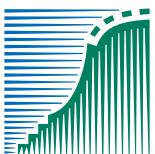
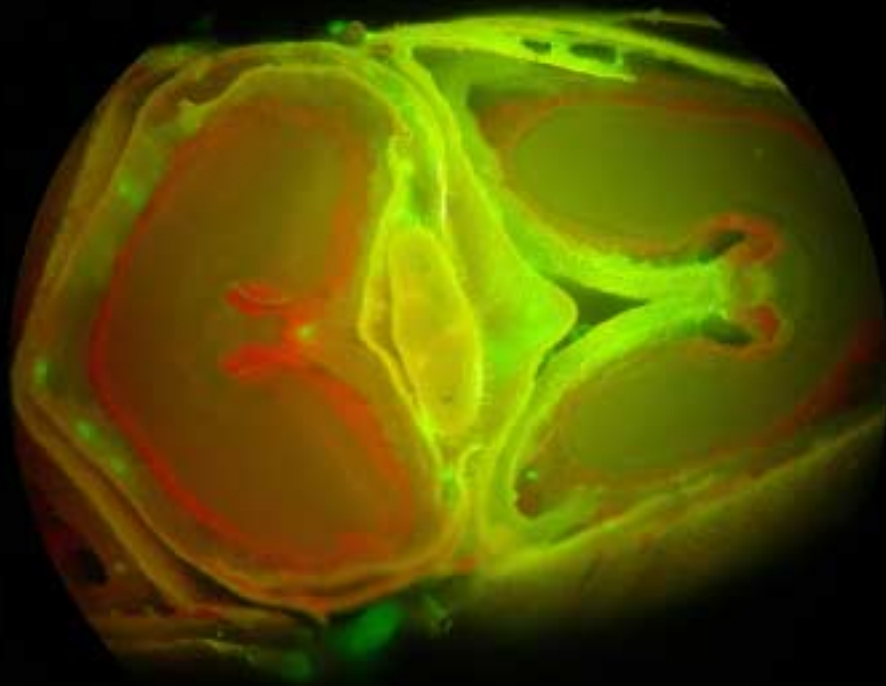




# FusariumScreen

Een studie naar geautomatiseerde detectie en kwantificering van resistentie tegen *Fusarium* in tarwe

Theo A.J. van der Lee, Cees Waalwijk, Henk Jalink, Rob van der Schoor & Gert H.J. Kema







# FusariumScreen

Een studie naar geautomatiseerde detectie en kwantificering van resistentie tegen *Fusarium* in tarwe

Theo A.J. van der Lee, Cees Waalwijk, Henk Jalink, Rob van der Schoor  
& Gert H.J. Kema

© 2009 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

## **Plant Research International B.V.**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317 - 48 60 01  
Fax : 0317 - 41 80 94  
E-mail : [info.pri@wur.nl](mailto:info.pri@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl](http://www.pri.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
1. Producten van dit onderzoek	1
1.1 Conclusies van dit onderzoek	1
1.2 Aanbevelingen naar aanleiding van dit onderzoek	2
2 Introductie	3
2.1 Ontwikkeling hardware en software voor FusariumScreen	4
2.2 Ontwikkeling van de constructen met de GFP- en RFP-markergenen voor de transformatie van <i>Fusarium</i> en andere ascomyceten	5
2.3 Transformatie van <i>Fusarium</i> met merkerogenen	5
2.4 Microscopische analyse van het infectieproces	6
2.5 Optimalisatie van de kwantitatieve <i>Fusarium</i> metingen	8
2.6 Geautomatiseerde analyse van het infectieproces met behulp van FusariumScreen	8
2.7 Patroonherkenning voor de verschillende resistentiemechanismen	9
2.8 Analyse van de FusariumScreen resultaten	11
2.9 Correlatie tussen FusariumScreen metingen en veldwaarnemingen	13
2.10 Correlatie tussen FusariumScreen, kwantitatieve Fusarium PCR en DON-accumulatie	13
2.11 Bepaling van type I resistentie in tarwerassen van de Nederlandse rassenlijst	17
2.12 Effect van luchtvochtigheid en temperatuur op de infectie door <i>Fusarium</i>	20
Dankbetuiging	21
Referenties	23



# 1. Producten van dit onderzoek

1. FusariumScreen, een snelle methode voor geautomatiseerd onderzoek naar resistentie tegen *Fusarium* in tarwearen.
2. Gespecialiseerde hardware en software voor gedetailleerd resistentieonderzoek tegen *Fusarium* in tarwearen.
3. Moleculaire gereedschappen en flexibele constructen met de markereiwitten GFP en RFP.
4. Transformatieprotocollen voor *Fusarium culmorum* (door middel van *Agrobacterium tumefaciens* én protoplasten transformatie) en *Fusarium graminearum* (protoplasten).
5. GFP- en RFP- transformanten van *Fusarium graminearum* (isolaat Fg820) en GFP transformanten van *Fusarium culmorum* (isolaat IPO39).

## 1.1 Conclusies van dit onderzoek

1. Gemerkte *Fusarium* isolaten kunnen tijdens de infectie en kolonisatie met FusariumScreen worden gevolgd zonder achtergrond (autofluorescentie) van tarwearen of meeldraden.
2. FusariumScreen heeft een grote dynamische range zodat over een groot bereik betrouwbaar kwantitatief gemeten kan worden.
3. FusariumScreen kan het infectieproces van *Fusarium* in tarwearen registeren en analyseren.
4. Dit onderzoek heeft bevestigd dat er geen correlatie bestaat tussen symptoomontwikkeling en de hoeveelheid *Fusarium-biomassa* in een tarweaar.
5. Onderdelen van tarwebloempjes, met name palea, lemma en pericarp, zijn bepalend voor het infectie- en kolonisatieproces van *Fusarium* in tarwearen.
6. Er zijn grote rasverschillen in de accumulatie van *Fusarium-biomassa* vastgesteld, maar het effect hiervan op het succes van *Fusarium* infectie is minder groot dan de ontwikkelingsstadia tussen en binnen bloeiende tarwearen van één tarweras.
7. *Fusarium* heeft verschillende kolonisatiepatronen in tarwerassen. Het is mogelijk met behulp van FusariumScreen onderscheid te maken tussen resistentie type I (infectie) en resistentie type II (kolonisatie).

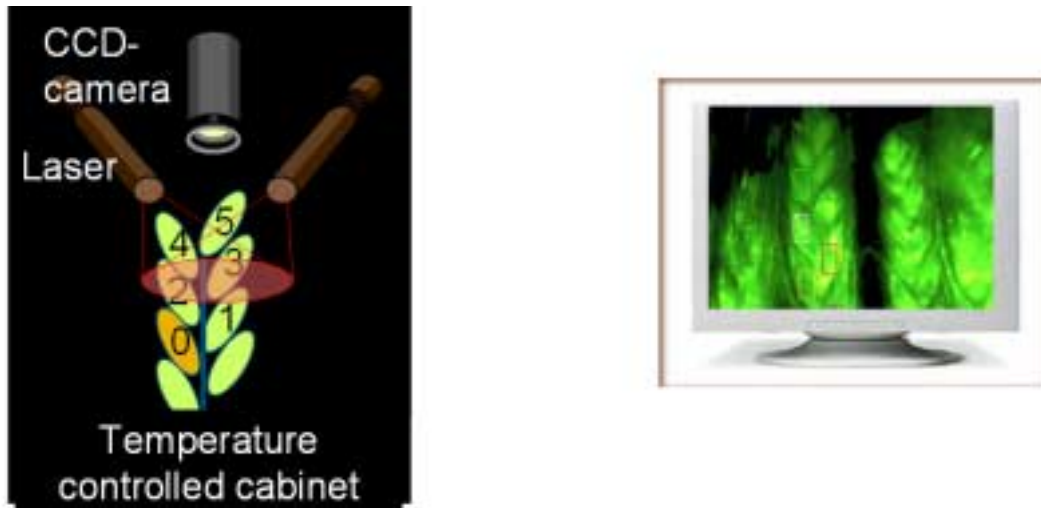
## 1.2 Aanbevelingen naar aanleiding van dit onderzoek

1. Het resistentieniveau en het resistentietype van tarwe tegen *Fusarium* konden tot voor kort alleen goed worden bepaald in meerjarige evaluaties. FusariumScreen is een technologie om snel en zeer gedetailleerd onderzoek te doen naar deze moeilijk te bepalen parameters. Vanuit de optiek van telers en veredelaars is deze technologie zeer geschikt om veelbelovende geniteurs specifiek te karakteriseren voor resistentie tegen *Fusarium* schimmels. Met dit onderzoek is de basis gelegd voor toekomstig onderzoek naar de real-time registratie van het aanschakelen van de DON-biosyntheseroute. Dit is van groot belang omdat meer inzicht in dit proces de risicomodellen voor DON-besmetting sterk zal ondersteunen. Hiermee kan de dynamiek van de productie van DON bepaald worden en zal de uiteindelijke DON-hoeveelheid gesimuleerd kunnen worden door deze gegevens te integreren in epidemiologische risicomodellen.
2. FusariumScreen is geschikt voor routinematige *Fusarium* resistentiebepalingen omdat de microscopische driedimensionale ruimte effectief in kaart gebracht kan worden. De toegevoegde waarde van FusariumScreen ten opzichte van kwantitatieve PCR is dat de *Fusarium-biomassa* gelokaliseerd kan worden. Er kan dus worden bepaald of de biomassa beperkt blijft tot één pakje of over de gehele aar is verspreid. Een voorwaarde voor toekomstig onderzoek en routinematige screening van tarwerassen is dat experimenten onder optimale omstandigheden in een kas worden uitgevoerd. De benodigde aanvragen voor het werken met getransformeerde schimmelstammen zijn inmiddels in behandeling. Tevens zijn diverse onderzoekvoorstellen gehonoreerd waarin van FusariumScreen gebruik wordt gemaakt. Toekomstig onderzoek zal zich vooral richten op de praktische toepassing van FusariumScreen als een geautomatiseerd platform om snel resistentie in tarwe te karakteriseren.
3. De latente aanwezigheid van *Fusarium* onder suboptimale omstandigheden vormt een niet te onderschatten risico voor uitbreiding van de besmetting in de productie/verwerkingsketen. *Fusarium-biomassa* kan zodoende later ontwikkelen en alsnog de kwaliteit van het product beïnvloeden door DON-accumulatie. Het in kaart brengen van (micro-) klimatologische drempelwaarden is belangrijk om deze risico's te beperken.



## 2 Introductie

Resistentie tegen *Fusarium* aarinfectie in tarwe wordt onderverdeeld in vijf typen: type I resistentie tegen infectie, type II resistentie tegen kolonisatie, type III resistentie tegen korrelinfectie, type IV tolerantie tegen infectie en type V resistentie tegen ophoping van mycotoxinen (Mesterhazy, 1995). Het onderscheid tussen deze resistentietypen is zeer moeilijk te bepalen mede als gevolg van de interactie met omgevingsfactoren. Daarom kunnen niveau en type resistentie tegen *Fusarium* aarinfectie alleen globaal bepaald worden in meerjarige evaluaties volgens een statistisch design (o.a. Paul *et al.*, 2007; 2008). Dit is voor de beoordeling van rasverschillen ten behoeve van rassenlijsten en in veredelingsprogramma's een groot nadeel. Dit project heeft zich daarom geconcentreerd op het ontwikkelen van FusariumScreen, een snelle en efficiënte manier om in tarwe het resistentietype en het niveau van resistentie te bepalen (Van der Lee *et al.*, 2005). Deze methode is gebaseerd op snelle fluorescentie beeldverwerking. Met deze fluorescentie beeldverwerking kan enerzijds de kolonisatie van de plant door het pathogeen gevolgd worden nadat deze getransformeerd is met een fluorescerende merker (Green/Red Fluorescent Protein, GFP/RFP). De fluorescentie metingen zijn niet destructief en voor elke locatie in de plant kan de aanwezigheid en de hoeveelheid van het gemerkte pathogeen direct worden gemeten (Figuur 1). Daarnaast kan met fluorescentie beeldverwerking ook de reactie van de plant gevolgd worden door het meten van de chlorofylfluorescentie. Biotische stress, zoals door *Fusarium* infectie, of abiotische stress (zoals zout of droogte) resulteert in een afname van de fotosynthese-efficiëntie die wordt uitgedrukt in meetbare chlorofylfluorescentie verschillen (Moradi & Ismail, 2007). Dergelijke verschillen zijn in met *Fusarium* geïnfecteerde tarwearen een maat voor de vatbaarheid van de plant. Fluorescentie van geïnfecteerde tarwearen wordt opgewekt door de belichting met LEDs (Light Emitting Diodes) of een laser en de fluorescentiesignalen worden opgevangen met een gevoelige digitale (CCD) camera en opgeslagen voor dataverwerking. FusariumScreen werd gevalideerd met moleculaire kwantitatieve biomassa-bepalingen van de schimmel met behulp van TaqMan PCR (Waalwijk *et al.*, 2004), veld- en potexperimenten en veldgegevens.

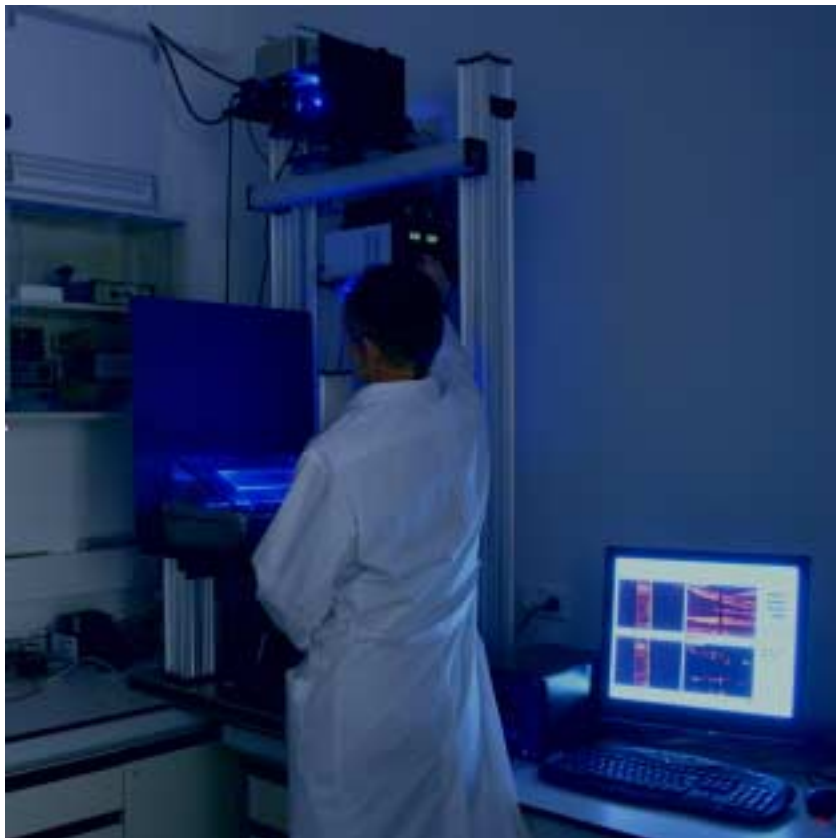


*Figuur 1. Schematische opzet van de FusariumScreen opstelling. De geïnoculeerde aren worden belicht door een laser of door LED's die het GFP eiwit aanslaan. De fluorescentie die vervolgens ontstaat wordt waargenomen door een digitale camera en opgeslagen voor digitale beeldverwerking.*

## 2.1 Ontwikkeling hardware en software voor FusariumScreen

Van 2004 tot 2006 zijn de FusariumScreen experimenten uitgevoerd met LEDs. Deze zijn relatief goedkoop en bieden de mogelijkheid in het biologische materiaal de signaal/ruis verhouding op verschillende golflengten te analyseren. In 2004 is bovendien een railopstelling ontworpen, waarmee de laser en CCD camera over een afstand van 1.5 meter verplaatst kunnen worden, waardoor de capaciteit sterk werd uitgebreid. Met deze aanpassingen kunnen vier gesloten eenheden doorgemeten worden zodat het infectieproces in 72 aren tegelijkertijd nauwkeurig gevolgd kan worden. Door hetzelfde object met grote regelmaat te meten kan een goede indruk worden verkregen van het verloop van de infectie. De opstelling heeft in juni 2005 zonder storing gedraaid, maar daarna zijn enkele problemen aan het licht gekomen die betrekking hadden op de aansturing van de CCD camera en de opslag van de verkregen beelden. Deze problemen zijn in 2006 opgelost.

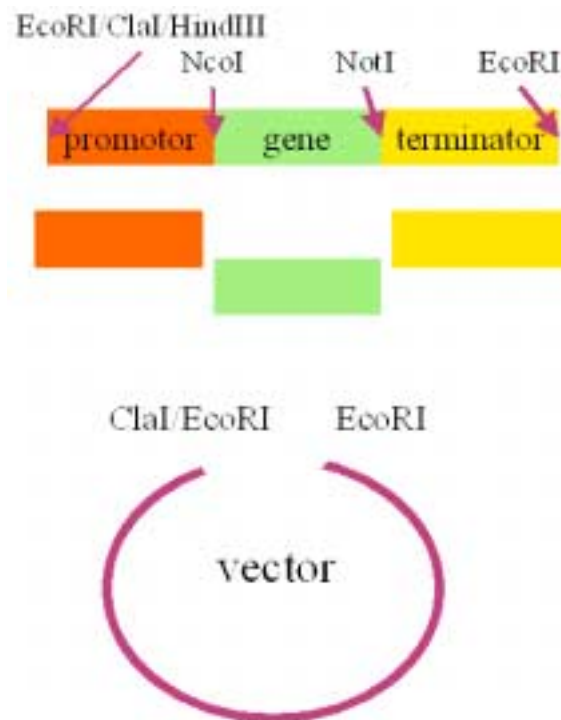
Na uitgebreide spectrumanalyses in 2004 is een hoog vermogen blauwe laser aangeschaft. Deze laser kan met behulp van verschillende filters zowel voor GFP als chlorofylfluorescentie worden gebruikt. De benodigde software voor de bediening van deze laser werd in 2006 ontwikkeld en was in 2007 operationeel. Tevens werd in 2007 een nieuwe zeer gevoelige camera met een zeer hoge resolutie (12 mega pixels) in gebruik genomen. Geavanceerde software voor de aansturing van deze camera werd ontwikkeld, die het mogelijk maakt de grote hoeveelheid data te verwerken met een 100-1000 maal verbeterde signaal/ruis verhouding. Dit heeft geresulteerd in gevoeliger analyses met een dynamische range van 8 log schalen ( $10^8$ ). Met de toevoeging van een groene laser kan FusariumScreen nu ook gelijktijdig RFP (Red Fluorescent Protein) en GFP metingen uitvoeren (Figuur 2).



*Figuur 2. FusariumScreen opstelling waarbij de geïnoculeerde aren door een hoog vermogen blauwe laser worden belicht die het GFP eiwit aanslaat. De fluorescentie wordt waargenomen door een digitale camera en direct zichtbaar gemaakt op het scherm.*

## 2.2 Ontwikkeling van de constructen met de GFP- en RFP-markergenen voor de transformatie van *Fusarium* en andere ascomyceten

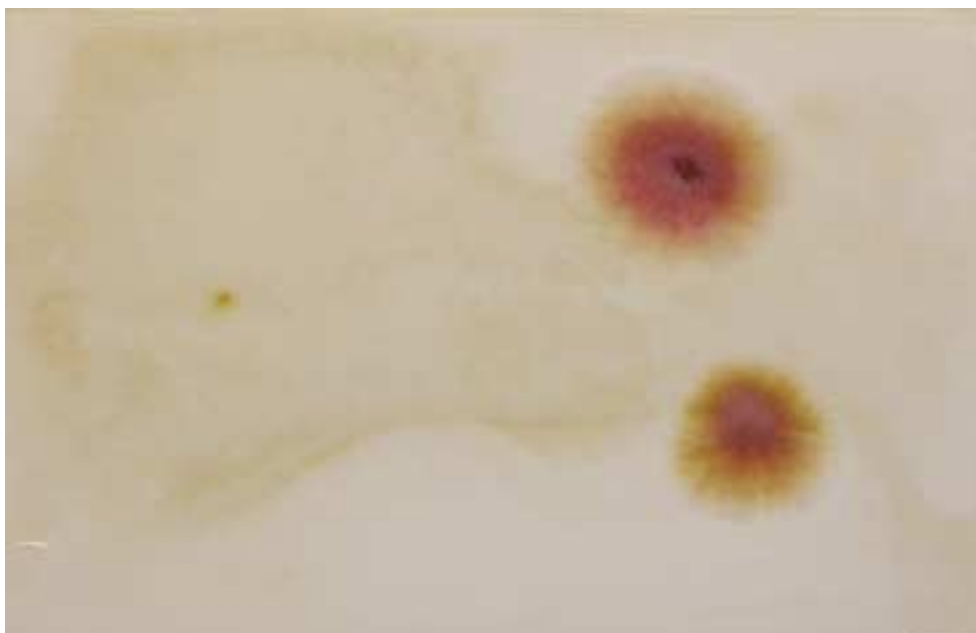
Binnen het project is een modulaair systeem van promotoren, genen, terminatoren en vectoren opgebouwd. Door deze modulaire structuur is een groot aantal transformatievectoren samengesteld. In de laatste fase is bijzondere aandacht besteed aan een reeks van constructen waarmee het aanschakelen van de deoxynivalenol (DON) biosynthese route gevolgd kan worden. Door expressiestudies van de genen in de DON-biosyntheseroute is duidelijk geworden dat de expressie van deze genen gelijktijdig omhoog gaat (Güldener *et al.*, 2006). Bovendien blijkt dat GFP onder controle van de *tri5* promotor (die de eerste stap in de richting van DON reguleert) zichtbaar is tijdens de infectie, maar deze promotor heeft een duidelijk ander expressiepatroon dan constitutieve promotors (Jansen *et al.*, 2005). Met dergelijke constructen kan tijdens de infectie niet alleen de biomassa van de schimmel maar óók de aanmaak van mycotoxinen worden geregistreerd. Van de benodigde losse componenten is de sequentie tweezijdig bepaald, gecontroleerd en gedocumenteerd en deze zijn vervolgens als opgezuiverd DNA en als construct in plasmiden opgeslagen ten behoeve van transformaties (Figuur 3). De ontwikkeling van constructen voor het detecteren van het aanschakelen van de DON-biosyntheseroute is vanwege budgettaire beperkingen helaas niet afgerond.



Figuur 3. Modulaire opbouw van de constructen maakt het mogelijk verschillende promotors, genen en terminators snel te combineren.

## 2.3 Transformatie van *Fusarium* met merker genen

Nadat eerder een *F. culmorum* stam IPO39::toxGFP was verkregen door *Agrobacterium tumefaciens* transformatie van het *F. culmorum* isolaat IPO39 zijn de transformatie-experimenten voor *Fusarium graminearum* isolaat Fg820 met een toxGFP construct en ander protocol uitgevoerd. Dit heeft geresulteerd in drie Fg820::toxGFP isolaten en twee additionele IPO39::toxGFP isolaten (Figuur 4). Dit is een zeer belangrijk omdat deze technologie van grote waarde is bij het realiseren van nieuwe kleur- en promotormutanten ten behoeve van FusariumScreen.



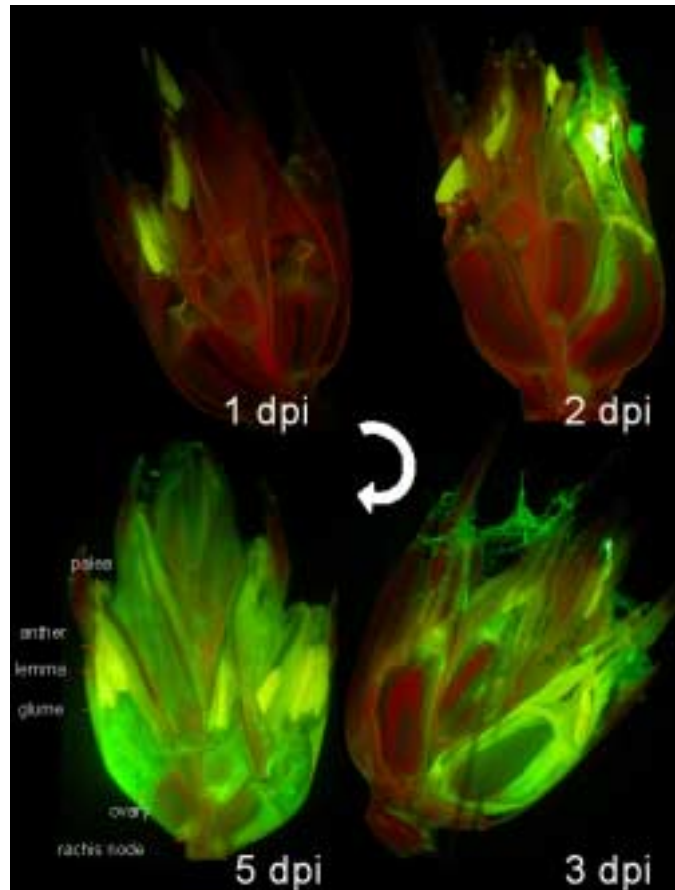
Figuur 4. Twee *F. culmorum* IPO39::toxGFP transformanten die uitgroeien op selectief medium.

## 2.4 Microscopische analyse van het infectieproces

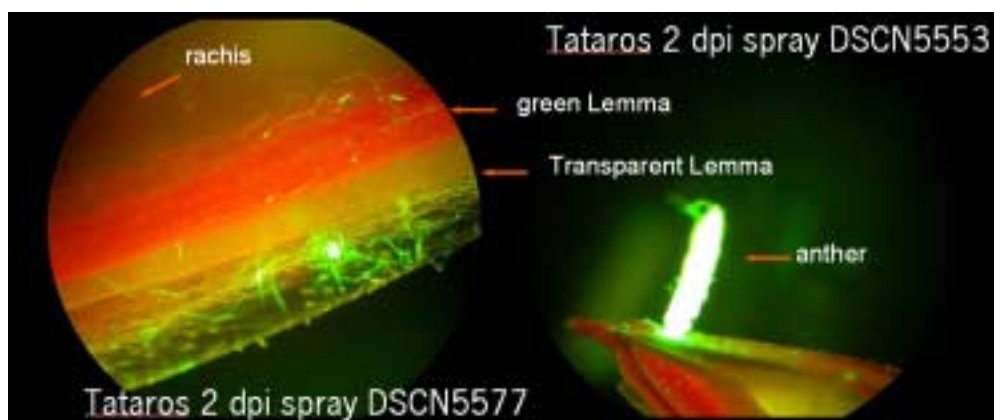
Het infectieproces van *Fusarium* in de plant is gevolgd na puntinoculaties met *F. culmorum* IPO39::toxGFP op individuele tarwepakjes. Tevens werden spray-inoculatie experimenten uitgevoerd waarbij op 120 uur na inoculatie de pakjes van de aar zijn doorgesneden en geanalyseerd met behulp van fluorescentiemicroscopie. In totaal zijn ca. 2000 geïndexeerde opnamen gemaakt en de analyse van het infectieproces van zowel *F. culmorum* als *F. graminearum* laat zien dat de distributie van de biomassa van beide pathogenen niet gelijkmatig verdeeld is over een pakje. Daarnaast is er een duidelijke volgorde in het infectieproces (Figuur 5). De puntinoculaties van tarweras 04Kfu11 geven aan dat de vliezen om de bloempjes (palea en lemma) zeer belangrijk zijn voor het infectieproces. Het infectieproces kan als volgt worden beschreven:

- dag 1, kieming van de sporen en ongerichte groei van mycelium;
- dag 2, gerichte groei via palea en lemma en kolonisatie van de rachis knoop;
- dag 3, verdere kolonisatie van het vruchtbeginsel en
- dag 4/5, kolonisatie van bloempjes in niet rechtstreeks geïnoculeerde pakjes en verspreiding van *Fusarium* via de aarspil naar boven en ondergelegen pakjes. Daarnaast blijkt het pericarpweefsel om het embryo zwaar geïnfecteerd te kunnen raken.

De microscopische analyse van spray-inoculaties, uitgevoerd op ruim 100 verschillende tarwegenotypen, geeft aan dat er naast verschillen in de uiteindelijke hoeveelheid *Fusarium* ook verschillen zijn in het kolonisatiepatroon. Tevens is met behulp van microscopische analyses vastgesteld dat er een grote spreiding kan bestaan in de infectie-efficiëntie van verschillende pakjes binnen één aar en van de verschillende bloempjes binnen één pakje. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de gespreide afrijping en dus de fysiologische ouderdom van pakjes binnen dezelfde aar. In 2005 is de tijdreeks van het infectieproces van *F. culmorum* IPO39::toxGFP herhaald op cv. Tataros. Hierbij werden drie verschillende inoculatiemethoden (punt, spray en onderdompeling in een sporensuspensie) vergeleken. De kolonisatie van de aar werd gedurende acht dagen na inoculatie nauwkeurig gevolgd. De resultaten van beide microscopiestudies zijn vergelijkbaar, waarbij in cv. Tataros bovendien een snelle kolonisatie van de niet-groene delen van lemma en palea werd waargenomen (Figuur 6).



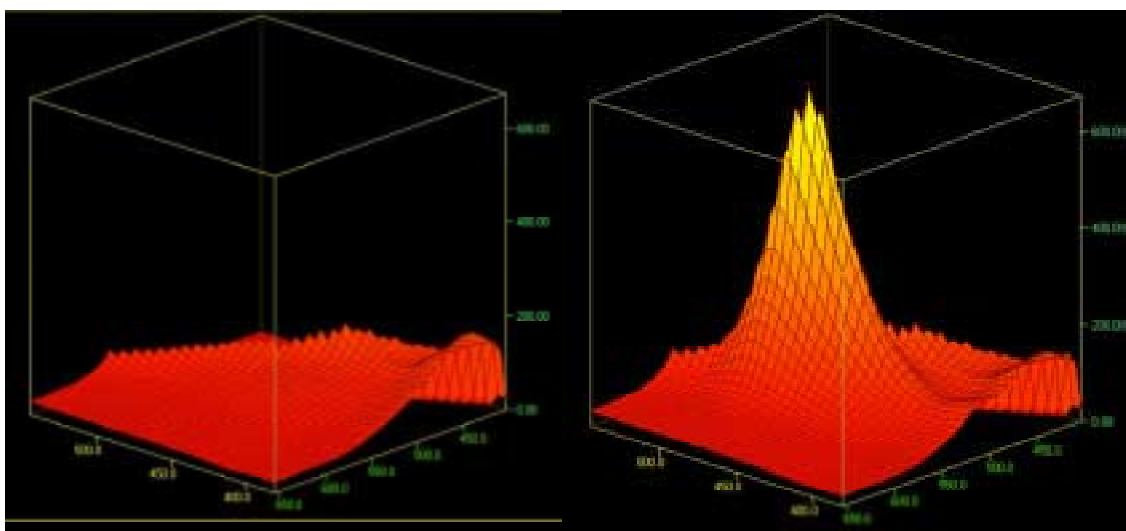
*Figuur 5. De verschillende stadia in het infectieproces zichtbaar gemaakt door het traceren van de GFP gemerkte *F. culmorum* stam, IPO039::toxGFP, in dwarsdoorsneden van geïnoculeerde tarwearen met behulp van fluorescentiemicroscopie. Vier tijdstippen zijn weergegeven: linksboven, één dag na inoculatie; rechtsboven, twee dagen na inoculatie; rechtsonder, drie dagen na inoculatie en linksonder, vijf dagen na inoculatie.*



*Figuur 6. Microscopische opname van de snelle kolonisatie van de doorzichtige delen van het lemma en de helmraden door het groen gekleurde *Fusarium* isolaat IPO039::toxGFP twee dagen na spray inoculatie.*

## 2.5 Optimalisatie van de kwantitatieve *Fusarium* metingen

Voor de optimalisatie van de metingen zijn allereerst het driedimensionale spectrum van absorptie en de emissie van de GFP gemerkte *Fusarium* stam bepaald (Figuur 7) zodat de juiste filters en lichtbronnen konden worden geïnstalleerd. Vervolgens is het signaal ten opzichte van de achtergrond van het wildtype bepaald (Figuur 8) en is de groei *in vitro* gevolgd (Figuur 9). Nadat deze metingen positief werden bevonden, is gestart met de detectie, de geautomatiseerde monitoring van het *Fusarium* infectieproces in een tarweaar en de reproduceerbaarheid. De kinetiek van de GFP toename werd in vier verschillende tarwearen bepaald (Figuur 10) en de benodigde software om de verschillen tussen de tijdstippen nauwkeurig in beeld te brengen werd ontwikkeld (Figuur 11).



Figuur 7. Driedimensionale weergave van de optimale absorptie en emissie spectra van het GFP-signaal aan de sporen van *F. culmorum* IPO39::toxGFP (rechts) in vergelijking met het wild type (links).

## 2.6 Geautomatiseerde analyse van het infectieproces met behulp van FusariumScreen

Tabel 1. Uitgevoerde FusariumScreen experimenten.

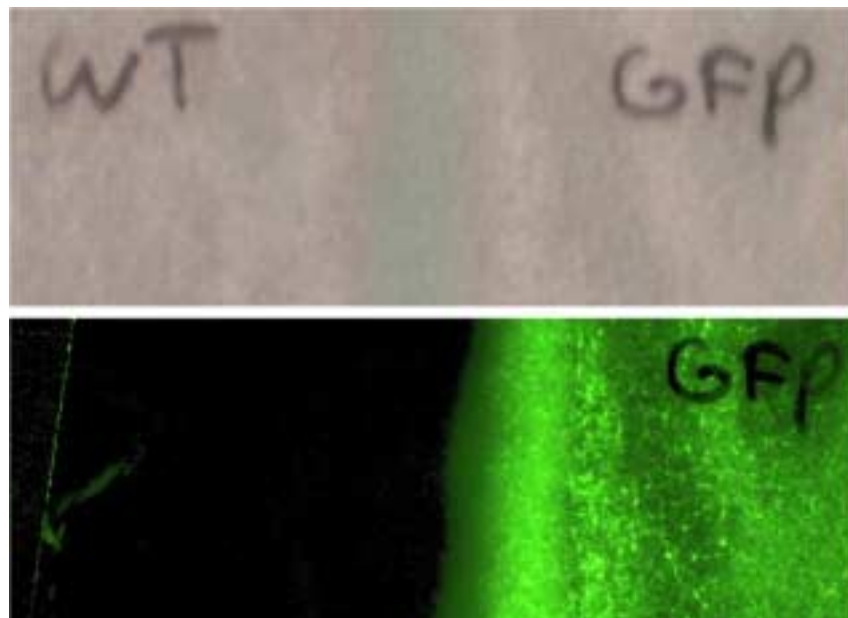
Uitgevoerde FusariumScreen experimenten			
Jaar	Experiment	Wijze van inoculeren	
2004	FS2-10	Punt (type II) 10 $\mu$ L, 10 <sup>6</sup> sporen in het pakje	Spray (type I) 10 <sup>5</sup> sporen tot run-off
2005	FS11-21	Punt (type II) 10 $\mu$ L, 10 <sup>6</sup> sporen in het pakje	Spray (type I) 10 <sup>5</sup> sporen tot run-off
2007	FS22-28	Punt (type II) 10 $\mu$ L, 10 <sup>6</sup> sporen in het pakje	Spray (type I) 10 <sup>5</sup> sporen tot run-off

Tabel 1 geeft een overzicht van de uitgevoerde FusariumScreen experimenten. FS2-10 werden uitgevoerd met een vaste camera opstelling waarbij steeds om de 13 minuten werd gemeten. In FS11-21 werd gemeten met de hierboven beschreven mobiele cameraopstelling waarmee de capaciteit van zes naar ruim 60 aren werd uitgebreid en er met een tijdsinterval van ~60 minuten werd gemeten. In totaal zijn ruim 122 genotypen met diverse herhalingen geanalyseerd. Het GFP-sigitaal werd gekwantificeerd (gemiddelde waarde van het centrale deel van de aar) en uit de analyses bleek dat de spreiding tussen aren van een zelfde tarweeras in FS11-21 groter was dan in FS2-10. Daarnaast bleek ook de signaal/ruis verhouding in FS11-21 groter dan in FS2-10.

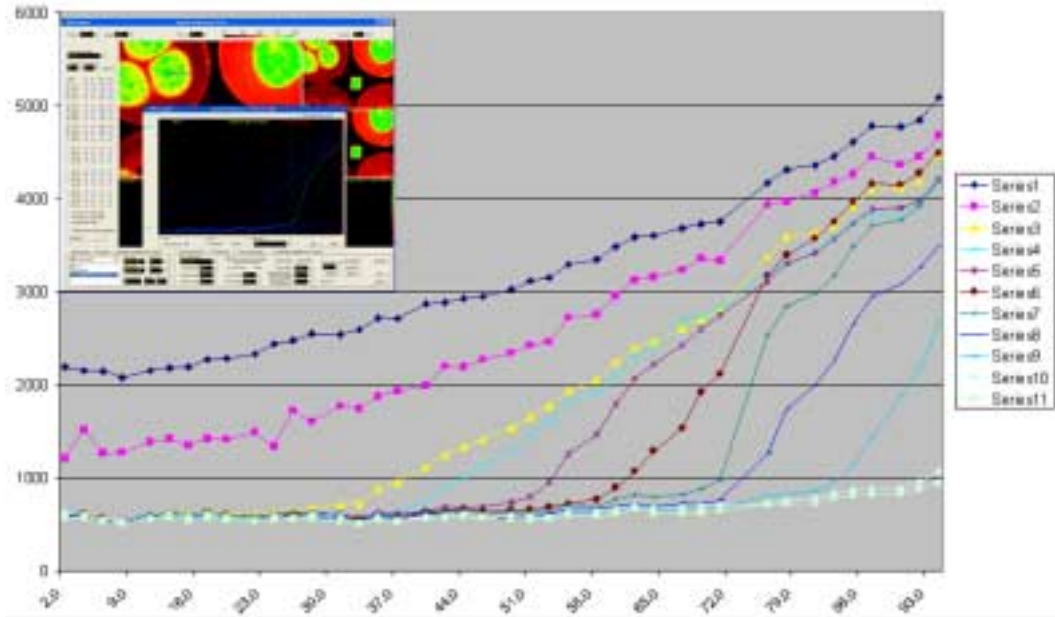
De parameters voor de herkenning voor type I resistentie zijn bepaald, waardoor het nu mogelijk is dit type resistentie snel, betrouwbaar en reproduceerbaar te bepalen. De juiste parameters voor type II en andere typen resistentie zijn nog niet vastgesteld. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de verdeling van *Fusarium* in ruimte én tijd in de pakjes van de tarweaar. De driedimensionale beeldverwerking is complex en bovendien is de biologische spreiding van deze resistentietypen groter. De resultaten van FS11 tot FS21 laten duidelijke verschillen zien tussen de verschillende genotypen. De intensiteit van het GFP-sigitaal in FusariumScreen komt sterk overeen met de fluorescentie in de microscopische analyse op de dwarsdoorsneden van tarwearen.

## 2.7 Patroonherkenning voor de verschillende resistentiemechanismen

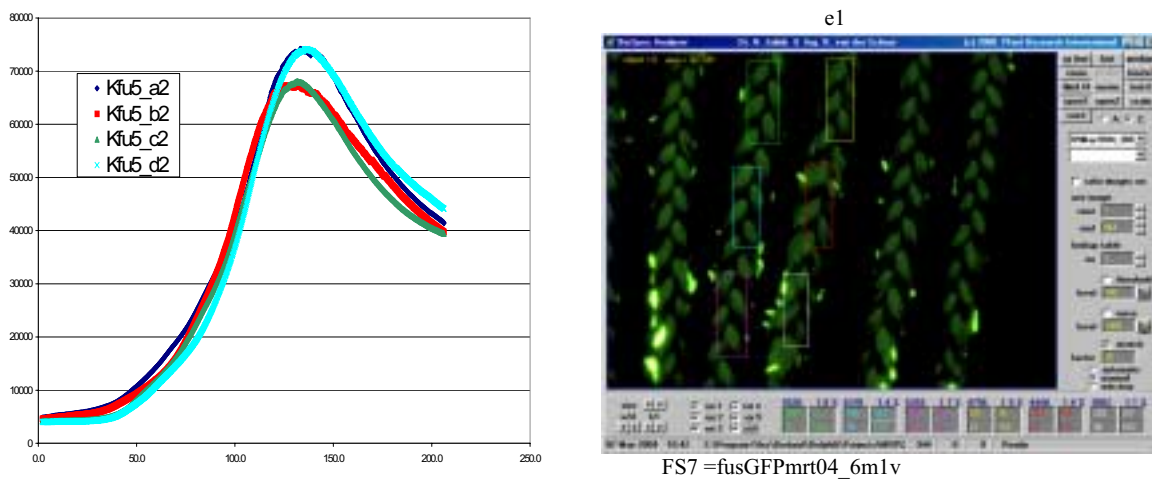
Zoals hierboven werd beschreven is de analyse van de driedimensionale distributiepatronen van *Fusarium* in tarwearen moeilijk te automatiseren. Daarom zijn er dwarsdoorsneden van tarwearen (120 hpi) gemaakt ter vergelijking met de verdeling van *Fusarium* in ruimte én tijd in de pakjes van de tarweaar in FS11-21. Deze gegevens zijn na consultatie van beeldanalyse-experts vertaald in nieuwe software waarmee verschilbeelden geproduceerd worden. Dit is behulpzaam bij het opsporen van de locatie en de directionaliteit van de *Fusarium*-biomassa-toename. De duidelijk herkenbare verdeling van *Fusarium*-kolonisatiepatronen in ruimte én tijd in de pakjes van de tarweaar geven belangrijke aanknopingspunten voor het 'real time' volgen van de verschillende fasen van het infectieproces. Dit lijkt echter meer bepaald te worden door de fysiologische processen tijdens de rijping van de aar dan door resistentie.



Figuur 8. Daglicht (boven) en FusariumScreen opname (onder) van *F. culmorum* IPO39::toxGFP (rechts) naast het oorspronkelijke wild type isolaat (links).

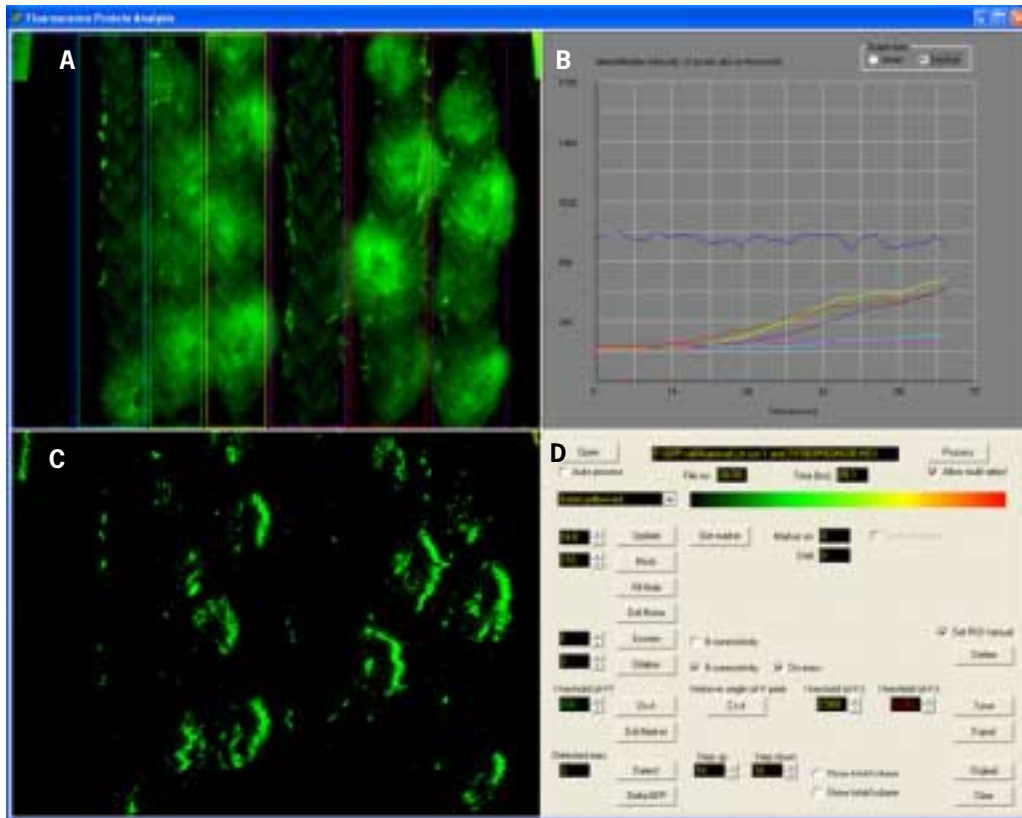


Figuur 9. Bepaling van de in vitro groeisnelheid van *F. culmorum* IPO39::toxGFP met behulp van Fusarium-Screen. Na inoculatie in het midden van een petrischaal (9 cm diameter) wordt de fluorescentie elke 13 minuten gemeten op 11 afstanden van het middelpunt (gemarkeerd in de inzet linksboven) en werd het GFP-sigitaal gekwantificeerd met behulp van de Biospec software. Door de radiale groei van de schimmel neemt het GFP-sigitaal (y-as) gedurende de tijd (in uren; x-as) achtereenvolgens toe op de verschillende posities (serie 1 tot 11; waarbij serie 1 en serie 2 gemeten op de inoculatie plek en serie 3 tot en met serie 11 steeds verder naar de rand van de petrischaal gelokaliseerd zijn).



Figuur 10. Geautomatiseerde kwantificering van het GFP-sigitaal met behulp van de BioSpec software. Van de verschillende regio's, aangegeven door de gekleurde rechthoeken (rechts), wordt in de tijd de mediaan van het GFP-sigitaal bepaald. Dit GFP-sigitaal is grafisch uitgezet tegen de tijd (in uren) in de inzet linksboven.

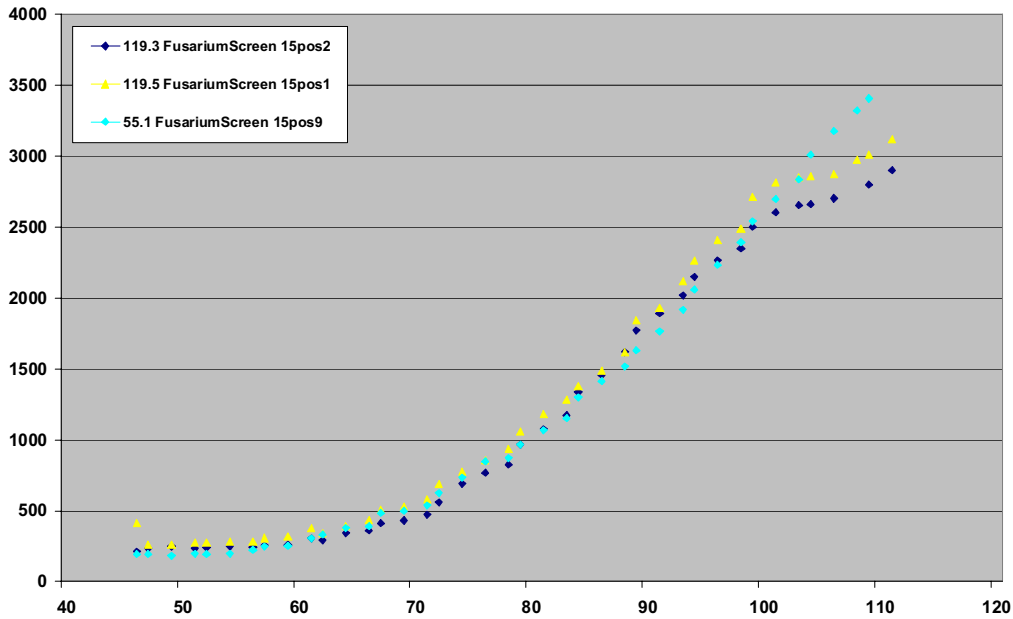




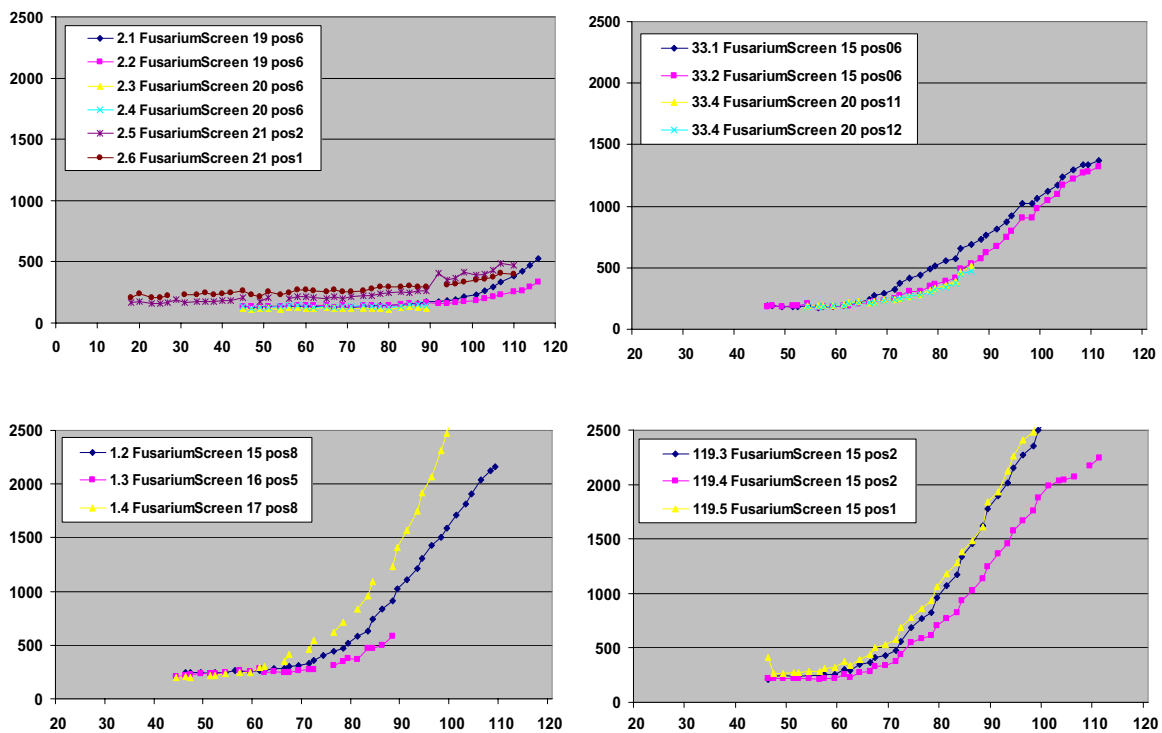
Figuur 11. Screenshot van de aangepaste versie van de Biospec software (versie 2005-5) met Microsoft Windows gebaseerde data-analyse vensters. Deze uit te klappen vensters geven goed inzicht in de absolute hoeveelheid (A), de toename tussen twee tijdstippen (B-C), de distributie van de verschillende intensiteitsniveaus (B), het aantal pixels boven een bepaald achtergrond niveau (D) en de ruimtelijke verdeling van het fluorescentiesignaal (D). De instellingen kunnen worden gewijzigd om de lokale achtergrond te reduceren (D).

## 2.8 Analyse van de FusariumScreen resultaten

Uit de toename van de *Fusarium* GFP-signaal is de Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC, Jeger *et al.*, 2001) berekend over de periode van 50 tot 70 uur en de periode van 70 tot 80 uur na infectie (zie ook Figuur 12). Er is bewust gekozen voor deze twee vroege tijdsintervallen omdat later in de infectie ook een toename van biomassa aan de buitenzijde van de aar plaatsvindt en de waarnemingen van dag 2 naar dag 3 en van dag 3 naar dag 4 ook in de microscopische infectiestudies het meest informatief waren. Bijzonder is dat de AUDPC berekend is over de toename van de biomassa van het pathogeen. Voor zover ons bekend is nooit een AUDPC berekend op basis van de toename in pathogeen biomassa. Met deze gegevens zijn drie parameters bepaald te weten: de AUDPC 50-70, de AUDPC 70-80 en de ratio tussen deze twee. Met deze waarden is gekeken welk gedeelte van de gevonden variatie verklaard kan worden door genotype, aar, experiment en positie (zie Tabel 2). Dezelfde analyses zijn uitgevoerd na transformatie van de data op een log-schaal zodat de mediaan en het gemiddelde dichter bij elkaar komen te liggen. Doordat van de verschillende genotypen steeds het maximaal aantal beschikbare aren tijdens de bloei is genomen was het aantal aren per genotype ongelijk (1-9). Met behulp van een toegesneden statistische analyse voor ongebalanceerde datasets zijn alle 122 in de FusariumScreen experimenten geteste tarwegentypen gerangschikt en is de significantie van de gevonden verschillen bepaald (gedeeltelijk in Figuur 13). Doordat enkele genotypen onder code in duplo werden getest kon bepaald worden dat de variatie tussen deze duplo's gelijk is aan de variatie binnen deze genotypen. Dit laatste wordt vooral veroorzaakt door de spreiding van de bloei tussen verschillende aren van hetzelfde genotype wat een belangrijk zorgpunt blijft voor een routinematig gebruik van FusariumScreen.



Figuur 12. Met behulp van de kwantitatieve gegevens in de tijd is het mogelijk om na bepaling van de baseline de Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) te berekenen.



Figuur 13. De toename van het GFP-sigitaal gemeten met de FusariumScreen opstelling (y-as) van verschillende rassen in de tijd (tijd in uren na inoculatie, x-as). De code van het ras, de  $\log_{10}$ -waarde van de AUDPC van het tijdsinterval 70-80 uur na inoculatie en de statistische klasse zijn weergegeven in de inzet bij elke grafiek. Het tijdsinterval waarover de AUDPC is gemeten is gemarkeerd met de blauwe horizontale lijnen.

## 2.9 Correlatie tussen FusariumScreen metingen en veldwaarnemingen

In 2005 zijn de resistentieniveaus bepaald van verschillende genotypen op basis van visuele beoordeling na inoculatie met maïsstopfels, én na spray-inoculatie met macrosporen. Voor deze tarwegentypen is de correlatie berekend tussen de gegevens verkregen met FusariumScreen en de waarnemingen in het veld. De correlatie van de veldexperimenten met AUDPC 50-70 of AUDPC 70-80 waarden bleek gering. Daarentegen bleek de correlatie met de ratio van de AUDPC 70-80/AUDPC50-70 veel groter.

De correlatie tussen de AUDPC zoals bepaald met FusariumScreen en de spray-inoculaties van *F. culmorum* in het veld is beter dan de correlatie tussen de twee inoculatiemethoden in het veld (spray-inoculaties en aanbrengen van maïsstopfels). Hierbij moet in ogenschouw worden genomen dat de resultaten verkregen met FusariumScreen gebaseerd zijn op toename van de biomassa van het pathogeen, terwijl bij veldproeven de symptomen van de plant worden waargenomen. Op microscopische schaal is reeds geconstateerd dat er geen lineair verband bestaat tussen symptoomontwikkeling en de hoeveelheid *Fusarium-biomassa*.

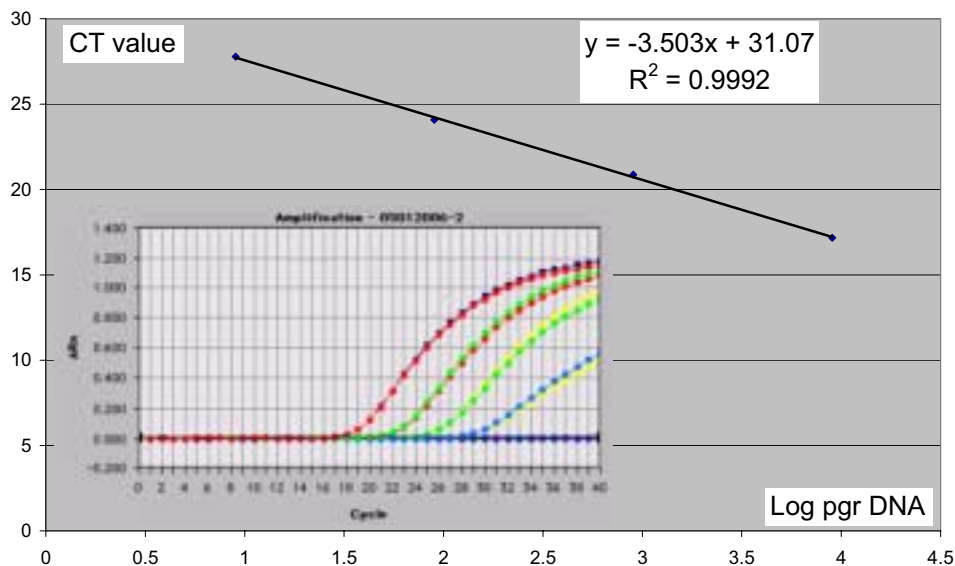
## 2.10 Correlatie tussen FusariumScreen, kwantitatieve Fusarium PCR en DON-accumulatie

Uit het in de -80 °C opgeslagen materiaal van FS11-21 zijn 80 aren geselecteerd op grond van het verkregen FusariumScreen signaal. Voor deze analyses zijn de volgende genotypen geselecteerd:

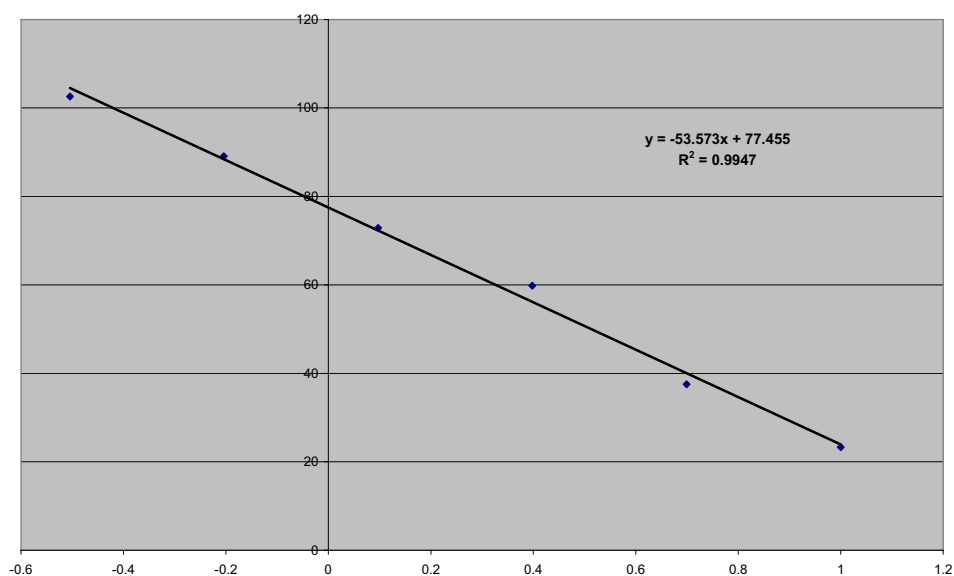
Fenotype	Gebruikte genotype		
Resistent	05KFU2	05KFU9	05KFU6
Vrij resistent	05KFU108	05KFU114	05KFU122
Matig resistent	05KFU86	05KFU102	05KFU104
Vatbaar	05KFU107	05KFU115	05KFU20
Zeer vatbaar	05KFU119	05KFU69	05KFU24

Van deze monsters werd steeds in drievoud DNA geïsoleerd waarin vervolgens de *Fusarium-biomassa* met kwantitatieve TaqMan PCR (Waalwijk *et al.*, 2004) werd bepaald. De hoeveelheid DON werd ook in drievoud bepaald met behulp van ELISA (DEOXYNIVALENOL EIA kit, Eurodiagnostica). De reproduceerbaarheid van deze waarnemingen was zeer goed ( $R^2$  van de standards reeks boven de 0.99 en standaarddeviatie van ongeveer 15-30 procent van de waarde van het monster, zie Figuren 14 en 15). Het is opvallend dat, analoog aan de FusariumScreen metingen, DON- en biomassabepalingen aan verschillende aren van hetzelfde genotype grote verschillen laten zien (Figuur 16). De correlatie tussen *Fusarium-biomassakwantificering* met behulp van FusariumScreen en kwantitatieve PCR was iets lager ( $R^2$  van 0.6, Figuur 17) en de correlatie tussen kwantitatieve PCR en DON-gehalten was beter dan verwacht ( $R^2$  van 0.5 bij lineaire regressie, Figuur 18). Vier van de gevonden afwijkende waarden (oranje omcirkeld) die een groot effect hebben op de  $R^2$  zijn afkomstig van een enkel tarweras. Dit is wellicht een indicatie voor het voorkomen van resistentie type V in dit ras. In twee gevallen (paars omcirkeld) was de kwantitatieve PCR score veel hoger dan de FusariumScreen score, wat zou kunnen duiden op een overschatting van de biomassa. Verwijdering van deze zes afwijkende waarden verbetert de relatie tussen kwantitatieve PCR en DON ( $R^2 = 0.71$ ). Tenslotte is de correlatie tussen FusariumScreen en DON-gehalten minder sterk ( $R^2 = 0.4$ ). Dit suggereert dat de *Fusarium-biomassa*-bepalingen met FusariumScreen minder accuraat zijn dan de kwantitatieve PCR. Hierbij moeten echter een aantal kanttekeningen geplaatst worden; (1) met FusariumScreen wordt de biomassa bepaald vanaf één enkele zijde van de aar, terwijl met kwantitatieve PCR de biomassa bepaald wordt van de totale aar; (2) de grootte van de pakjes binnen een aar is per ras verschillend en beïnvloedt de oppervlakte/inhoud verhouding. Als gekeken wordt naar aren van

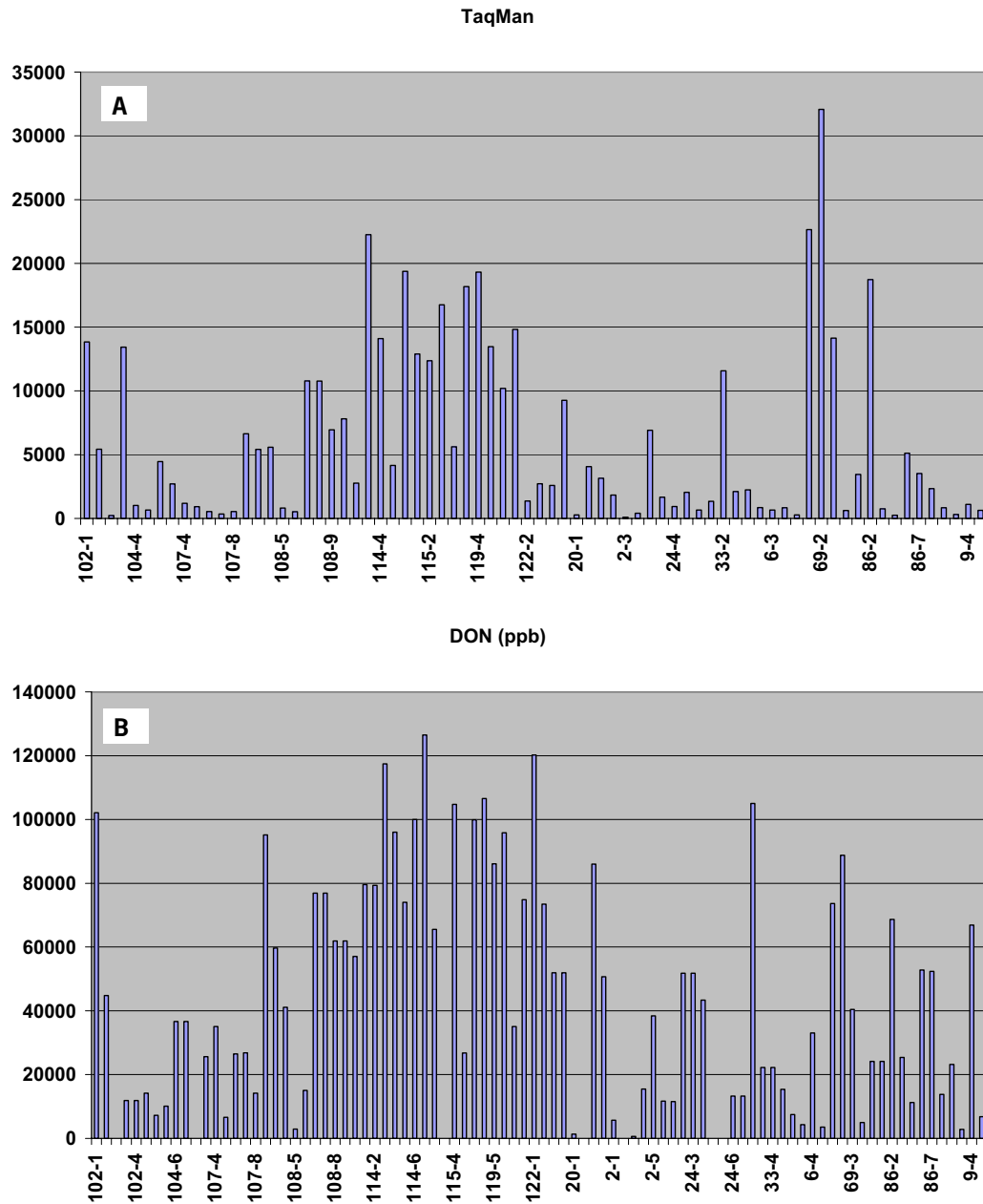
hetzelfde ras dan is de ratio tussen de waarden van de kwantitatieve PCR en FusariumScreen duidelijk beter zoals te zien is voor genotype KFU-9 in Figuur 19; (3) kwantitatieve PCR en DON-bepalingen zijn uitgevoerd op hetzelfde (homogeen vermalen) materiaal, wat resulteert in een hogere correlatie; en (4) de laatste FusariumScreen meting werd acht uur voor het invriezen uitgevoerd. Een mogelijke toename in *Fusarium-biomassa* gedurende deze periode is niet bepaald.



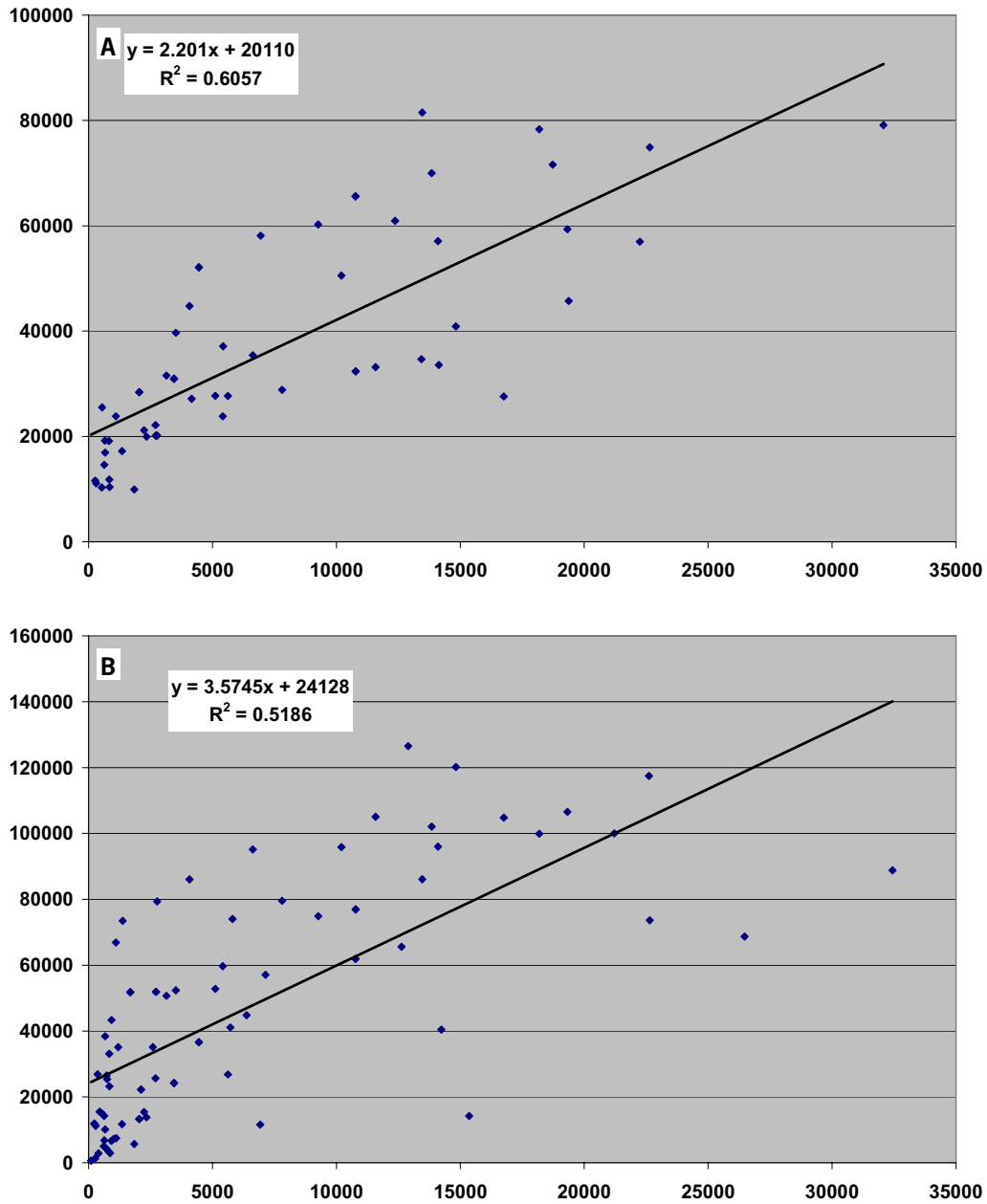
Figuur 14. *Kwantitatieve PCR calibratiecurve voor Fusarium DNA met op de x-as de logaritme van een reeks van bekende DNA hoeveelheden en de corresponderende PCR cyclus drempelwaarden. De inzet laat de toename van fluorescentie zien (y-as) als functie van de PCR cyclus (x-as). De duplo's van de standaard hebben naast vrijwel gelijke PCR cyclus drempelwaarden ook een vrijwel identieke kinetiek.*



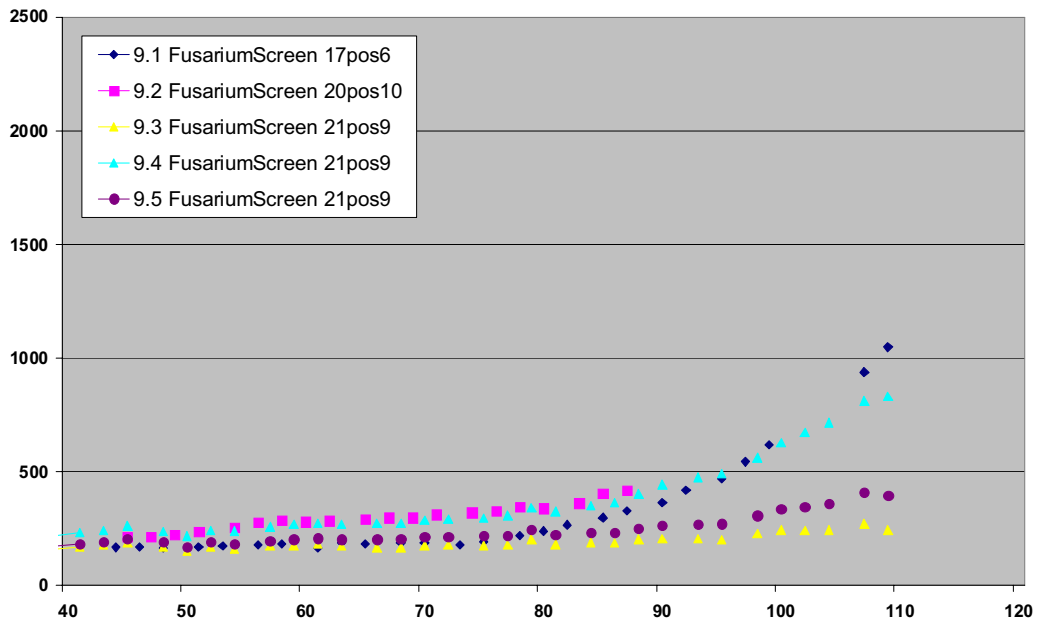
Figuur 15. *ELISA calibratiecurve met op de x-as de logaritme van de DON-concentratie en op de y-as het percentage van de maximale optische dichtheid bij 450 nm.*



*Figuur 16. Fusarium-biomassa en DON-gehalten in met F. culmorum stam IPO39::toxGFP geïnoculeerde aren. (A) Histogram van Fusarium-biomassa zoals bepaald met kwantitatieve PCR in de verschillende tarwearen na inoculatie. Het gemiddelde van drie bepalingen (pg/mg droog gewicht) is weergegeven op de y-as. Op de x-as staat het genotype gevolgd door het aarnummer. (B) De gemiddelden van drie DON-bepalingen (ppb) zijn weergegeven op de y-as. Op de x-as staat het genotype gevolgd door het aarnummer.*



*Figuur 17. (A) Correlaties tussen bepalingen van de Fusarium-biomassa met FusariumScreen (AUDPC over het tijdsinterval van 50 tot 100 uur na inoculatie, y-as) en kwantitatieve PCR (pg DNA/mg droog gewicht, x-as). (B) Correlatie tussen de Fusarium-biomassa zoals bepaald met kwantitatieve PCR (pg DNA/mg droog gewicht, x-as) en de hoeveelheid DON (in ppm, x-as) in dezelfde aren.*



*Figuur 18. Relatie tussen de Fusarium-biomassabepaling met behulp van FusariumScreen (AUDPC over het tijdsinterval van 50 tot 100 uur na inoculatie, y-as) en de Fusarium-biomassa zoals bepaald met kwantitatieve PCR (pg DNA/mg droog gewicht, x-as) voor het tarweras KFU-9.*

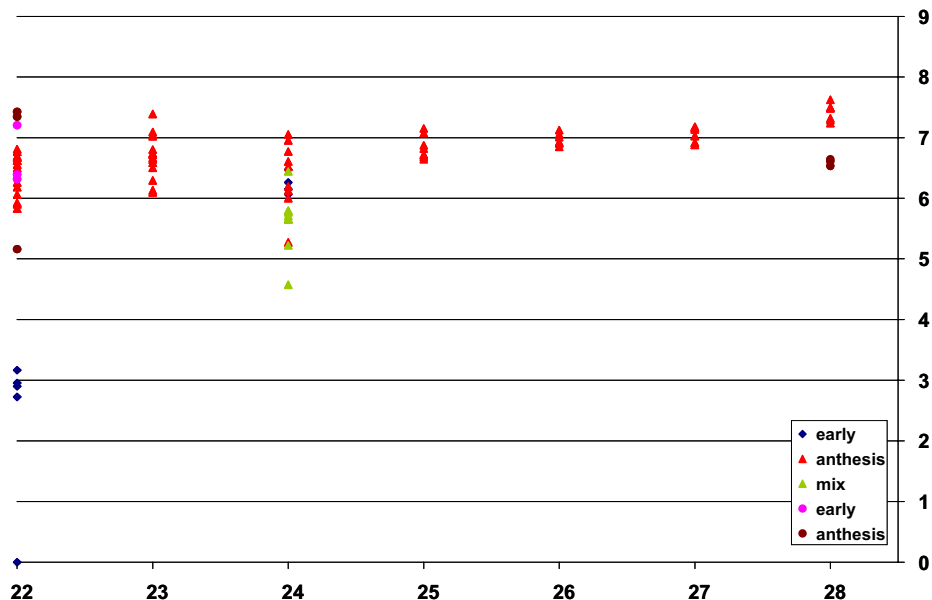
## 2.11 Bepaling van type I resistentie in tarwerassen van de Nederlandse rassenlijst

In 2006 zijn aren afkomstig van verschillende rassen uit proefvelden van PPO te Lelystad tijdens de bloei geïnoculeerd met *F. culmorum* IPO39::toxGFP. Per bepaling zijn zes spray-inoculaties en drie puntinoculaties uitgevoerd (48hpi-120hpi, 20 °C, 95% RH). Door de sterke weersomslag en aanhoudend warm weer was de ontwikkeling van tarwearen bijzonder snel waardoor capaciteitsproblemen in de FusariumScreen opstelling ontstonden. Door een technische storing is bovendien een deel van de metingen verloren gegaan. Daarom zijn in 2007 additionele experimenten uitgevoerd ter completering van de dataset.

In 2006 zijn van de rassen LP413.8.0011 (2x), NIC98-3896b, Anthus, Tulsa, Limes, Ilias, Harlem (2x), Bristol (2x), Globus, Residence (2x), Robigus en Tataros (2x) voldoende FusariumScreen gegevens verzameld. De verschillen tussen aren van hetzelfde genotype zijn lager dan in de FS11-21 experimenten (Tabel 1; Figuur 2), maar de gevonden verschillen tussen de genotypen zijn niet stabiel. Binnen een experimentele periode wordt bijvoorbeeld *cv.* Tataros relatief zwaar gekoloniseerd op dag 1 maar vier dagen later treedt er nauwelijks *Fusarium* kolonisatie op. Omdat er binnen een experiment nauwelijks spreiding in de bloeitijd tussen aren van één genotype is geconstateerd, lijken deze verschillen vooral het gevolg te zijn van verschillen in vatbaarheid van de diverse ontwikkelingsstadia van de bloem tijdens de bloei. Zelfs een nauwkeurige registratie van het bloeitijdstip en inspectie van de meeldraden tijdens de bloei (ook binnen de pakjes) voor de inoculatie hebben de variabiliteit van de metingen niet kunnen reduceren. De natuurlijke variatie in bloeitijdstip en het bepalen van het optimale inoculatietijdstip blijken daarom bepalende factoren te zijn in het succes van *Fusarium* infectie.

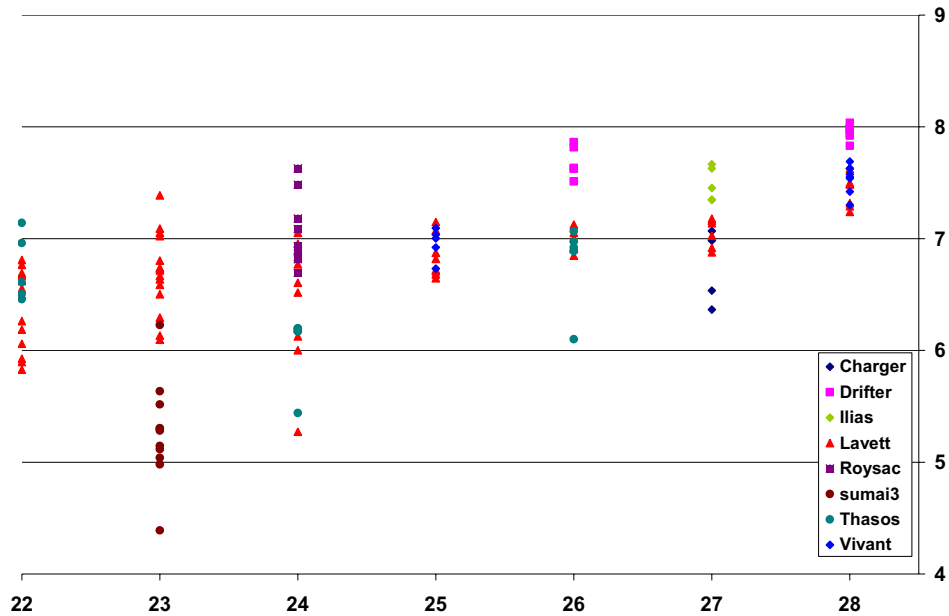
In 2007 zijn daarom nieuwe inoculaties (FS22-28) uitgevoerd op planten die onder gecontroleerde kascondities opgekweekt werden. De aren werden afgesneden en direct geïnoculeerd. Ook hier werden weer duidelijke resistentieverschillen tussen aren van verschillende ontwikkelingsstadia binnen hetzelfde ras geconstateerd. In Figuur 19 is dit geïllustreerd voor *cv.* Lavett na punt- en spray-inoculaties. Daarnaast zijn er opvallende verschillen tussen de experimenten (Figuren 20-22). Dit kan worden veroorzaakt door de ontwikkelingsstadia van de planten of door variatie in het *Fusarium* inoculum. De rasverschillen (Figuur 21-22) ten opzichte van *cv.* Lavett en bekende

resistente rassen zoals *cv.* Sumai-3 en bekende vatbare rassen zoals *cv.* Royssac zijn volgens de verwachting en laten resp. minder en meer *Fusarium* accumulatie ter grootte van 3 log schalen (factor 1000) zien. De verschillen tussen  *cvs.* Vivant (resistentie cijfer 5), Drifter (resistentie cijfer 6,5) en Ilias (resistentie cijfer 8) zijn niet groot waarbij met name in het laatste ras een grote *Fusarium* accumulatie werd geconstateerd.

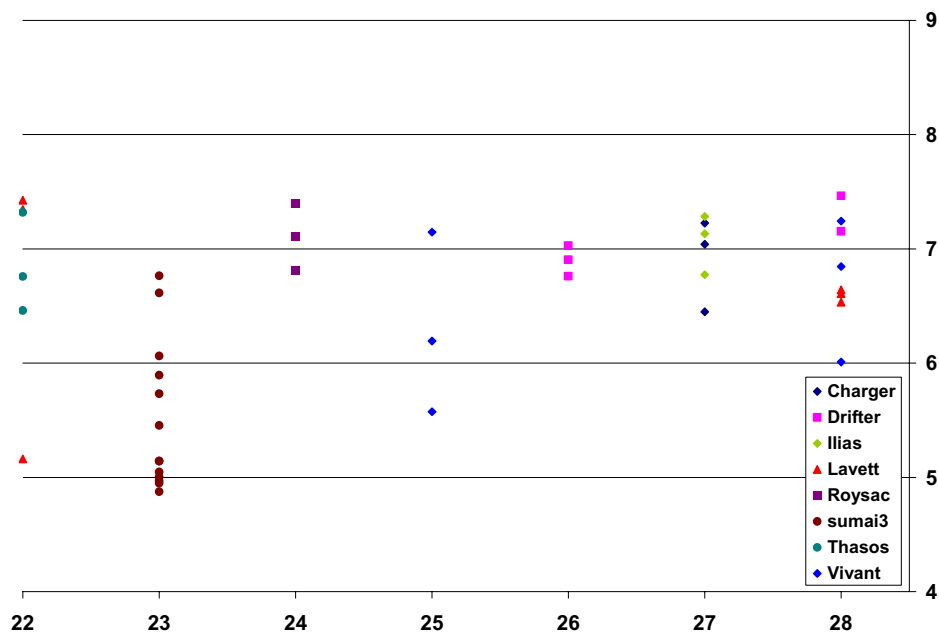


*Figuur 19. Kwantificering van F. graminearum stam Fg820::toxGFP met FusariumScreen in cv. Lavett in FS22-FS28 met behulp van de BioSpec software. De driehoeken laten de spray inoculatie zien (early = vóór bloei, anthesis = tijdens bloei en mix = is voor en tijdens bloei). De cirkels laten de resultaten van de puntinoculatie zien (early = vóór bloei). In alle gevallen is van de gehele aar het signaal (aantal pixels x gemiddelde intensiteit) bepaald en hiervan is de log10-waarde uitgezet op de y-as waarbij op de x-as de verschillende experimenten (FS22 tot FS28) staan aangegeven. Er is duidelijk te zien dat er verschillen zijn tussen experimenten en er grote verschillen in resistentie worden waargenomen in aren die voor en tijdens de bloei worden geïnoculeerd (spray). Bij puntinoculaties zijn deze verschillen kleiner.*





Figuur 20. Kwantificering van *F. graminearum* stam Fg820::toxGFP met FusariumScreen in cv. Lavett in FS22-FS28 met behulp van de BioSpec software. Na spray-inoculatie op aren tijdens de bloei is na vijf dagen van het gehele aar oppervlak het signaal (aantal pixels x gemiddelde intensiteit) bepaald en hiervan is de  $\log_{10}$ -waarde uitgezet op de y-as waarbij op de x-as de verschillende experimenten (FS22 tot FS28) staan aangegeven. Er zijn duidelijke verschillen tussen experimenten en rassen.

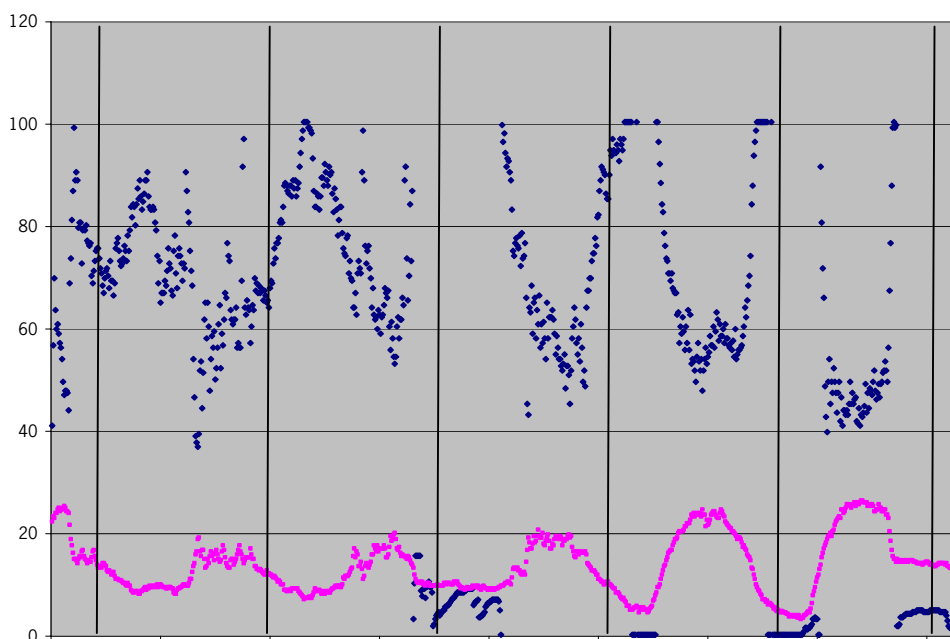


Figuur 21. Kwantificering van *F. graminearum* stam Fg820::toxGFP met FusariumScreen in cv. Lavett in FS22-FS28 met behulp van de BioSpec software. Na puntinoculatie op aren tijdens de bloei is na vijf dagen van het gehele aar oppervlak het signaal (aantal pixels x gemiddelde intensiteit) bepaald en hiervan is de  $\log_{10}$ -waarde uitgezet op de y-as waarbij op de x-as de verschillende experimenten (FS22 tot FS28) staan aangegeven. Er zijn duidelijke verschillen tussen experimenten en rassen.

## 2.12 Effect van luchtvochtigheid en temperatuur op de infectie door *Fusarium*

In een aanpalende studie door PPO wordt een beslissingsondersteunend model voor *Fusarium* in tarwe geoptimaliseerd. De twee rassen die in dit onderzoek centraal staan (*cvs.* Tataros en Vivant) zijn, in overleg met PPO, ook in ons onderzoek opgenomen om het effect van temperatuur en luchtvochtigheid op de infectie te bepalen waarin ook veldwaarnemingen werden betrokken (Figuur 22). Afgesneden planten van *cvs.* Tataros en Vivant uit proefvelden te Ebelsheerd werden in water vervoerd naar PRI waarop de volgende dag inoculaties met *F. culmorum* stam IPO39::toxGFP werden uitgevoerd. Door de sterke weersomslag en aanhoudend warm weer was de ontwikkeling van de zomertarwearen bijzonder snel. De twee rassen verschillen weliswaar in vroegheid, maar zijn vanwege de proefopzet toch tegelijkertijd meegenomen. Met de aren zijn twee *Fusarium*Screen experimenten uitgevoerd bij lage en hoge temperatuur (resp. 15-16 °C en 20-21 °C). In elk experiment zijn de aren bij drie verschillende relatieve luchtvochtigheden geïncubeerd (60%, 90% en 95%) en werden van elk ras zes aren behandeld (drie met spray-inoculatie en drie met puntinoculatie).

De kolonisatie van de aar door *F. culmorum* verloopt duidelijk langzamer bij 16 °C in vergelijking met de kolonisatie bij 21 °C, maar er treedt wel groei van de schimmel op. Ook lieten deze experimenten zien dat *F. culmorum* kan groeien bij lage relatieve luchtvochtigheid (60%) maar er treedt geen massieve kolonisatie op. Het latent aanwezige mycelium kan mogelijk onder gunstige omstandigheden verder uitgroeien (waarschijnlijk zonder de ontwikkeling van symptomen) en later alsnog voor (mycotoxinen) problemen zorgen. Anderzijds kan de aanwezige geringe biomassa verantwoordelijk zijn (lokale) ophoping van mycotoxinen. Dit is een belangrijke waarneming die het belang van een nadere analyse van *Fusarium* infectie en kolonisatie onder suboptimale omstandigheden benadrukt.



Figuur 22. *Temperatuur (in paars) en relatieve luchtvochtigheid (donker blauw) gedurende een zevendaagse bloeiperiode in 2005 (de verschillende dagen worden gescheiden door de verticale lijnen). De schijnbare lage relatieve vochtigheid (<20%) ontstaat gedurende periodes met regen of extreem hoge vochtigheden waarbij het instrument verzadigd is met water waardoor de bepalingen niet goed kunnen worden uitgevoerd.*

## Dankbetuiging

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het Productschap voor Granen, Zaden en Peulvruchten. Co-financiering werd ontvangen van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. De bijdrage van Prof. Xiude Xu werd gefinancierd vanuit het China programma van de Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen. Ing. Els C.P. Verstappen, O. Mendes, A. Elskamp en I.Ph. de Vries verleenden ondersteuning bij kas- en veldproeven.



## Referenties

- Güldener, U., Seong, K.Y., Boddu, J., Cho, S., Trail, F., Xu, J.R., Adam, G., Mewes, H.W., Muehlbauer, G.J. & Kistler, H.C., 2006.  
Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression *in vitro* and *in planta*. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 316-325.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.H., Felk, A. & Maier, F.J., 2005.  
Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 102: 16892-16897.
- Jeger, M.J. & Viljanen-Rollinson, S.L.H., 2001.  
The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 102: 32-40.
- Lee, T.A.J. van der, Yu, D., Jalink, H., van der Schoor, R., Waalwijk, C. & Kema, G.H.J., 2005.  
Tools to analyse the complexity of fungal populations and resistance in the wheat-Fusarium pathosystem. In: *Modern fungicides and antifungal compounds IV* (Eds. Dehne, H.W., Gisi, U., Russell, P.E. & Lyr, H. Proceedings of the 14th International Reinhardtsbrunn Symposium on Modern Fungicides and Antifungal Compounds. April 25-29, Reinhardtsbrunn, Germany, 311-320.
- Mesterhazy, A., 1995.  
Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat *Plant Breeding* 114, 377-386.
- Moradi, F. & Ismail, A.M., 2007.  
Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice. *Ann. Appl. Biol.* 99: 1161-1173.
- Paul, P.A., Lipps, P.E., Hershman, D.E., McMullen, M.P., Draper, M.A. & Madden, L.V., 2007.  
A quantitative review of tebuconazole effect on Fusarium head blight and deoxynivalenol content in wheat. *Phytopathology* 97:211-220.
- Paul, P.A., Lipps, P.E., Hershman, D.E., McMullen, M.P., Draper, M.A. & Madden, L.V., 2008.  
Efficacy of triazole-based fungicides for Fusarium head blight and deoxynivalenol control in wheat: a multivariate meta-analysis. *Phytopathology* 98:999-1011.
- Waalwijk, C., van der Heide, R., de Vries, P.M., van der Lee, T.A.J., Schoen, C., Costrel-de Corainville, G., Häuser-Hahn, I., Kastelein, P., Köhl, J., Lonnet, P., Demarquet, T. & Kema, G.H.J., 2004.  
Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using Taqman. *Eur. J. Pl. Pathol.* 110: 481-494.

