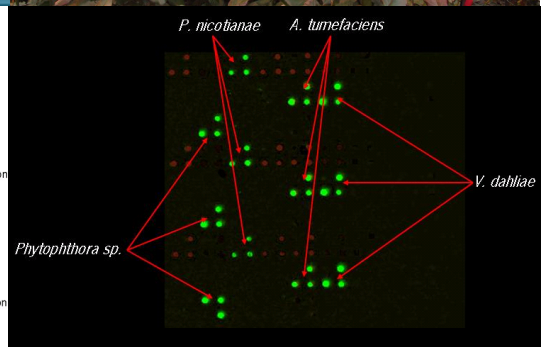
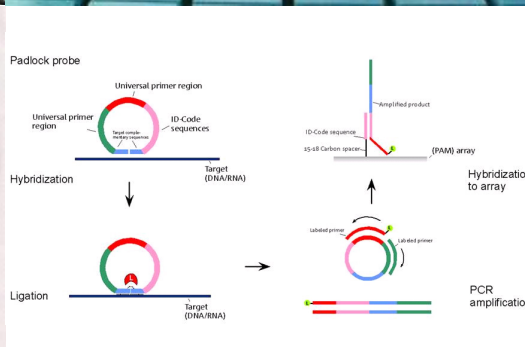
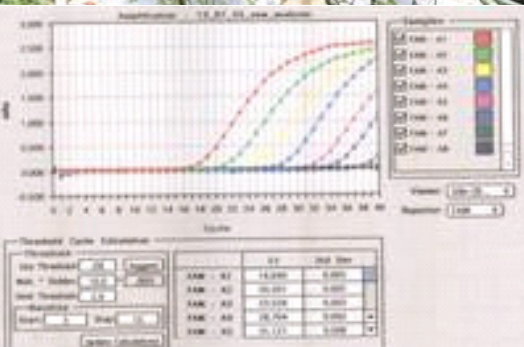


Multiplex detectie van plantenpathogenen van tomaat, roos en spathiphyllum in waterige recirculatie-systemen met behulp van micro-array technologie

P. Bonants & J. Wubben





Multiplex detectie van plantenpathogenen van tomaat, roos en spathiphyllum in waterige recirculatie-systemen met behulp van micro-array technologie

P. Bonants¹ & J. Wubben²

¹ Plant Research International B.V., Wageningen

² PPO Glastuinbouw, Aalsmeer

© 2006 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.

Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw (90%) en het Ministerie van LNV (10%).



Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Inleiding	1
1.1 Probleemstelling/Achtergrond	1
1.2 Doel	2
2. Projectplan	3
2.1 Inventarisatie	3
2.2 Sequentieanalyse	3
2.3 Ontwikkeling uniforme DNA/RNA extractie uit waterige recirculatiesystemen van de teelt van tomaat/roos/spathiphyllum	4
2.4 Generieke amplificatie / Labeling	4
2.5 Toetsen plantpathogeniteit van diverse concentraties van de diverse plantenpathogenen	4
2.6 Multiplex test met mengsels van DNA/RNA monsters	5
2.7 Inoculatie recirculatiewater met verschillende pathogenen per teelt	5
2.8 Praktijktoets	6
2.8.1 Selectie bedrijven en verzameling drainwatermonsters	6
2.8.2 Validatie PLP amplificatie / detectie met praktijk- watermonsters	6
2.8.3 Vergelijking met klassieke uitplaatmethoden	6
2.8.4 Validatie schadedrempeltoetsen en opzetten van een monitoringsysteem	6
3. Resultaten	7
3.1 Inventarisatie	7
3.2 Sequentie-analyse	8
3.3 Ontwikkeling uniforme DNA/RNA extractie uit waterige recirculatiesystemen van de teelt van tomaat/roos/spathiphyllum	9
3.4 Generieke amplificatie / Labelling	12
3.4.1 3D micro-array van PamGene BV, Den Bosch	12
3.4.2 Padlock probe (PLP) amplificatie	14
3.5 Toetsen plantpathogeniteit van diverse concentraties van de diverse plantenpathogenen	14
3.6 Multiplex test met mengsels van DNA/RNA monsters	14
3.7 Inoculatie recirculatiewater met 5-10 plantenpathogenen per teelt	15
3.7.1 Roos	17
3.7.2 Spathiphyllum	18
3.7.3 Tomaat	19
3.8 Praktijktoets	23
4. Slotconclusie	27
5. Aanbevelingen	29
6. Publiekssamenvatting	31

	pagina
7. Publicaties, lezingen, posters en overige presentaties	33
7.1 Publicaties	33
7.2 Lezingen	33
7.3 Posters	34
7.4 Overige presentaties	34
Bijlage I. Flyer boek Gewasbeschermingsprogramma 397-III	1 p.
Bijlage II. Poster Open Broeidagen Lisse	1 p.

1. Inleiding

1.1 Probleemstelling/Achtergrond

In afgelopen jaren heeft de ontwikkeling van detectiemethoden van plantenpathogenen, gebaseerd op moleculair biologische technieken, een enorme ontwikkeling doorgemaakt. Een belangrijk voordeel van deze nieuwe technieken ten opzichte van de gangbare diagnostiek is de snelheid waarmee een resultaat verkregen kan worden. In veel gevallen kan binnen 24 uur uitsluitsel gegeven worden of een ziekteverwekker aanwezig is of niet. Behalve aangetast plantmateriaal, kan ook de voedingsoplossing en substraat onderzocht worden op besmetting. Nog recenter is de ontwikkeling van multiplex detectietechnieken waarbij in één toets de aanwezigheid van meerdere ziekteverwekkers bepaald kan worden. Hiermee ontstaan voor de praktijk vele nieuwe mogelijkheden. Bedrijven kunnen middels het periodiek uitvoeren van controles op aanwezigheid van plantenpathogenen het gebruik van kostbare en milieubelastende bestrijdingsmiddelen terugdringen en hun systeem wellicht certificeren voor een plantpathogeen-vrije teelt. Dergelijke toetsen kunnen ook gebruikt worden voor toetsen en certificeren van uitgangsmateriaal. Deze ontwikkelingen sluiten nauw aan bij de LNV visie voor de komende jaren ('Duurzame Gewasbescherming') waarbij veel aandacht wordt geschonken aan terugdringing van milieubelastende bestrijdingsmiddelen door inzet van schadedrempels en waarschuwingssystemen.

Het project

Het project richt zich op een drietal teelten met verschillende watersystemen:

Een glasgroente, een snijbloem en een potplant:

- | | | |
|-----------------|-----------|------------------------------------|
| • Tomaat | groente | substraat m.b.v. recirculatiewater |
| • Roos | snijbloem | substraat m.b.v. recirculatiewater |
| • Spathiphyllum | potplant | m.b.v. eb/vloedsysteem |

Bij de deelnemende onderzoeksinstituten (PRI en PPO Glastuinbouw) is veel kennis aanwezig over verschillende ziekteverwekkers van deze gewassen. In het project is een aanvang gemaakt met de ontwikkeling van een multiplex detectiesysteem, waarbij met name naar ziekteverwekkers gekeken wordt, welke zich met de voedingsoplossing in de teelt kunnen verspreiden. In het recirculerende water kunnen met behulp van moleculaire technieken de pathogenen worden gedetecteerd. Er zijn momenteel technologische ontwikkelingen gaande waarin op een klein oppervlak duizenden DNA spots (stukjes DNA) kunnen worden aangebracht. Na hybridisatie met een onbekend DNA monster lichten diverse spots op en geven zo een beeld van wat in het onbekende DNA monster aanwezig is. Duizenden spots op een klein oppervlak heet nu een DNA-array of micro-array. Door nu DNA sequenties aan te brengen die specifiek zijn voor bepaalde plantenpathogenen en vervolgens te hybridiseren met DNA afkomstig van een watermonster kan een inzicht verkregen worden welke plantenpathogenen aanwezig zijn in het watermonster. Op deze manier kunnen watersystemen gemonitord worden gedurende een bepaalde tijdsperiode van een teelt. Hiermede wordt een methode ontwikkeld om de hygiëne en gezondheid van het gebruikte water te kunnen controleren. De ontwikkelde methode zal in praktijksituatie getoetst worden waarbij toepassingsmogelijkheden voor deze drie gewassen duidelijk zichtbaar gemaakt worden.

Er zijn de afgelopen jaren diverse DNA technieken ontwikkeld waarmee ziekteverwekkers in een recirculerend teeltsysteem aangetoond kunnen worden. De DNA technieken zijn algemeen zeer gevoelig en kunnen in relatief korte tijd uitslag geven (24 uur). Er kan onderscheid gemaakt worden tussen enkelvoudige toetsen waarbij maar een ziekteverwekker per analyse aangetoond kan worden en meervoudige toetsen (multiplex) waarbij meerdere ziekteverwekkers (tientallen) per analyse aangetoond worden. Een tweede onderscheid dat gemaakt kan worden is of een analyse kwalitatief is (ja of nee) of kwantitatief (hoeveelheid). Er vindt een ontwikkeling plaats van enkelvoudig kwalitatief naar meervoudig kwantitatief.

Sinds 2003 worden in de praktijk DNA multiplex analyses uitgevoerd (DNA multiscan, Relab den Haan of Riscover, Bgg). De ervaring van de eerste jaren is dat deze techniek informatie geeft over de aan of afwezigheid van ziekteverwekkende organismen in het teeltsysteem. Indien noodzakelijk wordt op basis van de uitslag van de analyse een

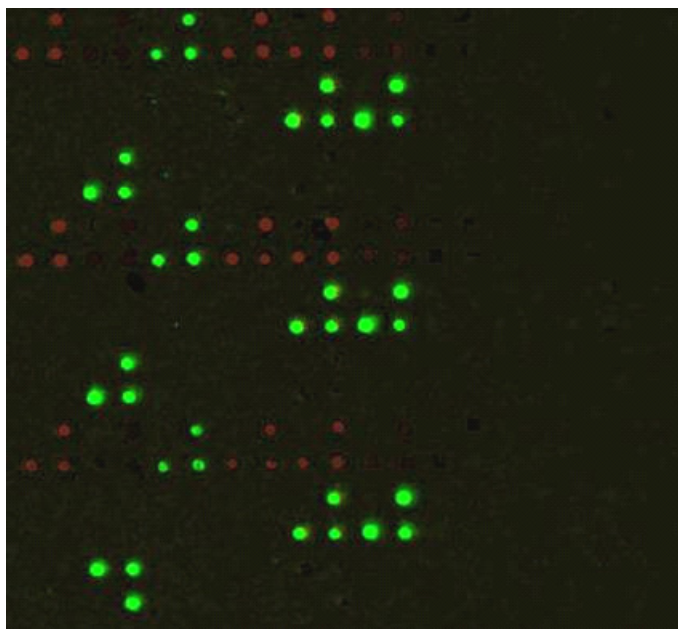
advies gegeven aan de teler voor de uitvoering van een beheersmaatregel, waaronder toepassing van gewasbeschermingsmiddelen. Omdat de DNA technieken veel meer en sneller informatie geven over aanwezigheid van ziekteverwekkers zijn de telers in eerste instantie ook geneigd om sneller gewasbeschermingsmiddelen in te zetten. Dit zou aanleiding kunnen geven tot een toename van het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen. Het is essentieel dat er schadedrempelgegevens beschikbaar komen welke de noodzaak van de inzet van gewasbeschermingsmiddelen onomstotelijk vastleggen. In dat kader is het ook belangrijk dat er in de toekomst steeds meer gebruik gemaakt gaat worden van kwantitatieve detectietechnieken waarmee de exacte hoeveelheid van een ziekteverwekker in het teeltsysteem vastgesteld kan worden.

PRI werkt in dit project samen met PPO Glastuinbouw aan de ontwikkeling van een kwantitatieve DNA multiplex detectiemethode om ziekteverwekkers in recirculatiewater aan te tonen. Dit project is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw. Het project heeft betrekking op de gewassen roos, tomaat en spathiphyllum. Naast de ontwikkeling van de detectiemethoden door PRI is er door PPO in het project veel tijd geïnvesteerd in de uitvoering van schadedrempelproeven voor deze gewassen. Welk niveau van een bepaalde ziekteverwekker geeft schade aan de plant. De resultaten van deze proeven zijn diverse malen aan PT en aan de begeleidingsgroep van het project gepresenteerd.

In het laatste jaar van het project (2005) is de ontwikkelde multiplex DNA analyse methode getoetst aan de hand van recirculatiewatermonsters welke afkomstig waren van de schadedrempel proeven. Daarnaast zijn in 2005 op praktijkbedrijven monsters verzameld en deze zijn eveneens met behulp van de multiplex DNA analyse methode onderzocht. Deze analyses verschaffen inzicht in de deugdelijkheid van de DNA toets en de waarde van een praktijkadvies.

1.2 Doel

Doel van het project is het ontwikkelen van een multiplex detectie systeem m.b.v. DNA micro-array technologie voor plantenpathogenen in water van een drietal belangrijke teelten: tomaat, roos en spathiphyllum.



Figuur 1. Voorbeeld van een micro-array.

2. Projectplan

Het project bestaat uit een aantal fasen:

- 2.1 Inventarisatie
- 2.2 Sequentieanalyse
- 2.3 Ontwikkeling uniforme DNA/RNA extractie uit waterige recirculatiesystemen van de teelt van tomaat/roos/
spathiphyllum
- 2.4. Generieke amplificatie / Labeling
- 2.5. Toetsen plantpathogeniteit van diverse concentraties van de diverse plantenpathogenen
- 2.6 Multiplex test met mengsels van DNA/RNA monsters
- 2.7 Inoculatie recirculatiewater met 5-10 plantenpathogenen per teelt
- 2.8 Praktijktoets
- 2.9 Rapportage

Het project is uitgevoerd door PRI Wageningen en PPO Glastuinbouw Aalsmeer.

Projectleider	: Dr. P.J.M. Bonants
Adres	: Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Telefoonnummer	: 0317-476213
Faxnummer	: 0317-418094
E-mailadres	: peter.bonants@wur.nl
Overige uitvoerder	: Dr.ir. J. Wubben
Adres	: Praktijkonderzoek Plant &Omgeving Glastuinbouw, Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
Telefoonnummer	: 0297-352303
Faxnummer	: 0297-352270
E-mailadres	: jos.wubben@wur.nl

2.1 Inventarisatie

In dit onderdeel van het project wordt geïnventariseerd welke plantenpathogenen belangrijk zijn om in waterige systemen in een multiplex setting gedetecteerd te worden voor de drie gekozen teelten: tomaat, roos en spathiphyllum.

Vervolgens zijn de volgende vragen opgehelderd:

- Zijn van deze plantenpathogenen DNA sequenties bekend? En zo ja, welke?
- Zijn er DNA sequentiegegevens bekend van nauw verwante soorten van de gekozen plantenpathogenen? Ook de niet-pathogene soorten en mogelijke crossreageerders worden meegenomen in het onderzoek.
- Zijn er daarnaast DNA sequentiegegevens voorhanden van andere soorten die voor kunnen komen in de genoemde teelten, die niet of nauwelijks pathogeen zijn? Zijn er universele PCR primers voorhanden voor de gekozen DNA sequenties?

2.2 Sequentieanalyse

In dit onderdeel worden de gekozen plantenpathogenen plus hun verwante soorten en andere organismen, die in genoemde teelten voor kunnen komen, verzameld en opgekweekt. Vervolgens is DNA isolatie uit de kweken uitgevoerd. Uit de inventarisatie (2.1) werd opgehelderd welke DNA sequenties in de diverse databases wereldwijd voorhanden zijn en welke niet voorhanden zijn. Van een groot aantal plantenpathogenen is de DNA sequentie van sommige genen bepaald ter verificatie van DNA sequenties uit de databases. Van een beperkt aantal plantenpathogenen is nieuwe DNA sequentie informatie verkregen.

Voor het maken van de micro-arrays is er een selectie van oligo's (korte stukjes DNA) gemaakt welke op de micro-array zullen worden gespot. Er zullen meerdere oligo's per plantenpathogeen worden gespot. Dit verhoogt de specificiteit en dus de betrouwbaarheid van de test.

2.3 Ontwikkeling uniforme DNA/RNA extractie uit waterige recirculatiesystemen van de teelt van tomaat/roos/spathiphyllum

In dit onderdeel van het project wordt een methode ontwikkeld om op een uniforme manier DNA te extraheren uit het recirculatiewater, waaraan een set van plantenpathogenen is toegevoegd. Het water zal worden gecentrifugeerd of gefiltreerd. Vervolgens zal een efficiënte DNA/RNA extractie uit recirculatiewater van genoemde teelten worden ontwikkeld. Diverse bestaande extractie methodieken zullen hiervoor worden geëvalueerd. Watermonsters uit de praktijk zullen worden gespiked met een bekende hoeveelheid van de geselecteerde plantenpathogenen. In eerste instantie is gekozen om een nematode, een bacterie, en twee verschillende schimmelsoorten te testen.

2.4 Generieke amplificatie / Labeling

Daar verwacht mag worden dat de gevoeligheid van de detectie niet voldoende zal zijn, zal een preamplificatie (vermenigvuldiging) van het DNA/RNA noodzakelijk zijn.

Twee methodes zullen hiervoor worden geëvalueerd voor hun bruikbaarheid:

Een universele preamplificatie methode

Verwacht mag worden dat niet voor alle pathogenen een universele primerset te ontwikkelen zal zijn. Derhalve zal voor schimmels, bacteriën en nematoden (ev. ook virussen) een aparte primerset ontwikkeld worden. Gedacht wordt aan 16S PCR voor bacteriën, ITS PCR voor schimmels en ITS PCR voor nematoden. Getracht zal worden deze drie a vier primersets in één amplificatie reactie te integreren.

De detectie van de gelabelde amplicons zal geschieden door hybridisatie op een micro-array waarop oligo's (korte stukjes DNA), die specifiek zijn voor diverse plantenpathogenen, gespot zijn.

Een nieuwe preamplificatie methode

Plant Research International heeft een nieuwe preamplificatie methode ontwikkeld op basis waarvan alle pathogenen in een keer geamplificeerd kunnen worden (padlock probe (PLP) gebaseerde methode). Deze methode zal voor gekozen pathogenen worden geïmplementeerd. Vervolgens zal bekeken worden op welke manier de preamplificatie-producten gelabeld dienen te worden, hetzij met een fluorescente groep of anderszins.

2.5 Toetsen plantpathogeniteit van diverse concentraties van de diverse plantenpathogenen

Doel is te bepalen welke hoeveelheid van een ziekteverwekker bij eenmalige besmetting leidt tot zichtbare aantasting en schade. Gedurende een periode van 12 maanden is het onderzoek uitgevoerd op 16 onafhankelijke teeltsystemen ingericht met tomaat, roos en spathiphyllum. Voor tomaat werd cultivar 'Durintha' geteeld op steenwol matten. Voor roos werd stek van cultivar 'Vendela' op steenwol matten geteeld en voor spathiphyllum werden zaailingen van cultivar 'Chopin' in 10 cm potten geteeld. Planten zijn geïnoculeerd met verschillende hoeveelheden van de diverse pathogenen om te zien welke hoeveelheid van een bepaald pathogeen schade geeft. De proeven die in dit kader zijn ingezet hebben mede geresulteerd in de invulling van Tabel 4 waarin schadedrempel voor verschillende gewas-ziekteverwekker combinaties weergegeven staan. De tabel kan als handvat fungeren voor schadedrempels die in de praktijk aangehouden kunnen worden wanneer een teeltsysteem gemonitord wordt op ziekteverwekkers. De weergegeven waarden moeten echter wel vertaald worden naar de praktijk. Cultivargevoeligheid, substraat type, teelt-

omstandigheden, gewasleeftijd en nog vele andere zaken bepalen of een bepaald niveau van een ziekteverwekker tot daadwerkelijke schade aan het product zal leiden. Deze zogenaamde weegfactoren bepalen de uiteindelijke hoogte van de schadedrempel in de praktijk. Deze weegfactoren kunnen op basis van onderzoeksresultaten van verschillende partijen en op basis van praktijkervaring nader vastgesteld worden.

2.6 Multiplex test met mengsels van DNA/RNA monsters

Alle facetten van multiplex detectie zullen worden uitgevoerd met een mengsel van DNA/RNA preparaten van een aantal plantenpathogenen:

- Universele preamplificatie van het DNA
- Hybridisatie met gelabelde preamplicons met micro-arrays
- Evaluatie van de data

Voornamelijk is gewerkt met diverse *Phytophthora* soorten. Preamplicons zijn gemaakt met behulp van PCR en generieke schimmel primers.

Een nieuw soort micro-array is geëvalueerd: een 3D micro-array van PamGene BV uit Den Bosch. Er zijn door PamGene een aantal door ons geselecteerde probes, die specifiek zijn voor een groot aantal *Phytophthora* soorten, gespot. De micro-arrays zijn getest op specificiteit, bruikbaarheid, gevoeligheid en kosten.

De nieuwe preamplificatie methode m.b.v. padlock probes (PLPs) is uitgetest in eerste instantie op *Phytophthora fragariae*. Vervolgens zijn padlock probes ontwikkeld op een aantal voor het project relevante schimmels, bacteriën en nematoden. De amplicons van deze preamplificatie methode zijn zowel op de traditionele 2D micro-arrays als ook op de 3D micro-arrays uitgetest.

Een kwantitatieve component is aan de padlock probe strategie toegevoegd. Daartoe zijn andere probes (PRI-lock probes) ontwikkeld die het te detecteren plantenpathogeen kwantitatief kunnen bepalen.

De micro-arrays die hiervoor gebruikt zijn werken op het BioTrove systeem, een systeem dat door PRI is aangeschaft om multiplex en kwantitatieve detectie met elkaar te kunnen combineren.

2.7 Inoculatie recirculatiewater met verschillende pathogenen per teelt

Bij de pathogeniteitsproeven zijn de planten eenmalig besmet met een enkele ziekteverwekker. In de praktijk zal er, wanneer er sprake is van een besmette voedingsoplossing, continu besmetting van dezelfde plant plaatsvinden (afhankelijk van het teeltsysteem en het al of niet ontsmetten van voedingswater). Om hier een praktijksituatie na te bootsen zijn systemen infecties uitgevoerd in gesloten teeltsystemen met recirculatie van voedingswater. Het systeem is eenmalig besmet door het toevoegen van de ziekteverwekker aan de voedingsoplossing in de tank.

Voor tomaat, roos en spathiphyllum zijn recirculerende systemen opgezet. In een enkel systeem werden meerdere ziekteverwekkers gelijktijdig geïnoculeerd. Combinatie van ziekteverwekkers werden gekozen welke elk verschillende symptomen geven op de gewassen. Door middel van wekelijkse gewaswaarnemingen werd vastgesteld of en welke ziekteverwekkers zichtbare aantasting gaven. Het ontstaan van zichtbare aantasting is een indicatie voor schadedrempel in recirculerende systemen. Watermonsters werden genomen direct na inoculatie, halverwege de teelt en aan het einde van de teeltperiode. De watermonsters werden gefiltreerd en DNA/RNA extracties zijn uitgevoerd op de filters. Deze monsters zijn gebruikt voor multiplex detectie om vast te stellen of deze ziekteverwekkers in detecteerbare hoeveelheden aanwezig waren. Preamplificatie is uitgevoerd inclusief labelling, gevolgd door hybridisatie op de micro-array. De data zijn tenslotte geëvalueerd.

2.8 Praktijkttoets

Er zijn 9 praktijkbedrijven benaderd om mee te werken aan de praktijktoets. De selectie van de bedrijven is deels afgestemd met de landelijke commissie van LTO groeiservice (Spathiphyllum), deels afgestemd met praktijknetwerk Telen met Toekomst (tomaat), en deels afgestemd met teeltvoorlichting roos en gewasonderzoeker roos van PPO. Waar mogelijk is er gekozen voor bedrijven welke in recent verleden problemen hadden met ziekteverwekkers in het recirculatiewater. Watermonsters zijn van de praktijkbedrijven verzameld door medewerkers van PPO. Na filtratie van de watermonsters zijn DNA/RNA extracties uitgevoerd op de filters. Vervolgens is preamplificatie uitgevoerd inclusief labelling gevolgd door hybridisatie op de micro-array. De data zijn tenslotte geëvalueerd.

2.8.1 Selectie bedrijven en verzameling drainwatermonsters

Van de gewassen tomat, roos en spathiphyllum zijn 3 bedrijven per teelt gezocht waarvoor gedurende een periode van 3 tot 5 maanden recirculatiewatermonsters verzameld zijn voor de multiplex DNA analyse. Voorkeur ging uit naar bedrijven met verschillende teeltsystemen en of substraten welke in meer of mindere mate problemen hebben met het optreden van ziekteverwekkers. Van ieder bedrijf werden gemiddeld 15-18 watermonsters verzameld (250 ml) welke binnen 24 uur gefiltreerd werden over een filter. Op de bedrijven werden verschillende locaties bemonsterd. Het filter werd opgeslagen in een vriezer tot het moment dat de DNA extractie uitgevoerd werd.

2.8.2 Validatie PLP amplificatie / detectie met praktijk- watermonsters

Met behulp van recirculatiewatermonsters van de bedrijven wordt in eerste instantie vastgesteld of aanwezige ziekteverwekkers m.b.v. specifieke PLP amplificatie/detectie aangetoond kunnen worden. Vervolgens is van een groter aantal monsters met behulp van PLP amplificatie /detectie vastgesteld welke ziekteverwekkers in het recirculatiewater aanwezig waren. Daarnaast is een door PRI ontwikkelde TaqMan probe voor *Phytophthora spp.* ingezet om snel te kunnen bepalen of het DNA monster, en derhalve het recirculatiewater, *Phytophthora spp.* bevatte.

2.8.3 Vergelijking met klassieke uitplaatmethoden

Om een vergelijking van de DNA methode met de klassieke uitplaatmethoden te gebruiken is op een of twee tijdstippen per bedrijf een kleine hoeveelheid van het watermonster uitgeplaat op schalen zodat de aanwezige bacteriën en schimmels geteld konden worden (kolonievormende eenheden per ml; cfu/ml).

2.8.4 Validatie schadedrempeltoetsen en opzetten van een monitoring-systeem

In aanvulling op de resultaten van de PLP amplificatie / detectie en de klassieke uitplaatmethoden zijn op alle deelnemende bedrijven gegevens verzameld over de toepassing van gewasbeschermingshandelingen en het eventuele optreden van schade als gevolg van aanwezige ziekteverwekkers. De deelnemende bedrijven is gevraagd om het gebruik van toegepaste gewasbeschermingsmiddelen te registreren.

De gegevens van de praktijkbedrijven kunnen op termijn vergeleken worden met de analyseresultaten van de schadedrempelproeven die bij PPO uitgevoerd zijn onder semi-praktijkomstandigheden.

3. Resultaten

3.1 Inventarisatie

Op basis van bestaande kennis uit de praktijk, bij LTO Groeiservice, bij PPO Glastuinbouw en beschreven in de literatuur, is een inventarisatie uitgevoerd om aan te geven welke ziekteverwekkers in het kader van dit onderzoeksproject relevant zijn voor de gekozen gewassen tomaat, roos en spathiphyllum.

Onderliggende vragen waren:

- Welke zijn ziekteverwekkend op de gekozen gewassen?
- Kunnen deze aantasters zich met behulp van recirculatiewater verspreiden?
- Zijn er beschikbare DNA sequenties voor de soort en zijn er isolaten beschikbaar?

Het belangrijkste resultaat van de inventarisatie is een pathogenenlijst welke als basis voor het project gefungeerd heeft (Tabel 1). De code in de tabel is de isolaatcode die binnen het project gebruikt is.

Tabel 1. Relevante pathogenen per gewas met een interne isolaatcode.

Tomaat		Roos		Spathiphyllum	
Code	Schimmels	Code	Schimmels	Code	Schimmels
t-02	<i>Colletotrichum coccodes</i> (Anthracnose)	r-01	<i>Calonectria morganii</i> (= <i>Cylindrocladium scoparium</i>)	s-01	<i>Cylindrocladium spathiphylli</i> (= <i>Calonectria spathiphylli</i>)
t-03	<i>F. ox f.sp. lycopersici</i>	r-02	<i>Gnomonia radicola</i>	s-02	<i>Myrothecium roridum</i>
t-04	<i>F. ox f.sp. radidis lycopersici</i>	r-03	<i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>	s-03	<i>Pythium ultimum</i> var. <i>ultimum</i>
t-05	<i>Fusarium spp. niet pathogeen</i>	r-04	<i>Phytophthora citrophthora</i>	s-04	<i>Pythium aphanidermatum</i>
t-06	<i>Humicola fuscoatra</i>	r-05	<i>Phytophthora megasperma</i>	s-05	<i>Pythium myriotylum</i>
t-07	<i>Myrothecium roridum</i>	r-06	<i>Phytophthora ssp. Rosa</i>	s-06	<i>Pythium middletoni</i>
t-09	<i>Phoma destructive</i>	r-07	<i>Pythium middletoni</i>	s-07	<i>Pythium irregulare</i>
t-10d	<i>Phytophthora drechsleri</i>	r-08	<i>Pythium oedoehilum</i>	s-08	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
t-13e	<i>Phytophthora erythroseptica</i>	r-09	<i>Pythium irregulare</i>	s-09	<i>Phytophthora nicotianae</i> x <i>cactorum</i>
t-35	<i>Phytophthora palmivora</i>	r-10	<i>Pythium aphanidermatum</i>	s-10	<i>Phytophthora drechsleri</i>
t-10c	<i>Phytophthora cryptogea</i>	r-12	<i>Pythium myriotylum</i>	s-11	<i>Phytophthora ssp.</i> <i>Spathiphyllum</i>
t-11	<i>Phytophthora infestans</i> <i>f. sp. Infestans</i>	r-13	<i>Rhizoctonia solani</i> (= <i>Thanatoporus cucumeris</i>) AG?	s-12	<i>Phytophthora nicotianae</i>
t-12	<i>Phytophthora nicotianae</i>	r-14	<i>Verticillium albo-atrum</i>	s-13	<i>Rhizoctonia solani</i> (= <i>Thanatoporus cucumeris</i>) AG?
t-14	<i>Pythium myriotylum</i>	r-15	<i>Verticillium dahliae</i>		
t-15	<i>Pythium ultimum</i> var. <i>ultimum</i>				

Tomaat		Roos		Spathiphyllum	
Code	Schimmels	Code	Schimmels	Code	Schimmels
t-33	<i>Pythium middletoni</i>		Bacteriën		
t-32	<i>Pythium irregulare</i>	r-16	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
t-16	<i>Rhizoctonia solani</i> (= <i>Thanatephorus cucumeris</i>) AG4				
t-18	<i>Verticillium albo-atrum</i>		Nematoden		
t-19	<i>Verticillium dahliae</i>	r-17	<i>Meloidogyne hapla</i>		
t-20	<i>Verticillium tricorpus</i> (partieel pathogeen?)	r-18	<i>Pratylenchus penetrans</i>		
		r-19	<i>Pratylenchus vulnus</i>		
	Virussen				
t-22	<i>Pepino Mosaic Virus (PepMV)</i>				
t-23	<i>Potato Virus X (PVX)</i>				
	Bacteriën				
t-26	<i>Clavibacter michiganensis</i> <i>subsp. michiganensis</i>				
	Nematoden				
t-	<i>M. arenaria</i> , <i>M. incognita</i> ,				
27aijm	<i>M. javanica</i> , <i>M. mayaguensis</i>				
t-28	<i>M. chitwoodi</i>				
t-29	<i>M. hapla</i>				
t-31	<i>Pratylenchus penetrans</i>				

Deze tabel is meer dan compleet. Een aantal van de isolaten die in de tabel beschreven staan zullen niet vaak als veroorzaker van uitvalproblemen in genoemde teelten beschreven staan; echter ze zijn wel in deze gewassen gevonden. Op basis van deze lijst is een isolatencollectie opgebouwd waarbij bij voorkeur isolaten uit het doelgewas opgenomen zijn. Voor veel schimmels zijn weinig gegevens bekend omtrent eventuele sequentie variatie tussen isolaten van eenzelfde soort. Algemeen wordt in dit project maar van één of enkele isolaten de relevante sequentie bepaald vandaar dat er bij voorkeur gewerkt wordt met een isolaat afkomstig van het doelgewas.

3.2 Sequentie-analyse

Van de meeste isolaten uit bovenstaande tabel werden DNA sequentiegegevens gevonden in de diverse databases. Van alle isolaten is voldoende DNA geïsoleerd voor het bepalen van de DNA sequentie van de gekozen genen en voor gebruikt als controle bij PCR toetsen. Schimmels werden opgekweekt in 50 ml potato dextrose broth in een steriele 300 ml erlenmeyer door te schudden met 120 rpm bij 21°C. Na voldoende groei is het mycelium verzameld door dit op te vangen in een miracloth filter in een trechter of op een papierfilter op een buchner trechter. Het mycelium werd direct ingevroren in vloeibare stikstof en gevriesdroogd. DNA extractie uit het gevriesdroogde mycelium is uitgevoerd met behulp van MolBio DNA extractie kit. Kwaliteit van DNA en concentratie werd vastgesteld na elektroforese op een agarose gel en kleuring met Et Br. DNA isolatie van bacteriën werd m.b.v. standaard-methoden uitgevoerd.

Van een aantal isolaten werd de DNA sequentie van de gekozen genen bepaald ter verificatie van de DNA sequentie-gegevens verkregen uit de diverse databases.

3.3 **Ontwikkeling uniforme DNA/RNA extractie uit waterige recirculatiesystemen van de teelt van tomaat/roos/spathiphyllum**

Voordat de detectie uitgevoerd wordt, moet DNA geïsoleerd worden uit de verschillende ziekteverwekkers die in het water aanwezig zijn. Hiervoor hebben we gebruikt gemaakt van een standaard extractie protocol wat voor een belangrijk deel gebaseerd is op een commercieel verkrijgbare kit. Bij deze DNA extractie moet aandacht uitgaan naar twee belangrijke onderdelen. Allereerst moeten de ziekteverwekkers uit het water geïsoleerd worden (concentratiestap). Daaropvolgend moeten de cellen van deze verschillende organismen kapot gemaakt worden zodat het DNA vrijkomt en geëxtraheerd kan worden (lysis). Bij dit onderdeel leert de ervaring dat cellen van grotere organismen zoals aaltjes en schimmels met overlevingsstructuren anders behandeld moeten worden dan cellen van bacteriën en zoösporen.

Voor vier verschillende organismen is de methode uitgetest:

Nematoden

Meloidogyne arenaria (afkomstig uit eigen kweek) of *Meloidogyne incognita* (afkomstig van RZ Research). Na isolatie van aaltjes wordt een monster geteld en kan deze vervolgens gedurende langere tijd bewaard worden in de vriezer alvorens voor de DNA extracties te gebruiken. Voorkeur heeft het om een monster dat niet ouder dan drie weken is in de koelkast te bewaren alvorens te gebruiken voor DNA extractie.

Schimmels met zoösporen

Phytophthora nicotianae. Zoösporen productie is wekelijks voor ongeveer 5 schalen met slootwater ingezet. Zoösporen zijn vers gemaakt voor toevoeging aan de voedingsoplossing. De gemiddelde zoösporen productie per schaal is ± 2500 per ml

Schimmel met overlevingsstructuren

Verticillium albo-atrum. Versclerotiseerd mycelium van een schaal met PDA. Wanneer de schaal ongeveer 3 weken oud is, is het mycelium voldoende gesclerotiseerd. Medium snijden en in een 50 ml buis overbrengen. Aanvullen met ongeveer 20 ml water en met de ultraturrax bij een laag toerental fijn malen. Ruststructuren worden gescheiden van medium d.m.v. spoelen over een 20 μm en een 10 μm zeef.

Verticillium dahliae. Microsclerotien: opgekweekt in Czapeck dox, vloeibaar medium: na 2 weken op schudplateau bij 20-25 graden worden volop zwarte microsclerotien geproduceerd. Deze worden uit het medium gezeefd met behulp van een 20 μm zeef.

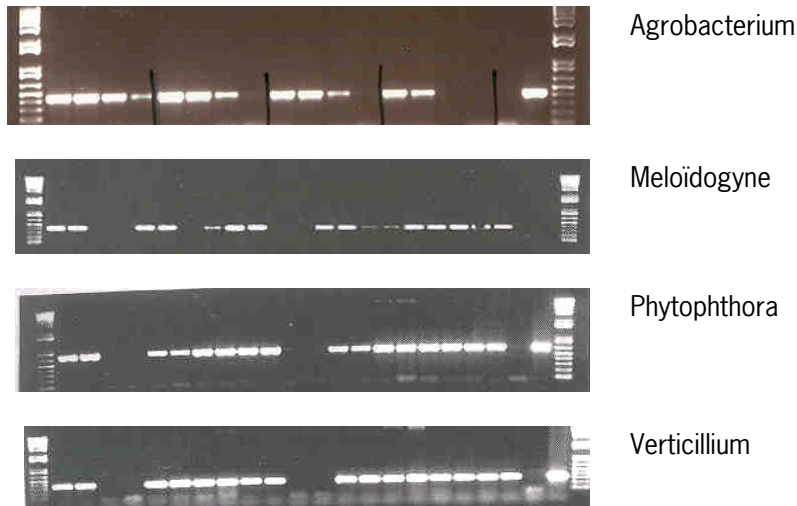
Bacteriën

Agrobacterium tumefaciens stam Cassy I. Bacterie wordt als single kolonie plaat in de koelkast bewaard. Wanneer bacteriën nodig zijn voor de DNA extractie wordt een schudcultuur ingezet in Tryptic Soy Broth Medium (1,5 g/l) met Yeast extract (0,5 g/l). De cultures zijn gedurende 24-48 uur bij 28°C opgegroeid.

Een extractieprotocol is ontwikkeld dat erop gericht is om water te concentreren op een filter. DNA wordt vervolgens geëxtraheerd vanaf dit filter. Er zijn DNA extracties uitgevoerd waarbij het uitgangsmateriaal bestaat uit een voedingsoplossing waaraan infectieuze deeltjes van verschillende pathogenen toegevoegd zijn. Het gaat hierbij om de bacterie *Agrobacterium tumefaciens*, de nematode *Meloidogyne incognita*, de schimmel met overlevingsstructuur *Verticillium dahliae*, en de pseudo-schimmel met zwerm sporen *Phytophthora nicotianae*. Verschillende filters zijn getest op diverse watermonsters waaraan de verschillende pathogenen in variërende concentraties zijn toegevoegd.

De DNA extracten werden vervolgens met een specifieke of generieke PCR methode geamplificeerd voor de aanwezigheid van het pathogeen (Figuur 2). Met het beste filter werden de volgende detectielimieten behaald:

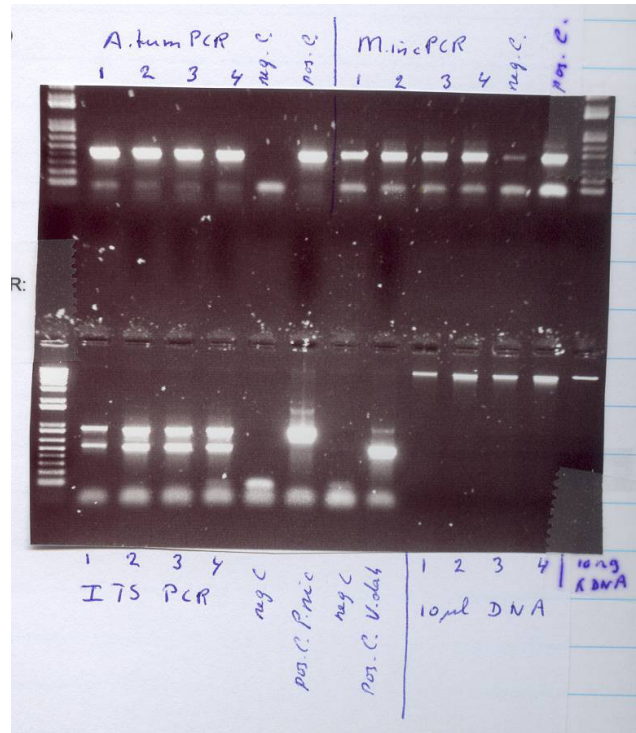
- *V. dahliae*; 100 microsclerotien op $\frac{1}{4}$ filter = enkele microsclerotien in een specifieke PCR
- *P. nicotianae*; 100 zoosporen op $\frac{1}{4}$ filter = 1 zoospore in een ITS-PCR
- *M. incognita*; 16 aaltjes op $\frac{1}{4}$ filter = 0.16 aaltje in een generieke PCR
- *tumefaciens*; 10^5 cellen op $\frac{1}{4}$ filter = 1000 bacteriecellen in een specifieke PCR



Figuur 2. Amplificatieproducten van de diverse organismen op agarosegel.

Voor de extractie werd het volgende procedé gehanteerd:

- In 200 ml water:
 - *P. nicotianae* 10^5 zoosporen,
 - *V. dahliae* 5×10^4 microsclerotien,
 - *M. incognita* 500 juvenielen J2,
 - *tumefaciens* 4×10^7 cellen
- De oplossing wordt gefiltreerd door een Millipore Durapore membraan filter $0.22 \mu\text{M}$.
- $\frac{1}{4}$ filter in beadbeat buis + 2 stainless steel balls 3.2 mm beadbeaten.
- Na vloeibare N_2 behandeling, droog beadbeaten 2500 bpm.
- Promega Foodkit wordt gebruikt, beadbeaten met lysisbuffer A.
- Het DNA monster elueren in 100 μl ; 1 μl wordt gebruikt in de PCR (Figuur 3).



Figuur 3. Amplificatie van DNA geïsoleerd van een filter waarop de diverse organismen zijn gespiked. Linksboven *Agrobacterium tumefaciens*; rechtsboven *Meloidogyne incognita* en linksonder de 2 schimmels: *Verticillium dahliae* en *Phytophthora nicotianae*.

Tabel 2. Detectielimieten van verschillende organismen.

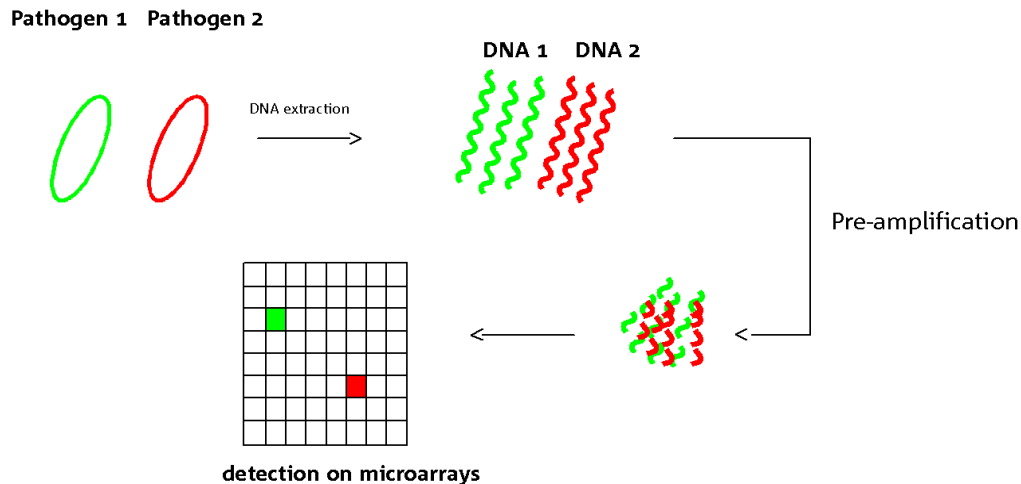
Pathogenen	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5
<i>P. nicotianae</i>	1	10	100	10^3	10^4
<i>V. dahliae</i>	1	10	100	10^3	10^4
<i>M. incognita</i>	1	4	16	64	250
<i>A. tumefaciens</i>	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7

De volgende conclusies kunnen worden getrokken:

- Er is een uniforme DNA extractiemethode ontwikkeld voor schimmels, nematoden en bacteriën in water:
 - *Verticillium dahliae* (microsclerotien)
 - *Phytophthora nicotianae* (zoosporen)
 - *Meloidogyne incognita* (juvenielen J2)
 - *Agrobacterium tumefaciens* (bacteriecellen)
- De detectielimiet is:
 - *V. dahliae*; 100 op $\frac{1}{4}$ filter = 1 in specifieke PCR
 - *P. nicotianae*; 100 op $\frac{1}{4}$ filter = 1 in ITS-PCR
 - *M. incognita*; 16 op $\frac{1}{4}$ filter = 0.16 in generieke PCR
 - *tumefaciens*; 1.105 op $\frac{1}{4}$ filter = 1000 in specifieke PCR

3.4 Generieke amplificatie / Labelling

Het principe van micro-arrays is te zien in onderstaande figuur. Op een micro-array worden in de vierkantjes stukjes DNA gespot die specifiek zijn voor een bepaald organisme. Zo is het rode vierkantje specifiek voor pathogeen 2. Na isolatie van het DNA uit het substraat en na vermenigvuldiging (amplificatie) en labelling wordt het DNA gehybrideerd met de micro-array. Na analyse van het resultaat kan gezien worden welk pathogeen aanwezig is in het oorspronkelijke DNA monster aan de hand van welk vierkantje oplicht.

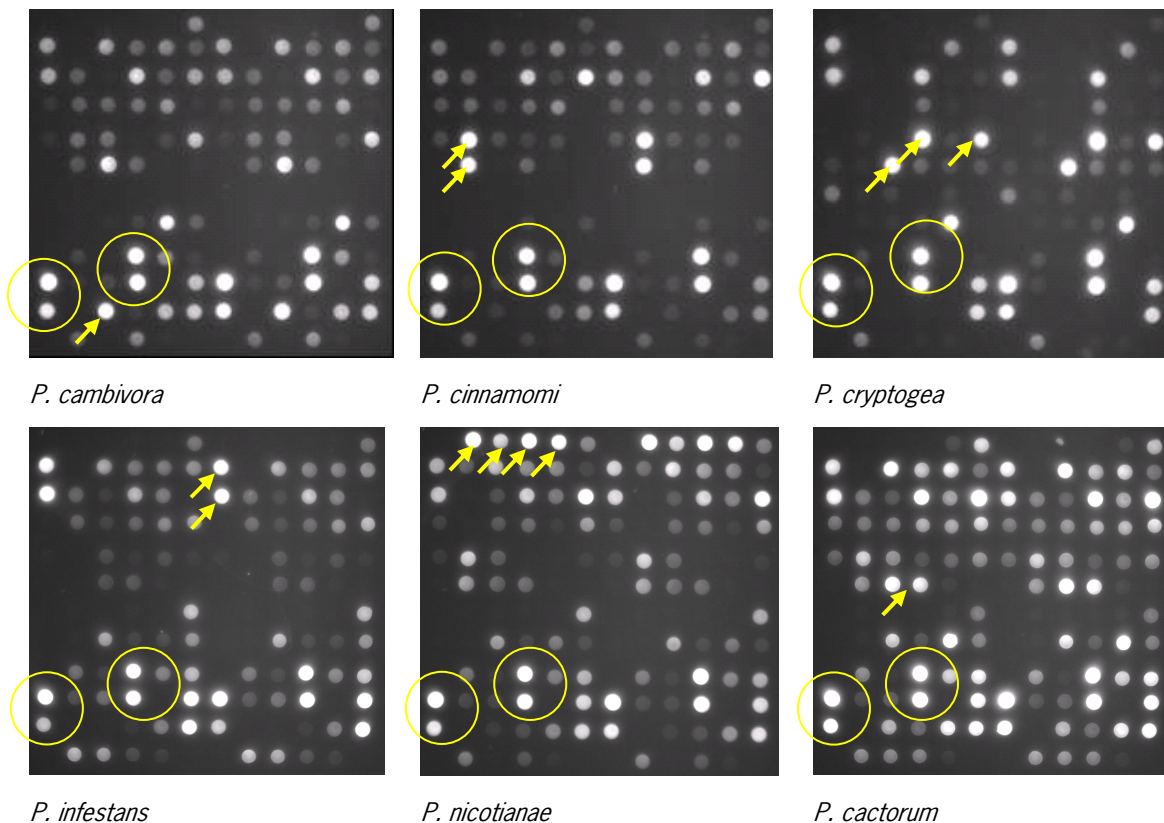


Figuur 4. Principe van detectie op micro-arrays.

3.4.1 3D micro-array van PamGene BV, Den Bosch

Op een 3D micro-array zijn diverse stukjes DNA in duplo gespot welke specifiek zijn voor diverse *Phytophthora* soorten. De micro-array bestaat uit twee maal 6x12 spots. Na hybridisatie van *Phytophthora* DNA op de micro-array lichten een aantal spots op. Een voorbeeld van een resultaat is te zien in Figuur 5. Voor een zestal *Phytophthora* soorten is dit aangegeven. De intense spots in de cirkels zijn specifiek voor alle *Phytophthora* soorten en de pijlen geven soortspecifieke signalen aan. Ook is te zien dat naast de specifieke spots ook andere spots oplichten.

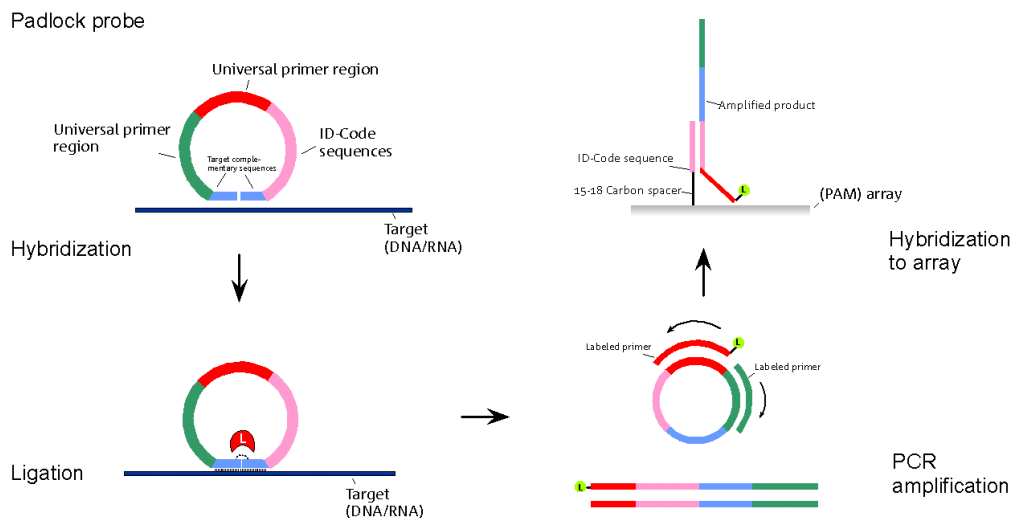
REF	NIC1 tag5	NIC1B	NIC1	NIC3B	NIC4	REF	NIC1 tag5	NIC1B	NIC1	NIC3B	NIC4
IS	NIC1 tag3	NIC4B tag5	NIC4B	CAC2	INF3	IS	NIC1 tag3	NIC4B tag5	NIC4B	CAC2	INF3
IS	QIN2	NIC4B tag3	CAC2 tag5	INF4B	CAC5	IS	QIN2	NIC4B tag3	CAC2 tag5	INF4B	CAC5
QIN3	QIN2	QIN4	CAC2 tag3	CIN2 tag5	INF5	CIN3	QIN2	QIN4	CAC2 tag3	CIN2 tag5	INF5
QIN3B	QIN5	QIN4B	CRY4	CIN2 tag3	ERY1 tag5	QIN3B	QIN5	QIN4B	CRY4	CIN2 tag3	ERY1 tag5
CRY6	QIN5B	ERY1	CAC2B	LAT2 tag5	ERY1 tag3	CRY6	QIN5B	ERY1	CAC2B	LAT2 tag5	ERY1 tag3
CRY1B	LAT2	CRY6	RAM2 tag5	LAT2 tag3	INF2	CRY1B	LAT2	CRY6	RAM2 tag5	LAT2 tag3	INF2
RAM2	LAT4	INF2 tag5	RAM2 tag3	ERY1B	INF3	RAM2	LAT4	INF2 tag5	RAM2 tag3	ERY1B	INF3
RAM3	INF4B tag5	INF2 tag3	PHYT1B	INF4	INF5	RAM3	INF4B tag5	INF2 tag3	PHYT1B	INF4	INF5
PHYT1 tag5	INF4B tag3	INF6	PHYT1	CAP4	IS 69	PHYT1 tag5	INF4B tag3	INF6	PHYT1	CAP4	IS 69
PHYT1 tag3	QC1	FRA4	GON1	MES2	IS 30r5	PHYT1 tag3	QC1	FRA4	GON1	MES2	IS 30r5
REF	IS 70	PAL1	SOJ4	IS 71	REF	REF	IS 70	PAL1	SOJ4	IS 71	REF



Figuur 5. Weergave van de signalen na hybridisatie van DNA van een zestal *Phytophthora* soorten op een micro-array waarop specifieke oligo's (stukjes DNA) voor diverse *Phytophthora* soorten zijn gespot (onder). Lay-out van de micro-array (boven). Algemene *Phytophthora* DNA sequenties (cirlcel) en soortspecifieke sequenties (pijlen) zijn weergegeven.

3.4.2 Padlock probe (PLP) amplificatie

Een alternatieve multiplex amplificatiemethode is door PRI uitgewerkt. Deze methode heeft de naam pUMA meegekregen. pUMA staat voor Padlock probe gebaseerde Universele Multiplex Array (zie Figuur 6). Hierin wordt gebruikt gemaakt van targetspecifieke probes die m.b.v. moleculaire technieken het target DNA kunnen detecteren op een zgn. micro-array. Deze benadering is in eerste instantie uitgevoerd voor een 5-tal pathogenen (eind 2003). De resultaten hiervan laten zien dat deze 5 pathogenen multiplex gedetecteerd kunnen worden op een nylon membraan en op een micro-array. In 2004 is het systeem uitgebreid naar 30 pathogenen. De micro-array is nu een glas micro-array.



Figuur 6. Principe van Padlock Probe Amplificatie.

3.5 Toetsen plantpathogeniteit van diverse concentraties van de diverse plantenpathogenen

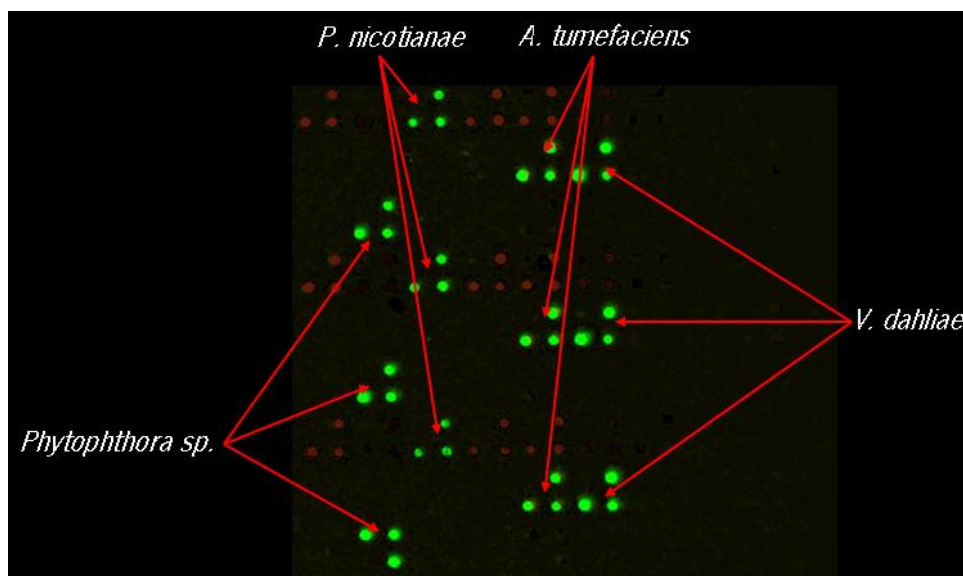
De pathogeniteitstoetsen zijn in 2003 afgerond. Voor de drie relevante gewassen zijn in totaal 19 verschillende ziekteverwekkers ingezet bij de toetsen. Van deze 19 ziekteverwekkers is uiteindelijk bij 9 ziekteverwekkers een duidelijk zichtbare aantasting gevonden. Voor een aantal ziekteverwekkers werd zelfs bij een zeer hoge concentratie geen aantasting gevonden. Op basis van de resultaten is een inschatting gemaakt van hoeveelheid ziekteverwekker die schadelijk is voor een gewas zoals in de proefopzet bepaald. Deze resultaten spelen een belangrijke rol bij de interpretatie van de uitkomst van een multiplex analyse van praktijk monsters.

Een samenvatting van de resultaten wordt weergegeven onder 3.7 en in Tabel 4.

3.6 Multiplex test met mengsels van DNA/RNA monsters

Het multiplex detectiesysteem pUMA is in eerste instantie uitgetest op mengsels van DNA van drie plantenpathogenen. Hiertoe werd het DNA mengsel in het multiplex detectie systeem getest met een mix van 11 probes. Na de reactie werd de uitslag gedetecteerd op de micro-array en kon aanwezigheid van de 3 targets worden bewezen (zie Figuur 7). Hierin is te zien dat de drie pathogenen welke waren toegevoegd konden worden gedetecteerd op de micro-array. Voor elk pathogeen zijn 3x3 probes gespot op de micro-array. Een algemene *Phytophthora* probe reageert ook positief. Ook DNA monsters geïsoleerd van filters, waardoor water is gefiltreerd, waaraan diverse pathogenen zijn toegevoegd, reageerde positief voor de toegevoegde pathogenen.

Een wetenschappelijke publicatie is hierover geschreven in een wetenschappelijk tijdschrift (Nucleic Acids Research).



Figuur 7. Hybridisatie van DNA van een viertal organismen geïsoleerd uit recirculatiewater op een glas micro-array.

Het multiplex detectiesysteem is verder geoptimaliseerd m.b.v. DNA preparaten vanuit de recirculerende systemen (onderdeel 7). Ook is aan het amplificatiesysteem een kwantitatieve component toegevoegd. Een nieuw soort probe (PRHock probe) werd hiervoor ontwikkeld. Met behulp van deze PRHock probes kunnen kwantitatieve data verkregen worden. De hoeveelheid van een ziekteverwekker in een watermonster kan in principe bepaald worden.

Een nieuwe publicatie over het gebruik van de nieuwe PRHock probes is in voorbereiding.

Het volgende kan geconcludeerd worden:

- Een Padlock probe gebaseerde pre-amplificatie (pUMA) is ontwikkeld:
 - Target specifieke padlock probes zijn ontwikkeld.
 - Ligatie condities zijn gevonden om op puntmutatie te discrimineren.
 - In mengsels van DNA kunnen verschillende targets worden gedetecteerd.
 - Target specifieke PRHock probes zijn ontwikkeld.
 - Hiermee kunnen in principe kwantitatieve gegevens worden verkregen.

3.7 Inoculatie recirculatiewater met 5-10 plantenpathogenen per teelt

Voor dit onderdeel zijn gesloten recirculerende systemen opgezet met een beperkt aantal planten per systeem (tomaat 9 of 25, roos 25, spathiphyllum 96). De systemen zijn eenmalig besmet met maximaal drie verschillende ziekteverwekkers door deze aan de voedingsoplossing toe te voegen. Gedurende een vastgestelde teeltperiode van maximaal 6 maanden werd de ziekteontwikkeling gevolgd. In totaal zijn 42 verschillende systeembesmettingen uitgevoerd waarbij 19 verschillende ziekteverwekkers getoetst zijn (roos 6, spathiphyllum 5, tomat 8). Bij deze systeeminfectie proeven werd voor 8 van de ziekteverwekkers een specifiek ziektebeeld gevonden (dit in tegenstelling tot 9 bij de pathogeen infecties). In combinatie met de resultaten van onderdeel 5 zijn de schadedrempels voor de verschillende ziekteverwekkers beschreven. Van alle proeven zijn watermonsters verzameld, gefiltreerd en zijn de filters opgeslagen bij -20°C.

Niet alle proeven hebben een gelijke periode ingestaan. De duur was enerzijds afhankelijk van de verwachte incubatieperiode en anderzijds ook van de duur van de proef en het aantal ziekteverwekkers dat in deze periode

onderzocht moest worden. De resultaten waren wisselend. Bijvoorbeeld voor *Cylindrocladium spathiphylli* in Spathiphyllum werd bij een eerste proef nauwelijks uitval gemeten omdat de concentratie te laag gekozen werd terwijl een tweede proef bij een 10 en 100 maal hogere concentratie in korte tijd zeer veel uitval liet zien. Voor *Cylindrocladium scoparium* in roos had eerder onderzoek laten zien dat eenmalige besmettingen bij jong plant-materiaal op de mat nauwelijks tot uitval van planten resulteerde. Als onderdeel van de systeem besmettingen zagen we echter dat deze schimmel bij herhaalde besmetting via de voedingsoplossing wel degelijk tot aantasting van de planten kon leiden.

Van de in 2003 en 2004 opgeslagen filters is DNA geïsoleerd. Analyse van een groot aantal van deze filters met behulp van het multiplex detectiesysteem is uitgevoerd. De pathogenen welke geïntroduceerd waren in het recirculerend systeem konden in een groot aantal gevallen worden aangetoond (Tabel 3). Hiermee wordt de betrouwbaarheid van de DNA multiplex analyse vastgesteld.

Tabel 3. Ct-waarden van amplificatiereacties van DNA monsters afkomstig van filters van recirculatie water-monsters voor een aantal verschillende schimmels. Hoe lager de Ct-waarde hoe meer pathogeen er in het DNA monster zit.

Monster primers	All Phyt.	M. ror.	Fus. oxy.	V.a.a.	V. dahl.
RCW1, ITS	25.38	ND	24.35	29.64	ND
RCW2, ITS	ND	ND	23.88	28.60	ND
RCW19, ITS	ND	ND	24.87	ND	ND
RCW20, ITS	ND	27.36	31.10	ND	ND
RCW36, ITS	24.53	ND	23.67	ND	23.16
RCW52, ITS	ND	23.38	24.28	ND	ND
RCW65, ITS	ND	ND	23.88	ND	ND
RCW87, ITS	20.39	ND	25.22	23.54	ND
MQ	ND	ND	ND	ND	ND

Verwacht →positief, waargenomen →positief
 Verwacht →positief, waargenomen →negatief
 Verwacht →negatief, waargenomen →positief

In een aantal watermonsters werd *Fusarium oxysporum* gedetecteerd alhoewel deze niet in het recirculerend systeem was ingebracht (Tabel 3). Dit duidt op een algehele aanwezigheid van deze schimmel.

De inoculatieproeven hebben informatie opgeleverd over schadedrempels voor belangrijke ziekteverwekkers in roos, tomaat en spathiphyllum. De gevoeligheid van de DNA detectie methoden is voor alle ziekteverwekkers ruimschoots voldoende om schadelijke niveaus in een vroeg stadium aan te kunnen tonen. Gecombineerd met de resultaten van de kwantitatieve DNA multiplex analyse wordt de mogelijkheid gecreëerd om op basis van een DNA analyse het risico op schade te kunnen bepalen. Hiermee kan uiteindelijk de vraag beantwoordt worden: 'Wat betekent de uitslag van een analyse voor de teler?'. Moet hij actie nemen of is er niets aan de hand?

Kort samengevat zijn de resultaten:

- Er zijn in totaal 42 systeem besmettingen uitgevoerd met 19 verschillende ziekteverwekkers.
- Bij 8 ziekteverwekkers is een specifiek ziektebeeld bij besmetting van recirculerende systemen gevonden.
- Filters van watermonsters van het voedingswater zijn op drie tijdstippen gemaakt en opgeslagen in de vriezer. Filters bevatten belangrijk materiaal voor de validatie van de DNA technieken.
- Analyse van het DNA van de filters toonden aan dat het geïnoculeerde pathogeen in veel gevallen kon worden aangetoond.

Hieronder volgt een beschrijving van de resultaten van de pathogeniteitstoetsen en de systeembesmettingen voor alle getoetste pathogenen op de gewassen roos, spathiphyllum en tomaat. Tabel 4 geeft hiervan een samenvatting.

3.7.1 Roos

Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium is niet onderzocht bij roos voor plantinfecties. Gelijktijdig met dit onderzoek is wel een concentratiereeks uitgevoerd bij het gewas aster waarbij jonge stek aangesneden werd met besmette mesjes. Onder gunstige omstandigheden kan hierbij al bij zeer lage hoeveelheden *agrobacterium* aantasting ontstaan (100 bacteriën per plant). Bij de systeeminfectie van roos en bij een concentratie van 1×10^8 bacteriën per liter is geen wortelknobbel tot ontwikkeling gekomen. Dit lijkt erop te duiden dat het risico voor verspreiding van aantasting via de voedingsoplossing bij een normale teelt van roos gering is. Risico voor het ontstaan van aantasting ligt met name bij de vermeerdering waar omstandigheden voor het optreden van woekeringen ideaal zijn. Echter wanneer uitgangsmateriaal wordt genomen uit een kas met *Agrobacterium* besmetting dan bestaat er wel een risico voor het ontstaan van schade.

Cylindrocladium scoparium

Bij systeeminfecties zien we dat na een teelt van ruim twintig weken bijna 40 % van de planten aangetast zijn door *Cylindrocladium* wanneer de tank besmet is tot een concentratie van 1×10^6 sporen per liter. De verwachting is dat bij een langdurige teelt als roos op termijn toch schade kan ontstaan als gevolg van de aanwezigheid van *Cylindrocladium* in de voedingsoplossing. Bij de systeembesmettingen zijn geen lagere concentraties getoetst. Eerder onderzoek had al aangetoond dat aantasting kan ontstaan vanaf 100 sporen per plant. Vertalen we dit naar de voedingsoplossing dan mag aangenomen worden dat er vanaf 1000-10.000 sporen per liter actie gewenst is om in ieder geval de aantallen sporen omlaag te brengen. Bij eenmalige besmettingen van planten op de steenwolmat werd zichtbare aantasting geconstateerd vanaf 10.000 sporen per plant. Het was hierbij wel noodzakelijk om de planten fysiek te beschadigen met behulp van een mesje.

Gnomonia radicola

Bij de systeembesmettingen is zelfs bij een concentratie van 1×10^6 cfu geen zichtbare aantasting als geval *Gnomonia* besmetting geconstateerd. Verklaring kan zijn dat de isolaten die gebruikt waren niet meer pathogeen zijn of dat omstandigheden niet bevorderlijk waren voor het ontstaan van aantasting. Eerder onderzoek had wel aangetoond dat aantasting via de voedingsoplossing kan ontstaan wanneer er een miljoen cfu per plant aan het systeem toegevoegd werd. Het is aannemelijk dat verspreiding ook via de voedingsoplossing kan plaatsvinden omdat de sporen op de wortels gevormd worden. Bij het aantreffen van aantoonbare hoeveelheden *Gnomonia* in de voedingsoplossing is actie gewenst, alleen al omdat het een indicatie is dat er een besmetting in het gewas aanwezig is.

Meloidogyne hapla

Bij de systeem besmettingen werden bij een concentratie van 6 aaltjes per liter nog geen knobbels gevonden maar vanaf 60 aaltjes per liter waren de wortelknobbels zichtbaar op de wortels van de planten. Bij de eenmalige besmetting werd een zichtbare aantasting geconstateerd vanaf 50 juvenielen per plant. Aangezien het hier een relatief korte teeltperiode betreft zal het bij een normale teelt in de praktijk zeker tot meer aantasting leiden, mogelijk zelf al bij de laagste concentratie. Het is dan nog wel de vraag in hoeverre er dan ook schade veroorzaakt wordt door de aantasting. Hier zijn de meningen over verdeeld. Het is een goede streven om zeker in het begin van de teelt ervoor te zorgen dat er geen aaltjes in het systeem komen dus de actiedrempel ligt zeer laag.

Phytophthora sp. Roos

Net als bij *Gnomonia* is ook hier geen geslaagde besmetting uitgevoerd. Oorzaak zal zeker liggen bij de moeilijke hanteerbaarheid van de ziekteverwekker. In het verleden waren inoculatie met name succesvol wanneer als uitgangsmateriaal aangetaste planten gebruikt werden. Bij de laatste systeembesmetting is ook gebruik gemaakt van aangetast wortelmateriaal afkomstig uit de praktijk maar hierbij kon niet vastgesteld worden dat de oorzaak van de aantasting primair *Phytophthora* was, of dat andere pathogenen een rol speelde. Ervaring uit de praktijk leert echter dat deze *Phytophthora* soort besmettelijk is en dat de aantasting zich snel in de lengterichting van een mat kan verspreiden. De isolatie van deze schimmel uit aangetast plantmateriaal is lastig. De oorzaak wordt meestal vastgesteld door de aanwezigheid van specifieke oosporen in de aangetaste wortels. Gevoelige detectie waarbij de schimmel niet geïsoleerd hoeft te worden en waarbij kleine aantallen zoosporen in de voedingsoplossing aangetoond kunnen worden zal bijdragen aan een verbeterde beheersing van het probleem. De actiedrempel voor bestrijding van aantasting moet relatief laag liggen zodat er bestreden kan worden voordat de aantasting daadwerkelijk tot schade gaat leiden. Bij geconstateerde besmetting is bestrijding relatief goed met toegelaten chemische middelen uit te voeren.

Verticillium dahliae

Bij een concentratie van 10^8 sporen per liter en in combinatie met andere ziekteverwekkers is enige wortelaantasting geconstateerd maar niet vastgesteld kon worden of *Verticillium* de primaire oorzaak was. Recent onderzoek aan *V. albo-atrum* in tomaat laat zien dat verspreiding van aantasting via de besmette voedingsoplossing maar beperkt zal optreden. Direct wortelcontact, teelthandelingen en bovengrondse verspreiding via stof en plantenresten lijken een belangrijke rol te spelen. De constatering van *Verticillium* in de voedingsoplossing kan wel een maat zijn van aanwezige besmetting. Bij de eenmalige besmettingen met *V. dahliae* werd geen aantasting geconstateerd tot 5×10^7 sporen per plant. Vergelijkbaar onderzoek is in dezelfde periode uitgevoerd bij Chrysanten geteeld in potten. Voor een goede aantasting moest hiervoor een hoeveelheid van 10^8 sporen per plant aangegoten worden.

3.7.2 Spathiphyllum

Cylindrocladium spathiphylli

Deze schimmel is infectieus en veroorzaakt grote problemen bij de teelt van Spathiphyllum. Bij een eerste systeem besmetting werd bij een concentratie van 10^4 sporen per liter geen aantasting geconstateerd. De tweede proef is 10^5 en 10^6 als besmettingsconcentratie gehanteerd. Bij 10^6 waren binnen een periode van 10 weken alle planten aangetast en uitgevallen. Bij 10^5 zien we binnen 8 weken eerste symptomen en ook dan verspreid de aantasting zich snel. Bij een langere teeltduur van meer dan 20 weken zien we ook bij een concentratie van 10^4 sporen per liter aantasting ontstaan. De schimmel is dus zeer infectieus maar het optreden van schade is sterk afhankelijk van de teeltduur. Het is niet bekend of de uitval na de teeltperiode bij de consument alsnog door kan zetten. Als dit het geval is dan kunnen we de schadedrempel voor deze schimmel nagenoeg gelijk zetten met een eventuele detectiedrempel. Op de wortels van aangetaste planten kunnen snel zeer grote hoeveelheden besmettelijk sporen aangetroffen worden. Het is dus zaak om goed ziek te zoeken en aangetaste planten uit het systeem te verwijderen om verdere verspreiding van aantasting te voorkomen.

Myrothecium roridum

Bij concentraties tot 10^7 sporen per liter in de voedingsoplossing werden de planten niet zichtbaar aangetast. De voedingsoplossing lijkt in het eb en vloed teeltsysteem wat gehanteerd is geen belangrijke besmettingsbron. Er is uiteindelijk een proef uitgevoerd waarbij de jonge planten bovendoor gespreid werden met een sporensuspensie waarna de planten gedurende ongeveer 14 dagen afgedekt werden met folie om een hoge RV te handhaven. Hiermee werden wel nagenoeg alle planten aangetast. Bij het verwijderen van het doek waarmee de RV verlaagd werd verdween de aantasting nagenoeg. Planten hadden in eerste instantie wel een groeiachterstand maar uitval werd niet geconstateerd. Het gevaar is dus met name aanwezig bij vochtige teeltomstandigheden waarbij bovendoor water en bemesting gegeven wordt met een besmette voedingsoplossing. Dit zijn omstandigheden die in de vermeerdering en bij jonge aanplant voorkomen.

Phytophthora nicotianae

Bij directe besmetting van planten op de pot kwam naar voren dat *Phytophthora* een agressieve ziekteverwekker is. Het is echter bij de systeembesmetting niet gelukt om planten zichtbaar aan te tasten door zoosporen toe te voegen aan de voedingsoplossing. Het is niet duidelijk waarom de besmetting via de voedingsoplossing niet gelukt is. Mogelijk dat de overleving van de kwetsbare zoosporen in de voedingsoplossing in combinatie met het eb en vloed watergeefstelsel hier debet aan is. Bij de plantbesmettingen zijn hoeveelheden van 50.000 zoosporen per plant ziekteverwekkend.

Pythium spp.

Besmetting zijn uitgevoerd met *Pythium ultimum* en *Pythium myriotylum*. Geen aantasting werd gevonden. Voor de besmetting zijn fijn gemalen schalen mycelium of oosporen gebruikt. *Pythium* is een gelegenheidparasiet die toeslaat als de omstandigheden voor de schimmel gunstig zijn en omstandigheden voor de plant slecht. *Pythium* blijft daarmee ook een heel lastige schimmel als het gaat om het vaststellen van schadedrempels. Deze schimmelsoorten zijn algemeen voorkomen. Er zou dus in veel gevallen wel eens een actie geadviseerd worden (mogelijk met inzet van chemische gewasbeschermingsmiddelen) terwijl de noodzaak hiervoor niet aanwezig is. Er moet dus goed rekening gehouden met de teeltomstandigheden en de fysiologie van de plant.

3.7.3 Tomaat

Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici

De resultaten van zowel de plantbesmettingen als de systeembesmettingen vallen hier tegen. Er is halverwege de toetsen gewisseld van isolaat maar dit heeft niet het beoogde resultaat opgeleverd. Mogelijk dat het infecterend vermogen van de gebruikte isolaten onvoldoende was. Onderzoek in de praktijk moet meer inzicht opleveren. Bij de plantbesmettingen waren meer dan 100.000 microconidiën per plant nodig voor aantasting. Dit duidt er inderdaad op dat de isolaten niet zeer infectieus waren.

Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici

Deze soort is bij lage concentraties al ziekteverwekkend. Bij een concentratie van 10^5 sp./liter is er sprake van uitval van planten bij een teeltperiode van 20 weken. Vaatverkleuring wordt al geconstateerd bij concentratie van 10^3 sp./liter. Het is de verwachting dat deze planten (indien vatbaar) binnen een normale teeltperiode zullen uitvallen. Schade en infectiedrempel voor deze ziekteverwekker liggen laag. Het is dan wel een vereiste dat *Fusarium* op fsp niveau onderscheiden kan worden met DNA technieken. Bij enkelvoudige besmettingen zien we zichtbare aantasting vanaf 5.000 sporen per plant.

Meloidogyne

Systeembesmettingen met *Meloidogyne* zijn uitgevoerd bij concentraties van 4, 40 en 400 aaltjes per liter. Zelfs bij de laagste concentratie van 4 aaltjes per liter zien we aantasting ontstaan. *Meloidogyne* kan zich snel vermeerderen in de wortels van tomaat. Het is niet bekend bij welk niveau van aantasting er daadwerkelijk schade op gaat treden. Op basis hiervan kan eventuele actie ondernomen worden. Ook bij de eenmalige besmettingen van de plant was zichtbare aantasting aanwezig vanaf 5 aaltjes per plant.

Pythium debaryanum

Bij een concentratie van 10^5 sporen per liter is geen aantasting als gevolg van *Pythium debaryanum* ontstaan. *Pythium* kan veel uitval veroorzaken maar de aantasting is afhankelijk van de algemene gesteldheid van de plant. Ook het moment waarop besmetting uitgevoerd wordt is van belang.

Phytophthora nicotianae

De verschillende systeem besmettingen welke met verschillende isolaten van *P. nicotianae* uitgevoerd zijn hebben niet tot een duidelijk aantoonbare aantasting geleid. Ook bij enkelvoudige besmettingen werd nauwelijks tot geen aantasting gevonden. Net als bij *Pythium* geldt ook hier dat de gezondheid van het gewas, het moment van besmetten maar mogelijk ook het infecterend vermogen van het isolaat van belang is. Het is jammer dat de proeven met *P. nicotianae* geen duidelijk resultaat opgeleverd hebben.

Pratylenchus penetrans

Systeembesmettingen zijn uitgevoerd bij concentraties van 4, 40 en 400 aaltjes per liter voedingsoplossing. Na een teeltperiode van 20 weken worden alleen bij de hoogste concentraties aaltjes in de voedingsoplossing lesies geconstateerd. Ook hier geldt dat dit niet perse inhoudt dat er dan ook schade door de planten ondervonden wordt in de vorm van oogstderving. Bij eenmalige plantbesmettingen was aantasting zichtbaar vanaf 500 aaltjes per plant.

Pythium ultimum

Ook hier geldt hetzelfde als voor *P. debaryanum* en *Phytophthora nicotianae*. Er is geen aantasting geconstateerd als gevolg van de systeembesmettingen.

Verticillium albo-atrum

In de systemen die opgezet zijn is er bij enkele planten een vaatverkleuring opgetreden als gevolg van de *Verticillium* besmetting. Gelijktijdig met dit onderzoek is in Naaldwijk in een afdeling een deel van de planten besmet met een grote hoeveelheid *Verticillium* sporen. Planten vertoonden hier snel zichtbare symptomen maar gedurende het seizoen waren de planten in staat om door de aantasting heen te groeien. Echter zagen we wel dat met name in de eerste maanden na de besmetting dat er een sterk verminderde productie gemeten werd waarbij in het meest extreme geval bijna 20 % productie achterstand gemeten werd.

Tabel 4. *Samenvatting schadedrempel toetsen.*

	Plantbesmetting		Systeembesmetting	
	Tomaat	roos	spathiphyllum	
<i>F. ox f.sp. lycopersici</i>	eenmalige toediening van 50 ml per plant bij een concentratie vanaf 2000 sp/ml zijn eerste symptomen zichtbaar			1x10 ⁶ /liter
<i>F. ox f.sp. radicis lycopersici</i>	twee proeven uitgevoerd. Bij toediening van 50 ml per plant vinden we tussen 20 en 100 sp/ml eerste aantasting			< 1 x 10 ³ /liter
<i>Phytophthora nicotianae</i>		bij eenmalige besmetting wordt aantasting (uitval) gevonden vanaf 62.000 zoosporen per plant		
<i>Verticillium albo-atrum</i>	bij toediening van 50 ml per plant symptomen vanaf 5x10 ⁴ sp/ml			< 1x 10 ⁶ /liter
<i>Gnomonia radicicola</i>		geen zichtbare aantasting door ons		
		Jan heeft eerder gevonden dat bij inoculatie met 1 miljoen mycelium deeltjes per plant er snelle aantasting zichtbaar is. Uitgaande van 2 liter substraat per plant komt dit overeen met 500 mycelium deeltjes per ml		
<i>Phytophthora citrophthora</i>		geen zichtbare aantasting		

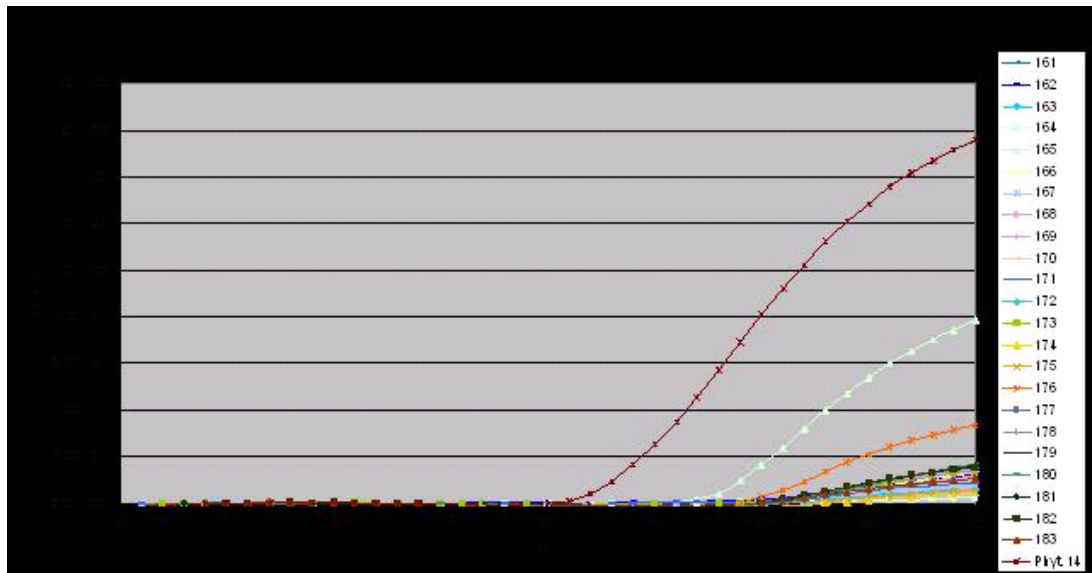
Plantbesmetting		Systeembesmetting	
Tomaat	roos	spathiphyllum	
<i>Phytophthora</i> ssp. <i>rosa</i> (nieuwe soort <i>J. Amsing</i>)	bij een concentratie van minder dan 1000 sp/ml voedingsoplossing (planten staan in voedingsoplossing worden alle planten ziek)		
<i>Verticillium dahliae</i>	geen zichtbare aantasting		1x10 ⁷ /liter
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	in stek zichtbare aantasting vanaf 100 sporen per plant per blokje		< 10 ⁵ /liter
<i>Cylindrocladium spathiphylli</i>	bij planten op steenwol matten zichtbare aantasting vanaf 10.000 sporen per plant		
<i>Pythium myriotylum</i>		besmetting met 50 ml per plant geeft aantasting van af 84 sp/ml	< 10 ⁵ /liter
<i>Phytophthora nicotianae</i> x <i>cactorum</i>		geen aantasting gevonden	
<i>Myrothecium roridum</i>		geen aantasting gevonden	
<i>Meloidogyne hapla</i>			tussen 6 en 60 per liter
<i>Meloidogyne incognita</i>	vanaf 5 aaltjes per plant zichtbare aantasting	bij aantallen van 50 aaltjes per plant (eenmalige besmetting worden enkele planten ziek)	< 4/liter
<i>Pratylenchus penetrans</i>	vanaf 500 aaltjes per plant zichtbare aantasting		tussen 40 en 400/liter
<i>Pepino Mozaiek Virus</i>	geen aantoonbare aantasting gevonden als gevolg van besmetting met voedingswater		

3.8 Praktijktoets

Watermonsters genomen van verschillende bedrijven werden gefiltreerd en van alle filters werd DNA geïsoleerd. Het DNA werd getest op bruikbaarheid door een algemene schimmeltest uit te voeren op de DNA preparaten.

Een aantal filters welke een goed positief signaal gaven werden verder getest.

Allereerst werd een algemene *Phytophthora* test uitgevoerd. Aangevend werd dat een aantal praktijkmonsters *Phytophthora* bevatten (Figuur 8).



Figuur 8. Resultaten van amplificatiereacties van DNA monsters afkomstig van filters van praktijk watermonsters voor *All Phytophthora* als target.

Verder werd een aantal praktijkmonsters getest met het multiplex amplificatie systeem. Hoewel alle deelnemende bedrijven aangaven dat zij geen schade ondervonden als gevolg van ziekteverwekkende schimmels, werden in diverse monsters wel *Phytophthora* en *Fusarium* aangetoond (een voorbeeld is te zien in Tabel 5). Ook bevatten de geanalyseerde monsters bacteriën (G-Prot, Tabel 5), wat niet verwonderlijk is.

Tabel 5. Ct-waarden van amplificatiereacties van DNA monsters afkomstig van filters van praktijk water-monsters van potplanten, tomaat en roos voor een aantal verschillende targets. Hoe lager de Ct-waarde hoe meer pathogeen er in het DNA monster zit. Groene velden zijn positief.

Monster-datum	Bedrijf	Gewas	Monsterpunt	No.	All Phyt	M.ror	F.oxv	Vaa/tri	V.dahl	Rhiz 4-1	Rhiz 4-2	G-Prot
02-08-05	A	potplanten	bassin	rcw101	ND	ND	23.04	ND	26.37	ND	ND	20.30
02-08-05	A		silo 2	rcw102	23.60	ND	24.32	ND	ND	ND	ND	21.15
02-08-05	A		drainwater fases	rcw103	ND	ND	34.20	ND	ND	ND	ND	24.66
06-10-05	A		drainwater fases	rcw107	ND	ND	23.76	27.60	ND	ND	ND	19.83
03-08-05	B	potplanten	put	rcw110	ND	ND	20.12	29.67	ND	ND	ND	16.09
15-09-05	B		put kas	rcw113	22.38	ND	23.41	ND	ND	ND	ND	17.99
15-09-05	B		put schuur	rcw114	ND	ND	20.34	ND	ND	ND	ND	16.47
06-10-05	B		bassin	rcw115	ND	ND	23.27	26.08	ND	ND	ND	24.65
06-10-05	B		kas	rcw116	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24.15
06-10-05	B		schuur	rcw117	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22.33
01-09-05	C	potplanten	bassin herh 1	rcw121	ND	ND	26.83	ND	ND	ND	ND	22.22
				MQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
01-09-05	C	potplanten	bassin herh 2	rcw122	ND	ND	29.66	ND	ND	ND	ND	24.25
01-09-05	C		bassin herh 3	rcw123	22.14	ND	19.35	ND	ND	ND	ND	17.57
06-10-05	C		retour herh 1	rcw127	ND	ND	23.64	ND	ND	ND	ND	20.19
06-10-05	C		retour herh 2	rcw128	ND	ND	17.63	24.86	ND	ND	ND	16.09
06-10-05	C		retour herh 3	rcw129	ND	ND	17.53	22.91	ND	ND	ND	15.45
22-09-05	D	tomaat	160 3 poot	rcw136	ND	ND	19.99	26.76	ND	ND	ND	16.44
22-09-05	D		470 5 poot	rcw137	ND	ND	20.03	26.94	ND	ND	ND	17.38
22-09-05	D		422 8 poot	rcw138	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20.15
19-10-05	D	tomaat	160 3 poot	rcw142	29.42	ND	23.74	ND	ND	ND	ND	21.48
19-10-05	D		470 5 poot	rcw143	ND	ND	24.29	ND	ND	ND	ND	20.44
19-10-05	D		422 8 poot	rcw144	ND	ND	24.75	ND	ND	ND	ND	20.96
				MQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
08-09-05	E	tomaat	pad 20 fytoceel	rcw147	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23.31
26-10-05 *	E		pad 2 rechts	rcw154	24.56	ND	24.40	29.84	ND	ND	ND	21.01
26-10-05 *	E		pad 2 links	rcw155	21.24	ND	19.59	ND	ND	ND	ND	17.16
26-10-05 *	E		pad 20 fytoceel	rcw156	24.04	ND	19.23	23.25	ND	ND	ND	17.67
07-09-05	F	tomaat	dagvoorraad biofilter	rcw157	ND	ND	19.10	ND	ND	ND	ND	18.47
07-09-05	F		drainput	rcw158	18.21	ND	20.70	22.73	ND	ND	ND	18.44
07-09-05	F		regenwater bassin	rcw159	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25.84
07-09-05	F		mat	rcw160	ND	ND	20.58	29.65	ND	ND	ND	19.17
06-10-05	F		dagvoorraad biofilter	rcw165	ND	ND	21.59	29.13	ND	ND	ND	19.66
06-10-05	F		drainput	rcw166	ND	ND	21.08	ND	ND	ND	ND	19.87
06-10-05	F		mat	rcw167	ND	ND	23.60	27.24	ND	ND	ND	21.54
				MQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
06-10-05	F	tomaat	drainemmer	rcw168	ND	ND	21.09	ND	ND	ND	ND	18.01
06-10-05	G	roos	dagvoorraad	rcw171	ND	ND	18.74	ND	ND	ND	ND	18.82
06-10-05	G		drainput	rcw172	24.84	ND	23.11	ND	ND	ND	ND	19.81
19-10-05	G		dagvoorraad	rcw173	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22.11
19-10-05	G		drainput	rcw174	24.77	ND	22.00	ND	ND	ND	ND	20.66
06-10-05	H	roos	dagvoorraad	rcw175	ND	ND	33.42	ND	ND	ND	ND	17.56
06-10-05	H		drainopvangbak	rcw176	16.37	23.75	19.18	ND	ND	ND	ND	17.33
06-10-05	H		mat	rcw177	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21.50
19-10-05	H		dagvoorraad	rcw178	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18.86
19-10-05	H		drainput	rcw179	26.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19.05
19-10-05	H		matmonster	rcw180	ND	ND	ND	23.29	ND	ND	ND	21.20
				MQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

In het bassinwater werd in de meeste gevallen geen ziekteverwekkende schimmel aangetoond terwijl een analyse van de drainput of het retourwater vaker *Phytophthora* opleverde. Waarschijnlijk is de hoeveelheid van de aanwezige *Phytophthora* te laag om schade te geven of de schade (in de vorm van verminderde groei) is door de teler niet opgemerkt. Dit geeft nogmaals aan dat het zeer belangrijk is om de hoeveelheid van een ziekteverwekker vast te stellen en de kennis over schadedrempels mee te laten wegen in het advies naar de teler.

Voor monsternamen is het belangrijk dat een representatief monster van het teeltsysteem genomen wordt. De drainput is een verzamelplaats maar hierin kunnen ziekteverwekkende schimmels zich over een langere periode ophopen. Met name voor *Fusarium* soorten is bekend dat deze bezinken in een put. Een monsternamen uit de drainput zou dus een verkeerde weergave van het moment kunnen geven. Een verzamelmonster uit de mat (meerdere monsterplaatsen samenvoegen tot een monster) zal een betere weergave geven van de aanwezigheid van ziekteverwekkers in het systeem.

Praktijkvalidatie van de multiplex detectie is uitgevoerd door gedurende meerdere opeenvolgende maanden op een meerdere praktijkbedrijven monsters van recirculatiewater te nemen en hiervan met behulp van multiplex DNA detectie vast te stellen welke ziekteverwekkers in het monster voorkomen. Van een aantal monsters is met behulp van klassiek uitplaten het aantal kolonievormende eenheden bepaald. Dit is een niet specifieke methode welke alleen iets zegt over aantallen algemeen voorkomende schimmels en bacteriën.

Een korte opsomming van de resultaten volgt hieronder:

- Geen schade gemeld door deelnemende bedrijven
- Uitplaat tellingen meer dan 40 monsters:
 - Grote verschillen tussen monsterplaats en monstertmoment
 - Tomaat > Potplant > Roos
- DNA bepalingen:
 - Drain > Bassin
 - *Fusarium* in 80% van de gevallen aanwezig
 - *Phytophthora* en *Verticillium* minder vaak aanwezig
 - In vergelijking met de recirculatiewatermonsters werden in de praktijkmonsters hogere Ct waarden gevonden wat duidt op lagere hoeveelheden van de gedetecteerde plantenpathogenen

Conclusies:

- DNA detectie van *Fusarium* is geen maat voor mogelijke aantasting (niet pathogene soorten zijn in overmaat aanwezig).
- Detectie van ziekteverwekkende schimmels zou kunnen leiden tot bestrijdingsadvies terwijl de noodzaak hiervan in huidige praktijktoets niet vastgesteld kon worden.
- Pleit voor meer onderzoek naar schaderelaties en kwantitatieve analyses.

4. Slotconclusie

De diverse onderdelen van het werkplan zoals beschreven in hoofdstuk 2 zijn uitgevoerd:

- ✓ Selectie pathogenen
 - ✓ Pathogenen voor de drie gekozen teelten werden geïdentificeerd en in een tabel samengevat.
- ✓ Bepaling sequenties in databases pathogenen
 - ✓ Sequentiegegevens op basis waarvan detectie kon geschieden werden vastgesteld of bepaald.
- ✓ Efficiënte DNA/RNA extractiemethode uit water
 - ✓ Een DNA extractieprotocol inclusief filtratie van het water werd ontwikkeld.
- ✓ Efficiënte generieke pre-amplificatie systeem:
 - ✓ Amplificatie en detectie procedures werden ontwikkeld (Padlock probe (PLP) gebaseerde amplificatie (pUMA)).
 - ✓ Hybridisatie amplicons:
 - ✓ Padlock probe ZipCodes: goede hybridisatie op nylon en glas micro-arrays.
- ✓ Pathogeniteitstoets
 - ✓ Pathogeniteitsproeven werden uitgevoerd op individuele besmettingen als ook op meervoudige besmettingen.
- ✓ Multiplex test mengsels DNA
 - ✓ Multiplex analyses werden uitgevoerd op (mengsels) van DNA preparaten van diverse plantenpathogenen.
- ✓ Praktijktoets in 2005
 - ✓ Watermonsters afkomstig van een vijftiental bedrijven werden genomen en geanalyseerd.

5. Aanbevelingen

Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

Plant Research International (PRI) en Praktijkonderzoek Plant & Omgeving Glastuinbouw (PPO Glastuinbouw) zijn een aantal jaren geleden met plannen voor multiplex detectie gekomen. In 2002 is dit strategische project gehonoreerd door PT om methodieken te ontwikkelen voor multiplex detectie van een aantal plantenpathogenen in water van recirculerende watersystemen van een drietal teelten. In eerste instantie werd een multiplex kwalitatieve benadering gekozen maar gedurende de looptijd van het project werd duidelijk dat kwantitatieve gegevens essentieel zijn om basis van hoeveelheid en schadedrempel data een goede keuze te kunnen maken over mogelijke vervolgacties. Het ambitieuze project is grotendeels uitgevoerd (na extra verlengingsjaar) zoals in het begin verwacht:

- Pathogenen werden geïdentificeerd.
- Sequentiegegevens op basis waarvan detectie kon geschieden werden vastgesteld of bepaald.
- Een DNA extractieprotocol uit gefiltreerd water werd ontwikkeld.
- Amplificatie en detectie procedures werden ontwikkeld.
- Pathogentiteitsproeven werden zowel uitgevoerd op individuele besmettingen als ook op meervoudige besmettingen.
- Monsters van praktijkbedrijven werden genomen en geanalyseerd.
- Veel DNA monsters werden verkregen en geanalyseerd.

Echter om optimaal gebruik te maken van de aanwezige DNA monsters zou het zinvol zijn om deze verder te analyseren, daar het budget optimale analyse van de DNA monsters niet toestond. Vooral de verdere kwantificering verdient nadere aandacht.

Voorgestelde activiteiten voor vervolg:

DNA monsters

Uit het project zijn naast veel gegevens ook DNA preparaten verzameld. Een deel van de verzamelde DNA preparaten zijn nog niet volledig geanalyseerd of kunnen in de toekomst nog met nieuwe methodieken geanalyseerd worden. Gezien de herkomst van deze preparaten en de achtergrond informatie, die van deze monsters bekend is, verdient het aanbeveling om de resterende DNA preparaten dan ook goed te bewaren voor toekomstig DNA analyse onderzoek. Het huidige onderzoeksbudget was niet toereikend om deze nieuwe methodieken op alle DNA preparaten uit te voeren.

Schadedrempels in de praktijk

Het project heeft voor de drie gewassen belangrijke informatie opgeleverd rondom schadedrempels. In de praktijk zijn er echter verschillende omstandigheden die van invloed zijn op de gevoeligheid van het systeem welke dus ook de hoogte van de schadedrempels beïnvloeden. Denk hierbij aan gevoeligheid cultivar, leeftijd gewas, teeltsubstraat, teelt klimaat, en ga zo maar door. Momenteel wordt door PPO Glastuinbouw, samen met Blgg, LUCEL en Groen Agro Control een EU Life gesubsidieerd project uitgevoerd ('CEPE') waarbij een adviessysteem ontwikkeld wordt welke een automatisch advies genereert op basis van de uitslag van een DNA detectie (monitoring) en de teeltomstandigheden welke door de teler geregistreerd worden. Voor veel gewassen ontbreekt het nog aan goede schadedrempelgegevens. Diverse belangenpartijen (waaronder Keuringsdiensten en LTO) onderkennen deze ommissie en laten weten dat zonder het gebruik van goede schadedrempel gegevens het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen lijkt toe te nemen, in plaats van de verwachte afname. Vanuit het Ministerie van LNV zijn deze signalen opgepakt en schadedrempel onderzoek zal de komende jaren extra aandacht krijgen.

Bemonstering

Ook het onderzoek naar punt van bemonstering verdient nadere aandacht.

6. Publiekssamenvatting

Meervoudige detectie van ziekteverwekkers in voedingswater met behulp van DNA technieken.

Afgelopen jaren (2002-2006) hebben Plant Research International (PRI) en Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Glastuinbouw (PPO Aalsmeer) in opdracht van het Productschap Tuinbouw onderzoek uitgevoerd naar de mogelijkheden van meervoudige detectie van ziekteverwekkers in voedingswater met behulp van DNA technieken. Dit onderzoek wordt uitgevoerd met de gewassen tomaat, roos en spathiphyllum. Doel van het onderzoek was een snelle en gevoelige detectie methode te ontwikkelen waarmee een besmetting van voedingswater met verschillende ziekteverwekkers in één keer vastgesteld kan worden. Voor spathiphyllum zijn dit onder meer *Cylindrocladium spathiphylli*, *Phytophthora* soorten, *Pythium* soorten en *Myrothecium roridum*. Deze ziekteverwekkers kunnen allen met het recirculatiewater door het teeltsysteem verspreid worden, waardoor de aantasting vanuit een kleine infectiebron snel kan toenemen. Wanneer het recirculatiewater met regelmaat onderzocht wordt op de aanwezigheid van ziekteverwekkers, en de besmetting in een vroegstadium vastgesteld kan worden voordat er een zichtbare schade bij de planten optreedt dan kan de teler gericht maatregelen nemen om de schade tot een minimum te beperken. Het onderzoek rust op twee belangrijke pijlers. Allereerst moet van de relevante ziekteverwekker het niveau bepaald worden dat in een recirculerend systeem infectie en mogelijk schade geeft. Voor een aantal pathogenen waaronder *Cylindrocladium* en *Phytophthora* zijn deze gegevens verkregen door infectieproeven uit te voeren, waarbij ofwel enkele planten besmet zijn door de ziekteverwekker op de kruit in de pot te gieten, ofwel het hele teeltsysteem te besmetten door de ziekteverwekker in een eb en vloed systeem aan het voedingswater in de tank toe te voegen. Vergelijkbare proeven zijn ook uitgevoerd voor tomaat en roos. Dit onderzoek is uitgevoerd bij PPO Glastuinbouw te Aalsmeer. De andere pijler van het onderzoek, uitgevoerd door PRI in Wageningen, is het detecteren van een ziekteverwekker op basis van zijn DNA sequentie. DNA is aanwezig in de celkern van alle organismen. De volgorde van het DNA, de DNA sequentie, is specifiek voor ieder organisme, en dus ook voor elke ziekteverwekker. Het is mogelijk om uit besmet voedingswater, DNA te isoleren van aanwezige ziekteverwekkers en op basis van de specifieke DNA sequentie vast te stellen welke ziekteverwekkers aanwezig zijn. Met moderne DNA technieken kan dit gelijktijdig voor meerdere ziekteverwekkers in één monster (multiplex). Deze technieken zijn zeer gevoelig en kunnen binnen zeer korte tijd uitgevoerd worden. Wanneer een watermonster geanalyseerd wordt dan levert de DNA toets binnen één tot twee dagen een uitslag over de aanwezigheid van ziekteverwekkers in dit systeem. Samen met de informatie over de schade die deze ziekteverwekker kan geven, wordt een advies voor bestrijding gegeven. De belangrijkste voordelen ten opzichte van de gangbare diagnostiek is dat de toets snel is en dat een uitslag voor meerdere ziekteverwekkers tegelijk gegeven wordt. Inmiddels vinden de toepassingen van deze technologie zijn weg naar de glastuinbouw. Verschillende diagnostische laboratoria gebruiken deze detectie methoden inmiddels. PRI voegt echter een nieuw aspect toe aan de analyses en dit is een kwantitatieve component. Tezamen met de bepaling van de schadedrempel kan zo nog gerichter een analyse en daarmee een zinvol advies worden afgegeven. In het laatste jaar van het project zijn een aantal praktijkbedrijven gevolgd en bemonsterd en zijn de watermonsters geanalyseerd. Hoewel een aantal plantenpathogenen werd gedetecteerd, werd op de bedrijven geen schade geconstateerd. Het onderzoek dat PRI en PPO uitgevoerd hebben zal bijdragen aan de ontwikkeling van deze toetsen bij de verschillende labs.

7. Publicaties, lezingen, posters en overige presentaties

7.1 Publicaties

Wetenschappelijke publicaties

1. Marianna Szemes, Peter Bonants, Marjanne de Weerd, Johan Banner, Ulf Landegren & Cor Schoen, 2005. Diagnostic application of Padlock Probes – Multiplex Detection of Plant Pathogens using universal microarray. *Nucleic Acids Research*, 2005, Vol. 33, No. 8 e70.
2. Nari M. Anderson, Marianna Szemes, Philip A O'Brien, Marjanne de Weerd, Cor D. Schoen, Piet J. Boender & Peter J.M. Bonants, 2006. Use of hybridization melting kinetics for detecting *Phytophthora* species using three dimensional microarrays. *Mycological Research* 110, 664-671.
3. Schoen, C.D., M. Szemes, P.J.M. Bonants, A. Speksnijder, M.M. Klerks, P.H.J.F. van den Boogert, C. Waalwijk, J.M. van der Wolf & C. Zijlstra, 2005. Novel molecular and biochemical techniques for quality control and monitoring in the agrofood production chain. In: *Rapid Methods for biological and chemical contaminants in food and feed*. Eds. A. van Amerongen, D. Barug & M. Lauwaars. Wageningen Academic Publishers. 151-177.

Publicaties in vakbladen

1. Bonants, P.J.M., J.P. Wubben & H. Kamminga. Alle ziektes in de glastuinbouw op één DNA-chip. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 2 maart 2001, pp. 36-38.
2. Bonants, P. & J. Wubben. Alle ziekten op één DNA-chip. *Groenten en Fruit Glasgroenten*, 2 maart 2001, pp. 6-7.
3. Wubben, Jos & Peter Bonants. Meervoudige detectie van ziekteverwekkers in voedingswater met behulp van DNA technieken. *LTO gewasnieuws spathiphyllum / potplanten*. Feb. 2004.

7.2 Lezingen

Wetenschappelijke congressen

Op diverse (inter)nationale congressen zijn lezingen gehouden met name m.b.t. multiplex detectie.

Invited lectures

1. Peter Bonants, Cor Schoen, Jan van der Wolf & Carolien Zijlstra. Developments in Detection of Plant Pathogens and Other Plant-Related Organisms: Detection in the Past towards Detection in the Future. Gent, Belgium. May 2001.
2. P.J.M. Bonants, C.D. Schoen, M. Szemes, A. Speksnijder, M.M. Klerks, P.H.J.F. van den Boogert, C. Waalwijk, J.M. van der Wolf & C. Zijlstra. From single to multiplex detection of plant pathogens by micro-arrays. *Phytopathological Society Portugal*. Faro, Portugal. Feb. 2004.
3. P.J.M. Bonants, C.D. Schoen, M. Szemes, A. Speksnijder, M.M. Klerks, P.H.J.F. van den Boogert, C. Waalwijk, J.M. van der Wolf & C. Zijlstra. Workshop Improvement and Unification of Plant Disease Diagnostics. *Phytopathological Society Poland, Skienierwice Poland*, Sep 2004. *Phytopathol. Pol.* 35: 29-47. From single to multiplex detection of plant pathogens: pUMA, a new concept of multiplex detection using microarrays.
4. Peter Bonants, Ronald van Doorn, Odette Mendes, Annette Dulleman, Richard van Hoof & Cor Schoen. Diagnostic application of 'padlock probes'- multiplex detection of plant pathogens using universal micro-arrays. *BioTech 2006*. Wadenswill, Zwitserland. June 2006.

Overige lezingen congressen

1. IBC conference Germany (jun 2002).
2. EFPP congress Czech Republic (sep 2002).
3. Congress Switzerland (feb 2003).
4. Nematology Congress Tenerife, Spain (jul 2003).

Lezingen voor praktijkonderzoek en telersverenigingen

1. Jos Wubben. Toepassing van multiplexdetectie van ziekteverwekkers in recirculerende systemen. Lezing PPO bollen en bomen, 3 juni 2004.
2. Jos Wubben. Bodemziekten bij spathiphyllum. Lezing en discussie excursiegroep spathiphyllum, 30 maart 2005.

7.3 Posters

Posterpresentaties op wetenschappelijke congressen en Open Dagen PPO

Op diverse (inter)nationale congressen zijn posters gepresenteerd met name m.b.t. multiplex detectie: o.a. Poster International Congress for Plant Pathology New Zealand (feb 2003). Een poster is gepresenteerd op de openbroeidagen van PPO bollen te Lisse.

Overige Posterpresentaties

Zie ook Bijlagen.

7.4 Overige presentaties

- Diverse bijeenkomsten COST 853 actie op het gebied van Micro-arrays voor Agrarische Applicaties (2002-2007).
- Diverse PamGene symposia (2002-2003).
- Multiplex detectie grond project (2002-2005) gefinancierd door Ministerie van LNV (2002-2005).
- Bsik (ICES KIS) project: een nieuw project met als thema Ecogenomics (2004-2009).
- KNPV werkgroep Detectie van Plant Pathogenen (2002-2006).
- KNPV werkgroep *Phytophthora* / *Pythium* (2002-2006).
- Gastbezoek AIO student (Nari Anderson) van Murdoch University Perth, Australia (aug-dec 2003).
- Poster Nari Anderson, Murdoch University Perth, Australia (dec 2003).

Bijlage I.

Flyer boek Gewasbeschermingsprogramma 397-III

Detectie van meerdere gewasbelagers in water

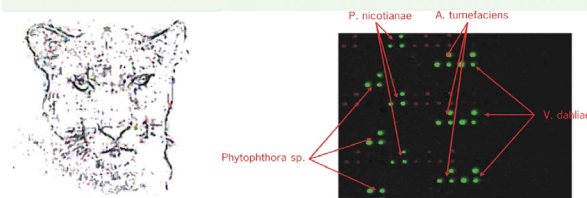
Peter Bonants, Cor Schoen, Marianna Szemes, Ronald van Doorn, Jos Wubben

Uitgangspunt

- Water dat wordt gebruikt om bollen schoon te spoelen (spoeiwat) of om kasgewassen van water te voorzien wordt veelal hergebruikt door middel van recirculatie.
- Hierbij loopt men het risico dat het water besmet wordt met gewasbelagers zoals bijvoorbeeld bacteriën, virussen, schimmels en aaltjes.
- Het dramatische gevolg zal zijn dat tijdens de recirculatie van het besmette water de bollen of gewassen besmet worden met gewasbelagers, met alle nadelige gevolgen van dien.

Onderzoek

- Detectie via moleculair biologische technieken (DNA-analyses) maakt het mogelijk om zeer kleine hoeveelheden gewasbelagers aan te tonen in diverse substraten zoals plantmateriaal, water, grond, etc., waardoor bijtijds maatregelen getroffen kunnen worden.
- De nieuwste ontwikkeling betreft de detectie van meerdere gewasbelagers tegelijkertijd (multiplex-detectie) in één toets. Hierbij wordt gebruik gemaakt van chips of micro-arrays gecombineerd met het pUMA systeem.



Resultaten

- Er is een multiplex detectiesysteem ontwikkeld met de naam pUMA.
- Het pUMA (Padlock based Universal Multiplex Array) systeem behelst een aantal stappen van digestie, ligatie, amplificatie en hybridisatie die worden losgelaten op het DNA dat wordt geïsoleerd uit het te analyseren monster.
- Het uiteindelijke resultaat kan worden afgelezen van een micro-array, waarvan hier een voorbeeld is afgebeeld.

De praktijk

Multiplex detectie met gebruik van het pUMA-systeem biedt de volgende voordelen:

- In één toets kunnen meerdere gewasbelagers tegelijkertijd worden gedetecteerd.
- Naast pathogenen kunnen ook beneficials worden gedetecteerd.
- Het is mogelijk om pathogenen te detecteren in water, grond, plantmateriaal, lucht, etc.
- De pUMA micro-arrays zijn universeel toepasbaar.
- Verschillende array-platforms zijn te combineren met het pUMA detectiesysteem.



Contact: Jos Wubben
Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
T 0297 25 23 03 - F 0297 35 22 70
jos.wubben@wur.nl
www.ppo.wur.nl

Bijlage II.

Poster Open Broeidagen Lisse



**PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING**



PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

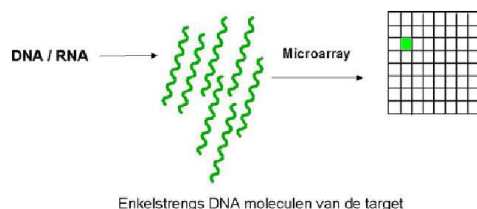
Multiplex detectie van plantpathogenen in recirculatiewater met behulp van DNA-chips

J. Wubben¹, R. de Werd¹, I. Bosker¹, J. van Beckhoven², D. Donkers-Venne² en P. Bonants²
j.p.wubben@ppo.dlo.nl p.j.m.bonants@plant.wag-ur.nl (projectleider)

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving en Plant Research International werken samen aan een systeem, waarmee de aanwezigheid van een groot aantal ziekteverwekkers tegelijkertijd bepaald kan worden in recirculatiewater.

Detectie ziekteverwekkers in water

Verspreiding van ziekten en plagen vormt een belangrijk probleem bij hergebruik van de voedingsoplossing. Nieuwe ontwikkelingen bieden mogelijkheden om in één enkele toets de aanwezigheid van vele ziekteverwekkers tegelijk te bepalen (multiplex).



DNA-chip waarop kleine stukjes DNA, specifiek voor een groot aantal plantenpathogenen, zijn aangebracht.

Principes multiplex detectie

Bij multiplex detectie wordt gebruik gemaakt van zogenaamde DNA-chips. Op één chip kunnen unieke stukjes erfelijk materiaal (DNA of RNA), van meer dan 100 verschillende ziekteverwekkers geplaatst worden. De aanwezigheid van deze pathogenen kan vervolgens bepaald worden, door het DNA en RNA in een watermonster te vergelijken met dat op de chip. Hiermee is de hygiëne van de gebruikte voedingsoplossing op efficiënte en complete wijze te bepalen.

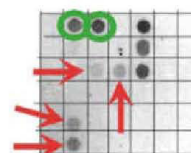
Roos, Tomaat en Spathiphyllum

Multiplex detectie wordt aanvankelijk voor drie teeltsystemen ontwikkeld en getoetst, namelijk Roos en Tomaat, beide op steenwol en Spathiphyllum op eb/vloed-tafels. Voor deze gewassen worden DNA-chips ontwikkeld waarmee alle ziekteverwekkers aangetoond kunnen worden die in deze gewassen schade geven.



Toepassingen

- Diagnose
- Geleide (preventieve) bestrijding
- Onderdeel certificering



P. nicotianae / *P. cinnamomi*
P. cactorum / *P. cryptogea*

Multiplex detectie van 4 *Phytophthora* sp. m.b.v. DNA-chips. Specifieke *Phytophthora* spots zijn aangegeven met een pijl. De spots met een groene cirkel worden gebruikt voor positionering. De drie spots rechts zijn spots die voor alle *Phytophthora* een signaal geven.

¹ Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
Tel.: 0297 - 352525
Fax: 0297 - 352270
E-mail: j.p.wubben@ppo.dlo.nl
Internet: www.ppo.dlo.nl

² Plant Research International
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel.: 0317 - 476213
Fax: 0317 - 418094
E-mail: p.j.m.bonants@plant.wag-ur.nl
Internet: www.plant.wageningen-ur.nl/

