

monster vele verschillende target moleculen tegelijkertijd gedetecteerd kunnen worden met grotere specificiteit. Daardoor kunnen micro-arrays worden ingezet voor snelle, specifieke, efficiënte, kosten-effectieve, gebruikersvriendelijke en betrouwbare multiplex detectie-methoden voor verschillende planten-pathogenen. Om de micro-array technologie geschikt te maken voor diagnostische toepassingen, moeten allereerst generieke extractiemethodes voor DNA en RNA ontwikkeld worden. Ten tweede, moet de gevoeligheid verbeterd worden met generieke pre-amplificatie methodes om ook lage concentraties van de geëxtraheerde nucleinezuren te kunnen detecteren. PCR is de meest gebruikte methode voor amplificatie om zo voldoende kopiën te genereren van specifieke fragmenten van het target DNA. In een simplex PCR bepaling waarin slechts één set PCR primers wordt gebruikt, kan weinig DNA al voldoende kopiën produceren welke een zichtbaar signaal geven op de micro-array. Wordt de detectie van meerdere pathogenen met één primerset uitgevoerd, dan wordt hoofdzakelijk dat pathogeen geamplificeerd welke in de hoogste concentratie aanwezig is. Detectie van het pathogeen in lage concentratie geeft dan problemen. De dynamische range is op deze manier beperkt. Om meerdere targets in één PCR te amplificeren kunnen ook meerdere primersets gebruikt worden. Echter, in deze benadering van multiplex PCR, gaat de gevoeligheid behoorlijk naar beneden en is het aantal te detecteren targets in één bepaling beperkt.

Om al deze problemen te omzeilen is door PRI de pUMA techniek ontwikkeld. pUMA staat voor "padlock based Universal Multiplex detection Array". DNA geëxtraheerd uit een te onderzoeken monster wordt gemengd met specifieke padlock-probes die binden aan het target, welke gedetecteerd moet worden. Deze specifieke padlock-probes worden vervolgens geligeerd, geamplificeerd en gedetecteerd op een universele micro-array. Targets kunnen zijn schadelijke plantpathogenen, goedaardige organismen (beneficials), maar ook genen die betrokken zijn bij bodemgezondheid.

De eerste resultaten met het prototype pUMA laten zien dat simultane detectie van zes pathogenen mogelijk is. Momenteel zijn voor dertig pathogenen (schimmels, bacteriën, nematoden maar ook virussen) padlock probes ontwikkeld. Resultaten gebruikmakend van het pUMA principe zullen worden gepresenteerd.

Door het universele karakter van pUMA zijn er talloze applicaties te bedenken. Dit opent mogelijkheden om gezondheidsproblemen te monitoren op een dusdanige manier dat in een enkele test meerdere kwaadaardige organismen tegelijkertijd gedetecteerd kunnen worden op een gevoelige, betrouwbare en snelle manier.

### 3.2.2 Plantenbeelden voor gewasbeschermingsonderzoek

J.F.H. Snel, H. Jalink, W.J.R.M. Jordi en  
A.H.C.M. Schapendonk<sup>1</sup>

*Plant Research International, Postbus 16,  
6700 AA Wageningen*

<sup>1</sup> *Plant Dynamics, Englaan 8, 6703 EW Wageningen*

Multiple Imaging of Plant Stress (MIPS) heeft zich de afgelopen jaren ontwikkeld tot een veelbelovende techniek voor het gewasbeschermingsonderzoek. De methode is gebaseerd op een combinatie van drie beeldvormende sensoren: chlorofyl fluorescentie, kleur en warmte. MIPS maakt non-destructief meten van fotosynthese en transpiratie van hele planten mogelijk. Een aantal belangrijke plantpathogenen en gewasbeschermingsmiddelen hebben een effect op de fotosynthese, de ademhaling of op de huidmondjes. Met MIPS krijgt de onderzoeker daardoor niet alleen de visuele informatie maar ook de extra informatie van de voor het oog niet zichtbare symptomen. Door opeenvolgende beelden in de tijd op te nemen kan het verloop van de symptomen goed bestudeerd en gekwantificeerd worden. Om het onderzoek betaalbaar te houden is de MIPS sensor op een industriële robot gemonteerd waardoor een beschikbaar meetoppervlak van ruim twee vierkante meter ontstaat. Hierdoor kunnen tientallen planten tegelijkertijd gevolgd worden.

Eén van de meest voor de hand liggende toepassingen is het onderzoek naar de optimale formulering van pesticiden, met name de herbiciden uit de groep fotosyntheseremmers. Omdat deze middelen vaak geen directe visuele symptomen te zien geven, duren gebruikelijke toetsen van de effectiviteit van deze formuleringen ongeveer twee weken. Met de MIPS kan vaak al binnen drie dagen een goede voorspelling gegeven worden van de effectiviteit van de betreffende formulering.

Een andere toepassing is het monitoren van de symptomen van plantpathogenen. Inmiddels is van diverse pathogenen aangetoond dat ze een effect op fotosynthese, ademhaling of energiebalans hebben. Belangrijke pathogenen als *Fusarium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pepino mosaic virus* etc. veroorzaken symptomen die goed met MIPS gemeten kunnen worden. Met de bijbehorende software kan de ontwikkeling van de symptomen gekwantificeerd worden. Dat biedt diverse mogelijkheden voor onderzoek, zoals de interactie tussen endofyten en pathogenen. Omdat de meetmethode non-destructief is kan de plant gericht bemonsterd worden om de aan-

wezige populatie van micro-organismen te bestuderen. Met snelle en gevoelige detectiemethoden gebaseerd op flowcytometrie kunnen de monsters vervolgens gekarakteriseerd en gesorteerd worden voor verder onderzoek.

Een andere op PRI ontwikkelde toepassing van beeldvormende sensoren is GFPScreen: technologie voor de detectie van fluorescentiesignalen van reporter-moleculen in planten en/of pathogenen. Een voorbeeld hiervan vormt FusariumScreen voor het non-destructief monitoren van de penetratie en kolonisatie van planten door een met GFP getransformeerde schimmel (*Fusarium culmorum* isolaat). Met deze, in samenwerking met de groep van Gert Kema ontwikkelde, techniek kan het kolonisatieproces in de levende plant vanaf het allereerste begin kwantitatief gevolgd worden. Met FusariumScreen kan kwantitatieve informatie verkregen worden over de beschreven resistentiemechanismen in tarwe. Deze informatie is waardevol als ondersteuning van veredelingsprogramma's.

In de afgelopen 5 jaar is er op PRI zoveel vooruitgang geboekt op het gebied van de sensortechnologie dat het mogelijk wordt om de boven beschreven methoden te combineren in één sensor. Daarmee wordt het denkbaar dat niet alleen het pathogeen en de respons van de plant maar ook het effect van bestrijding in één beeld zichtbaar gemaakt worden.

### 3.2.3 **Plantenvirologie in Nederland; opbrengst en verliezen**

*René van der Vlugt,*

*Plant Research International BV, Postbus 16,  
6700 AA Wageningen*

De wieg van het onderzoek aan plantenvirussen, de kleinste en minst zichtbare van alle plantpathogenen, stond in Nederland. Al meer dan 120 jaar geleden startte Adolf Mayer in Wageningen onderzoek naar een destijds vernietigende ziekte in de Nederlandse tabaksteelt. De verantwoordelijke ziekteverwekker het tabaksmozaïekvirus zorgt ook nu nog steeds wereldwijd voor vele problemen. Het Wagenings onderzoek van Mayer en later Beijerinck legde echter de basis voor het Nederlandse plantenvirologisch onderzoek. Dit onderzoek groeide vooral na de Tweede Wereldoorlog tot een zeer hoog niveau en heeft dan ook een zeer belangrijke bijdrage geleverd aan de ontwikkeling en het succes van onze naoorlogse land- en tuinbouw. Geen land ter wereld heeft zulke geavan-

ceerde keurings- en monitoringsystemen opgebouwd om de kwaliteit van zijn uitgangsmateriaal en exportmateriaal te waarborgen. De noodzaak om betrouwbaar en goedkoop schadelijke virusziekten op een zo vroeg mogelijk moment in de keten te onderkennen was en is een belangrijke pijler onder dit systeem. Verschuiving in het beleid van de overheid leidde echter sinds de jaren '90 tot een afbouw van de directe financiering van dit praktijkgerichte onderzoek. Reductie van het bestrijdingsmiddelengebruik stond voortaan centraal. Als gevolg hiervan zijn de kennis en expertise op het gebied van de plantenvirologie de laatste jaren sterk achteruitgegaan. Langzamerhand is de grens bereikt waarop niet meer adequaat kan worden gereageerd op actuele en potentiële virologische problemen omdat de kennis en expertise uit het verleden niet meer toereikend of zelfs al verdwenen zijn. Ook in het buitenland zijn de ontwikkelingen vergelijkbaar.

Virussen zijn echter bij uitstek opportunisten en zijn als geen ander in staat om razendsnel de kop op te steken en grote, zelfs wereldwijde (economische) problemen te veroorzaken (denk aan SARS). Ook plantenvirussen veroorzaken de laatste tijd wereldwijd steeds meer problemen. Pepino mozaïekvirus is het voorbeeld hoe ook in Nederland in zeer korte tijd een schadelijk virus om zich heen kan grijpen en zich kan vestigen. Een groot aantal oude, nieuwe en potentiële problemen staan voor de deur en de vraag dringt zich op of en hoe de BV Nederland daar wel adequaat op kan reageren. Zal er voldoende (basis)kennis en expertise beschikbaar zijn om een effectief fyto-sanitair beleid mogelijk te maken? Wat zal er nodig zijn om te voorkomen dat de in het verleden behaalde opbrengsten van het plantenvirologische onderzoek teniet gedaan worden door de dreigende verliezen???

### 3.2.4 **Detectie van gewasaantasting door insecten en plant- pathogenen**

*H.J. Bouwmeester, F.W.A. Verstappen,  
I.F. Kappers en M.A. Jongsma*

*Plant Research International, Postbus 16,  
6700 AA Wageningen*

Planten zijn door het feit dat ze zich niet uit de voeten kunnen maken bij dreigend gevaar aangewezen op de verdediging met behulp van chemische stoffen. Bekend is dat planten giftige stoffen kunnen bevatten waardoor ze onaantrekkelijk zijn voor insecten. In de afgelopen vijftien jaar is echter ook duidelijk geworden dat planten onder invloed van aantasting door