

Nieuwe mogelijkheden voor het monitoren van pathogenen: de inzet van niet-invasieve en flowcytometrische detectiemethoden

J.M. van der Wolf, J.H.W. Bergervoet,
H. Jalink, J. Peters, R. van der Schoor,
W. Sledz, J.F.H. Snel en R.A.A. van der Vlugt

Plant Research International, Postbus 16,
6700 AA Wageningen

Door toenemende kwaliteitseisen aan land- en tuinbouwproducten worden snelle, betrouwbare en kosteneffectieve methoden voor monitoring van ziekten en plagen van steeds groter belang. In de meest ideale situatie worden alle producten op een niet-invasieve wijze onderzocht, waarna ze nog steeds vermarkt kunnen worden. Deze situatie wordt benaderd bij gebruik van de MIPS technologie (Multiple Image Plant Stress), een beeldvormend meetsysteem waarbij door middel van een geavanceerde ruimtelijke verkenning van plantsignalen, simultaan patronen van chlorofyl fluorescentie en spectrale reflectie worden geanalyseerd. Met de MIPS kan de inwendige kwaliteit van planten op laboratoriumschaal worden bepaald. Deze unieke sensor is gemonteerd op een industriële robot. Planten tot een grootte van circa 50 x 50 x 50 cm (lxbxh) kunnen hiermee automatisch en continue gemeten worden. MIPS heeft zich de afgelopen jaren ontwikkeld tot een veelbelovende techniek voor het gewasbeschermingsonderzoek. MIPS maakt non-destructief opnamen van de fotosynthese activiteit van hele planten. Een aantal belangrijke plantpathogenen hebben een direct effect op de fotosynthese. Uit de veranderende patronen van de MIPS-beelden kan de aantasting door plantpathogenen worden gekwantificeerd zelfs voordat dit met het oog waarneembaar is. Dit is voor diverse pathogenen aangetoond, zoals *Fusarium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Xanthomonas* en Pepinomozaïekvirus.

Als er toch een toets uitgevoerd moet worden op de (latent) aanwezige ziekteverwekkers in plantenextracten, dan is de Luminex technologie zeer geschikt. Deze flowcytometrische methode is gebaseerd op het gebruik van bolletjes ('microspheres') met een diameter van circa 5 µm, die intern gekleurd zijn met twee fluorochromen, rood en infrarood. Er is een assortiment van honderd uniek gekleurde bolletjes beschikbaar, waarmee honderd verschillende pathogenen tegelijk gedetecteerd kunnen worden. Zowel antistoffen als nucleïnezuuren kunnen aan de bolletjes gekoppeld worden. In een microsphere immunoassay (MIA) worden ruwe plantenextracten eerst twintig minuten

geïncubeerd met de bolletjes voorzien van specifieke antilichamen en daarna dertig minuten met antistoffen die met Alexa532, een reporter fluorochroom, gekoppeld zijn. De monsters worden daarna geanalyseerd met een Luminex analyzer, waarin de identiteit van het bolletje met een rode laser wordt vastgesteld en de aanwezigheid van een reporter fluorochroom met een groene laser.

Een MIA kan binnen een uur worden uitgevoerd en heeft tenminste eenzelfde gevoeligheid als ELISA. Echter, voor een MIA hoeven geen wasstappen uitgevoerd te worden, terwijl er ook minder reagentia voor nodig zijn. Met een 'high throughput' Luminex analyzer kunnen tot 100.000 toetsen per dag worden uitgevoerd.

Inmiddels zijn er toetsen beschikbaar voor Tulpenvirus X (TVX), Aardappelvirus Y (PVY), aardappelvirus X (PVX), Slamozaïekvirus (LMV), Pepinomozaïekvirus (PeMV) en voor *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en *Erwinia chrysanthemi*.

Nieuwe mogelijkheden van moleculaire technieken in de tuinbouw: DNA Multiscan in de praktijk

D.J.W. Ludeking en J.R. Sanders

Relab den Haan, afdeling Plantenziektkunde, Lookwatering
62, 2635 EA Den Hoorn

Sinds de zomer van 2003 biedt Relab den Haan de DNA Multiscan aan. Deze techniek voor multiplex detectie en identificatie van plantpathogenen wordt sindsdien op grote schaal in de praktijk toepast voor diagnostische doeleinden. Met de gebruikte DNA array techniek kunnen in een enkele test 44 schimmels en acht bacteriën worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Om de techniek ook te kunnen gebruiken voor 'monitoring'-doeleinden zijn sinds 2003 verschillende praktijkonderzoeken gestart. Bij deze praktijkonderzoeken is gedurende de teelt het voorkomen en de verscheidenheid van verschillende ziekteverwekkers in het drainwater gevolgd. Ook is gekeken naar de effecten van het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen op de schimmelpopulatie in het drainwater. Het drainwater is bemonsterd uit verzamelpotten in de kas. In dit water zijn gedurende praktijkproeven verschillende schimmels gedetecteerd. Eenmaal gedetecteerde schimmels worden langere tijd waargenomen in het drainwater. Ook is gedurende deze proeven een duidelijke variatie in signaalsterkte van de gedetecteerde schimmels waarneem-

VOORDRACHTEN