

Inleiding

Doel van het project is het maken van een DNA test voor het aantonen van (latente) bacteriebesmettingen in poot aardappelen. Het betreft een test die op het boerenerf uitgevoerd kan worden, aanvullend op een PCR toetsing die door NAK en de pootgoedhandelshuizen wordt uitgevoerd. Het geeft de teler snel inzicht in de besmettingssituatie van de verschillende partijen pootgoed op het bedrijf. Dit is vooral interessant voor telers van kwalitatief hoogwaardig pootgoed.

Een vergelijkbare test is in 2014-2015 ontwikkeld en in 2016 getest voor *Alternaria spp.* in aardappelen. Hiermee is aangetoond dat het principe werkt. In het bacterieproject wordt een test ontwikkeld voor bacteriële besmettingen in aardappelpootgoed.

De test wordt ontwikkeld en vervolgens in het veld getest bij twee pootgoedtelers in Noord Friesland, mede aanvragers in dit project. Deze test is een belangrijk management instrument voor pootgoed-telers in de beheersing van het bacterieprobleem in de pootgoedsector.

Latente besmettingen met bacteriën zijn een groot probleem voor pootgoedtelers en een bedreiging voor de export positie van de Friese en Nederlandse pootgoed telers. Latente besmettingen zijn in het veld niet waarneembaar en worden vaak achteraf vastgesteld door knolanalyse. Regelmatig is dit een totale verrassing voor de teler: in het veld lijkt het gewas gezond, de juiste teelt-technische maatregelen zijn genomen, en toch blijken stammen/partijen latent besmet. In het seizoen 2015 is bijna 15% procent van het pootgoed in de nacontrole in klasse verlaagd (bron NAK). Het aantonen van (overmatige) latente aanwezigheid is voor het handelshuis reden partijen niet als S uit te leveren maar voor een lagere klasse te verhandelen. Het mislopen van een eventuele S-premie, is een flinke kostenpost voor de telers. De economische impact voor de boer, de regio en de BV Nederland is groot.

Het is onduidelijk wanneer en hoe de initiële besmettingen ontstaan, wel is duidelijk hoe bestaande besmettingen tot uitbreiding komen. De huidige situatie is dat regelmatig latente besmettingen achteraf worden vastgesteld door knolanalyse, uitgevoerd in laboratoria van de handelshuizen of de NAK. Dit leidt vaak tot onbegrip en frustratie bij telers omdat de partij gezond oogde en er tijdens de groei geen problemen zijn vastgesteld. Nieuwe innovatieve DNA technieken uit de lifescience zijn beschikbaar en maken het mogelijk om snel besmettingen vast te stellen. Dit kan in het veld zowel aan het blad als in de knol. Als deze DNA test door de teler of zijn adviseur direct kan worden uitgevoerd wordt waardevolle informatie verkregen die kan helpen om het probleem beter beheersbaar te maken. Als Nederland als eerste deze DNA technologie kan toepassen kan zij haar voorsprong en marktpositie wereldwijd behouden.

In dit project zijn snelle DNA toetsen ontwikkeld specifiek voor een aantal bacterie stammen die problemen veroorzaken in de pootaardappel productie gebieden van Friesland: *Pectobacterium wasabiae* (oude naam: *Pectobacterium carotovora subs. Carotovora*) en *Pectobacterium carotovorum spp brasiliense*.

Methode

Wij maken gebruik van de “Loop Mediated Isothermal Amplification” (LAMP) methode die beter geschikt is voor het gebruik in het veld dan de PCR methode. Zie bij voorbeeld <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5862059/>).

Een groot voordeel van de LAMP methode is de relatief ongevoeligheid voor storende componenten. Bij de meer bekende PCR (Polymerase Chain Reaction) methode, is het noodzakelijk dat het te testen materiaal wordt opgezuiverd. Daarnaast zijn de gebruikte instrumenten kostbaarder.

Een nadeel van LAMP is dat de ontwikkeling van de testen complexer is en dat het geen kwantitatieve uitslag geeft. Het is eigenlijk een ja/nee test. Besmet of niet besmet. Dat opgeschreven hebbende, er is wel degelijk een verschil zichtbaar tussen veel of weinig besmetting. Dit is te zien aan de gebruikte tijd dat de test positief wordt vanaf de start. Maar een duidelijke uitspraak daarover te geven is niet goed te doen. Daarom wordt er slechts een uitspraak gedaan in termen van zwak positief tot sterk positief in enkele gradaties in relatie tot de snelheid van de positieve standaard.

Er wordt een teststrip met 8 reactie vaten gebruikt waarvan twee reactievaten worden gebruikt voor een betrouwbaarheids- indicatie van de test: Positieve en Negatieve controle. De overige 6 reactie vaten worden gebruikt voor de monsters.

Test ontwikkeling

Een belangrijke component van de test zijn de gebruikte primers. Dit zijn korte stukjes DNA die specifiek hechten aan het ‘target’ DNA. Het target DNA moet specifiek zijn voor de te detecteren organisme. Voor de ontwikkeling van deze primers maken we gebruik van de (gehele) DNA sequentie van het organisme. Daarin wordt gezocht naar een stukje DNA dat alleen in dit organisme voor komt. Dit is geen eenvoudige klus. Vaak maken we gebruik van wetenschappelijke literatuur waarin PCR testen worden beschreven. Vaak staat daar een sequentie waarmee ze hun PCR test op gebaseerd hebben. Dit geeft een redelijke start voor het ontwikkelen van onze primers. De LAMP primers zijn namelijk anders dan die gebruikt worden bij PCR. Bij PCR wordt er gebruik gemaakt van 2 primers. De LAMP methode maakt gebruik van 4 main primers en 2 loop primers. Deze 6 subprimers tezamen wordt een primerset genoemd. En de concentratie verhouding tussen de subprimers kan worden getweaked om de gevoeligheid te variëren.

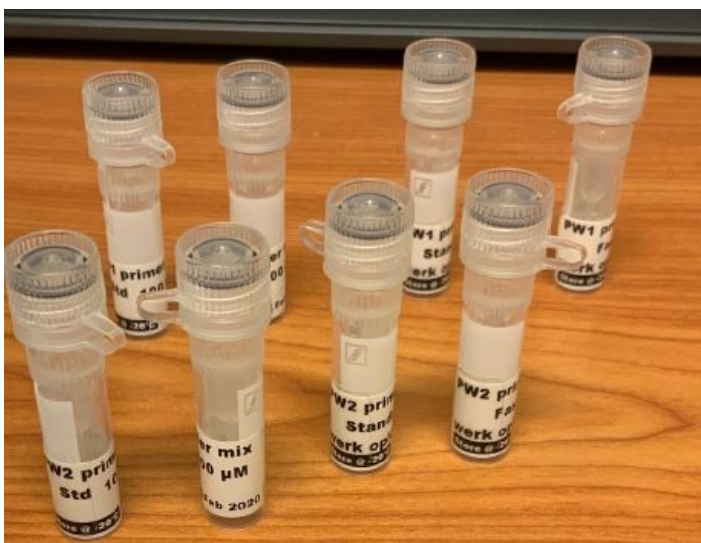
We hebben de volledige genetische DNA of RNA sequentie nodig van de ziekte verwekker om een uniek stukje genetische sequentie te vinden. Het makkelijkst is het om gebruik te maken van de wetenschappelijke literatuur. Vaak hebben anderen al unieke sequenties gevonden. Over het algemeen zijn ze voor pcr testen ontwikkeld.

Met behulp van deze PCR primers zoeken we in de 2.5 TB grootte databases welk stukje DNA herkend wordt. We gebruiken hiervoor een BLAST procedure. Vaak is de uitkomst een gedeelte uit een enzym dat specifiek is voor het organisme. Wij ontwikkelen LAMP primers voor een gedeelte uit deze unieke sequentie. Vervolgens wordt de potentiële LAMP primer sequenties geblast op de diverse databases om te zorgen dat er geen andere organismen wordt gedetecteerd. Dit gaat niet altijd goed. Vaak zien we dat de originele PCR primers meerdere organismen herkennen. Wat ook vaak voorkwam is dat de naamgeving van de diverse organismen varieert. Dit maakt het lastig om duidelijkheid te verkrijgen en kost extra tijd om orde te scheppen in de nomenclatuur chaos. Vaak zijn er historische gronden en voortschrijdende inzichten die dit veroorzaken.

We hebben diverse verschillende DNA sequenties gevonden voor Malate dehydrogenase genen (MHD genen) in *Pectobacterium wasabiae*. Deze genen kwamen in diverse *Pectobacteriae* stammen voor met name in *P. Parmentieri*. We hebben 1 gen gekozen die geen overeenkomsten had met andere organismen.

Voor de *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* test detecteren we stukje uit het 'AraC family transcriptional regulator' gen.

We hebben verschillende primer sets ontwikkeld voor elk gekozen gen. We hebben daarvoor commerciële software van Premier Bioscience gebruikt. Voor de test hebben we verschillende concentratie verhoudingen gebruikt van de subprimers. Een standaard set en een eentje met verhoogde detectie snelheid.



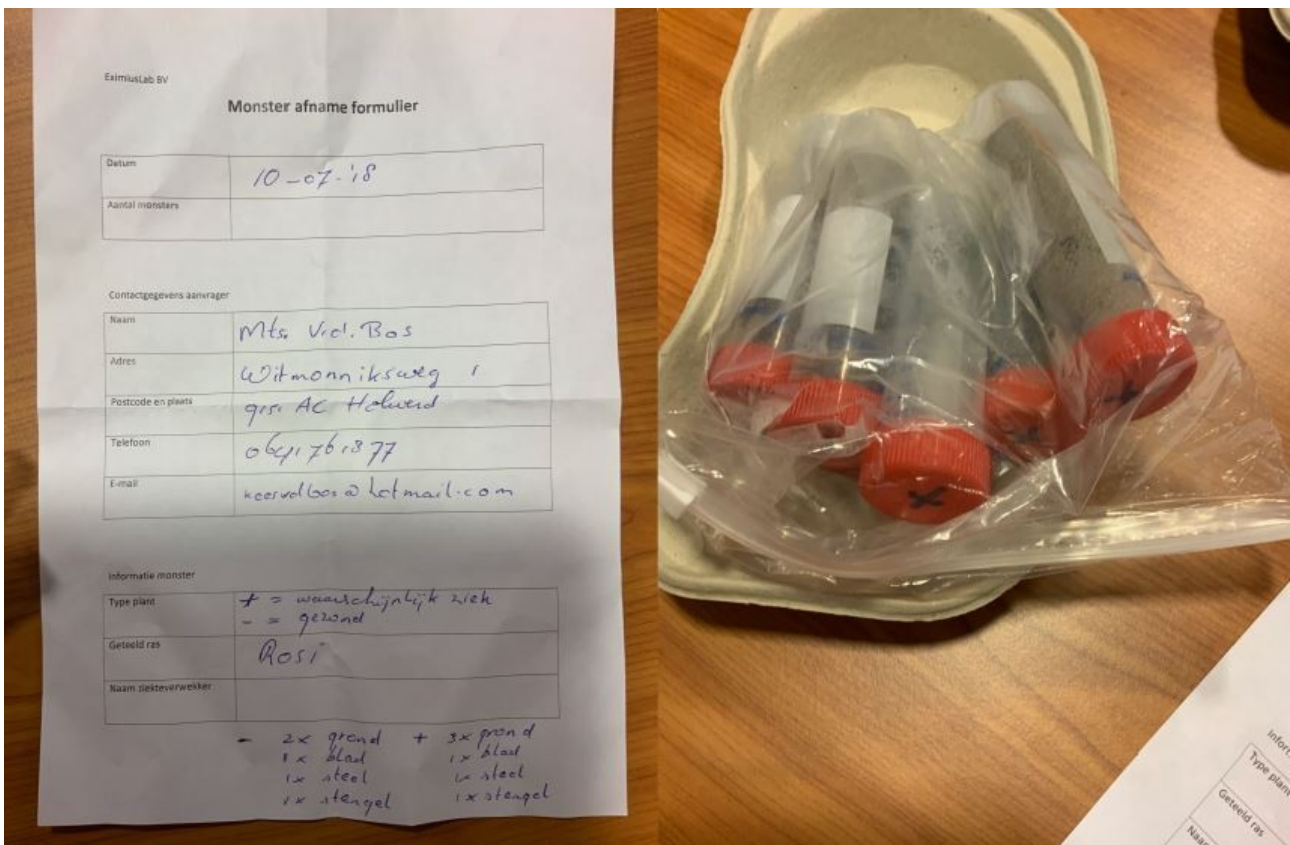
Diverse primers sets in aliquots van 50 µl in cupjes

Monstername en lysis

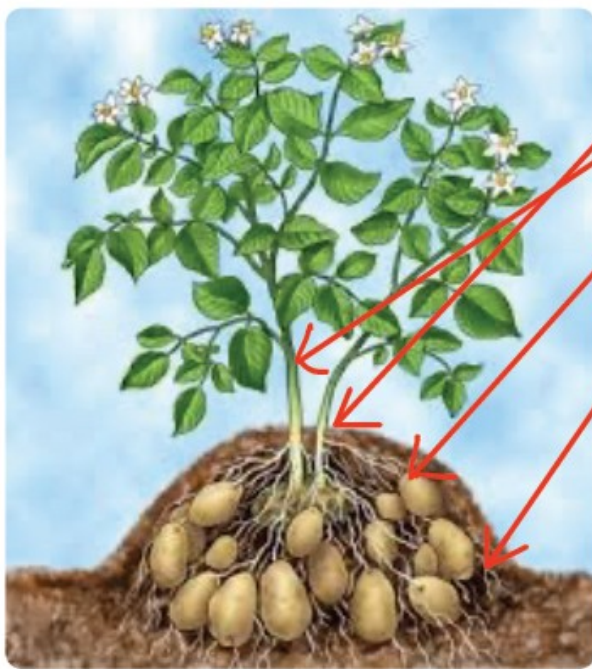
Kleine stukjes monster worden vermalen in een speciale lysis buffer door een metalen kogel en carborundum (een korrelig slijpmiddel). De vloeistof zorgt ervoor dat het genetisch materiaal vrijkomt. Ook komen enzymen vrij die het DNA afbreken. Daarom worden de buisjes met vermalen monster gedurende meer dan 10 minuten opgekookt.

Monster name en voorbereiding

Er zijn diverse veldproeven gedaan. In het begin hebben we monsters verzameld en in het lab verwerkt. De monsters werden voor zover mogelijk in een koelbox verstuurd. Dat was toch niet zo ideaal omdat er veel tijd verloren ging tussen monstername en lysis.



Gedurende de laatste veldproeven is de instructie aangepast:



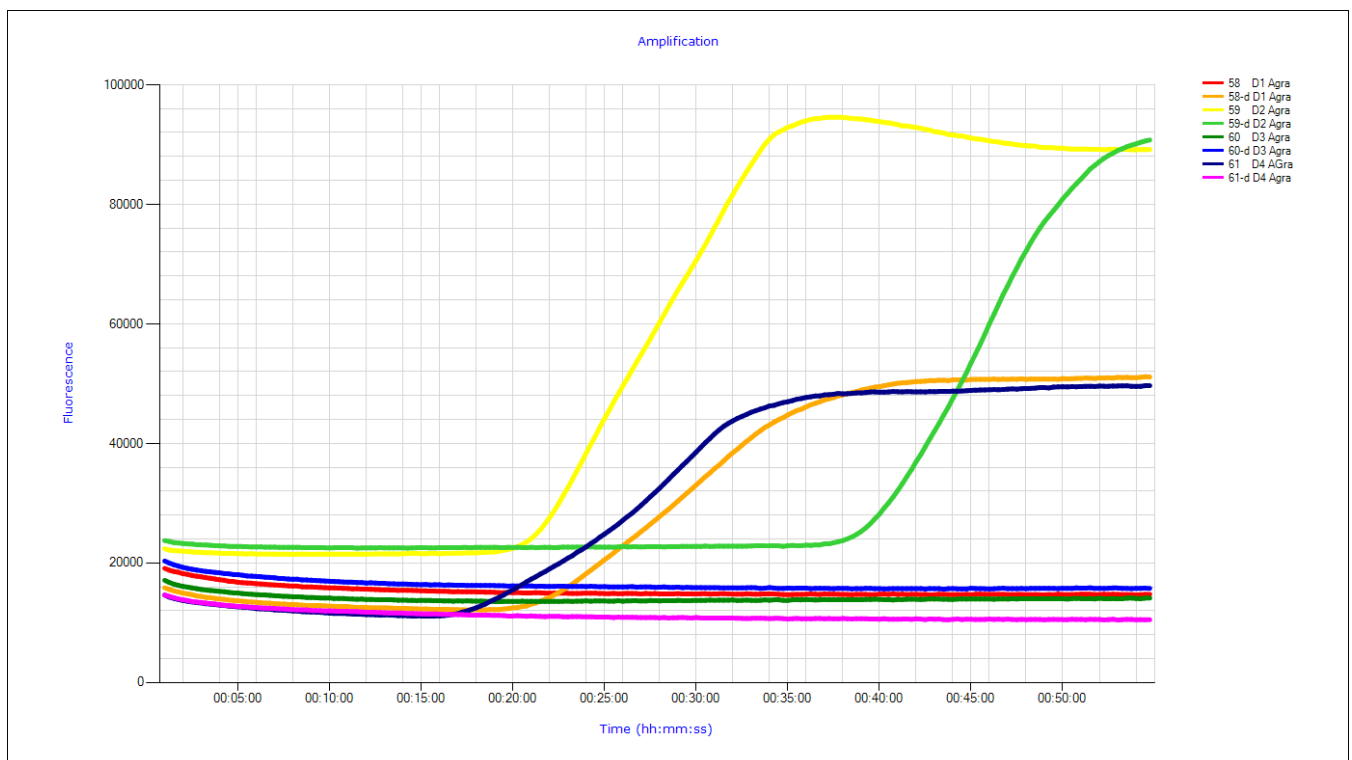
1. Overgang lucht aarde
2. Stengel
3. Knol huidje
4. Wortel stukje
- 5.

- Maak een foto van de slechte plant.
- Stop een klein beetje van het materiaal in een buisje (bevat Lysis buffer)
 - gebruik een klein mesje voor het afsnijden van het materiaal eventueel met een snijplankje.
 - Steriliseer de hulpmiddelen met chloor (bleekloog) en spoel zeer goed af met heet water na elke bemonstering.
 - maak het mesje goed schoon voordat je een volgend monster van de plant neemt.
- Doe de stalen kogel in het buisje (voorzichtig – de buffer mag er niet uit spatten)
- Markeer het buisje met het nummer zoals aangegeven in bovenstaande figuur
- Schudt het buisje voorzichtig totdat het monster kapot is en goed is vermengt.
- Verwarm het buisje 15 minuten bij 95 °C. Zorg ervoor dat het schroefdopje niet openbarst. Dat kan je makkelijk voorkomen door de verwarmde lucht eventjes te laten ontsnappen.
Het verwarmen zorgt ervoor dat de enzymen die DNA afbreken kapot gaan.
Op het lab gebruiken we een speciaal verwarmingsblok, maar in het veld kan mogelijk op kantoor de buisjes in een kokend water apparaat worden gestopt. Vaak worden deze apparaten voor het maken van thee gebruikt.
- Schrijf goed op een blad papier alle gegevens over het monster zoals
 - Plaats van opname
 - Stam
 - Opmerkingen
 - Weersomstandigheden van het groeiseizoen
 - Gebruik van pesticiden, meststoffen, hoeveelheden etc met datums
 - Markering van het buisje en welk monster daarin zit
 - Naam, adres, email en telefoon gegevens
- Laat de buisjes afkoelen
- Breng de buisjes naar het Lab of geef het aan Saskia Houben.

Resultaten

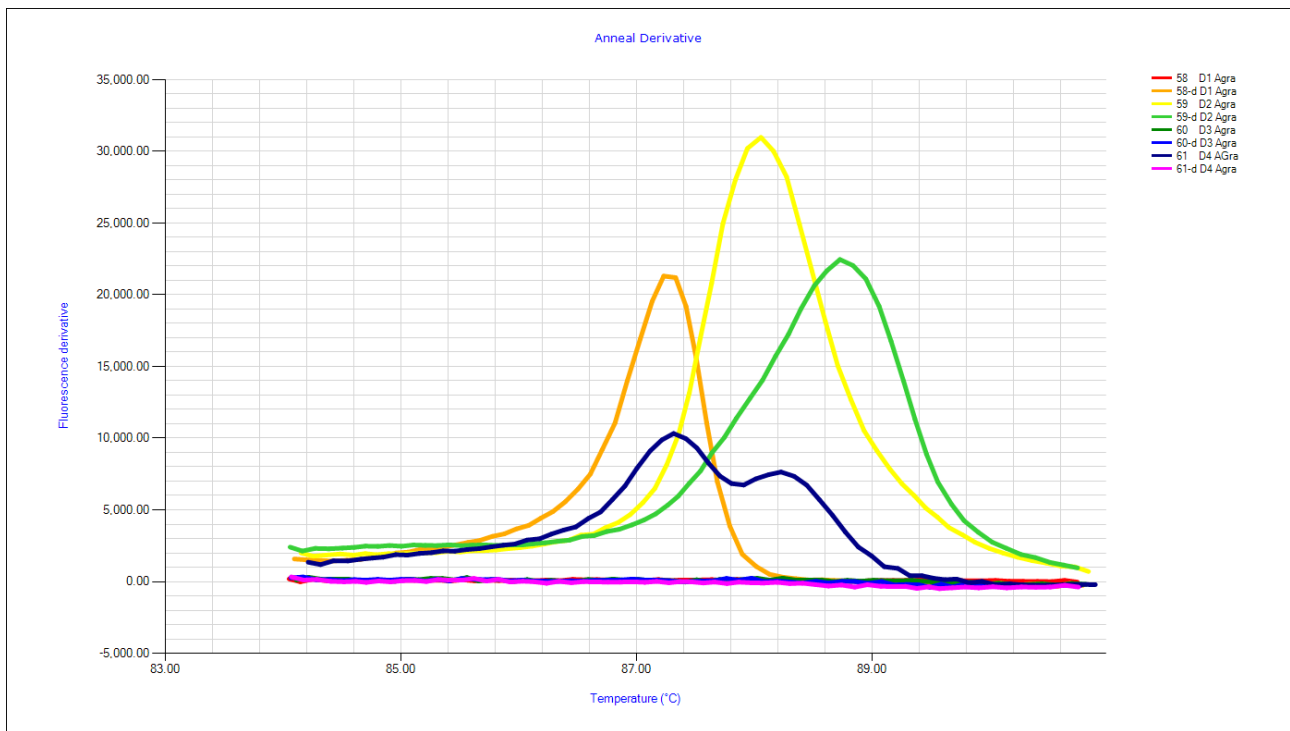
In de bijlage vind u de resultaten voor alle tests. De meeste tests zijn in enkelvoud uitgevoerd. We hebben ook een reeks testen in duplo uitgevoerd omdat we iets meer zekerheid zouden hebben over de gevoeligheid van de *P. Parmentieri* tests.

Van een aantal tests volgt hieronder gedetailleerde informatie om de lezer iets te vertellen over hoe test uitslagen tot stand komen. We kunnen natuurlijk niet elke test op deze wijze uitgebreid gaan opschrijven en bediscussiëren.



D1, D2, D3 en D4 Agria uit Flevoland. In duplo getest op *P. Parmentieri*.

We zien dat niet alle duplo's positief zijn. Vermoedelijk heeft dit te maken met een zeer lage concentratie van het te detecteren DNA. En dat is de reden dat we deze tests in tweevoud hebben uitgevoerd. Daarnaast is de tijd van detectie ook erg laat. Dat is een tweede indicatie dat de DNA concentratie erg laag is. Toch detecteren we een signaal en dat is de reden dat deze monsters positief worden vermeld in de tabel (zie bijlage monster uitslagen).

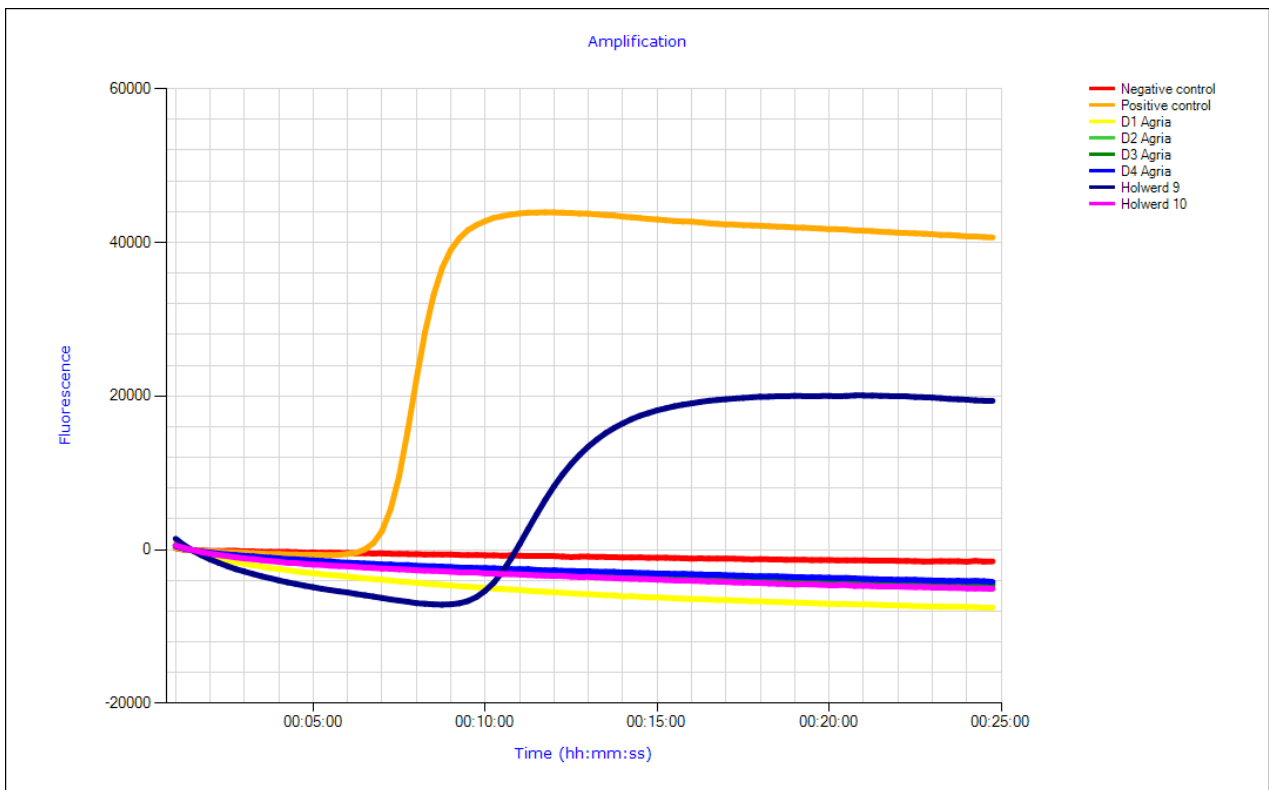


De monsters worden na de LAMP reactie naar 90°C gebracht. Daardoor smelt de DNA helix en neemt de fluorescentie af naar nul. De temperatuur wordt langzaam teruggebracht en op een gegeven moment plakken de losse DNA strengen weer aan elkaar vast en neemt de fluorescentie toe. Het smelt gedrag is afhankelijk van de sequentie. In bovenstaande grafiek is de eerste afgeleide daarvan zichtbaar. We zien dat de pieken niet mooi overeen komen. Dat kan duiden op mutaties, storingen in de test, zeer lage DNA concentraties tijdens de amplificatie stap (waardoor veel amplificatie fouten ontstaan).

Discussie

We leren uit de annealing grafiek dat er toch verschillende DNA sequenties zijn gedetecteerd. Aangezien de detectie tijden meer dan 20 minuten waren en de annealing curves niet dezelfde piek temperaturen laten zien moeten we concluderen dat er meer onderzoek nodig is naar deze primerset (PW1_fast) en dat we monsters nodig hebben met een veel hogere concentratie aan pathogenen. Daarnaast waren de monsters niet ter plekke gelyseerd, maar op het lab hetgeen niet goed is omdat er tijdens transport het DNA van de pathogenen wordt afgebroken.

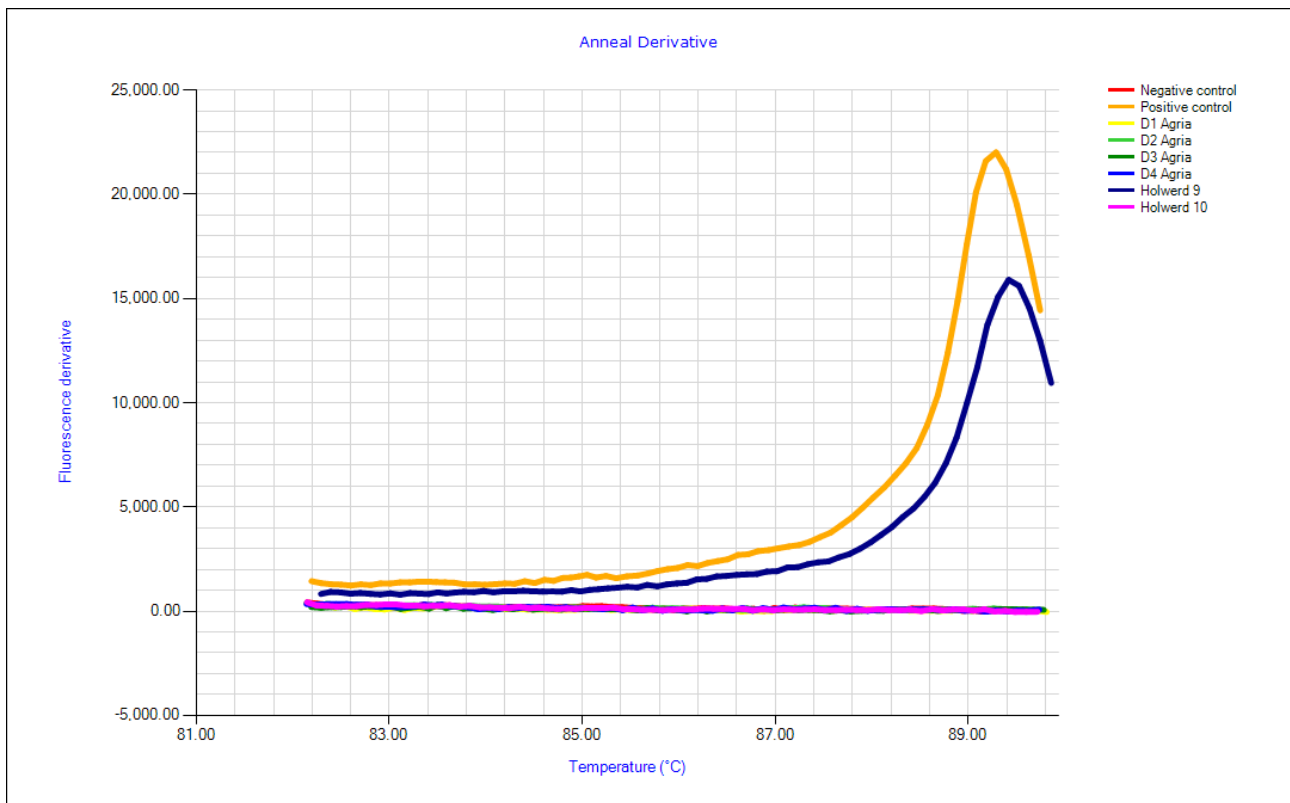
Tests op *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Brasiliense*.



Enkele tests op *P. carotovorum* subsp. *Brasiliense* met *pcb1_fast* primerset.

De positieve controle bevatte 20 pg controle DNA.

We zien dat Holwerd 9 (buis 9 overgang lucht/grond veld B) een sterk positief signaal afgeeft en de miniknol (buis 10) niet.



Annealing curve geeft aan dat het positieve signaal van buis 9 goed overeen komt met de positieve controle: Geen mutatie van pathogeen en gedetecteerde pathogeen komt dus goed overeen met de pathogeen waarvoor de test is ontwikkeld.

Conclusie & Discussie

We hebben een aantal LAMP testen ontwikkeld voor *Pectobacterium carotovorum subsp. Brasiliense* en *Pectobacterium parmentieri*. De resultaten van de veldtesten staan in de bijlage.

De cruciale DNA sequenties zijn gevonden om testen mee te ontwikkelen. Deze sequenties zijn gecontroleerd via blast analyses op cross reactiviteit en detecteren geen andere pathogenen. We zijn daar happy mee.

Met behulp van deze sequenties zijn diverse primer sets ontwikkeld en uit getest. We hebben gemerkt dat de concentratie aan pathogeen DNA van groot belang is in de positieve monsters. De meeste monsters zijn op het lab gelyseerd omdat het in het veld niet goed te doen viel om het ter plekke te liseren. We hebben de monsters moeten koelen in koelboxen. Helaas is dit geen goede methode gebleken. Het moet echt ter plekke worden gelyseerd. Daarom weten we niet voor 100% zeker of de primersets perfects zijn.

Daarnaast is gebleken dat herhaaldelijk de diepgevroren lysaten te ontdooien om testen mee te doen niet bevorderlijk is voor de kwaliteit van de monsters. We moeten dit in de toekomst zoveel mogelijk voorkomen. Maar dat opgeschreven te hebben, hebben we geen problemen gezien met monsters waar veel pathogeen DNA in zat (zoals buisje 9 uit Holwerd).

Een alternatief kan zijn om FTA papier te gebruiken om monsters of lysaten van monsters te bewaren. We hebben hiermee wel geëxperimenteerd, maar omdat we kwalitatief slechte monster hadden konden we er niets mee.