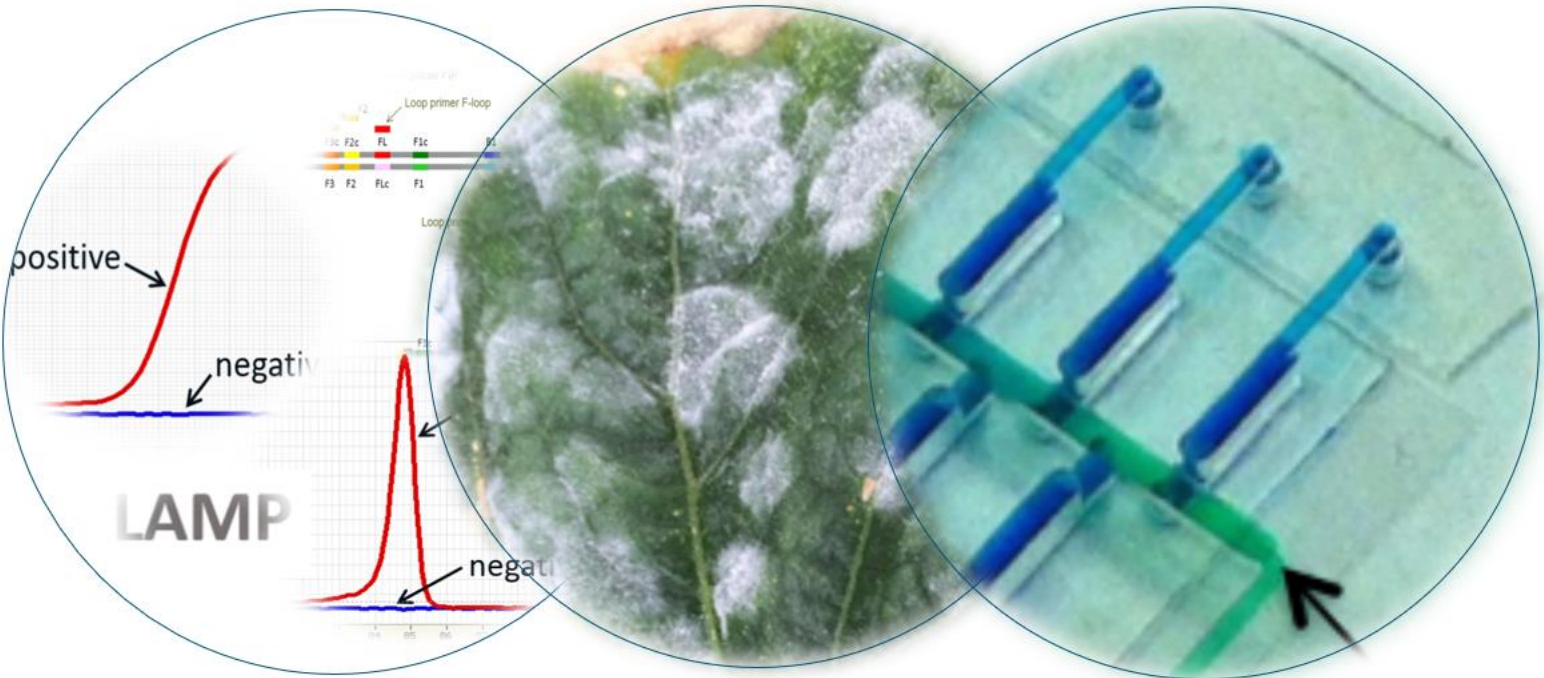
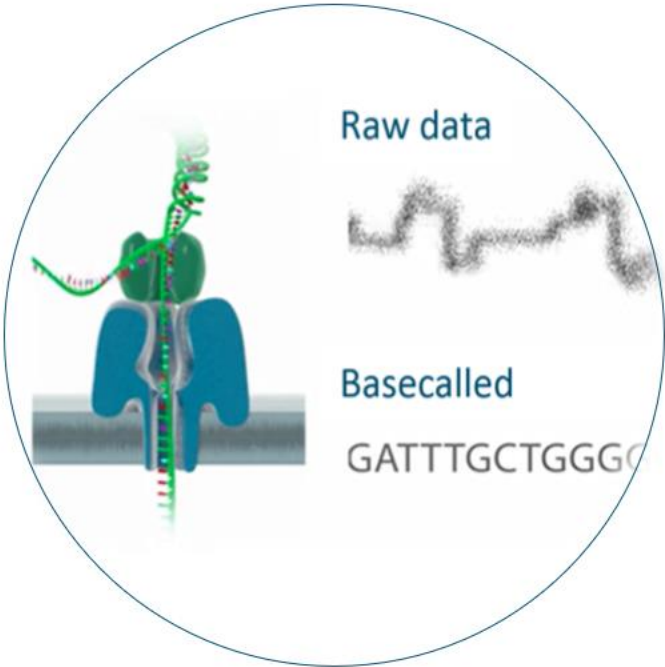


On-site detectiemethoden voor verbetering van plant gezondheid en fyto-sanitaire inspectie

Cor Schoen
Biointeractions & Plant Health





Voor het succes van quarantaine-inspanningen bij een pandemie is het cruciaal om de ziekte verwekker op een eenvoudige wijze te detecteren

Snelle coronatest

- De huidige PCR coronavirus-tests zijn tijdrovend / complex
- Testresultaten worden binnen 24-48 uur bevestigd
- Nieuwe testmethode is gebaseerd op de LAMP
- Monsterverzameling / resultaten gecondenseerd tot 45 minuten

Werking van de test

- Monsters uit de neus/mond worden in een reageerbuis gedaan
- Iedereen kan ter plaatse wachten op de uitslag
- Aanzienlijk lagere kosten

PCR



24 - 48 UUR

LAMP TESTMETHODE

45 MIN



NIEUWE TESTMETHODE

€

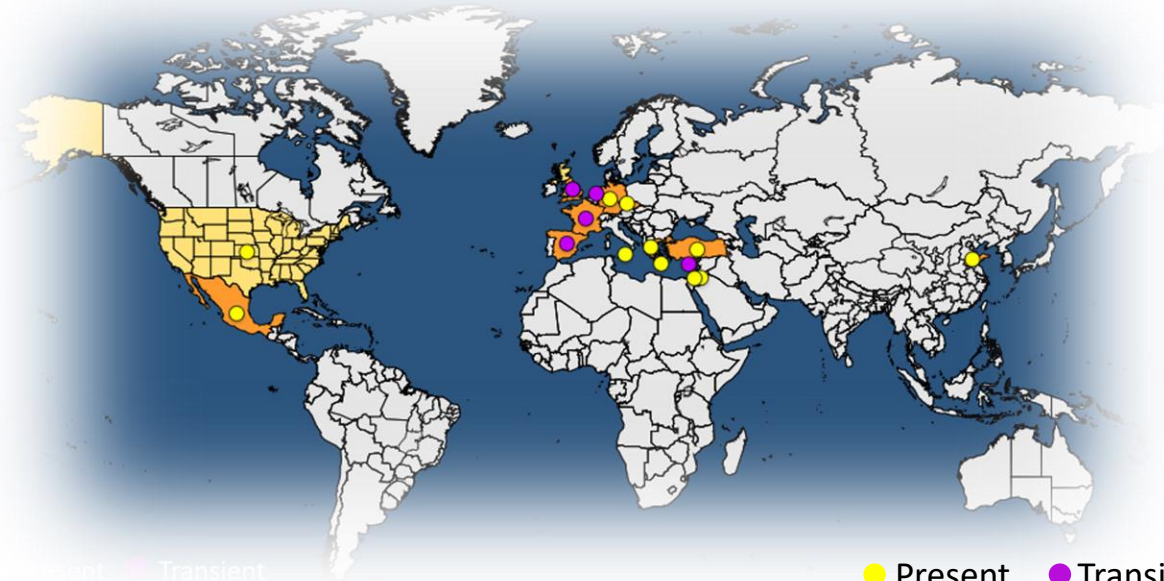
PCR

€€€

Internationaal vervoer van planten

Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) is een **nieuw geïdentificeerd virus dat tomaat en mogelijk verwanten aantast.**

ToBRFV verscheen voor het eerst in 2014 in Israël. Sindsdien is het in verschillende andere landen verschenen.



● Present ● Transient

Internationaal vervoer van planten



Maersk Mc Moller: 18,270 containers!

Inspecties zijn niet efficiënt:

- Het enorme volume van de handel in planten overtreft de inspectiecapaciteit
- Inspecties zijn gericht op bekende quarantaine-organismen
- Symptomen zijn niet altijd duidelijk - afhankelijk van de omstandigheden

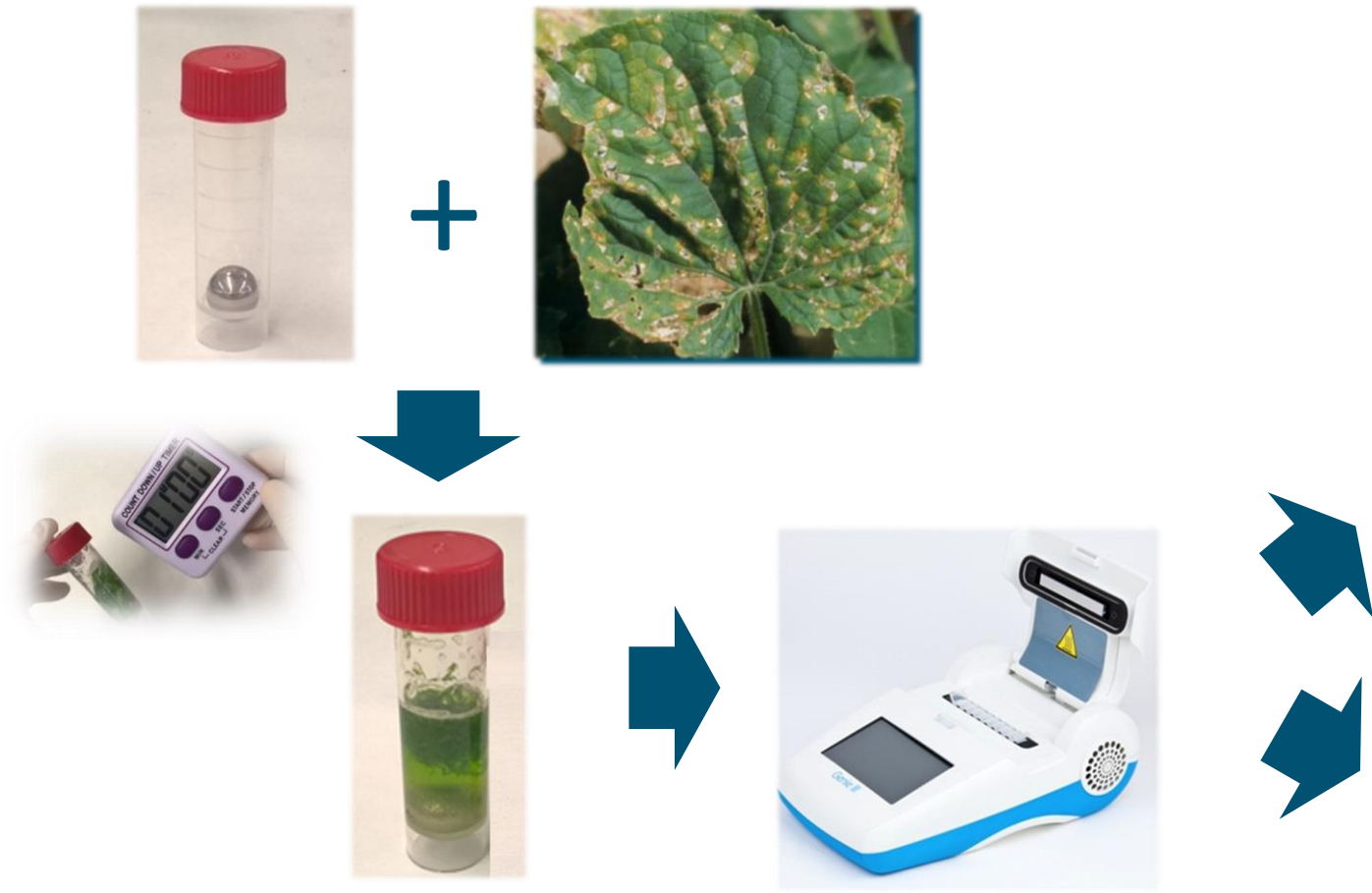
Wageningen Universiteit and Research ontwikkelt robuuste en eenvoudige tests op locatie die de reikwijdte van controle en inspectie uitbreiden tot buiten geavanceerde laboratoria

Waarom Loop mediated **AMPL**ification (LAMP)

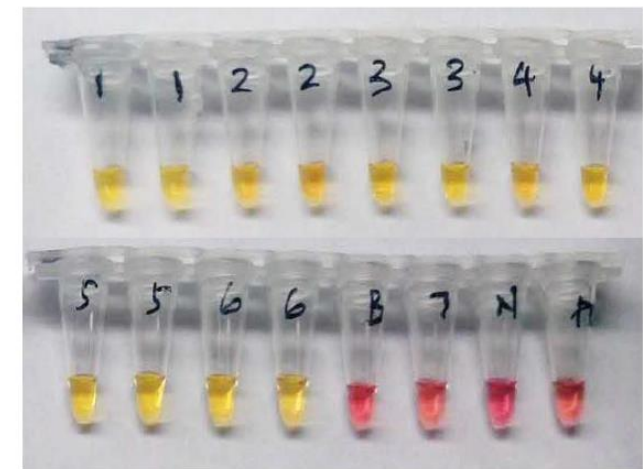
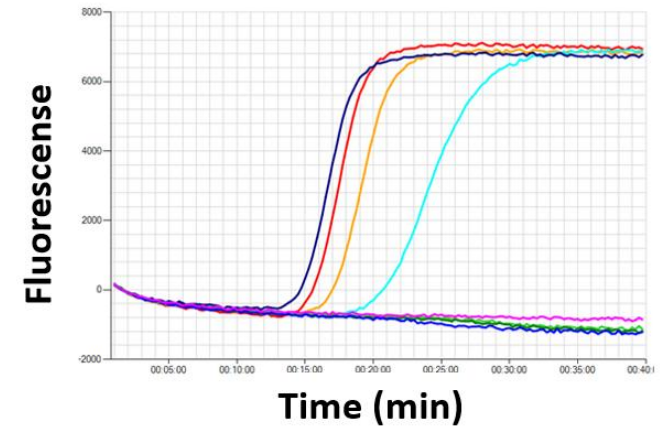
- Korte reactietijd (ongeveer 30 minuten), waardoor snelle beslissingen mogelijk zijn
- Gevoeligheid en specificiteit zijn vergelijkbaar met laboratoriumgebaseerde methoden (real-time PCR)
- Geen temperatuurr cycli = eenvoudige apparatuur
- Tolerantie voor remmers = ruwe extractiemethoden
- Eenvoudige extractiemethoden verkleinen de kans op fouten
- Hoge versterkingsefficiëntie vereenvoudigt interpretatie van resultaten (duidelijk +/-)

Amplificatie van plantpathogenen in ruwe plantenextracten

Hoe werkt detectie ter plaatse



Results 20-30 min

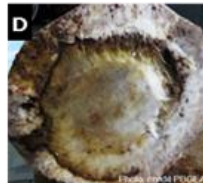


Colorimetric LAMP

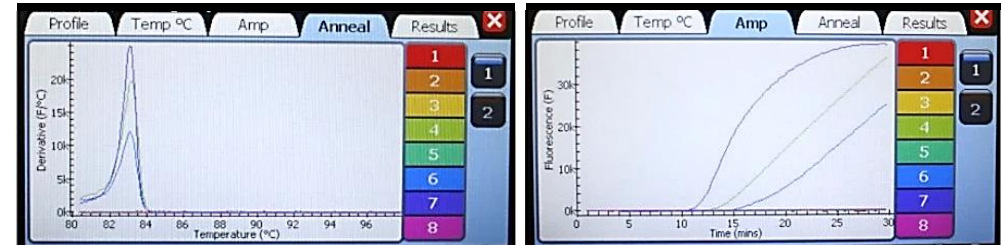
LAMP: Applicaties

Fusarium in banaan

Foc TR4 verwoesting in de Filippijnen



Ziekte symptomen na 2-9 maanden



LAMP: Applicaties

Evaluatie van de LAMP-technologie voor *Thrips palmi*-detectie op de luchthaven van Zürich



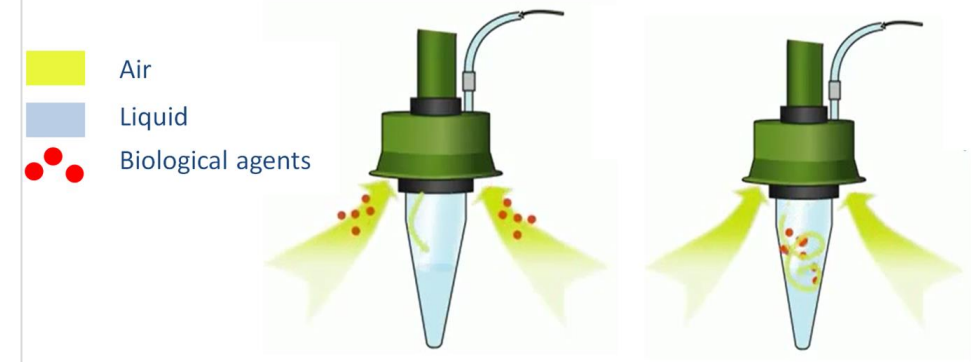
LAMP: Applicaties

LAMP luchtmonsterdetectie van *Acidovorax cattleya*

Experimentele opstelling:

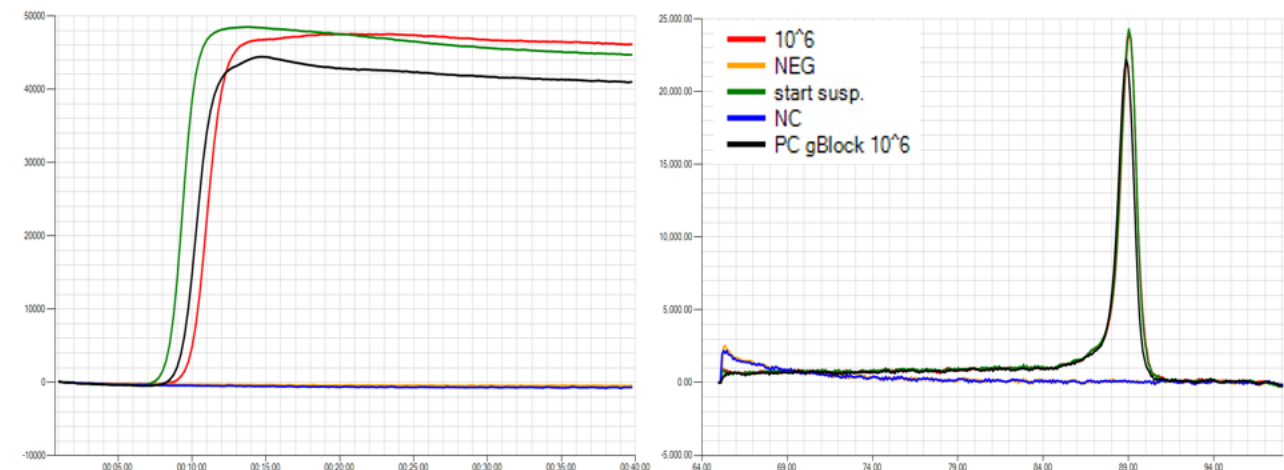
- Bevochtiger
- Coriolis μ lucht monsternemer:
 - 5 minuten
 - 300 L / min
 - 5 mL of 0.1 x TE buffer
 - 5 μ l in LAMP reactie

Corioles tech: microbiële sporen van schimmels en bacteriën worden gevangen in oplossing



Monsters: *Acat*-celsuspensie 10^6 en 0 cellen/ml

| | Tpos (min) | Tm (°C) |
|-------------|------------|---------|
| 10^6 | 10:45 | 89.0 |
| NEG | - | - |
| start susp. | 9:15 | 89.0 |
| NC | - | - |
| PC (gBlock) | 10:00 | 88.9 |

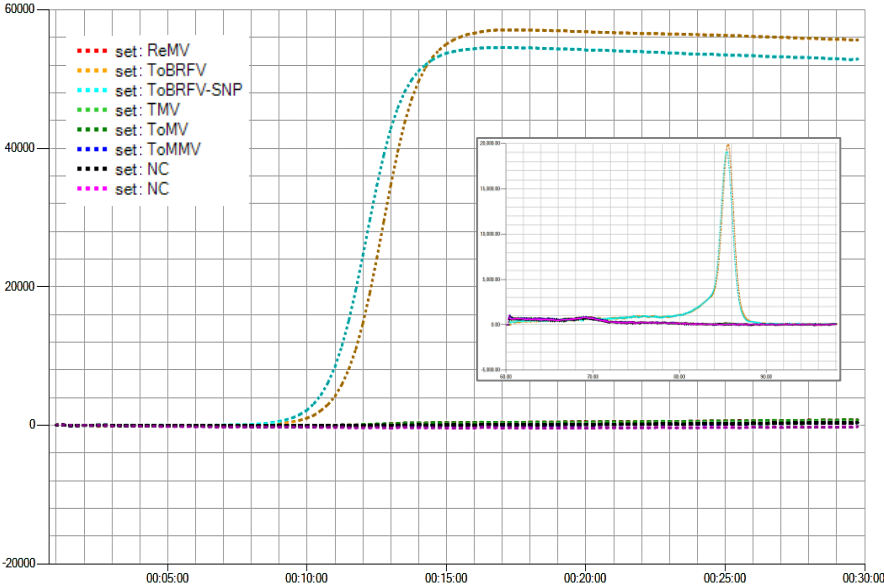


LAMP: Applicaties

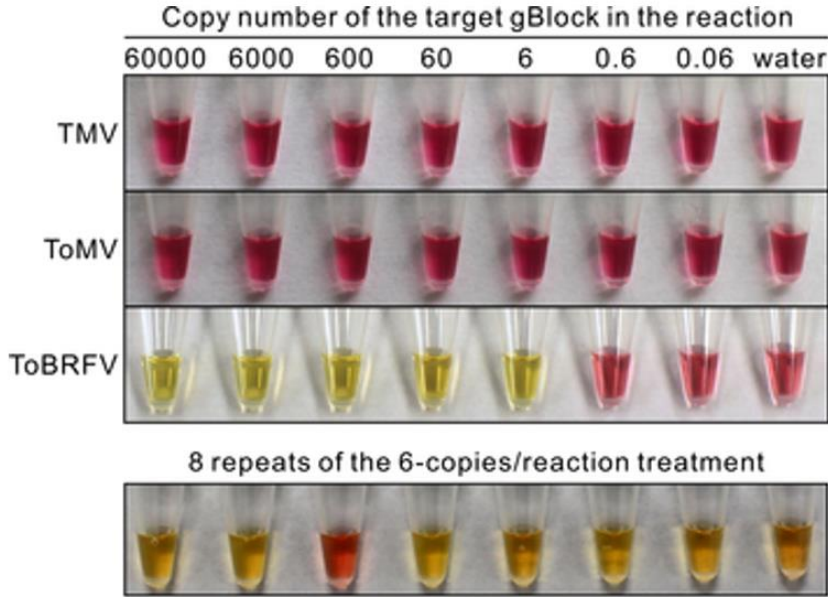
ToBRFV LAMP ontworpen op gebied dat internationaal gebruikt wordt voor TaqMan PCR

Getest op gBlocks (10⁶ kopieën/μl)

| | TBRFV LAMP set | |
|------------|----------------|---------|
| | Tpos (min) | Tm (°C) |
| ReMV | - | - |
| ToBRFV | 12:15 | 85.6 |
| ToBRFV_SNP | 11:45 | 85.4 |
| TMV | - | - |
| ToMV | - | - |
| ToMMV | - | - |
| NC | - | - |
| NC | - | - |

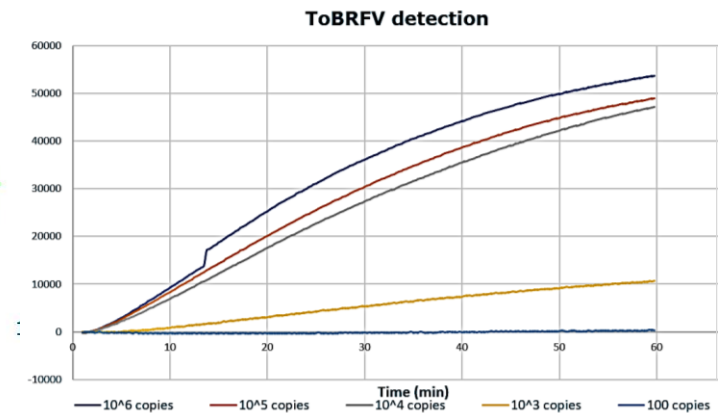
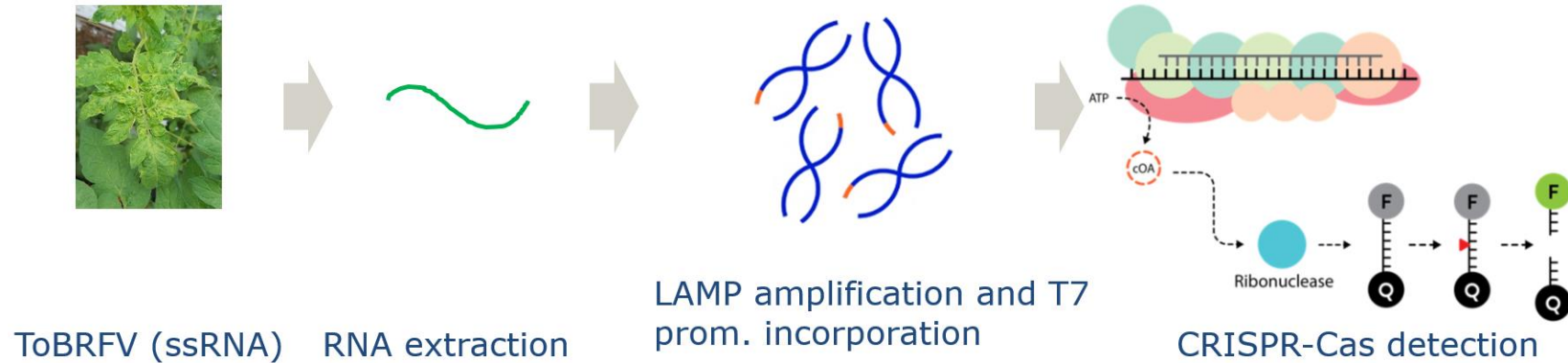


Eindpuntmeting door kleuring



LAMP: Applicaties

LAMP + CRISPR-CAS ToBRFV-detectie in één buis



ToBRFV detectie met een gevoeligheid van 100-1000 kopieën (aM-bereik)

LAMP: Applicaties

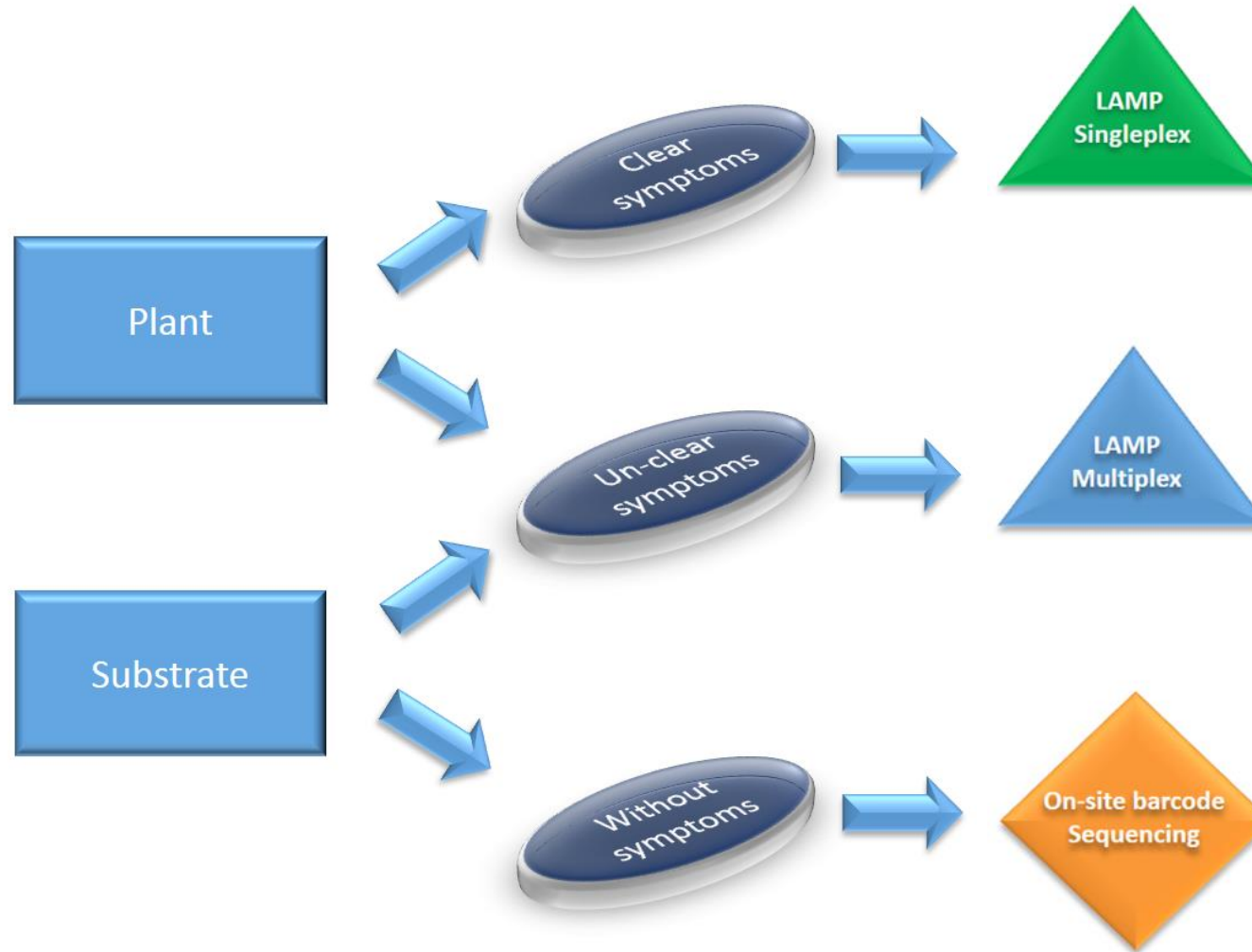
LAMP's die ontwikkeld zijn binnen
Publiek-privaat partnerschap voor
onderzoek en innovatie (PPS)
(2015 -2018)

| LAMP assay | Pathogen |
|------------|---|
| 1 | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> |
| 2 | <i>Acidovorax citrulli</i> |
| 3 | <i>Xanthomonas campestris campestris</i> and <i>Xanthomonas campestris raphani</i> |
| 4 | Pospiviroids |
| 5 | <i>Pseudomonas syringae</i> spp <i>peponis</i> |
| 6 | Tobamo viruses |
| 7 | Pepino Mosaic Virus (PepMV) |
| 8 | <i>Xanthomonas vesicatoria</i> / <i>euvesicatoria</i> / <i>gardneri</i> / <i>perforans</i> |
| 9 | <i>Thaumatotibia leucotreta</i> |
| 10 | <i>Helicoverpa armigera</i> |
| 11 | <i>Botrytis allii</i> / <i>B. aclada</i> |
| 12 | <i>Acidovorax cattleya</i> |
| 13 | <i>Ophiostoma ulmi sensu lato</i> |
| 14 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begonia</i> (<i>Xb</i>) |

Knelpunten bij on-site LAMP-detectie

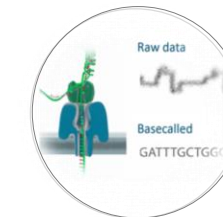
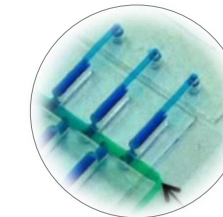
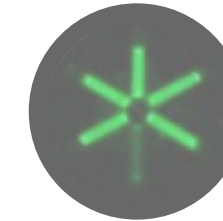
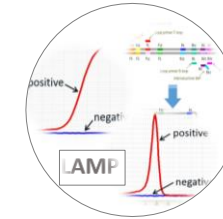
- Individuele LAMP-assays werken goed, maar wat te doen als het testresultaat negatief is
- Symptomen zijn niet altijd duidelijk en afhankelijk van de omstandigheden
- Situaties waarbij het niet duidelijk is welke ziekteverwekker een rol speelt (bijv. lucht, water etc.)
- Sommige pathogenen vertonen grote genomische variabiliteit

On-site methoden voor detectie van plantpathogenen



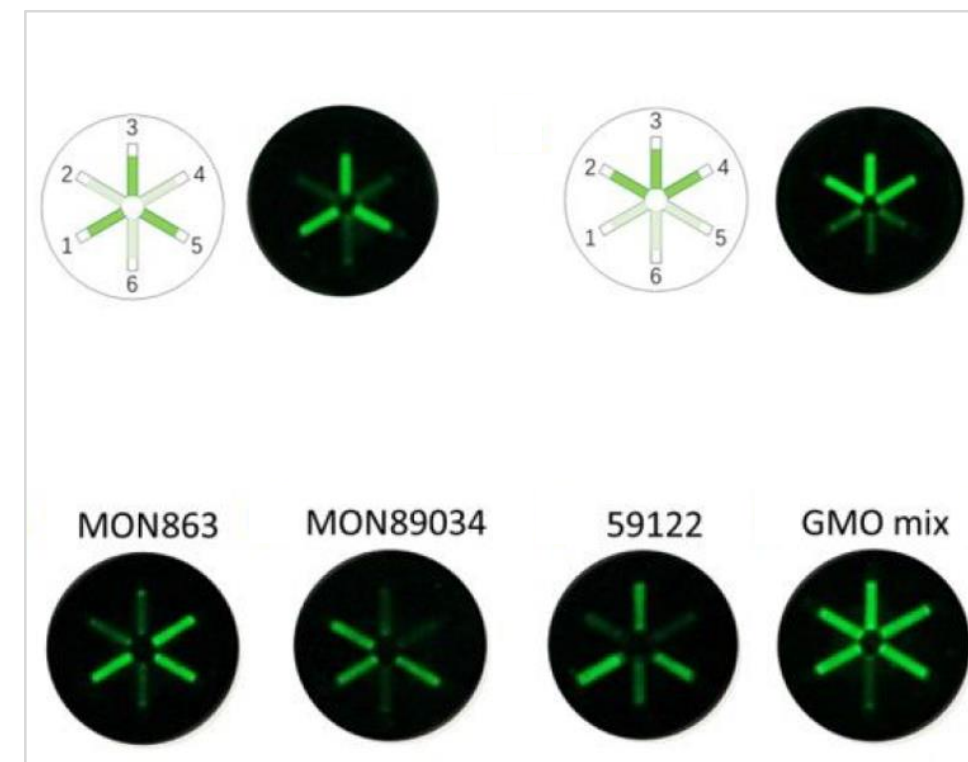
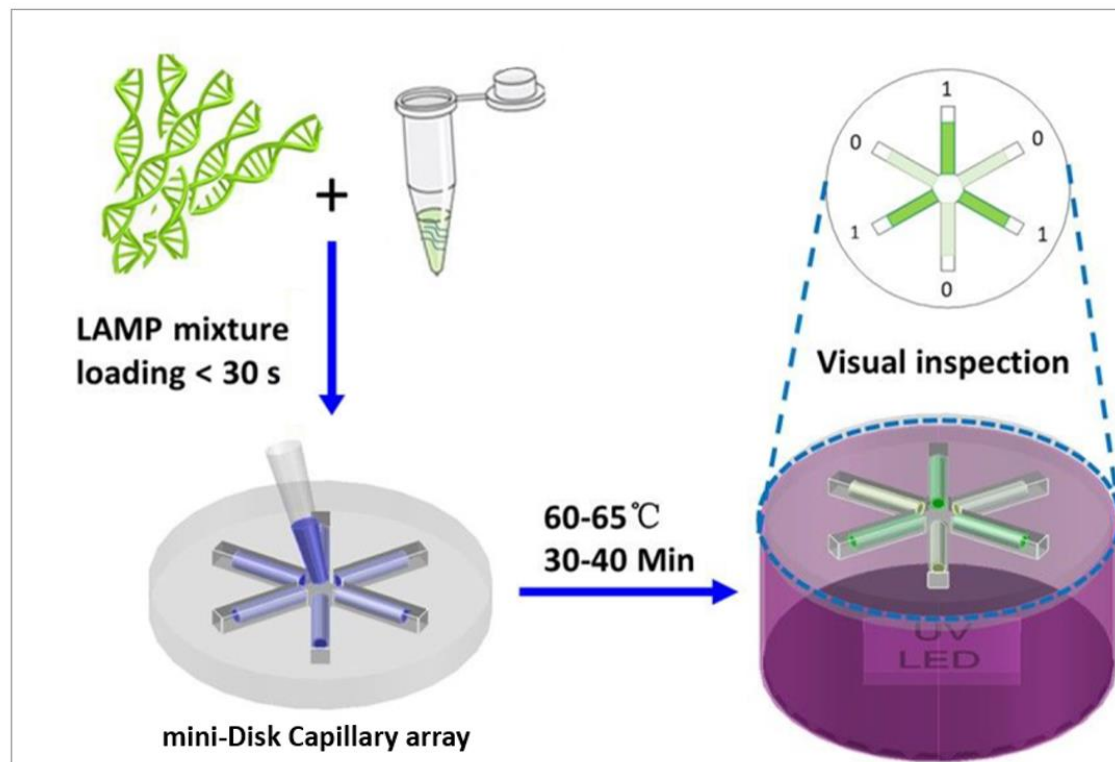
On-site methoden voor detectie van plantpathogenen

- **LAMP Multiplex-systemen**
 - Assimilatie probe detectie
 - Capillaire multiplexing
- **'dual' Multiplex-systemen**
 - RAMP (RPA / LAMP)
- **Oxford Nanopore barcode sequencing**



LAMP capillaire multiplexing

Een mini-disk capillaire array-koppeling met LAMP voor visuele detectie van DNA



Oxford Nanopore amplicon sequencing

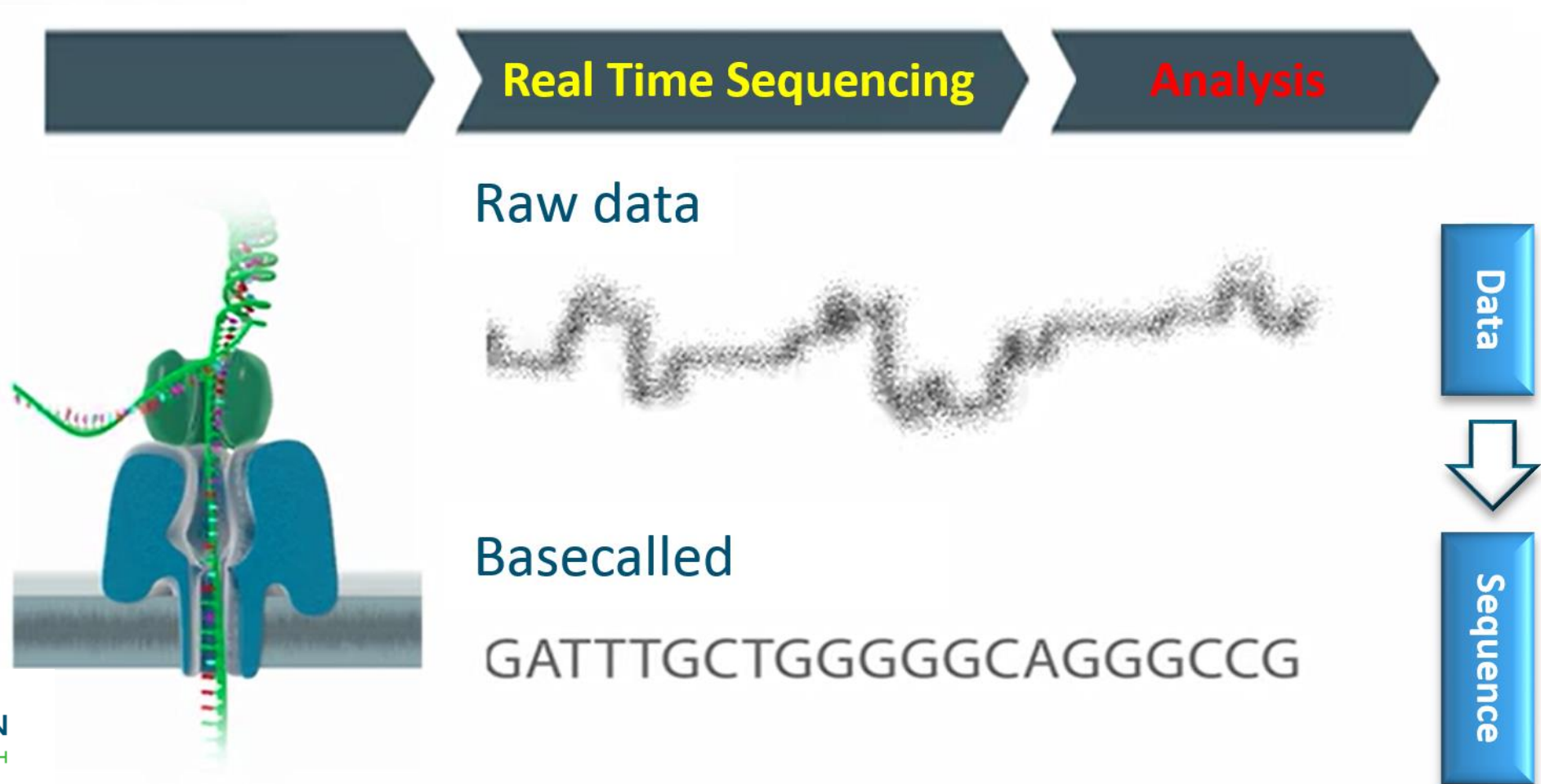
Amplificatie en amplicon-sequencing van verschillende specifieke DNA-gebieden (barcodes) van plantpathogenen

Oxford Nanopore sequencing

- Breed toepasbaar
- Snel
- Makkelijk 'on-site' te implementeren
- Minimale / eenvoudige uitrusting
- Er is weinig diepgaande bioinformatica-kennis nodig

Oxford Nanopore amplicon sequencing

Sequentiebepaling van verschillende specifieke DNA-gebieden van plantpathogenen

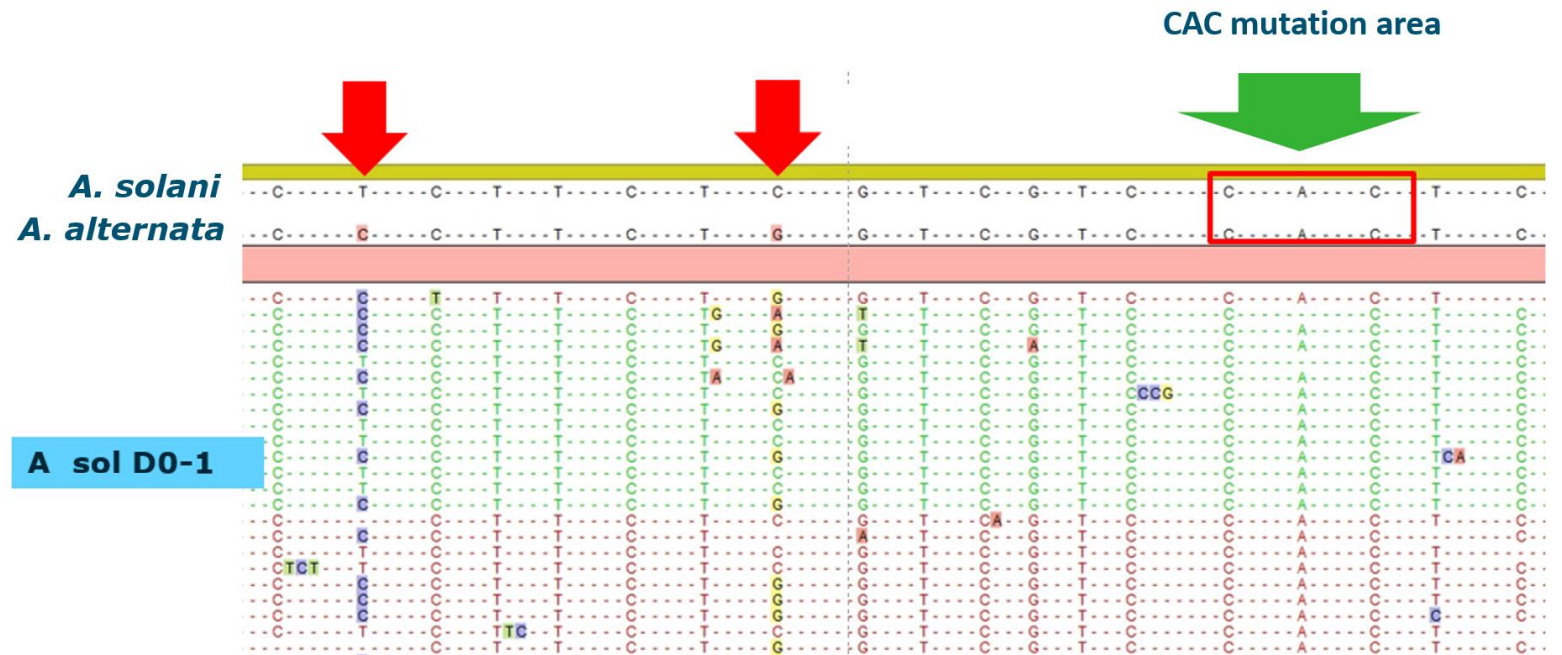


Oxford Nanopore amplicon sequencing

Sequentiebepaling van het SDHI-complex (3 genen) wordt gebruikt om *Alternaria solani* / *alternata*-pathogenen te onderscheiden en fungicideresistentie in symptomatisch aardappelblad te identificeren



Symptomatisch aardappelblad



Sequentiebepaling van het Sdh-complex kan worden gebruikt voor identificatie van *Alternaria solani* / *alternata*-fungicidenresistentie

Met dank aan

- WUR
 - BioInteractions and Plant Health
 - The laboratory of BioNanoTechnology
- Scope Biosciences
- Department of Mechanical Engineering and Applied Mechanics, University of Pennsylvania
- Shanghai Jiao Tong University
- Yvonne Griekspoor
- Viola Kurm
- Peter Bonants
- Cor Schoen
- Rosita Fratini
- Maurice Geurts
- Willem Stol
- Jurre Steens
- Bart Scholten
- Haim H. Bau
- Huiwen Bai
- Rong Li.
- Jianwei Chen
- Litao Yang

