

Recente ontwikkelingen in detectie en identificatie van plantenpathogenen: van microscopie naar moleculaire diagnostiek

Tini, J.M.A. Grauwet¹, Bruno, P.A. Cammue², Bart, P.H.J. Thomma³

¹ De Nayer Instituut, Jan De Nayerlaan 5, 2860 Sint-Katelijne-Waver, België

² Centrum voor Microbiële en Plantengenetica (CMPG), Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 20, 3001 Heverlee-Leuven, België

³ Laboratorium voor Fytopathologie, Universiteit Wageningen, Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen, Nederland

Het opsporen en identificeren van schadelijke organismen in planten, grond, teeltsubstraat, water of lucht vormt de basis van een veilige en duurzame gewasbescherming. Daarom bestaat er een grote behoefte aan diagnostische testen, die niet alleen de plantenpathogenen snel moeten kunnen detecteren en identificeren, maar liefst ook de concentratie van de ziekteverwekker moeten kunnen inschatten. Op deze manier kan een accuraat advies gegeven worden, zodat er, naargelang de aard en de ernst van de besmetting, op een verantwoorde manier (bij)gestuurd kan worden.

Klassieke identificatiemethoden op basis van morfologische kenmerken vereisen vaak gespecialiseerde taxonomische kennis en ervaring van een fytopatholoog en zijn tijdrovend en arbeidsintensief. Bovendien bevatten praktijkmonsters vaak meer dan één organisme, zijn tal van ziekteverwekkers moeilijk of niet te onderscheiden met behulp van een microscoop en is het merendeel van de organismen niet *in vitro* kweekbaar, waardoor ze met de klassieke methoden over het hoofd gezien kunnen worden. Recentere methoden, die steeds vaker gebruikt worden in de diagnostiek, omvatten serologische en nucleïnezuurgebaseerde technieken. Deze moleculaire diagnostische testen zijn in vergelijking met de klassieke methoden meer geschikt voor routineanalyses: het resultaat wordt sneller verkregen,

is nauwkeuriger en de technieken kunnen over het algemeen door minder gespecialiseerde personen gehanteerd en geïnterpreteerd worden. Tal van moleculaire detectiemethoden zijn reeds beschreven, elk met hun eigen protocol, benodigdheden en expertise. Om meer duidelijkheid te scheppen in deze snel evoluerende en dynamische wereld van technieken, wordt in dit artikel een overzicht gegeven van de meest gangbare moleculaire diagnostische testen, in hoofdzaak gericht op het detecteren en identificeren van schimmels.

Moleculaire technieken

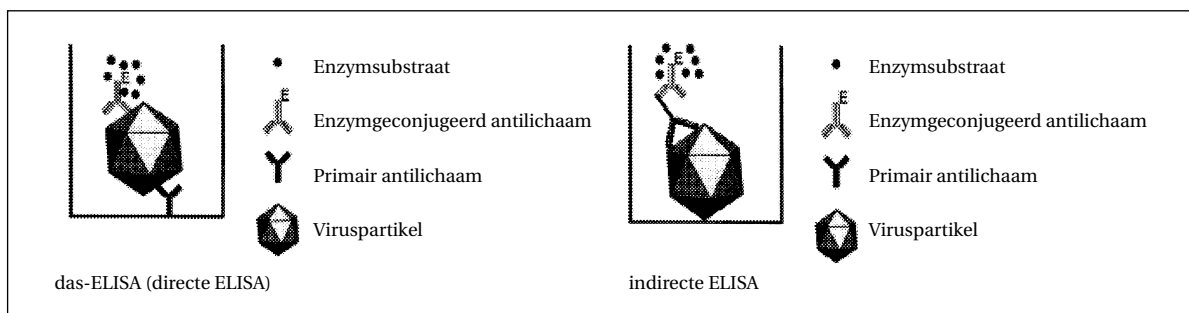
Met de komst van de moleculaire biologie komen meer en meer

technieken, specifiek en sensitief, ter beschikking die een snelle, objectieve, precieze en betrouwbare detectie en identificatie van pathogenen, waaronder ook niet-kweekbare organismen, toelaten. De laatste dertig jaar worden in dit verband gekenmerkt door twee belangrijke doorbraken. Een eerste doorbraak is het gebruik van antilichamen, wat vooral een belangrijk keerpunt vormde in de virologie en bacteriologie. Een tweede mijlpaal is de introductie van technologieën, die gebruik maken van erfelijk materiaal (DNA). Eén van de meest recente ontwikkelingen in dit verband is DNA-array technologie, waarbij met behulp van specifieke DNA-fragmenten, gespot op een vaste drager, tal van pathogenen gelijktijdig gedetecteerd en geïdentificeerd kunnen worden.

1. Serologische technieken

Serologische technieken zijn gebaseerd op de herkenning van specifieke antigenen door antilichamen. Veel studies werden gedaan naar de ontwikkeling van dergelijke testen, waaronder ELISA-testen of de zeer snelle membraangebonden immuno-testen.

ARTIKEL



Figuur 1. Principe van een directe en indirecte ELISA (aangepast volgens D'Arcy et al., 1999).

'Enzyme-Linked Immunosorbent Assays' (ELISA)

ELISA, ontwikkeld in de jaren '70, is in zijn oorspronkelijke vorm een 'sandwich' van antilichamen waartussen een antigen gevangen wordt. Tegenwoordig worden enkele basisprincipes onderscheiden, waaronder directe of 'double antibody sandwich' ELISA en indirecte ELISA (figuur 1). Directe ELISA kan van indirecte ELISA onderscheiden worden doordat de antilichamen, respectievelijk antigenen, rechtstreeks gebonden zijn op een drager. Detectie gebeurt door middel van een kleurreactie, waardoor ook kwantificatie mogelijk is. Succesvolle toepassingen zijn legio voor allerlei pathogenen, onder andere voor *Pythium ultimum* (Lädhe et al., 1998) en *Fusarium* spp. (Iyer en Cousin, 2003), de bacteriën *Ralstonia solanacearum* (Carusa et al., 2002) en *Erwinia* spp. (van der wolf et al., 1994), en tal van virussen waaronder het tabaksmozaïekvirus (Pereida et al., 2000) en het plum pox virus (Pasquini et al., 1998).

De voordelen van deze ELISA-testen zijn de hoge graad van specificiteit door het gebruik van monoklonale antilichamen en de mogelijkheid tot 'high-throughput screening'. Nadelen zijn de noodzaak aan specifieke antilichamen, het tijdrovende karakter bij het verwerken van een kleine hoeveelheid monsters, de onmogelijkheid om simultaan verschillende pathogenen op te sporen en de

relatief hoge kostprijs (Agrios, 1997).

Membraangebonden immunotesten

Membraangebonden immunotesten zijn een bijzonder type van 'sneltesten', die gebruik maken van de verschillende eigenschappen van poreuze, synthetische membranen zoals (i) vaste drager voor het antigen of antilichaam, (ii) filter en (iii) capillaire structuur. Ondanks het feit dat deze testen in termen van gevoeligheid en specificiteit het soms moeten afleggen tegen DNA-technieken of tegen andere serologische technieken, zijn ze omwille van hun snelheid (<< 5 minuten), eenvoud, relatief lage kostprijs en het feit dat ze geen laboratoriumomgeving vereisen, dé testen bij uitstek om diagnostiek 'ten velde' te bedrijven. Het ziet er bovendien steeds meer naar uit dat dergelijke sneltesten als 'front-line' screening kunnen gebruikt worden om vervolgens probleemsituaties verder te onderbouwen met andere, meer gevoelige DNA-technieken, die omwille van hun aard nog steeds een laboratoriumomgeving vereisen (Dilulio, 2002). Membraangebonden immunotesten werden tot nu toe hoofdzakelijk ontwikkeld voor snelle detectie van humane pathogenen, bijvoorbeeld voor de bacteriën *Salmonella* (Seo et al., 2003) en *Escherichia coli* (Capps et al., 2004) en het griepvirus *Influenza* (Cazacu et al., 2003).

2. Nucleïnezuurgebaseerde technieken

Nucleïnezuurgebaseerde technieken worden al jaren voor detectie en identificatie van tal van organismen gebruikt. Een onderscheid kan gemaakt worden naargelang het gaat om DNA- of RNA-gebaseerde technieken. Gezien deze laatste vooral voor detectie en identificatie van RNA-virussen worden toegepast, wordt hierop niet verder ingegaan.

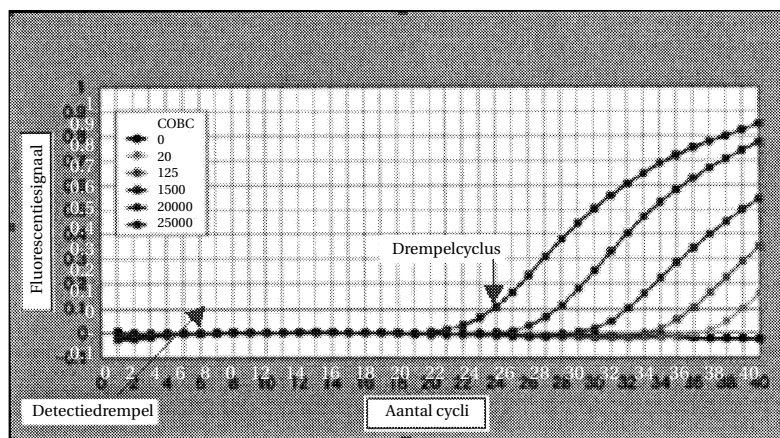
DNA-gebaseerde technieken

De DNA-gebaseerde technieken hebben geleid tot een grote doorbraak in de ontwikkeling van snelle en sensitieve diagnostische methoden. Voor vele pathogene micro-organismen zijn specifieke detectieprocedures met bijhorende DNA-probes of primers beschreven. Wanneer een monster tegelijkertijd op vele pathogenen moet getoetst worden, is dit echter duur en kan een DNA-array gebaseerd diagnostisch systeem uitkomst bieden. In wat volgt zullen enkele van de voornaamste DNA-gebaseerde technieken worden toegelicht.

'Polymerase Chain Reaction' (PCR)

'Polymerase Chain Reaction' (PCR) is een cyclisch proces waarbij met behulp van specifieke oligonucleotide primers een bepaald stuk DNA exponentieel geamplificeerd wordt om zo meetbare concentraties te bekomen. Deze techniek

steunt op de herhaling (doorgaans ≥ 30) van een driestapsproces (Henson en French, 1993): denaturatie van het doelwit-DNA, vasthaken van twee primers op de complementaire regio van het doelwit-DNA, en *in vitro* DNA-polymerisatie van een complementaire streng aan het doelwit-DNA door middel van een thermostaibel DNA-polymerase. Naast het gebruik voor amplificatiedoel-einden kan PCR rechtstreeks gebruikt worden als detectie- en identificatiemethode met behulp van taxonspecifieke primers, complementair aan een unieke sequentie binnen het doelwitge-noom. Indien het DNA van de doelwitpathogeen aanwezig is, zullen de specifieke primers aan het DNA binden en zal het DNA geamplificeerd worden. De PCR-producten worden gedetecteerd door gelelectroforese en gevisualiseerd in de vorm van een bandenpatroon. Varianten die kunnen leiden tot een verhoogde specificiteit en gevoeligheid zijn 'nested-PCR', waarbij een interne regio van de gegenereerde producten van een eerste PCR-reactie nogmaals ge-amplificeerd wordt met een tweede primerset. Een andere variant is 'immunocapture PCR', PCR in combinatie met antilichamen (McCartney *et al.*, 2003). In het algemeen biedt PCR verscheidene voordelen ten opzichte van meer traditionele methoden. De organismen hoeven niet opgezuiverd te worden, de techniek is specifiek, uiterst sensitief, vlug en kan op verschillende complexe mengsels toegepast worden. Een bijkomend voordeel is de mogelijkheid tot kwantificatie, hetzij via competitieve PCR, hetzij via kwantitatieve 'real-time PCR' (qrt-PCR). Een beperkte set pathogenen kan tegelijkertijd gedetecteerd worden in een multiplex PCR-reactie, waarbij meerdere taxonspecifieke primersets simultaan gebruikt worden. Detectie op gel gebeurt op basis van de lengteverschillen van de bekomen PCR-producten (Wilton en Cousins, 1992; Lopez



Figuur 2. Verloop van de amplificatiecurves van een qrt-PCR, uitgezet als fluorescentie-intensiteit ten opzichte van het aantal amplificatie-cycli.

et al., 2003; McCartney *et al.*, 2003).

In tal van publicaties zijn detectie- en identificatieprocedures op basis van PCR beschreven voor het opsporen van één of maximaal een drietal schimmelpathogenen per reactie, onder andere voor *Phytophthora infestans* (Judelson en Tooley, 2000), *Verticillium* (Nazar *et al.*, 1991), *Cylindrocladium floridanum* en *Cylindrocarpon destructans* (Hamelin *et al.*, 1996). Behalve voor tal van schimmels werden met succes PCR-reacties ontwikkeld voor andere pathogenen, waaronder de nematoden *Meloidogyne* (Zijlstra, 1997) en *Heterodera schachtii* (Amiri *et al.*, 2002), de bacteriële pathogeen *Agrobacterium* (Haas *et al.*, 1995) en het aardappelvirus Y (Nie en Singh, 2003).

De volgende kanttekeningen dienen echter gemaakt te worden. De extractie van PCR-amplificeerbaar DNA uit een complexe matrix, zoals plantenmateriaal en grond, kan bemoeilijkt worden door co-extractie van PCR-inhibitoren die de amplificatie-efficiëntie kunnen verminderen of de reactie zelfs volledig kunnen inhiberen. De voornaamste inhibitoren zijn humuszuren, fenolische componenten, zware metalen, fulvuszuren en overmatig niet-doelwit-DNA. Ze kunnen interfereren tijdens het lyseren van de cellen, DNA degra-

deren of de polymerisatiereactie inhiberen (Weiland en Sundsbak, 2000; Faggian *et al.*, 2003). Voor de meeste commercieel verkrijgbare DNA-extractiekits vormt dit echter geen beduidend probleem meer. Bovendien kunnen bijvoorbeeld polyvinylpyrrolidone of afgeroomde melk toegevoegd worden, die inhibitoren kunnen inactiveren. Ook het verdunnen van het DNA-extract kan PCR-inhibitie verhelpen. Om over een indicator voor inhibitie te beschikken, wordt er vaak een interne controle aan het PCR-mengsel toegevoegd (Nazar *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1993; Moukhamedov *et al.*, 1994; Bonants *et al.*, 2001). Daarnaast moet opgemerkt worden dat PCR, net als alle andere DNA-gebaseerde technieken, geen onderscheid maakt tussen DNA van levende en DNA van dode cellen, aangezien DNA-moleculen nog intact kunnen zijn, terwijl het organisme al dood is. Men kan echter verwachten dat DNA van dode organismen in een complex milieu, zoals een grond, vrij snel gedegradeerd wordt door de aanwezige microflora. In recirculatiesystemen kan een gecontroleerde UV-ontsmetting DNA-afbraak bovendien bevorderen. Anderzijds kan een omweg via het afgeschreven 'messenger RNA' (mRNA), een instabiel molecuul en bovendien alleen geproduceerd in levende cellen, dit euvel omzeilen (Bustin, 2000). Bovengenoemde obstakels kun-

ARTIKEL

nen door het gebruik van BIO-PCR vermeden worden. BIO-PCR voorziet een additionele stap van biologische amplificatie, namelijk door inoculatie in of op een geschikt voedingsmedium, vóór de PCR-amplificatie. Dit resulteert in eliminatie van vals positieven door minimalisatie van dode cellen en vrij DNA, en in eliminatie van vals negatieven omwille van de afwezigheid van inhibitoren (Schaad *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2003). De extra opgroei-stap vereist echter tijd, maakt kwantificatie onmogelijk en niet-kweekbare organismen kunnen niet gedetecteerd worden. Rechtstreekse moleculaire detectie is dan ook meer aanwezig.

Kwantitatieve 'real-time PCR' (qrt-PCR)

PCR-gebaseerde diagnostische testen hebben als nadeel dat rechtstreekse kwantificatie onmogelijk is. Alhoewel het relatief gemakkelijk is om de hoeveelheid PCR-product te bepalen, is het veel moeilijker om de hoeveelheid PCR-product te relateren aan de oorspronkelijke hoeveelheid doelwit-DNA. In het laatste decennium zijn een aantal apparaten ontwikkeld die toelaten het kwantitatieve verloop van een PCR-reactie 'real-time' of 'on-line' te volgen door middel van fluorescentiemetingen en daarenboven, naast een kwalitatieve, een accurate kwantitatieve detectie en identificatie van micro-organismen mogelijk maken door pathogeenconcentraties te koppelen aan DNA-hoeveelheden (Brouwer *et al.*, 2003). Men spreekt van kwantitatieve 'real time PCR' (qrt-PCR). Al deze apparaten hebben gemeen dat ze bestaan uit een PCR-module, die de eigenlijke PCR uitvoert en een optische module, die de hoeveelheid gegenereerd product met behulp van fluorescentie meet (Walker, 2001). Er is een aantal technieken dat gebruikt kan wor-

den om de gegenereerde PCR-producten fluorescent te merken, (i) technieken die werken met behulp van DNA-bindende kleurstoffen, zoals SYBR Green en (ii) technieken die gebruik maken van specifieke en gemerkte probes.

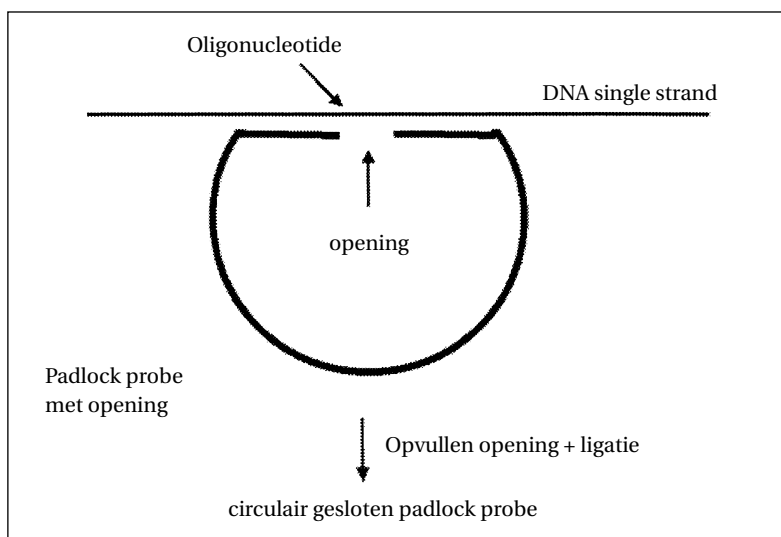
In een kwantitatieve 'real-time' multiplex PCR kunnen ook meerdere pathogenen gelijktijdig gedetecteerd en gekwantificeerd worden. Hierbij gelden echter een aantal beperkingen, waardoor het op dit moment slechts mogelijk is een kwantitatieve multiplex PCR te ontwerpen, waarin vier reacties tegelijkertijd plaatsvinden. Enkele bijkomende voordelen van qrt-PCR ten opzichte van traditionele PCR, zijn detectie in afwezigheid van gelelectroforese, met tijdwinst als gevolg, de mogelijkheid tot accurate kwantitatieve detectie en de minimalisatie van kans op contaminatie, gezien reactie en analyse, zonder bijkomende handelingen, in één enkele tube plaatsvinden (Walker, 2001; McCartney *et al.*, 2003). qrt-PCR als detectie- en identificatietechniek is echter duur. Meerdere publicaties beschrijven het gebruik van qrt-PCR voor het detecteren, identificeren en kwantificeren van pathogenen, waaronder de pathogene schimmels *Verticillium*

dahliae (Mercado-Blanco *et al.*, 2004) en *Fusarium* (Bluhm *et al.*, 2004), een aantal algemene bacteriële en fungale pathogenen (Brouwer *et al.*, 2003) en het 'tomato spotted wilt' virus (Boonham *et al.*, 2002).

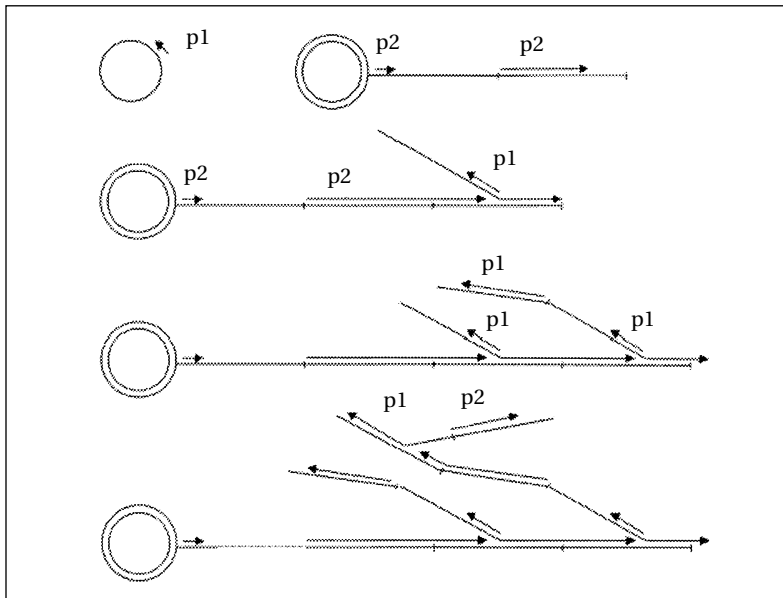
'Rolling Circle Amplification' (RCA)

Naast PCR, kan DNA eveneens geamplificeerd worden met 'rolling circle amplification' (RCA). Deze amplificatietechniek, die sinds het midden van de jaren '90 zijn opgang kent, wordt vaak toegepast in combinatie met zogenaamde 'padlock probes'. Een 'padlock probe' bestaat uit een enkelstrengs, lineair oligonucleotide van een 100-tal basen, dat aan beide uiteinden complementair is met het specifieke doelwit-DNA. Na aanhechting van het doelwit-DNA wordt door middel van een ligase een gesloten circulaire structuur gevormd die, hetzij via PCR, hetzij via RCA, geamplificeerd kan worden (Nilsson *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2002; Baner *et al.*, 2003) (figuur 3).

Twee verschillende 'padlock probe' gebaseerde RCA-amplificatieprocedures kunnen onderscheiden worden. Men spreekt van een



Figuur 3. Basis voor een 'padlock probe' gebaseerde DNA-amplificatie (Andras *et al.*, 2001).



Figuur 4. Padlock probe' gebaseerde 'hyperbranched rolling circle amplification' (Andras *et al.*, 2001).

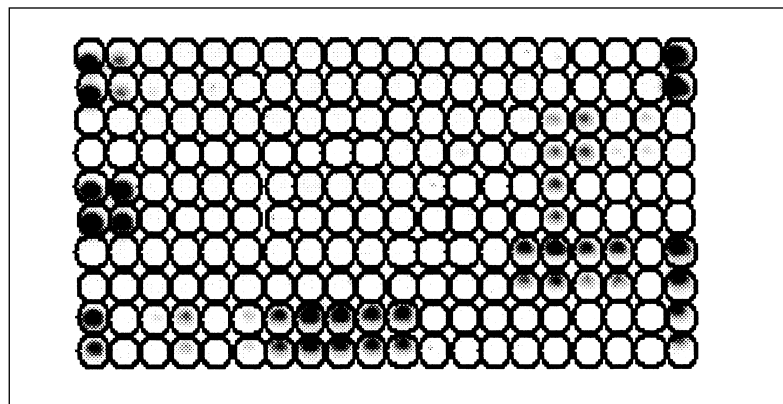
'lineaire RCA'-amplificatie indien gebruik wordt gemaakt van één primer, complementair aan een deel van de DNA-cirkel, waardoor lange, repeterende DNA-sequenties worden verkregen met een graduele accumulatie van het RCA-product tot gevolg. Bij 'hyperbranched-RCA'- (HRCA) amplificatie wordt een tweede primer toegevoegd, complementair aan een deel van de lineaire tandemherhalingen, waardoor een 'hypervertakking' wordt verkregen met steeds meer DNA-polymerisatiereacties tot gevolg (figuur 4) (Lizardi *et al.*, 1998; Andras *et al.*, 2001; Demidov, 2002).

In tegenstelling tot traditionele PCR, wordt met 'padlock probe' gebaseerde PCR of RCA de probe geamplificeerd en niet het doelwit-DNA. Op deze manier hangt de efficiëntie van de amplificatie niet af van de verschillende doelwitsequenties of primersets (Nilsson *et al.*, 1994; Andras *et al.*, 2001; Nallur *et al.*, 2001). Bovendien wordt met HRCA een snellere amplificatie verkregen dan met PCR (Andras *et al.*, 2001; Demidov, 2002). Deze RCA-techniek is bijgevolg zeer sensitief. Een nadeel is echter dat het gebruik van RCA

binnen de diagnostiek beperkt wordt door gebrek aan kennis en literatuur, aangezien de techniek op dit ogenblik vooral zijn toepassing kent binnen de medische sector (Lizardi *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999; Andras *et al.*, 2001). Qua applicaties is RCA te vergelijken met PCR: detectie en identificatie via specifieke probes en gelelektroforese, kwantificatie via fluorescente merking van de probes of DNA-bindende kleurstoffen en multiplexing via generieke primers en hybridisatiereacties (Thomas *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2002; Baner *et al.*, 2003).

DNA-arrays

Hoewel bovenstaande technieken geschikt zijn voor het opsporen van één pathogeen, voldoen ze niet wanneer een monster op verschillende ziekteverwekkers dient getest te worden. Een combinatie van deze individuele testen is duur, inefficiënt en vereist de nodige strategische planning. Het grote aantal beschikbare testen voor een pathogeen bemoeilijkt bovendien standaardisatie van pathogeendetectie en -identificatie. Een meervoudige DNA-test, gebaseerd op de DNA-array technologie, waarmee in één keer vele pathogenen kunnen opgespoord worden, vormt tegenwoordig de nieuwste generatie van DNA-gebaseerde testen. Met deze technologie wordt een 'onbeperkte' multiplexing, dus een detectie en identificatie van tal van organismen (schimmels, bacteriën, nematoden, virussen, onkruidzaden, ...) mogelijk. Om de gevoeligheid van de test te verhogen, wordt met een amplificatietechniek, hetzij met generieke primers, hetzij via 'padlock probes', de hoeveelheid DNA opgedreven tot detecteerbare hoeveelheden en bovendien gemerkt. De also bekomen DNA-fragmenten worden op de DNA-test, die 'detectoren' bevat onder de vorm van genus- of speciespecifieke DNA fragmenten, aangebracht. Deze 'detectoren' be-



Figuur 5. Voorbeeld van een diagnosemembraan voor snelle meervoudige detectie en identificatie van een set pathogenen. Elke positie bevat een detector (in herhaling) voor een bepaalde pathogeen. Een positieve detectie wordt weergegeven door een zwart signaal.

Tabel 1. Overzicht van op dit moment identificeerbare plantenpathogenen met de 'DNA multiscan' (Bron: Scientia Terrae Research Institute, Sint-Katelijne-Waver, België)

Schimmels:	<i>Pythium aphanidermatum</i>
<i>Athelia rolfsii</i>	<i>Pythium dissotocum</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pythium irregulare</i>
<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Pythium polymastum</i>
<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Pythium sylvaticum</i>
<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Pythium ultimum</i>
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Cylindrocladium</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> spp.
<i>Didymella</i> spp.	<i>Sclerotinia minor</i>
<i>Fusarium</i> spp.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Trichoderma</i> spp.
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Trichoderma asperellum</i>
<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Trichoderma hamatum</i>
<i>Phytophthora cactorum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Verticillium</i> spp.
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>
<i>Phytophthora cryptogea</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>Phytophthora drechsleri</i>	Bacteriën:
<i>Phytophthora fragariae</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>
<i>Phytophthora nicotianae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Phytophthora ramorum</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
<i>Pythium</i> spp.	<i>(Agrobacterium tumefaciens)</i>
	<i>Xanthomonas fragariae</i>

vinden zich op welbepaalde locaties op de zogenaamde 'array'. Aan de hand van de locaties waar reacties optreden kan bepaald worden welke organismen in het monster aanwezig zijn. De resultaten kunnen bijgevolg als een 'checklist' gelezen worden (figuur 5). Precieze identificatie vanuit een complex monster zoals plant, grond, compost of water kan gebeuren binnen 24 uur (Lévesque *et al.*, 1998; Lievens *et al.*, 2003). Voorbeelden van het gebruik van 'arrays' in de literatuur zijn het identificeren van enkele oömyceten (Lévesque *et al.*, 1998), nematoden (Uehara *et al.*, 1999) en bacteriën (Fessehaie *et al.*, 2003) en het detecteren en identificeren van een selectie verwelkingschimmels (Lievens *et al.*, 2003).

Inschatting van de pathogeenbiomassa op basis van de signaalintensiteit is in principe mogelijk. In het geval van een generieke amplificatie-gebaseerde meervoudige

test wordt de detectielimiet bepaald door het concentratieverschil tussen de doelwitpathogeen en de overige aanwezige flora. Deze blijkt in de grootteorde van 1/1000 (doelwitpathogeen / achtergrond flora) te liggen. Doch dergelijk grote concentratieverschillen zijn niet relevant voor een geïnfecteerde plant, besmette grond of water. Een 'padlock probe-HRCA' gebaseerde multiplex test zou mogelijk nog gevoeliger kunnen zijn. Onderzoek zal dit echter nog moeten uitwijzen. Op dit ogenblik bestaan reeds meerdere array systemen, in de vorm van een nylonmembraan, een glazen drager of een microtiterplaat. Een systeem op basis van een nylonmembraan is echter het gevoeligst, gezien bij deze methode een hogere concentratie van de detectorprobes kan gespot worden. De detectielimiet bedraagt in dit geval minder dan 1 pg DNA (Lievens *et al.*, 2003). Op dit moment zijn

DNA-arrays dan ook het meest geschikt om een monster gelijktijdig en kostenefficiënt te toetsen op vele ziekteverwekkers.

Conclusie en vooruitblik

Tegenwoordig worden steeds meer en meer testen aangeboden voor snelle, specifieke en sensitieve detectie en identificatie van plantpathogenen. Het is evenwel onze overtuiging dat de snelle meervoudige DNA-testen, waarmee in één test meerdere pathogenen kunnen opgespoord worden, dé testen van de toekomst zullen zijn, temeer omdat ze zeer kostefficiënt zijn. Met deze testen is het immers mogelijk een volledigheidstoestand van een plant, groeimedium of recirculatie- en gietwater. Dergelijke testen zullen aan de basis liggen van een preventief plantgezondheidsmanagement en gericht, al dan niet preventief, bijsturen mogelijk maken.

Tabel 2. Overzicht van op dit moment identificeerbare plantenpathogenen met de 'pUMA'-test (Bron: Plant Research International, Wageningen, Nederland)

Schimmels:
<i>Phytophthora cactorum</i>
<i>Phytophthora cinnamomi</i>
<i>Phytophthora fragariae</i>
<i>Phytophthora nicotianae</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Verticillium dahliae</i>
Bacteriën:
<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>Clavibacter michiganensis</i>

Ir. T.J.M.A. Grauwet is onderzoeker bij het De Nayer Instituut (Sint-Katelijne-Waver, België). Haar onderzoeksactiviteiten worden financieel gesteund door het Vlaams Instituut voor de bevordering van het Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen (HOBUP030109).

Ir. Tini Grauwet,
tgr@denayer.wenk.be

Dit zal dan ook resulteren in een hogere kwaliteit van het gewas en een reductie van het gebruik van chemische middelen, ten gunste van het milieu. In België, Nederland en Duitsland wordt reeds met succes een meervoudige DNA-test aangeboden onder de naam 'DNA multiscan', waarmee in zijn huidige vorm de aanwezigheid van 43 schimmels en 7 bacteriën (Tabel 1) tegelijkertijd vastgesteld kan wor-

den. Recent is in Nederland een prototype van een andere multiplextest ontwikkeld, pUMA gedoopt (Tabel 2), waarmee 8 pathogenen kunnen gedetecteerd worden. Indien een accurate kwantificatie gewenst is, is qrt-PCR in principe meer geschikt. Meerdere pathogenen gelijktijdig opsporen is in dit geval echter niet mogelijk. Een relatie leggen tussen vastgestelde besmettings-

graden en het tijdstip en de wijze van bestrijding, naast een inzicht verwerven in de plant-pathogeenrelaties en de structuur en functies van de pathogenen binnen hun gemeenschap vormen de volgende uitdaging voor de diagnostiek!

Literatuur

Zie website www.knpv.org

ARTIKEL

Gezocht:

oude Jaarverslagen van Phytopathologisch Laboratorium Willie Commelin Scholten

Ondergetekende, Dr. Patricia Faasse (wetenschapshistoricus), is op verzoek en onder supervisie van de Stichting voor de Fytopathologie Willie Commelin Scholten (WCS) bezig met een boek over de geschiedenis van het voormalige Phytopathologisch Laboratorium Willie Commelin Scholten.

Datum van uitgave is gepland begin 2006. Het boek zal in het Engels verschijnen.

Het archief van WCS is een belangrijke bron van informatie voor deze geschiedenis.

Uit het archief ontbreken echter de **Jaarverslagen van WCS tussen 1917 en 1930**.

Ook in de geregistreerde bibliotheken zijn ze niet aanwezig. Vandaar mijn oproep:

Wie weet waar deze jaarverslagen – als ze al verschenen zijn – nu aanwezig zijn?

Mocht u hierover informatie hebben, dan heel gaarne contact opnemen met:

Dr. Patricia E. Faasse

[HYPERLINK "mailto:faasse@xs4all.n]

020 6842890

Adm. De Ruyterweg 271 – 1055 LV Amsterdam