

### 1.2.2 **Detectie, identificatie en tracering van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in uitgangsmateriaal**

Harrie Koenraadt, Co Bruin, Mark Buimer, Hedwich Teunissen en Jan Westerhof

Naktuinbouw, Sotaweg 25, 2370 AA Roelofarendsveen; e-mail: h.koenraadt@naktuinbouw.nl

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) is een belangrijk zaadoverdraagbaar pathogeen van tomaat. Zaden worden getoetst door zaadbedrijven en Naktuinbouw om de kans op zaadtransmissie te minimaliseren. Toetsmethodieken en kritische factoren zullen in de presentatie worden belicht. Verschillende toetsverbeteringen zijn recentelijk door zaadbedrijven en Naktuinbouw geïmplementeerd. Incidenteel ontstaan er toch klachten, waarbij het zaak is de bron van het primaire inoculum te traceren. Met behulp van AFLP- *fingerprinting* is het mogelijk om de mate van genetische verwantschap te bepalen tussen isolaten die geassocieerd zijn met een klacht. Tijdens het genetisch klachtenonderzoek wordt er gebruik gemaakt van isolaten uit symptomatische monsters enerzijds en isolaten vanaf zaad anderzijds. Resultaten uit de AFLP-studie zullen worden gepresenteerd en bediscussieerd.

Een belangrijke doelstelling is om klachten in de toekomst juist te voorkomen. Een nieuwe internationale samenwerking is recentelijk opgestart tussen zaadbedrijven, plantenkwekers en keuringsdienst en zal worden toegelicht in de presentatie.

### 1.2.3 **Biosensing – de noodzaak van snelle en gevoelige sensoren voor vroege detectie van gewasaantasting**

Roel Jansen<sup>1</sup>, Jan Willem Hofstee<sup>1</sup>, Jürgen Wildt<sup>3</sup>, Francel Verstappen<sup>2</sup>, Harro Bouwmeester<sup>2</sup>, Hans Smid<sup>4</sup> en Eldert van Henten<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Leerstoelgroep Agrarische bedrijfstechnologie, Wageningen Universiteit

<sup>2</sup>Plant Research International, Wageningen

<sup>3</sup>Forschungszentrum Jülich, Jülich, Duitsland

<sup>4</sup>Laboratorium voor Entomologie, Wageningen Universiteit

‘De vanzelfsprekendheid waarmee gewasonderzoekers met een sterk technologisch georiënteerde achtergrond ervan uitgaan dat geavanceerde meetinstrumenten essentieel zijn voor gewasbescherming is terecht’. Juist daarom doet de leerstoelgroep Agrarische bedrijfstechnologie, onderdeel van Wageningen Universiteit, onderzoek naar de mogelijkheid om *biomarkers* te detecteren welke informatie verschaffen over de status van een gewas. Dit onderzoek richt zicht specifiek op vluchtige *biomarkers* welke door planten worden afgescheiden na aantasting door een pathogeen.

Het modelsysteem waaraan gewerkt wordt is de interactie tussen het gewas tomaat en de schimmel *Botrytis cinerea*. Experimenten uitgevoerd in samenwerking met onderzoekers van het Forschungszentrum Jülich, Duitsland, hebben laten zien dat tomatenplanten na kunstmatige inoculatie verschillende chemische verbindingen waaronder (*Z*)-3-hexenol vrijlaten. Deze emissie is het resultaat van celwandschade als gevolg van de plant-pathogeen interactie. De concentraties van stoffen in de lucht zijn extreem laag; deze liggen in de orde van enkele nanogrammen per liter lucht. Preconcentratie en geavanceerde gaschromatografie, gekoppeld aan massaspectrometrie (GC/MS), is noodzakelijk voor detectie en identificatie van de *marker*-moleculen (Jansen *et al.*, 2008).

Met de GC/MS-techniek blijkt het dus mogelijk om op niet-invasieve wijze een beginnende aantasting van het gewas te detecteren. Dergelijke

detectie is belangrijk voor gewasbescherming omdat vroege opsporing van gewasaantasting een efficiënte bestrijding mogelijk maakt. Echter, de gebruikte techniek is zeer kostbaar en een meting duurt minimaal een uur. Een alternatief voor kostbare en relatief trage GC/MS-analyse is het gebruik van biosensoren. Een biosensor is een apparaat voor het opsporen van moleculen dat een biologische component als gevoelig element combineert met een fysicochemische uitlezing. In ons geval is gekeken naar de gevoeligheid van een biosensor voor de biomarker (Z)-3-hexenol. Deze biosensor maakt gebruik van een insectenantenne als biologische component. Hiervoor zijn antennes van de Coloradoever (*Leptinotarsa decemlineata*) gebruikt. De antennes worden verwijderd van het insect en vervolgens geplaatst tussen elektroden om op deze wijze de actiepotentialen te bepalen na blootstelling aan vluchtige componenten. Met behulp van deze elektrofysiologische techniek is een gevoelige en snelle responsie mogelijk.

Een groot voordeel van de gebruikte biosensortechniek is de prijs voor het sensorelement welke niet meer dan één euro bedraagt. Een probleem van dit type sensor is de korte levensduur van het sensorelement van slechts enkele uren. Een tweede moeilijkheid is de voortdurende noodzaak tot calibratie, omdat de gevoeligheid sterk fluctueert binnen een kort tijdsbestek. Deze calibratie is verder essentieel omdat de biologische component grote variatie vertoont in gevoeligheid, wat de reproduceerbaarheid van meetresultaten bemoeilijkt. In theorie kan de toepassing van biosensoren het gebruik van kostbare GC/MS-analyse vervangen. Tot nu toe worden biosensoren vooral voor medische diagnostiek gebruikt. Ook bij de analyse van voeding zijn de eerste toepassingen ontwikkeld en zijn de verwachtingen hooggespannen. Met het vooruitzicht van vroege niet-invasieve detectie van plantaantasting zijn biosensoren dan ook binnen de gewasbescherming een interessante ontwikkeling.

### Referenties

Jansen, R.M.C., Hofstee, J.W., Verstappen, F., Bouwmeester, H.J. & Henten, E.J. van, 2008. A method to detect baseline emission and plant damage induced volatile emission in a greenhouse. *Acta Horticulturae* (in druk).

## 1.2.4

### **Detectie vroeger, nu en in de toekomst**

Peter Bonants en Cor Schoen

*Plant Research International (PRI), Wageningen*

Gezond uitgangsmateriaal is van eminent belang voor de land- en tuinbouw. Om de aan- of afwezigheid van allerlei plantenziekten in het uitgangsmateriaal te kunnen bepalen zijn in het verleden allerlei detectiemethoden ontwikkeld. Detectie is een activiteit die gericht is op het aantonen van de aanwezigheid (of afwezigheid) van een bepaald pathogeen waarvan bekend is of vermoed wordt dat het voorkomt. Dit kan zowel kwantitatief als ook kwalitatief. Routinematige detectie heeft daarom de neiging om het onbekende over het hoofd te zien. In dit verband moet *monitoring* of *screening* gezien worden als detectie omdat men in zo'n geval op zoek gaat naar bepaalde pathogenen in planten- en vectorpopulaties of specifieke planten of vectoren, in het kader van ecologische of epidemiologische studies.

Vele verschillende pathogenen kunnen aanwezig zijn in planten, grond, water en lucht. Wereldwijd worden methoden ontwikkeld om deze pathogenen in een vroegtijdig stadium te kunnen detecteren zoals:

- directe observatie van het pathogeen in plantenweefsel of plantenextract met behulp van microscopische technieken
- isolatie van het pathogeen, gebruik makend van jonge planten, plantendelen of specifieke media
- serologische methoden
- moleculaire DNA (of RNA)-methoden.

Vroeger duurden de methoden nogal lang, maar momenteel kunnen pathogenen snel en gevoelig worden aangetoond. Ook de specificiteit, robuustheid en kwantitatiefheid zijn vereisten die momenteel sterk zijn verbeterd.

Wie kent CSI (*Crime Scene Investigation*) niet, waarin daders van misdrijven door middel van allerlei DNA-technieken worden opgespoord. Het betreft hier echter plantenpathogenen die de daders zijn; de gebruikte technieken zijn hetzelfde. In de toekomst zullen nog geavanceerdere methoden worden ingezet om de daders sneller, gevoeliger, kwantitatief, multiplex en *on-site* op te sporen om zodoende sneller maatregelen te kunnen nemen. Enkele voorbeelden zullen worden geschetst.