

Kwantitatieve toets voor Agrobacterium rhizogenes

20 juli 2012





Kwantitatieve toets voor Agrobacterium rhizogenes

Opdrachtgever: **Productschap  Tuinbouw**

Looptijd project: september 2011 – maart 2012

COLOFON:

Contactpersoon: Adriaan Vermunt

Adres: Groen Agro Control
Distributieweg 1
2645 EG Delfgauw
Tel: 015 2572511
Fax: 015 2572522

Datum: 20 juli 2012
Titel Rapport: Kwantitatieve toets voor Agrobacterium rhizogenes
Opdrachtgever: Productschap Tuinbouw
PT projectnummer: 14515
Kernwoorden: Overmatige wortelgroei, crazy roots, Agrobacterium rhizogenes, kwantitatieve toets, PCR.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgevers.



INHOUDSOPGAVE

	pagina
INHOUDSOPGAVE	3
SAMENVATTING	4
1. INLEIDING	5
2. PLAN VAN AANPAK	6
2.1 Verzamelen van DNA-gegevens	6
2.2 Ontwikkelen van primers voor de kwantitative toets	6
2.3 Ophoping van bacteriën	7
2.4 Verschillende typen monsters	7
3. RESULTATEN	8
3.1 Specificiteit toets	8
3.2 Kwantificering toets	9
3.3 Bio-qPCR-toets	10
3.4 Detectielimiet toets	11
3.5 Verschillende typen monsters	11
4. CONCLUSIES	11



SAMENVATTING

Om te bepalen hoe hoog de infectiedruk is van de bacterie *Agrobacterium rhizogenes* in water-, substraat- en wortelmonsters heeft Groen Agro Control een kwantitatieve toets ontwikkeld. Deze bacterie veroorzaakt overmatige wortelgroei (crazy roots) in vruchtgroenten, zoals tomaat, aubergine en komkommer. Voor deze toets is gebruik gemaakt van real-time PCR. Dit is een DNA-techniek waarmee micro-organismen gekwantificeerd kunnen worden. Met deze toets kan de infectiedruk in uitgangswater, drainwater, substraat of in de wortels zelf bepaald worden. Zodoende kan de werking van diverse maatregelen tegen overmatige wortelgroei beter beoordeeld worden. Het ontwikkelen van deze toets is mede mogelijk gemaakt door Productschap Tuinbouw.



1 INLEIDING

Ziekteverwekker *Agrobacterium rhizogenes*

De ziekte overmatige wortelgroei in vruchtgroenten wordt veroorzaakt door een zeer besmettelijke bacterie, *Agrobacterium rhizogenes*. Deze bacterie heeft een cirkelvormige DNA-element (het Ri-plasmide) en kan een fragment hiervan aan de plant overdragen. Dit DNA-element verstoort de hormoonhuishouding in de plantwortels, met overmatige wortelgroei als gevolg.

Probleemstelling

Bij problemen met overmatige wortelgroei worden in de praktijk diverse maatregelen toegepast om de ziekte in het systeem en in de mat zo goed mogelijk onder controle te houden. Het is visueel niet duidelijk of de maatregelen daadwerkelijk effect sorteren, in de zin van het verlagen van de infectiedruk. Daarom is er behoefte aan een kwantitatieve toets voor *Agrobacterium rhizogenes* om de werking van de diverse maatregelen beter te kunnen monitoren in zowel de praktijk als in verder onderzoek naar middelen tegen de ziekte.

Doelstellingen

Verkrijgen van een mogelijkheid om de mate van besmetting met *Agrobacterium rhizogenes* kwantitatief vast te stellen in water, substraat en wortels.

Bestaande kennis

Vanaf het moment dat overmatige wortelgroei in Nederland is aangetroffen, is Groen Agro Control zeer nauw betrokken bij het onderzoek. Groen Agro Control had eerder al een gevoelige toets ontwikkeld om *Agrobacterium rhizogenes* aan te kunnen tonen in grond, wortels en water. Deze toets bevatte een verrijkingstap van de bacteriën met behulp van een specifiek groeimedium, gevolgd door een PCR detectie op de aanwezigheid van het Ri-plasmide. Het resultaat van die methode geeft aan of de besmettelijke bacterie die overmatige wortelgroei veroorzaakt al dan niet aanwezig is. Met deze methode kon echter niet vastgesteld worden wat de mate van besmetting is. Juist voor het vaststellen van de hoeveelheid aan bacteriën is dit onderzoek uitgevoerd. De methode die toegepast is, heet real-time PCR. Dit is een DNA-techniek waarmee micro-organismen gekwantificeerd kunnen worden.



2 PLAN VAN AANPAK

2.1 Verzamelen van DNA-gegevens

Voor het ontwikkelen van de kwantitatieve PCR toets zijn er eerst DNA-sequenties verzameld van verschillende stammen van *Agrobacterium rhizogenes*. Een DNA-sequentie is de volgorde van de bouwstenen van een stuk DNA. Sequenties zijn uit databanken gehaald.

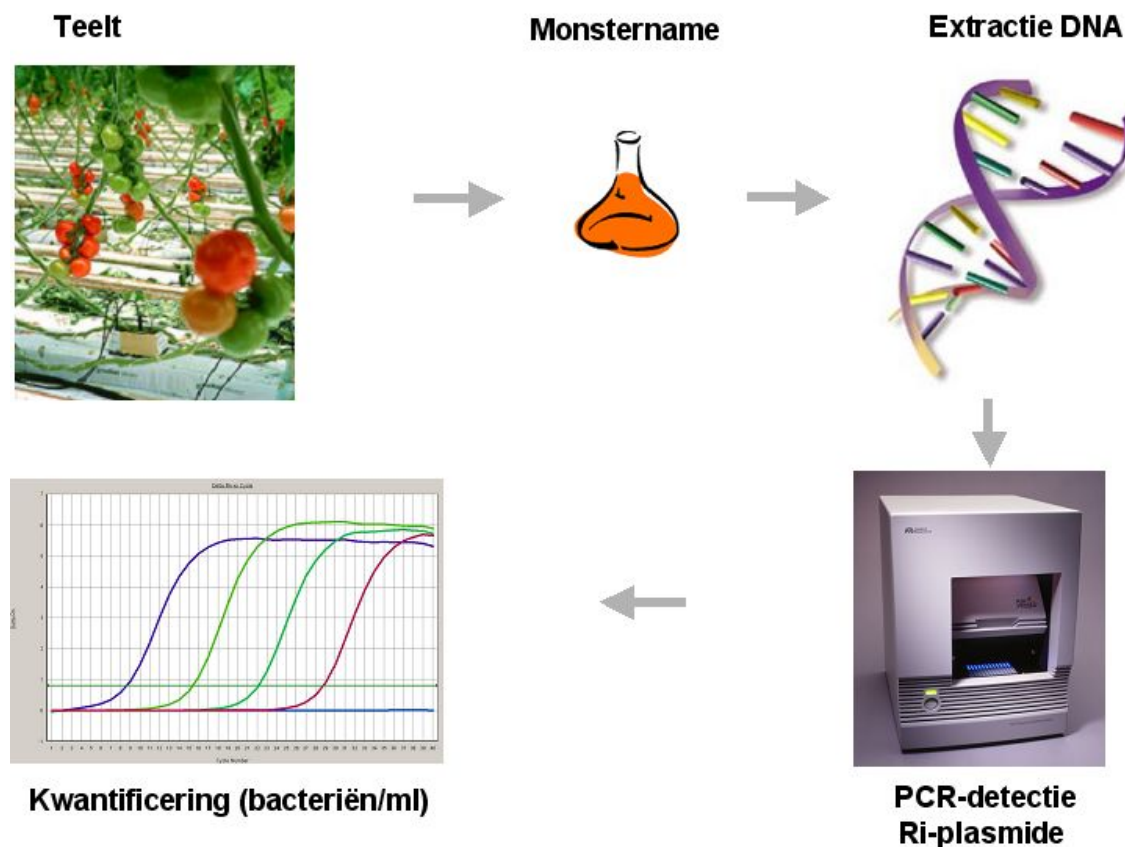


Fig. 1. Schematische weergave van de kwantitatieve real-time PCR toets voor *Agrobacterium rhizogenes*.

2.2 Ontwikkelen van primers voor de kwantitative toets

De *Agrobacterium* die voor overmatige wortelgroei zorgt, bezit een zogenaamd Ri-plasmide (Ri staat voor root-inducing). De kwantitatieve toets is gebaseerd op de detectie van dit plasmide. Voor de detectie en kwantificering met real-time PCR (Fig. 1) zijn primers ontwikkeld. Dit zijn kleine stukjes DNA die het DNA van een bepaald organisme herkennen en ervoor zorgen dat een specifiek DNA-fragment vermeerderd wordt. Met speciale software zijn de primers ontwikkeld die het Ri-plasmide herkennen van verschillende stammen en die daarnaast geen kruisreactie laten zien met andere organismen. Om te controleren of de primers inderdaad specifiek zijn en een DNA-fragment vermeerderen, is een validatie uitgevoerd op het



laboratorium. Met verschillende stammen van *Agrobacterium rhizogenes* dienen de primers positief te reageren. Groen Agro Control heeft hiervoor een isolaat uit een collectie gebruikt en tevens zijn er zeven isolaten uit de praktijk van verschillende bedrijven verzameld. Daarnaast moeten verschillende isolaten van *Agrobacterium tumefaciens*, andere bacteriën en gewassen waarin de bacterie voorkomt negatief reageren zodat getest kan worden of het optreden van vals positieven uitgesloten kan worden. Als de primers éénmaal specifiek zijn moeten ze eventueel aangepast worden zodat er ijklijnen mee gemaakt kunnen worden met bekende hoeveelheden bacteriën. Als er vervolgens in de praktijk een monster genomen wordt met een onbekende hoeveelheid *Agrobacterium rhizogenes*, kan hierop een analyse uitgevoerd worden. Aan de hand van het signaal kan uit de ijklijn afgeleid worden hoeveel bacteriën in het monster aanwezig waren.

2.3 Ophoping van bacteriën

Om de gevoeligheid te verbeteren zullen aanwezige bacteriën in een monster eerst opgehoopt worden in een specifiek groeimedium. Om zowel gevoelig te meten als goed te kunnen kwantificeren, zullen de condities van het ophopen geoptimaliseerd moeten worden. Variaties zijn er aangebracht in de parameters groeimedium, temperatuur en tijd.

2.4 Verschillende typen monsters

Verschillende soorten monsters zijn getest om te controleren of hiermee goed gekwantificeerd kan worden, zoals mat-, drain- en bassinwater, slib, grond en wortels.



3 RESULTATEN

3.1 Specificiteit toets

Verschillende primers zijn ontwikkeld voor de detectie van het Ri-plasmide. Voordat de primers gesynthetiseerd werden, zijn ze gecontroleerd met een software programma of ze niet kruisreageren met andere organismen in databases. Degenen die geen kruisreactie lieten zien, zijn gesynthetiseerd en getest op het DNA van verschillende micro-organismen. In totaal zijn 10 primer sets getest. Eén primer set kwam tijdens het testen het beste naar voren. Deze primer set detecteert alle geteste isolaten van *Agrobacterium rhizogenes* en reageert niet met andere bacteriën en schimmels (Fig. 1). Tevens reageren deze primers niet met het DNA van gezonde wortels van tomaat, komkommer, aubergine en roos.

Tabel 1. Specificiteit primers in real-time PCR toets, getest op verschillende micro-organismen. +, positieve reactie; -, negatieve reactie.

Getest micro-organisme	Resultaat
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> , referentie Groen Agro Control	+
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> , 7 isolaten uit praktijk van verschillende bedrijven, verzameld in 2011.	7x +
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-
<i>Pseudomonas cattleyae</i>	-
<i>Xanthomonas fragariae</i>	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	-
<i>Bacillus</i> sp.	-
<i>Fusarium</i> sp.	-
<i>Cylindrocarpon scoparium</i>	-

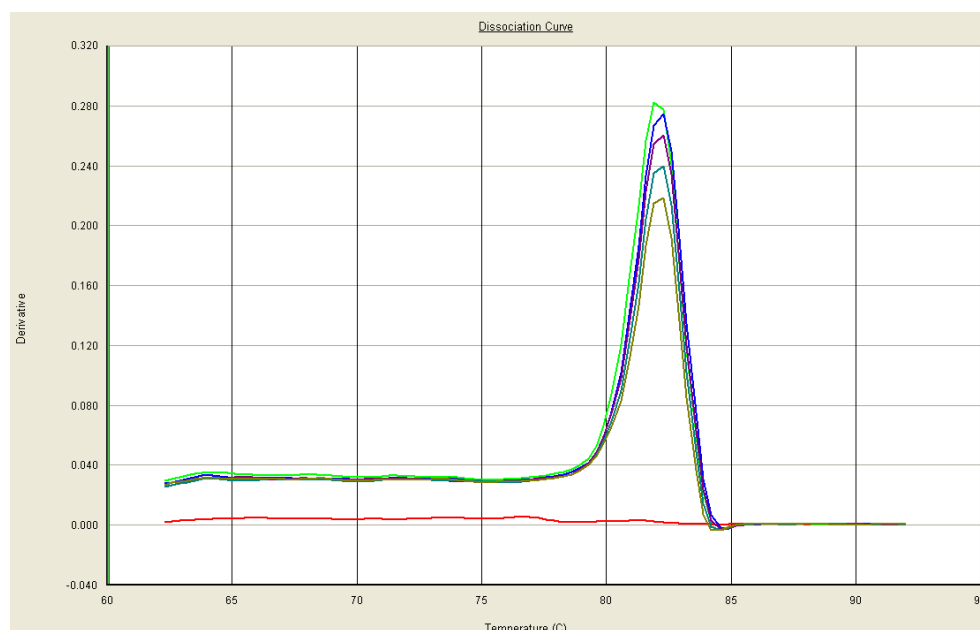


Fig. 2. Smeltcurves van PCR-producten van verschillende isolaten van *Agrobacterium rhizogenes*. De rode lijn is een negatieve water controle.



In de real-time PCR laten de smeltcurves van de PCR-producten van alle isolaten pieken zien die over elkaar heen vallen. Een blanco monster laat geen piek zien (rode lijn, Fig. 2). Dit resultaat toont aan dat er geen tot weinig aspecifieke ruis is en dat er een concreet PCR-product is vermeerderd tijdens de real-time PCR run.

3.2 Kwantificering toets

Om te controleren of de primers geschikt zijn om *Agrobacterium rhizogenes* te kwantificeren zijn verschillende verdunningen gemaakt van het DNA van deze bacterie en getest in het real-time PCR programma. In Fig. 3 en 4 is goed te zien dat bij elke 10x-verdunning de curve 3 tot 4 cycli opschuift. Dit betekent dat kwantificering goed mogelijk is.

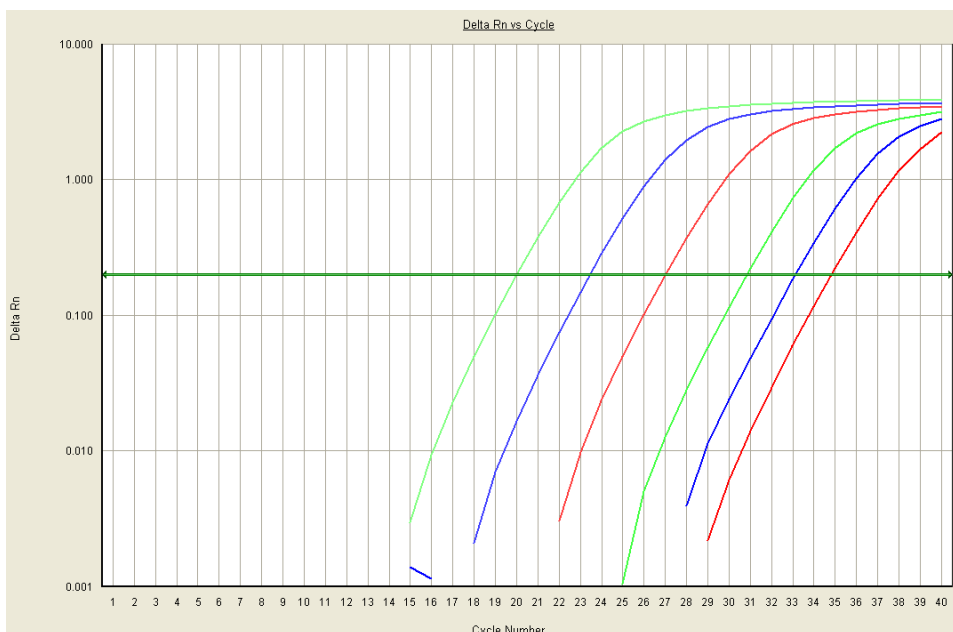


Fig. 3. Amplificatiecurves van 10-verdunningen van het DNA van *Agrobacterium rhizogenes*.

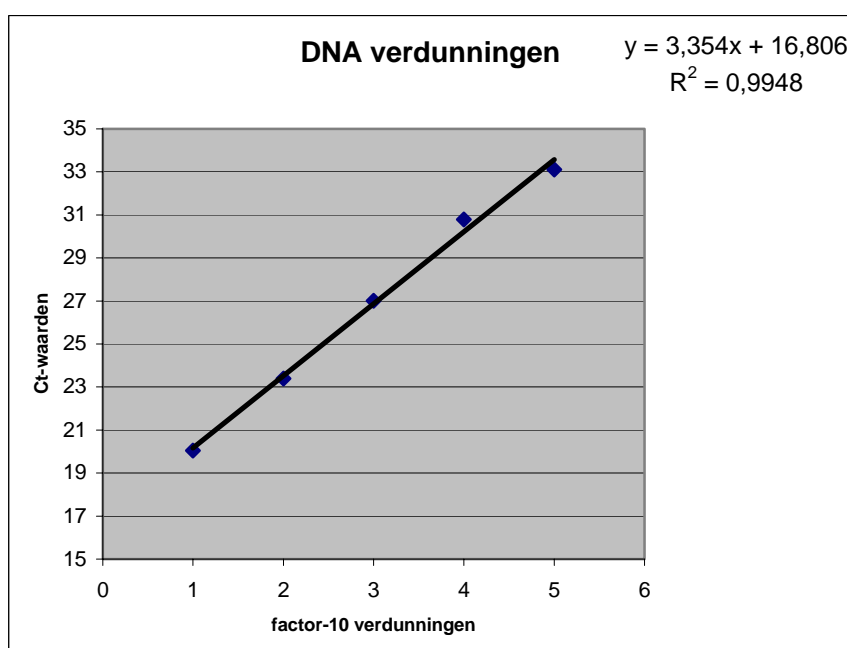


Fig. 4. Real-time PCR ijklijn van verschillende verdunningen van het DNA van *Agrobacterium rhizogenes*.



Tevens is er een ijklijn gemaakt van bekende hoeveelheden bacteriën. In Fig. 5 zijn de Ct-waarden (aantal cycli waarbij de amplificatiecurve door de threshold gaat) uitgezet tegen de hoeveelheid bacteriën (in een logaritmische-schaal).

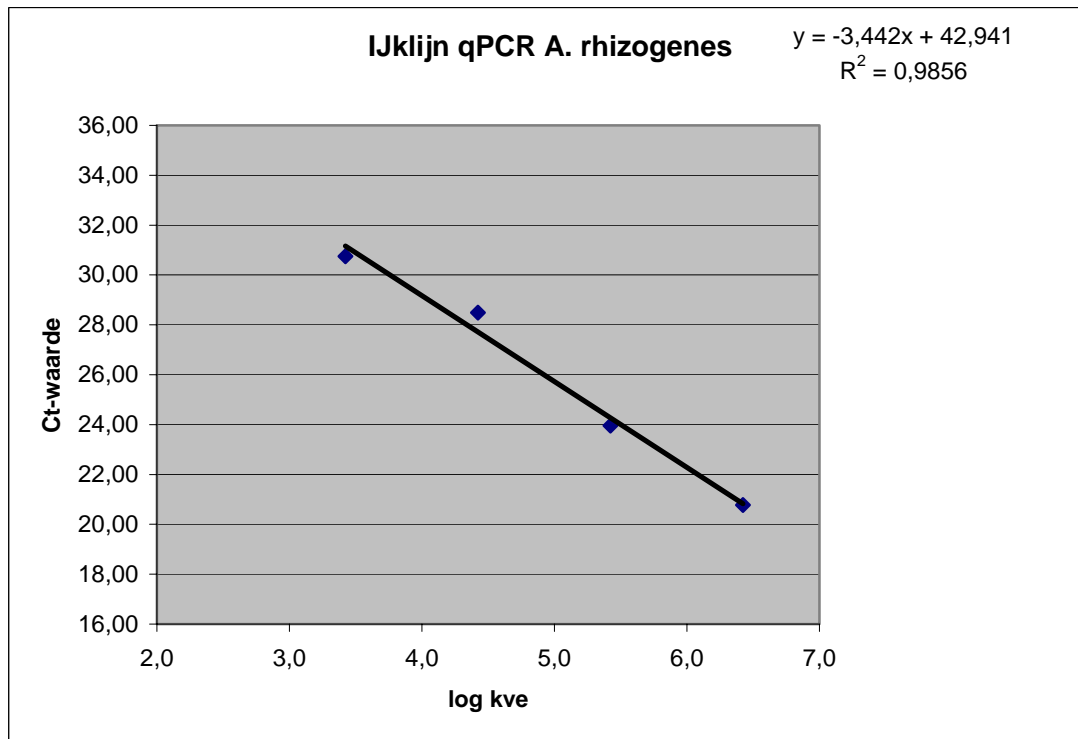


Fig. 5. real-time PCR ijklijn van verschillende aantallen bacteriën van *Agrobacterium rhizogenes*. Elk punt is de gemiddelde waarde van een duplo-meting.

Met behulp van deze ijklijn kan na een real-time PCR analyse van een monster met onbekende hoeveelheid bacteriën, vastgesteld worden hoeveel bacteriën *Agrobacterium rhizogenes* aanwezig zijn in het monster.

3.3 bio-qPCR-toets

Er is ook geprobeerd om een kwantitatieve bio-PCR te ontwikkelen. Hierbij worden de aanwezige bacteriën in een monster eerst opgekweekt en daarna gedetecteerd in een real-time PCR-toets. Hiervoor zijn dezelfde primers gebruikt als in de kwantitatieve PCR-toets zonder ophoping. Als met verschillende hoeveelheden bacteriën gestart werd, was het niet mogelijk om na ophoping een goed lineair verband vast te stellen. Er zijn verschillende voedingsmedia, groeitemperaturen en groeitijden getest. In sommige gevallen was de ophoping nog niet goed op gang gekomen en werd er niets gemeten. In andere gevallen was de ophoping goed op gang gekomen en waren er nauwelijks verschillen aan te tonen na ophoping. De reden hiervan is dat de groei eerst exponentieel verloopt waarna die in een verzadiging terecht komt. Uit de experimenten is gebleken dat het moeilijk is om de juiste ophopingscondities te vinden waarbij er een lineair verband is tussen de hoeveelheid bacteriën waarmee de ophoping gestart werd en de hoeveelheid bacteriën aan het eind van de ophoping



3.4 Detectielimiet toets

De detectielimiet waarmee nog bacteriën gedetecteerd kunnen worden met de kwantitatieve toets ligt op ongeveer 1000 bacteriën. De gevoeligheid van de bio-PCR toets is groter. Hierbij ligt de detectielimiet op ongeveer 25 bacteriën. De meest gevoelige toets is dus de bio-PCR toets, echter hiermee kan alleen aangetoond worden of een monster wel of niet besmet is. De kwantitatieve toets is minder gevoelig, maar hiermee kunnen dus wel hoeveelheden aangetoond worden. Ter vergelijking, typische concentraties in de praktijk zijn: in matwater miljarden bacteriën per ml van allerlei soorten bacteriën, in drainwater miljoenen bacteriën per ml van allerlei soorten. In planten die overmatige wortelgroei laten zien, kunnen miljoenen bacteriën *Agrobacterium rhizogenes* in één gram wortels zitten. Drainmonsters uit een besmette teelt kunnen 10.000 bacteriën *Agrobacterium rhizogenes* in 100 ml water bevatten.

3.5 Verschillende typen monsters

De kwantitatieve toets kan men uitvoeren op verschillende typen monsters, zoals water, wortels, substraat en grond. Voor de verschillende typen monsters worden verschillende voorbereidingsstappen en DNA-extractieprotocollen toegepast. De real-time PCR toets zelf is bij alle typen monsters hetzelfde. De verschillende typen monsters lieten na het uitvoeren van de bijbehorende protocollen geen verstoringen zien in de resultaten.

4 CONCLUSIES

- Er is een kwantitatieve toets ontwikkeld voor de bacterie *Agrobacterium rhizogenes*.
- Deze toets kan ingezet worden om de infectiedruk te bepalen in water-, substraat- en wortelmonsters.