cenis *et al.*, 1992, Curran & Webster, 1987, Hugal *et al.*, 1994, Powers *et al.*, 1986). Hoe betrouwbaar deze technieken ook zijn, ze vereisen microgrammen DNA afkomstig van tienduizenden nematoden. Minder nematoden zijn

nodig wanneer gekeken wordt naar repetitieve sequenties zoals satelliet DNA (satDNA) of ribosomaal DNA (rDNA). SatDNA bestaat uit repetitieve sequenties van ongeveer 100 tot 150 nucleotiden en is aanwezig in het genoom van bijna alle eukaryotische organismen. Per genoom komen ongeveer 103 tot 105 kopieën voor. Er zijn satDNA sequenties geïsoleerd van *M. hapla*, *M. chitwoodi* en *M. fallax* (Piotte *et al.*, 1994; Castagnone-Sereno *et al.*, 1999). Wanneer deze gebruikt worden als probe, dan hybridiseert de satDNA probe van *M. hapla* wel met *M. hapla* DNA en niet met DNA van *M. chitwoodi* of *M. fallax*. De satDNA probes van *M. chitwoodi* en *M. fallax* hybridiseren niet met DNA van *M. hapla* maar hybridiseren wel met DNA van *M. chitwoodi* en *M. fallax*, waarbij geen onderscheid gemaakt kan worden tussen deze twee soorten. In zogenaamde dot blot experimenten, waarbij nematodenmateriaal op een filter geplet wordt waarbij het zich erin bevindende DNA op het filter hecht, is aangetoond dat deze satDNA probes gebruikt kunnen worden om *M. hapla* op het nivo van één wijfje te onderscheiden van de soorten *M. chitwoodi* en *M. fallax*.

Met de introductie van de "polymerase chain reactie", beter bekend als PCR, konden detectietechnieken worden ontwikkeld die met veel minder uitgang-DNA konden worden uitgevoerd. PCR is een methode waarbij vele kopieën van een stuk DNA gegenereerd

ARTIKEL



Figuur 1. ITS-PCR-RFLP patronen verkregen door *Dra I* digestie van ITS-PCR producten van mengsels van *M. hapla* (M.h) en *M. chitwoodi* (M.c) waarmee de ratio waarin deze soorten in mengsels voorkomen geschat kan worden. De soortsaanstelling is boven de gel aangegeven. Un: niet gedigesteerd ITS-PCR product. Het tweede en het zevende laantje vertegenwoordigen de soortspecifieke *Dra I*-ITS patronen van *M. hapla*, respectievelijk *M. chitwoodi*. M: DNA-ladder.

kunnen worden. Door specifieke sequenties te vermeerderen en deze vervolgens te knippen met restrictie-enzymen, kunnen verschillende *Meloidogyne*-soorten onderscheiden worden. Vaak is de DNA-hoeveelheid van een enkel aaltje hiervoor al voldoende. Mitochondriaal DNA was daarvoor in eerste instantie een aantrekkelijk doelwit (Harris *et al.*, 1990, Powers & Harris, 1993).

rDNA methoden

rDNA heeft als voordeel dat het rijkelijk aanwezig is in het genoom. Het eukaryotische rDNA bestaat uit drie genen (18S, 5,8S en 28S). Daarnaast bestaan er nog interne "transcribed spacer" (ITS) regio's en "intergenic spacer" (IGS) regio's. Van dit genencluster zijn in ieder genoom vele kopieën aanwezig. Sommige regio's van rDNA vertonen veel overeenkomsten tussen soorten of zelfs geslachten (deze zijn conservatief) terwijl andere regio's juist veel verschillen vertonen tussen soorten. Door PCR-primers te gebruiken die op de conservatieve gebieden aanhechten kan in een DNA-monster

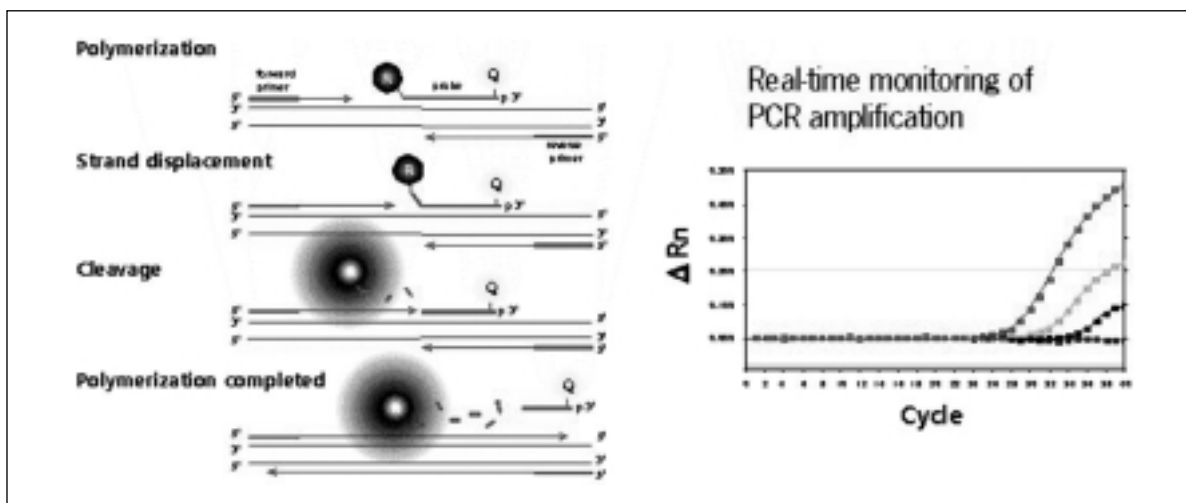
al snel aangetoond worden of het afkomstig is van één of meerdere geslachten aaltjes. ITS-PCR met DNA van het geslacht *Meloidogyne* levert bijvoorbeeld op gel een band op van ongeveer 770 nucleotiden, terwijl deze ITS-PCR met DNA van cystenaaltjes een veel grotere band geeft. Door PCR-primers te gebruiken die op meer variabele sequenties aanhechten kan meer inzicht verkregen worden op soortniveau.

De eerste rDNA PCR technieken om *Meloidogyne*-soorten aan te kunnen tonen betroffen RFLPs van interne "transcribed spacer" (ITS) regio's (Zijlstra *et al.*, 1995). Een aantrekkelijk aspect van deze ITS-PCR-RFLP methode is dat hij een schatting van de soortsaanstelling mogelijk maakt (Zijlstra *et al.*, 1997; Figuur 1). Restrictiepatronen van ITS-PCR producten van mengsels van *M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. fallax* en *M. incognita* detecteerden deze soorten wanneer hun aanwezigheid in het mengsel 5% of meer bedroeg. De verhouding van de intensiteiten van de banden van elk soortspecifiek restrictiepatroon correspondeerde met de verhouding waarin de soorten in het mengsel aanwezig waren. Een tijdsbesparende verbetering

van de ITS-PCR-RFLP methode is verkregen waarbij de soorten kunnen worden onderscheiden op grond van de grootte van hun geamplificeerde fragmenten die verkregen worden in één enkele PCR reactie zonder dat daar nog een digestiestap op hoeft te volgen (Zijlstra, 1997). Deze nieuwe methode is ontwikkeld door ITS-regio's van *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla* en *M. incognita* te kloneren en te sequencen waarna soortspecifieke "forward" PCR primers werden ontwikkeld. Door deze drie primers in een PCR reactie te combineren met een gemeenschappelijke "reverse" primer kunnen de *Meloidogyne* soorten gedetecteerd worden. Voor het onderscheid tussen *M. fallax* en *M. chitwoodi* is het wel wenselijk om referentie-amplicons van deze soorten op de gel mee te laten lopen aangezien hun fragmentlengtes (517 en 525 nt) niet erg van elkaar verschillen. Andere rDNA-PCR methoden om de soorten *M. hapla*, *M. chitwoodi* en *M. fallax* te onderscheiden zijn gericht op amplificatie van het IGS-gebied (Petersen *et al.*, 1997, Wishart *et al.*, 2002). Onlangs is ook een soortspecifieke ITS-PCR ontwikkeld voor de detectie van *M. naasi* (Zijlstra *et al.*, 2004). ITS-sequentiebepaling is vaak de eerste moleculaire biologische actie die men onderneemt om vast te stellen of een gevonden aaltje zich onderscheidt van al bekende soorten, zoals onlangs bij de beschrijving van de nieuw beschreven soort *Meloidogyne minor* ook gebeurd is (Karssen *et al.*, 2004).

SCARs

Ten einde een methode te ontwikkelen die *M. fallax* en *M. chitwoodi* in één PCR stap duidelijk onderscheidt zonder gebruik te hoeven maken van een referentie-amplicon op gel, zijn PCR-primer-sets ontwikkeld die soortspecifieke "randomly amplified polymorphic DNA" (RAPD) fragmenten amplifi-



Figuur 2. Het principe van TaqMan-PCR. Polymerization en Strand displacement: Een specifieke probe, waaraan een fluorofoor (R) en een “fluorescentiedimmer”(Q) gekoppeld zijn, bindt aan het doel-DNA. Ook de specifieke PCR-primers binden aan het doel-DNA en DNA-Taq-polymerase zorgt voor amplificatie van het doel-DNA. Cleavage: Tijdens de amplificatiestap bereikt het DNA-Taq-polymerase de gebonden specifieke probe, waarbij R losgekoppeld wordt van ‘dimmer’ Q en fluorescent wordt. Polymerization completed: DNA-Taq-polymerase gaat door met amplificatie, waarbij de probe wordt afgebroken. In de grafiek rechts wordt op de verticale as de mate van fluorescentie weergegeven en op de x-as het aantal uitgevoerde PCR-cycli.

ceren (Zijlstra, 2000). Nadat de sequenties bepaald waren van in lengte verschillende soortspecifieke RAPD-fragmenten van *M. hapla*, *M. chitwoodi* en *M. fallax* werden voor amplificatie van elk fragment paren van lange PCR primers ontworpen. Met de resulterende “sequence characterized amplified region” (SCAR) primer paren konden de drie soorten eenvoudig gedetecteerd worden. Op soortgelijke wijze zijn SCAR primer sets ontwikkeld voor de detectie van de warmteminnende *M. incognita*, *M. javanica* en *M. arena-ria* (Zijlstra *et al.*, 2000). Williamson *et al.* (1997) hebben deze benadering ook gebruikt om SCAR primers te ontwikkelen om *M. hapla* en *M. chitwoodi* aan te tonen. Hun *M. chitwoodi* SCAR-primer set bleek echter ook *M. fallax* aan te tonen. Soms kunnen meerdere SCAR-primer sets in één PCR reactie gebruikt worden maar dit gaat vaak ten koste van de gevoeligheid. Door nested PCR toe te passen kan de gevoeligheid vaak erg verbeterd worden, hoewel de kans op de vorming van ongewenste nevenproducten daarbij een negatief aspect is. Nested PCR is een PCR reactie waarbij het PCR product van een er

aan voorafgaande PCR reactie wordt gebruikt als template DNA en waarbij PCR primers worden gebruikt die binnen de uiteinden van de doelsequentie liggen.

Real-time PCR

Bij bovengenoemde PCR-assays was het steeds noodzakelijk om de verkregen DNA amplicons op een ethidiumbromide-bevattende agarosegel te runnen waarna ze onder UV licht gevisualiseerd konden worden. Deze stap kan worden weggelaten bij real-time PCR waarbij de mate van amplificatie tijdens de reactie gemeten wordt middels een fluorescentiemeter. Een vorm van real-time PCR is TaqMan (Figuur 2). Daarbij wordt een zogenaamde TaqMan-probe aan de PCR reactiemix toegevoegd, die door het afgeven van een fluorescerend signaal tijdens de PCR-reactie, detectie tijdens de amplificatie mogelijk maakt. Naast het tijdbesparende aspect is TaqMan gevoeliger en vaak ook specifiekier dan gewone PCR omdat naast specifieke PCR-primers ook nog een specifieke probe gebruikt

wordt. Tevens kan TaqMan gebruikt worden voor kwantitatieve detectie: hoe eerder fluorescentie gemeten wordt, hoe meer te detecteren DNA in de reactie aanwezig was. Voor real-time detectie van *M. chitwoodi* en *M. fallax* is onlangs een TaqMan ontwikkeld. Er zijn aanwijzingen dat deze toets dermate gevoelig en specifiek is dat hij het mogelijk maakt *M. chitwoodi* aan te tonen in aardappelschillen van symptomloze aardappelknollen. De betrouwbaarheid van deze toets wordt gewaarborgd doordat in de reactie een interne amplificatiecontrole wordt meegenomen. Indien geen signalen worden waargenomen van de interne controle kan worden geconcludeerd dat de testcondities niet geschikt waren voor PCR en de testresultaten niet vertrouwd kunnen worden. Dit sluit vals negatieve resultaten uit.

Multiplex detectie

Uit het voorgaande blijkt dat er diverse PCR-methoden zijn om één bepaalde *Meloidogyne*-soort te detecteren. Men spreekt van simplex

ARTIKEL

PCR wanneer met één soort wil aantonen, van multiplex PCR als meerdere soorten worden aange- toond. Voor simplex PCR wordt doorgaans één soortspecifieke pri- merset gebruikt. PCR waarbij meerdere primer-sets gebruikt worden, maakt het soms mogelijk meerdere soorten in een PCR aan te tonen. De eerder genoemde multiplex ITS-PCR maakt het mo- gelijk om in één PCR de soorten *M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. fallax* en de warmteminnende soorten aan te tonen. Ondanks het feit dat er voor *M. naasi* ook specifieke ITS-primers zijn ontwikkeld is het helaas niet mogelijk gebleken deze te integreren in bovengenoemde multiplex-PCR omdat in dat geval *M. naasi* niet meer wordt aange- toond (Zijlstra *et al.*, 2004). Naast de simplex SCAR-PCRs voor *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* en *M. arenaria* is er ook een multiplex SCAR-PCR ontwikkeld voor de eerste drie soorten, terwijl dit niet mogelijk bleek voor de laatste drie soorten. Over het algemeen wordt een PCR minder gevoelig naarma- te er meer primers worden ge- bruikt. Dit is ook duidelijk te zien bij de de multiplex SCAR-PCR voor *M. chitwoodi*, *M. fallax* en *M. hapla*. Detectie van deze soorten is ook gevoeliger wanneer men slechts twee ITS-primers gebruikt dan via multiplex ITS-PCR. De gevoeligheid in detectie bij de TaqMan voor *M. chitwoodi* en *M. fallax* lijkt niet achteruit te gaan wanneer beide soorten in een test worden aangetoond. In dat geval worden namelijk niet meer pri- mers gebruikt maar maakt men gebruik van meerdere probes die de gevoeligheid niet lijken te beïn- vloeden. Daar is de beschikbaar- heid van het aantal geschikte fluo- roforen voor de verschillende probes de limiterende factor voor het aantal te detecteren soorten. ITS-PCR-RFLP is ook een methode waarbij meerdere soorten aange- toond kunnen worden. Deze me- thode is relatief gevoelig omdat ook hier maar slechts twee primers ge-

bruikt worden, maar is wat om- slachtiger omdat de PCR gevolgd moet worden door digestiestappen.

Voordelen van moleculaire detectietechnieken

De kracht van moleculaire detec- tietechnieken ligt in het feit dat de uitkomst ervan voor slechts één uitleg vatbaar is. Waar herkenning op grond van morfologische ken- merken vaak lastig is of wordt beïnvloed door persoonlijke inter- pretatie, is een antwoord op grond van DNA-sequentie eenduidig. Aangezien de DNA-samenstelling in iedere cel van het te bestuderen organisme onder alle normale om- standigheden hetzelfde is maakt het voor moleculaire detectie niet uit welk ontwikkelingsstadium be- keken wordt. De uitslag zal het- zelfde zijn, of je nu naar een ei kijkt of naar een wijfje. Hierdoor zijn moleculaire detectietoetsen relatief snel. Daarnaast is bekend dat de reproduceerbaarheid van specifieke PCR experimenten groot is tussen en binnen labs. In een groot experiment binnen een EU project was de uitslag van SCAR-PCRs en rDNA-PCRs voor detectie van *M. chitwoodi*, *M. fal- lax* en *M. hapla* hetzelfde bij de verschillende deelnemende Euro- pese labs. De PCR-protocollen zijn zeer toegankelijk en eenvoudig aan te leren door geschoold perso- neel en vereisen niet de vaak in ve- le jaren opgebouwde nematologi- sche expertise die nodig is om op grond van morfologische en morf- ometrische analyses soorten vast te kunnen stellen. Het feit dat PCR het mogelijk maakt minuscule hoeveelheden DNA aan te tonen maken de beschreven PCR-tech- nieken ook buitengewoon gevoe- lig. Bijkomend voordeel is dat het voor veel moleculaire detectie- technieken niet nodig is om de ne- matoden te extraheren uit het sub- straat waarin ze zich bevinden. Zo lang men maar over specifieke se- quenties van het te detecteren aal-

tje beschikt kan men de aanwezig- heid daarvan aantonen in DNA af- komstig van geïnfecteerde grond, plantmateriaal, water, etc. Door het gebruik van de juiste PCR-pri- mer-sets is het ook zeer eenvoudig om aan te tonen welke wortel- knobbelaaltjesoorten zich bevin- den in een mengsel. Doordat grote hoeveelheden aaltjes in één keer bekeken kunnen worden komt hierbij met name de snelheid van de moleculaire detectietoetsen tot uiting. Voor onderzoeksdoelein- den is het vaak van cruciaal belang dat de nematodenpopulaties waarmee gewerkt wordt uit slechts één soort bestaan. Uitkomsten van virulentietoetsen kunnen mislei- dend zijn wanneer de getoetste populaties uit mengsels van aviru- lente en virulente aaltjes bestaan. Evenzeer zullen fingerprint-pat- ronnen van bijvoorbeeld RAPD-PCR of AFLP-technieken tot verkeerde gevolgtrekkingen leiden wanneer ze met DNA uitgevoerd worden af- komstig van mengpopulaties. Voor dergelijk onderzoek is het dus be- langrijk dat via DNA-technieken eenvoudig vastgesteld kan worden of een populatie geschikt is voor onderzoek of dat deze gecontami- neerd is met andere aaltjessoor- ten.

Criteria voor keuze van moleculaire detectietechniek

De keuze uit beschikbare technie- ken voor detectie van *Meloidogyne*-soorten is enorm. Welke techniek voor een bepaalde vraagstelling het meest geschikt is hangt af van een aantal factoren, zoals beschikbaarheid van het ty- pe materiaal. Bepalend daarbij is vaak hoe schoon het eruit verkre- gen DNA is en van hoeveel ver- schillende organismen het DNA afkomstig is. Een aaltjessuspensie van een schone kweek van wortel- knobbelaaltjes zal bijna uitslui- tend wortelknobbelaaltjes-DNA

Tabel 1. Overzicht van hoe de verschillende technieken zich tot elkaar verhouden ten aanzien van een aantal factoren. Verklaring tekens: <: minder dan, <<: veel minder dan, J2: juveniel aaltje, h: *M. hapla*, c: *M. chitwoodi*, f: *M. fallax*, w: warmteminnende *Meloidogyne* soorten, n: *M. naasi*, a: *M. arenaria*, j: *M. javanica*, i: *M. incognita*. Naarmate er meer plusjes staan is de test sneller, cq. specifiek.

Vergelijking van beschikbare moleculaire technieken voor de detectie van <i>Meloidogyne</i> -soorten	Detectiegrens simplex PCR	Soorten in simplex PCR	Soorten in multiplex PCR	Bepaling soortsratio	Snelheid test	Investeringskosten	Kwantificering mogelijk	Kans op vals-positieven	Specificiteit bij toepassing in grondmonsters
Methode:									
satDNA blot	1 wijfje	h, c/f	-	nee	+	laag	nee	laag	++
ITS-PCR op geslachtsnivo	< 1 J2	genus	genera	nee	++	matig	nee	laag	++
ITS-PCR-RFLP	< 1 J2	c, f, h, w	c, f, h, w	ja	+	matig	nee	laag	+
ITS-PCR (Zijlstra, 1997)	< 1 J2	c, f, h, w	c, f, h, w	ja	++	matig	nee	laag	+
ITS-PCR (Zijlstra et al., 2004)	< 1 J2	n	-	nvt	++	matig	nee	laag	+
IGS-PCR (Petersen et al., 1997)	< 1 J2	c, f	c, f	nee	++	matig	nee	laag	+
IGS-PCR (Wishart et al., 2002)	< 1 J2	c, f, h	c, f, h	nee	++	matig	nee	laag	+
SCAR-PCR (Zijlstra, 2000)	1 J2	c, f, h	c, f, h	nee	++	matig	nee	laag	+
Nested SCAR-PCR (Zijlstra, 2000)	<< 1 J2	c, f, h	c, f, h	nee	+	matig	nee	hoog	+
SCAR-PCR (Zijlstra et al., 2000)	1-5 J2	a, j, i	-	nee	++	matig	nee	laag	+
Nested SCAR-PCR (Zijlstra e.a., 2000)	<< 1 J2	a, j, i	-	nee	+	matig	nee	hoog	+
TaqMan (Zijlstra, in onderzoek)	< 1 J2	c, f	c, f	ja	+++	hoog	ja	laag	++

opleveren terwijl DNA geïsoleerd uit met wortelknobbelaaltjes besmette aardappelschillen voornamelijk aardappel-DNA zal bevatten met slechts een fractie wortelknobbelaaltjes-DNA. Voor de soortdeterminatie van de aaltjes-suspensie volstaat een eenvoudige PCR zoals de SCAR-PCR terwijl voor de soortdeterminatie van de wortelknobbelaaltjessoort in de aardappelschil een zeer gevoelige detectiemethode moet worden ingezet zoals TaqMan of nested PCR. DNA afkomstig van nematoden bevattende grondmonsters bevat vaak vele verschillende organismen waardoor de detectietechniek vooral specifiek moet zijn. Het komt wel eens voor dat experimenten met SCAR-PCR of rDNA PCR met dergelijke DNA-monsters meer fragmenten amplificeren dan die waar je naar op zoek bent. Soms kan dat de interpretatie van de resultaten bemoeilijken. TaqMan kan in een dergelijk geval een uitkomst zijn: naast specifieke primers is die reactie extra specifiek door het gebruik van een specifieke

ke probe. Soms bevat DNA afkomstig van lastige substraten zoals grond, oud plantmateriaal, verrotte wortels veel PCR-remmende stoffen. In een dergelijk geval is het zinvol om een extra gevoelige PCR-methode te gebruiken of, indien er voldoende wortelknobbelaaltjesmateriaal in aanwezig is een blotting-techniek. Diagnostische labs kunnen overwegen een combinatie van methoden in te zetten. Allereerst zou van een aaltjes-suspensie kunnen worden vastgesteld welke geslachten aaltjes er in aanwezig zijn door middel van een ITS-PCR op geslachtsniveau. Afhankelijk van die uitkomst kan vervolgens een keuze gemaakt worden welke soorten gedetecteerd gaan worden middels meer specifieke PCR-assays. De keuze van te gebruiken technieken hangt natuurlijk ook af van de apparatuur die men ter beschikking heeft. Voor een kwantitatieve TaqMan is een relatief duur apparaat nodig, terwijl voor een kwalitatieve TaqMan een eenvoudige PCR-machine en een fluores-

centimeter volstaan. PCR-machines zijn er in soorten en maten. Doorgaans worden ze in laboratoria gebruikt, maar sommige draagbare versies kunnen ook "on site" in het veld gebruikt worden. Indien men de behoefte heeft te kwantificeren zal men zich al gauw tot real-time PCR moeten wenden. Kwantificering van hoeveelheid geproduceerd PCR product op gel levert meestal geen betrouwbaar resultaat, evenmin als eindmetingen van fluorescentie van TaqMan. Voor het aantonen van meerdere *Meloidogyne*-soorten kan men gebruik maken van multiplex-PCR, ITS-PCR-RFLP of TaqMan. *M. chitwoodi*, *M. fallax* en *M. hapla* kunnen via ITS-PCR-RFLP, multiplex SCAR-PCR of multiplex ITS-PCR worden aangetoond. Men moet zich daarbij wel realiseren dat de gevoeligheid van multiplex-PCR lager is dan van simplex-PCR. Wanneer het nodig is te weten wat de verhoudingen zijn waarin *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla* en de warmteminnende soorten in mengsels voorkomen kan men het

ARTIKEL

beste een ITS-PCR-RFLP uitvoeren of multiplex ITS-PCR. De soorten *M. fallax* en *M. chitwoodi* kunnen eveneens samen worden aange- toond in een TaqMan. Dit is even- eens de snelste methode die mo- menteel beschikbaar is om deze soorten aan te tonen terwijl deze ook het meest geschikt is voor het testen van grote aantallen mon- sters. Deze TaqMan is derhalve ook een uitermate geschikte optie voor het snel, betrouwbaar en grootschalig toetsen van pootgoed

op de aanwezigheid van de quar- antaine-organismen *M. chitwoodi* en *M. fallax*. Tabel 1 geeft een be- knopt overzicht van hoe de ver- schillende technieken zich tot el- kaar verhouden ten aanzien van een aantal factoren.

Conclusie

De opmars van nieuwe moleculai- re technieken voor detectie van

Meloidogyne soorten laat zien dat ze vele voordelen bieden boven de conventionele methoden. Ze zijn betrouwbaar, gevoelig, relatief snel, gemakkelijk uitvoerbaar en vereisen geen uitgebreide nemato- logische expertise. De toepassings- mogelijkheden zijn zeer divers. Ze zullen bijdragen aan beter nema- tologisch onderzoek en bieden perspectief voor routinematige toepassingen in de praktijk.

Literatuurlijst op www.knpv.org

ARTIKEL

Lidmaatschap van de KNPV

Het lidmaatschap biedt u:

- Vrije deelname aan de gewasbeschermingsdagen
- Gratis abonnement op 'Gewasbescherming'
- Deelname aan de algemene ledenvergaderingen met stemrecht; statuten worden op verzoek toegezonden
- Mogelijkheid van een collectief abonnement (tegen gereduceerd tarief) op het European Journal of Plant Protection

Het lidmaatschap loopt van 1 januari tot en met 31 december. Bij tussentijdse toetreding is een evenredig ge- deelte van de contributie verschuldigd.

Opzeggen van het lidmaatschap dient voor 1 december schriftelijk te geschieden.

Aanmeldingen:

Mevr. M. Roseboom

Adm. Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging,

Postbus 31,

6700 AA Wageningen

E-mail: m.roseboom2@chello.nl

Het secretariaat van de KNPV is telefonisch bereikbaar op 0317-483654

Als nieuw lid ontvangt u als welkomstgeschenk de 'Lijst van Gewasbeschermingskundige Termen' (verkoop- prijs € 12,50). Na acceptatie door het bestuur volgt een acceptgiro



of copie

Ondergetekende meldt zich aan als:

	Nederland/België	Overige landen
<input type="checkbox"/> Gewoon lid van de KNPV	€ 25,-	€ 35,-
<input type="checkbox"/> Gewoon lid van de KNPV inclusief een abonnement op het EJPP	€ 146,-	€ 156,-
<input type="checkbox"/> Lid-donateur van de KNPV	€ 65,-	

Naam : _____

Straat : _____

Postcode : _____ Plaats : _____

Land : _____

Datum : _____ Handtekening : _____