

# Moleculair biologische technieken bij de Plantenziektenkundige Dienst

L.F.F. (Linda) Kox & J.W. (Annelien) Roenhorst

Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen, e-mail: l.f.f.kox@minlnv.nl

**De diagnostiek van plantenziekten en -plagen heeft met het gebruik van moleculair biologische technieken de laatste jaren grote vooruitgang geboekt. Voor veel plantpathogenen en -aantasters zijn detectie- en identificatiemethoden ontwikkeld die gebaseerd zijn op deze technieken. Moleculair biologische technieken zijn over het algemeen snel, gevoelig en specifiek en bieden daardoor een alternatief voor de conventionele methoden of leveren een waardevolle aanvulling. Dit artikel laat aan de hand van een aantal voorbeelden uit de dagelijkse praktijk zien hoe moleculair biologische technieken een belangrijke bijdrage leveren aan de kwaliteit van de diagnoses en toetsingen op de Plantenziektenkundige Dienst (PD).**

## Inleiding

Om effectieve maatregelen te kunnen nemen ter bestrijding van plantenziekten en -plagen is een accurate diagnose essentieel. Conventionele methoden om plantpathogenen en -aantasters te identificeren zijn o.a. visuele beoordeling van de aangetaste plant, isolatie en kweek van de organismen, morfologische analyse en biochemische testen, zoals serologische bepalingen of vetzuuranalyse. Daarnaast wordt er in toenemende mate gebruik gemaakt van moleculair biologische technieken.

Moleculair biologische technieken zijn van groot belang voor de detectie en identificatie van:

- organismen die niet of lastig *in vitro* te vermeerderen zijn, zoals virussen en fytoplasma's;
- organismen waarbij conventionele methoden arbeidsintensief zijn, waardoor routinematige toepassing niet mogelijk is;
- organismen waarvan sommige levensstadia niet of moeilijk te

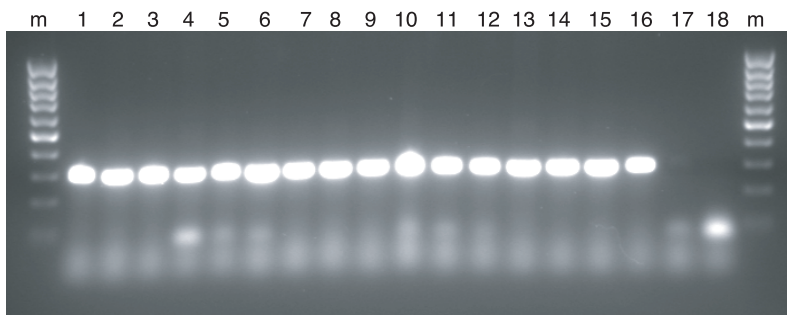
identificeren zijn, zoals larven en poppen van insecten en niet-sporulerende of niet-kweekbare schimmels;

- organismen waarbij de diagnose onacceptabel veel tijd kost vanwege langdurige kweken of bio-toetsen;
- organismen die in zeer lage concentraties voorkomen of moeilijk te isoleren zijn;
- organismen die met conventionele methoden niet of lastig te onderscheiden zijn van verwante organismen.

## Technieken

Diagnostische testen die gebaseerd zijn op moleculair biologische technieken grijpen aan op of maken gebruik van het erfelijke materiaal (genoom) van een organisme, het nucleïnezuur (DNA of RNA). Elk organisme heeft een uniek genoom dat bepaald wordt door de volgorde van de bouwstenen van het nucleïnezuur, de nucleotiden.

De meest gebruikte moleculair biologische techniek is de polymerase ketting reactie (polymerase chain reaction, PCR). Met deze techniek wordt een deel van het genoom enzymatisch vermeerderd in herhaalde cycli van DNA-synthese, waarbij tijdens elke cyclus hetzelfde stukje DNA verdubbeld wordt (fig. 1). Welk stuk van het genoom vermeerderd wordt, wordt bepaald door de samenstelling (nucleotidenvolgorde) van de primers. Dit zijn kleine stukjes synthetisch DNA, oligonucleotiden, die het enzym nodig heeft om de DNA-synthese te starten. Primers kunnen zodanig gekozen worden dat ze uniek (soort-specifiek) of juist generiek (groep-specifiek) zijn. Na dertig cycli, uitvoerbaar binnen twee tot drie uur, zijn meer dan een miljard DNA-moleculen (PCR-producten) in het reactiemengsel aanwezig. Deze kunnen worden aangetoond door middel van agarose gel elektroforese, waarbij de PCR-producten gescheiden worden op grond van hun fysische eigenschappen (fig. 2). Indien nodig kan een verdere analyse van PCR-producten uitgevoerd worden door middel van 'sequencing' (bepalen van de nucleotidenvolgorde), 'restriction fragment length polymorfism (RFLP) analysis', of hybridisatie met een gelabelde 'probe'. Hybridisaties kunnen overigens ook uitgevoerd worden met nucleïnezuur dat niet vermeerderd is door PCR. Het is mogelijk om de detectie van PCR-producten gelijktijdig met de PCR uit te voeren in een zoge-



Figuur 1. Scheiding van PCR producten op agarose gel. PCR *R. solanacearum* (Seal et al., 1993). Laan m, molecuulgewichtsmarker; 1 t/m 16, monsters; laan 16, positieve controle; laan 17 en 18, negatieve controles.

noemde real-time PCR. Hierbij wordt het PCR-product al tijdens de PCR aangetoond door middel van aspecifieke inbouw van een fluorescerende stof (SYBR Green) of door middel van hybridisatie met een fluorescerende probe. Dit gel-vrije systeem verkort de analysetijd aanzienlijk. Real-time PCR maakt het daarom mogelijk om grote aantallen monsters in korte tijd te toetsen. Het gebruik van real-time PCR voor diagnostiek staat echter nog in de kinderschoenen, waarbij het bemonsteren van de planten, het vermalen van het plantmateriaal en de nucleïnezuur-isolatie vooral nog de belangrijkste hindernissen zijn voor grootschalige, routinematige toepassing.

## Validatie

Voor veel plantpathogenen en -aantasters zijn inmiddels moleculair biologische detectie- en identificatiemethoden ontwikkeld. Voordat een ontwikkelde moleculaire toets echter routinematig kan worden toegepast, moet deze (net als iedere andere toets) gevalideerd worden op de relevante technische aspecten. Hierbij spelen de volgende factoren een rol:

- het doel van de toets: routinematige toetsing of eenmalige diagnose?
- specificiteit: worden alle varianten van het target organisme

aangetoond; treden kruisreacties op?

- gevoeligheid: hoeveel organismen, cellen, moleculen nucleïnezuur, kunnen aangetoond worden?
- herhaalbaarheid: geeft de toets bij herhaling hetzelfde resultaat?

Niet alle aspecten zijn voor elke toets even belangrijk: specificiteit is bijvoorbeeld een belangrijk aspect voor een moleculaire toets die gebruikt wordt voor de identificatie van een insect, maar gevoeligheid is nauwelijks aan de orde.

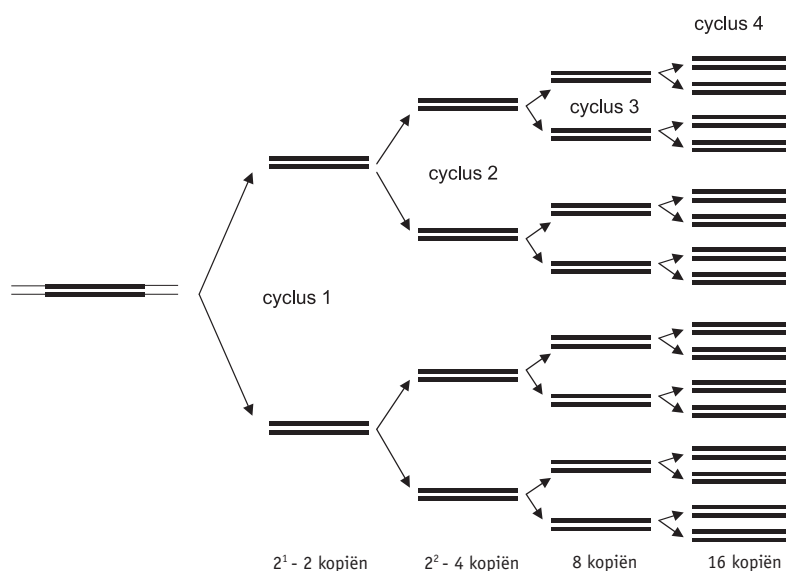
Naast de validatie van de toetskenmerken zal een nieuwe toets voor routinematig gebruik ook met praktijkmonsters gevalideerd moeten worden. Dit gebeurt door vergelijking met de resultaten die

verkregen zijn met de conventionele toets, de zogenaamde 'gouden standaard'. De PD beschikt over referentiecollecties om te kunnen valideren, maar ook over de expertise (mensen en methoden) om deze vergelijking met conventionele methoden te kunnen uitvoeren.

Geen enkele te valideren toets zal dezelfde resultaten geven als de gouden standaard: er zullen altijd discrepanties zijn. De discrepantieanalyse kan erg lastig zijn omdat moeilijk te beoordelen is welke toets 'faalt'. Als een moleculaire toets, zoals PCR gevoeliger is dan de gouden standaard, zullen er veel zogenaamde vals-positieve PCR-resultaten gevonden worden, terwijl dit eigenlijk vals-negatieve resultaten zijn van de gouden standaard. Om de discrepanties goed te kunnen analyseren is de aanwezige kennis van het organisme, het shadebeeld en de technische expertise binnen de PD van groot belang.

## Toepassingen

Op dit moment kunnen op de PD circa dertig organismen gedetecteerd en/of geïdentificeerd worden



Figuur 2. Schematische weergave van de verdubbeling van een DNA fragment. Na  $n$  cycli zijn  $2^n$  kopieën van het DNA fragment gemaakt.

met behulp van een gevalideerde PCR-methode. Voor de verschillende typen van organismen die op de PD gedetecteerd en/of geïdentificeerd worden volgt hieronder een aantal voorbeelden die laten zien hoe moleculaire technieken, met name PCR, bijdragen aan de kwaliteit van diagnoses en toetsingen.

## Virussen en viroïden

Tomatengeelkrulbladvirus (*Tomato yellow curl virus*; TYLCV) wordt de laatste jaren steeds vaker gevonden in tomaat in het gebied rond de Middellandse Zee. Dit virus, dat door de tabakswittevlieg (*Bemisia tabaci*) wordt overgebracht, behoort tot het geslacht *Begomovirus*, familie *Geminiviridae*. Het virus is niet mechanisch overdraagbaar op toetsplanten. Ook zijn geen goede serologische toetsen beschikbaar. Het virus is moeilijk te zuiveren, waardoor de productie van een antiserum problematisch is. De door Wyatt and Brown (1996) beschreven PCR-methode voor de detectie van begomovirussen bleek echter geschikt voor het detecteren van onder andere TYLCV. Door sequencing van het PCR-product en vergelijking van de sequentie met sequenties in databanken, kan het betreffende isolaat vervolgens worden geïdentificeerd.

Het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*; PSTVd) staat op de quarantainelijst van de EU. In de EU is het viroïde nog niet gevestigd. Vanwege recente vondsten in de EU (in tomaat) en de vermoedelijke aanwezigheid in kandidaat-lidstaten bestaat er een reële kans dat dit viroïde al in de EU voorkomt of zal worden geïntroduceerd. Om te weten of PSTVd reeds in de EU voorkomt, zijn surveys nodig waarbij grote aantallen monsters moeten worden getoetst op de aanwezigheid van dit viroïde.

Hiervoor is dan ook een toetsmethode nodig die op grote schaal kan worden uitgevoerd op zowel planten als knollen.

PSTVd is een viroïde bestaande uit een klein circulair enkelstrengs RNA-molecuul dat voor vermeerdering afhankelijk is van de gastheer. De afwezigheid van een eiwitmantel maakt dat viroïden niet gedetecteerd kunnen worden met serologische methoden zoals ELISA. Viroïden moeten dus aangetoond worden op RNA-niveau.

Grootschalige toetsing op RNA-niveau is mogelijk met een real-time PCR-methode die is ontwikkeld door onderzoekers van het Central Science Laboratory (CSL), York, Verenigd Koninkrijk (Boonham *et al.*, 2004). In samenwerking met zowel CSL als de NAK in Emmeloord is deze toets geschikt gemaakt voor grootschalige toetsing van bladmateriaal (Kox *et al.*, 2003; Roenhorst *et al.*, 2004). Momenteel wordt gewerkt aan de directe toetsing van knollen.

## Bacteriën

Bruinrot van aardappelen wordt veroorzaakt door de bacterie *Ralstonia solanacearum*. In het kader van de beheersmaatregelen wordt pootgoed integraal getoetst op de aanwezigheid van deze bacterie. De aardappels worden in monsters van 200 knollen per 25 ton aardappelen gescreend met behulp van de immunofluorescentie techniek (IF). Bij deze techniek worden preparaten van deze monsters met een fluorescerend antilichaam geïncubeerd dat aan de bacterie hecht. Als deze preparaten vervolgens onder een fluorescentie microscoop bekeken worden, lichten ze op wanneer de bacterie aanwezig is. De gebruikte antilichamen zijn echter niet specifiek genoeg, waardoor kruisreactie op kan treden met andere bacteriesoorten. Daarom moeten monsters met een positieve IF-

uitslag altijd nader onderzocht worden met een andere techniek. Eén van de gebruikte technieken is 'fluorescent *in situ* hybridisation' (FISH) (Wullings *et al.*, 1998), een techniek op waarbij een specifieke fluorescerende probe hecht aan het nucleïnezuur van de bacterie. De gevoeligheid van deze techniek is vergelijkbaar met die van IF. Daarnaast wordt ook PCR (Seal *et al.*, 1993) gebruikt. Hoewel deze methode gevoeliger en specifiek is dan IF, is PCR in deze vorm niet geschikt voor routinematige toepassing en biedt dan ook geen alternatief. Op dit moment onderzoeken we de geschiktheid van een real-time PCR-methode voor de routinematige screening op de aanwezigheid van bruinrot (Weller *et al.*, 2000). De toets is inmiddels gevalideerd op specificiteit en gevoeligheid, en blijkt op beide aspecten beter te scoren dan IF en conventionele PCR. Real-time PCR lijkt dan ook potentieel geschikt om grootschalig, snel, gevoelig, specifiek en betrouwbaar te toetsen op bruinrot, zodat de bevestiging met aanvullende technieken overbodig wordt.

## Schimmels

*Phytophthora ramorum* is een schimmel die in de VS massale eikensterfte ('sudden oak death') veroorzaakt en in Europa (Nederland en Duitsland) *Rhododendron* en *Viburnum* aantast. Omdat deze schimmel een bedreiging vormt voor het openbaar groen is het belangrijk om inzicht te krijgen in het voorkomen en de mate van verspreiding in Nederland. Daarom zijn vanaf augustus 2001 in de boomkwekerij en groene ruimte surveys uitgevoerd. Aanvankelijk werd *P. ramorum* geïdentificeerd door middel van microscopisch onderzoek op morfologische structuren van gekweekt materiaal. De schimmel is echter lastig kweekbaar uit plantmateriaal. Het slagen van een kweek is onder

meer afhankelijk van de omgevingscondities op de plaats waar het monster is genomen, de conditie van de plant en de aanwezigheid van andere organismen in het plantmateriaal. Met PCR is het echter mogelijk gebleken om niet-kweekbare organismen aan te tonen en te identificeren. PCR is bovendien sneller. De toets kost slechts één dag, terwijl de kweek vijf tot tien dagen duurt.

Omdat PCR vele voordelen biedt boven de kweek, werd besloten om een praktijkvalidatie van de door Matteo Garbelotto ontwikkelde PCR uit te voeren (Kox *et al.*, 2002b). Hierbij werden PCR en morfologische identificatie van gekweekt materiaal uitgevoerd aan 129 planten met symptomen van een infectie met *P. ramorum*. De monsters bestonden uit *Rhododendron* spp. (93), *Viburnum* spp. (23), *Quercus* spp. (6), *Aesculus* sp. (2), *Buxus* sp. (1), *Castanea sativa* (1), *Larix* sp. (1), *Sambucus* sp. (1), en *Vaccinium* sp. (1). De monsters van *Aesculus*, *Buxus*, *Castanea*, *Quercus*, *Larix* en *Sambucus* werden genomen van struiken of bomen in de buurt van zieke *Rhododendron* planten. Het plantmateriaal werd in kleine stukjes gesneden en willekeurig verdeeld voor kweek en PCR. Voor 54 monsters waren zowel kweek als PCR positief, en voor 51 monsters (inclusief die van *Aesculus*, *Buxus*, *Castanea*, *Larix*, *Sambucus*, *Quercus*, en *Vaccinium*) gaven beide methoden een negatieve uitslag. Dit resulteert in een overeenkomst van 81 % tussen beide methoden. (105/129). Zoals in tabel 1 te zien is, bleek de PCR 19 positieven meer op te sporen dan de kweekmethode (95 versus 75%). Voor tien van deze monsters kan de discrepantie verklaard worden doordat er andere schimmels in het materiaal aanwezig waren. Kweek is namelijk niet selectief, waardoor andere schimmels kunnen concurreren met *P. ramorum*. Het andere deel van deze PCR-positieven, maar kweek-negatie-

Tabel 1. Vergelijking van resultaten van PCR en morfologische identificatie van gekweekt materiaal uitgevoerd aan 129 planten met symptomen van een infectie met *P. ramorum*.

	Kweek-positief	Kweek-negatief
negatief		
PCR-positief	54	19
PCR-negatief	4	51

ven, is te verklaren door de slechte staat van het plantmateriaal, waardoor de schimmel niet levensvatbaar en dus niet kweekbaar meer was. In één van deze gevallen werden zelfs sporangia waargenomen.

De PCR voor *P. ramorum* wordt al enige tijd als screeningsmethode gebruikt. Negatieve monsters worden niet verder getoetst, terwijl monsters die positief zijn, worden uitgekweekt voor verdere analyse. Hierbij wordt bijvoorbeeld het 'mating type' vastgesteld, hoewel daar nu ook een op PCR gebaseerde methode voor ontwikkeld is, waarbij mating type gecorrigeerd is aan genotype (Kroon *et al.*, 2004). In het najaar van 2003 werd *P. ramorum* voor het eerst op een Amerikaanse eik (*Quercus rubra*) aangetoond met PCR. De kweek van dit monster was echter negatief. Herhalingsmonsters van deze eik bleken positief met PCR en nu ook met kweek. Dit voorbeeld laat nogmaals zien dat moleculair biologische technieken veel gevoeliger zijn dan de kweekmethoden. Met uitsluitend kweken zou de aanwezigheid van *P. ramorum* op eik over het hoofd gezien zijn.

Sinds een half jaar heeft de PD de conventionele PCR vervangen door een real-time PCR (Ivors & Garbelotto, 2003), waardoor de analysetijd nog aanzienlijk verder verkort is.

Black spot disease wordt veroorzaakt door de quarantaineschimmel *Guignardia citricarpa*. In de afgelopen jaren is de ziekte regelmatig aangetroffen in zendingen citrusvruchten uit landen van het zuidelijk halfrond. Zendingen met

verdachte symptomen worden vastgelegd, waarbij een monster wordt genomen voor diagnostisch onderzoek. Soms kan de diagnose onmiddellijk worden gesteld omdat er complete vruchtlichamen van de schimmels zichtbaar zijn in de aangetaste plekken op de schil. In andere gevallen moest tot voor kort op last van de EU een vijfdaagse incubatietoest worden uitgevoerd. Inmiddels blijkt een PCR-toets (Bonants *et al.*, 2003) die in één dag uitgevoerd kan worden een uitstekend alternatief voor de incubatietoets te bieden. Kwaliteitsverlies van citrusvruchten als gevolg van langdurig vastleggen van zendingen kan dankzij deze PCR worden geminimaliseerd.

*Monilinia fructicola* (een quarantainepathogeen in de EU), *M. fructigena* (een quarantainepathogeen in de VS en Australië) en *Monilinia laxa* zijn allen pathogenen van steen- en pitvruchten. Rotte plekken en/of schimmelpluis worden uitgekweekt, zodat de schimmel vervolgens kan worden geïdentificeerd op grond van morfologische en fysiologische (groei)karakteristieken. Er is echter overlap tussen de hierbij gehanteerde criteria, waardoor deze klassieke methode niet geschikt is voor een betrouwbare identificatie op soortsniveau. Door gebruik van drie primersets die specifiek zijn voor elk van de drie soorten (Ioos and Frey, 2000) kan een betrouwbare identificatie uitgevoerd worden. In een survey waarbij 114 vruchtmonsters met verdenking van *Monilinia* besmetting werden getoetst met de conventionele methode en met PCR bleken er negen (8%) overwoekerd met andere schimmels, voor der-

Tabel 2. Kolonie diameter van drie *Monilinia* spp. op PDA na 3 en 5 dagen incubatie bij 22 °C in het donker

<i>Monilinia</i> species	Koloniediameter in mm (spreiding)	
	3 dagen	5 dagen
fructicola (n = 14)	40,5 (33-51)	62,7 (45-75)
fructigena (n = 11)	22,7 (17-30)	34,2 (28-46)
laxa (n = 14)	16,0 (10-26)	23,4 (14-40)

tien monsters (11%) bleek de groeidiameter tussen *M.fructigena* en *M.laxa* niet discriminerend. Eén had de diameter voor *M. laxa* (16 mm), met PCR werd echter aangetoond dat het *M. fructigena* was. Bij vijftien monsters bleken er twee soorten aanwezig te zijn, waarbij de tweede species alleen met PCR aangetoond werd als gevolg van overgroei van de langzame door de snelle soort.

Bovenstaande voorbeelden laten zien dat de PCR een snelle, gevoelige, specifieke en betrouwbare methode is voor de identificatie van de betreffende schimmels.

## Nematoden

Verpakkingshout wordt op de PD onderzocht op de aanwezigheid van het dennehoutaaltje (*Bursaphelenchus xylophilus*). Daarnaast wordt er ieder jaar een survey uitgevoerd om de eventuele aanwezigheid van deze nematoden in Nederland te bepalen (tot op heden nog afwezig). Het dennehoutaaltje kan veel schade veroorzaken in dennenbossen, waarbij geïnfecteerde bomen binnen enkele maanden afsterven. Het aaltje heeft dan ook een quarantainestatus in de EU.

Het dennehoutaaltje lijkt erg veel op de niet-pathogene, maar ook op dennenhout voorkomende, *B. mucronatus*. Deze onderscheidt zich van *B. xylophilus* door o.a. de aanwezigheid van een scherpe puntige structuur (mucron) op de staart. Deze is echter niet altijd aanwezig, waardoor de afwezigheid van een mucron dus geen

100% zekerheid geeft dat het *B. xylophilus* is. Daarom wordt een morfologische identificatie van *B. xylophilus* altijd bevestigd met een PCR-methode (Hoyer *et al.*, 1998).

De in Nederland gevestigde quarantainenematoden *Meloidogyne chitwoodi* (maïswortelknobbelaaltje) en *M. fallax* (bedrieglijk maïswortelknobbelaaltje) kunnen grote problemen geven doordat veel gewassen, waaronder aardappel, vatbaar zijn voor deze aaltjes. Omdat het onderscheid tussen deze organismen op morfologische kenmerken erg lastig is, dient de identificatie bevestigd te worden door een isozymanalyse of PCR-methode. De isozymanalyse wordt al een aantal jaren uitgevoerd op de PD (Karssen *et al.*, 1995, van der Beek & Karssen, 1997). Nadeel van deze methode is echter dat deze alleen op vrouwtjes toegepast kan worden. Daarom verdient een moleculair biologische methode die op alle levensstadia toegepast kan worden de voorkeur. Recent is een PCR-methode voor identificatie van *Meloidogyne* soorten op de PD geïmplementeerd (Zijlstra *et al.*, 1995, 1997, 2000). Daar grootschalige toepassing van deze PCR gewent is op de PD, is een real-time protocol ontwikkeld (Zijlstra, 2004). Dit protocol zou tevens op symptoomloze aardappelen toegepast kunnen worden, hetgeen op grote schaal niet mogelijk is met de huidige incubatiemethode.

Tenslotte zijn voor de beschrijving van nieuwe soorten tegenwoordig sequentiegegevens vereist. Een voorbeeld hiervan is de recent beschreven *Meloidogyne minor*

(Karssen *et al.*, 2004), waarvoor de relevante sequentie-informatie is aangeleverd.

## Insecten

Net als bij nematoden kan de morfologische identificatie van insecten lastig zijn omdat de uiterlijke kenmerken van een soort variabel zijn of juist overlappen met die van een andere soort. Bevestiging van de identiteit door middel van een moleculaire toets is dan gewenst. Daarnaast is het een groot probleem dat er voor vele insecten geen adequate sleutels zijn voor de identificatie van onvolwassen stadia (eieren, larven, poppen) waardoor een identificatie alleen op volwassen insecten uitgevoerd kan worden.

Onder de mineervliegen is een aantal soorten bekend dat grote economische schade kan veroorzaken. De belangrijkste hiervan behoren tot het geslacht *Liriomyza*. De larven van *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. trifolii* en *L. sativae* vormen een bedreiging voor vele gewassen omdat ze aanzienlijke schade kunnen aanrichten. De laatste drie staan op de quarantainelijst van EU. Hun economische belang wordt niet alleen veroorzaakt door het feit dat ze zeer polyfaag zijn (een groot aantal gewassen kunnen aantasten), maar ook doordat ze resistent zijn voor verschillende insecticiden. *L. bryoniae*, *L. huidobrensis* en *L. trifolii* komen al voor in Europa. *L. sativae* komt tot op heden nog niet voor, maar wordt regelmatig aangetroffen in importzendingen. Het is belangrijk om de quarantainesoorten te onderscheiden van de soorten zonder quarantainestatus. Daarnaast is identificatie ook van groot belang voor een juiste bestrijdingswijze.

De hierboven genoemde mineervliegsoorten kunnen met zekerheid van elkaar onderscheiden

worden op grond microscopisch onderzoek van het mannelijk geslacht. Het uitprepareren is echter zeer arbeidsintensief. Vrouwjes, larven en poppen kunnen alleen op groepsniveau geïdentificeerd worden (*L. bryoniae* en *L. huidobrensis* versus *L. sativae* en *L. trifolii*). Moleculair biologische technieken maken het mogelijk om organismen onafhankelijk van het levensstadium te identificeren. Op de PD is een op PCR gebaseerde toets ontwikkeld voor de identificatie van bovengenoemde mineervliegen (Kox *et al.*, 2002a). Deze is toepasbaar op larven, poppen en vliegen. De PCR-methode werd gevalideerd met een vijftigtal mineervliegen, waarbij de identificatie met de moleculair biologische toets voor alle individuen gelijk was aan die van morfologische identificatie en/of isozymanalyse (Kox *et al.*, 2004).

## Tot slot

Bovenstaande voorbeelden maken duidelijk dat de moleculair biologische technieken hun plaats hebben gevonden tussen de overige diagnostische methoden op de PD. De redenen om deze technieken toe te passen kunnen, zoals in dit artikel is beschreven, zeer divers zijn. Moleculair biologische methoden zijn universeel: zij kunnen op elk type organisme in elk stadium worden uitgevoerd. Dit wil echter niet zeggen dat de kennis en expertise over de diagnostiek, biologie en fysiologie van de organismen die opgebouwd werden gedurende meer dan honderd jaar, overbodig geworden zijn. Voor het stellen van een diagnose is het juist de combinatie van kennis over de organismen, de schadebeelden en de expertise in conventionele en moleculaire methoden die de PD een meerwaarde verschaffen. Kennis en expertise die er bovendien voor zorgen dat de PD nationaal en internationaal erkenning geniet als plantenziekten-

kundig kennisinstituut.

## Literatuur

- Bonants, P.J.M., Carroll, G.C., de Weerd, M., van Brouwershaven I.R. & Baayen R.P., 2003. Development and Validation of a Fast PCR-Based Detection Method for Pathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa* European Journal of Plant Pathology **109**: 503-513
- Boonham, N., González Pérez, L., Mendez, M.S., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. & Mumford, R.A., 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Journal of Virological Methods **116**: 139-146.
- Hoyer U., Burgermeister W, and Braasch H., 1998. Identification of *Bursaphelenchus* species (nematoda, aphelenchoidea) on the basis of amplified ribosomal DNA. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz. **50**:273-277
- Ioos, R. and Frey, P., 2000. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola* and application to species identification by PCR. European Journal of Plant Pathology. **106**: 373-378.
- Ivors, K. & Garbelotto, M., 2003. TaqMan PCR for detection of *Phytophthora* DNA in environmental plant samples. Proceedings Sudden Oak Death Science Symposium, 17-18 Dec 2003, Monterey, California, USA, p 56
- Karssen, G., Van Hoenselaar, T., Verkerk-Bakker, B. & Janssen, R. (1995) Species identification of cyst and root-knot nematodes from potato by electrophoresis of individual females. Electrophoresis **16**: 105-109.
- Karssen, G., Bolk R.J., van Aelst A.C., van den Beld, I., Kox, L.F.F., Korthals, G., Molendijk, L., Zijlstra, C., van Hoof, R. & Cook, R., 2004. Description of *Meloidogyne minor* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode associated with yellow patch disease in golf courses. Nematology. In press.
- Kox, L.F.F., de Goffau, L.J.W., & Aukema B., 2002a. Moleculair biologische identificatie van economisch belangrijke mineervliegen. Gewasbescherming **33**: 56
- Kox, L., de Gruyter, H., Garbelotto, M., van Brouwershaven, I., Admiraal, J. & Baayen, R., 2002b. Validation of a PCR method for detection and identification of *Phytophthora ramorum*. Proceedings Sudden Oak Death Science Symposium, 17-18 Dec 2002, Monterey, California, USA, p 57-58
- Kox, L., Jansen, C., Willemen, D. & Roenhorst, A., 2003. Snelle en betrouwbare methode voor de detectie van het aardappel-spindelknolviroïde. Gewasbescherming **34**: 63
- Kox, L.F.F., van den Beld, H.E., Lindhout, B.I. & de Goffau, L.J.W., 2004. Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP.
- Kroon, L. P. N. M., Els C. P. Verstappen, E.C.P., Kox, L.F.F., Flier, W.G. & Bonants, P.J. M., 2004. A rapid diagnostic test to distinguish between American and European populations of *Phytophthora ramorum*. Phytopathology. In press.
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F. de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. & Mumford R.A. 2004. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for *Potato spindle tuber viroid*. EPPO conference on Quality of Diagnosis and New Diagnostic Methods for Plant Pests, Noordwijkerhout, 19-20 April 2004
- Seal, S.E., Jackson, L.A., Young, J.P.W. & Daniels, M.J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. Journal of General Microbiology **139**: 1587-1594
- Van Leeuwen, G.C.M. & Van Kesteren, H.A., 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. Canadian Journal of Botany **76**: 2042-2050
- Van der Beek, J.G. & Karssen, G., 1997. Interspecific hybridization of meiotic parthenogenetic *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. Phytopathology **87**: 1061-1066
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith N.C., Boonham N. & Stead D.E., 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Applied and Environmental Microbiology **66**: 2853-8
- Wullings, B.A., Van Beuningen, A.R., Janse J.D., Akkermans A.D. 1995. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. Applied and Environmental Microbiology **64**: 4546-54
- Wyatt, S.D. & Brown, J.K., 1996. Detection of subgroup III Genimivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology **86**:1288-1293
- Zijlstra, C., Lever, A.E.M., Uenk, B.J. & Van Silfhout, C.H., 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology **85**: 1231-1237
- Zijlstra, C., Uenk, B.J. & Van Silfhout, C.H., 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. Fundamental and Applied Nematology **20**: 59-63
- Zijlstra, C., 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology **106**: 283-290
- Zijlstra, C., 2004. Real-time PCR for detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. EPPO conference on Quality of Diagnosis and New Diagnostic Methods for Plant Pests, Noordwijkerhout, 19-20 April 2004.