

lijken. Seizoens- en omgevingsfactoren hebben een grote (negatieve) invloed op de reproduceerbaarheid van ziekte-toetsen, die het moeilijk maakt om *Botrytis*-resistente genotypes te identificeren. Doelstelling van het onderzoek in ons laboratorium is om fundamenteel inzicht te verkrijgen in het infectieproces. Deze kennis kan benut worden om nieuwe bestrijdingsmethoden te ontwikkelen.

Botrytis is een necrotrofe schimmel, die waardplantcellen eerst doodt alvorens ze te koloniseren. Vanuit een primaire lesie groeit de schimmel uit in omringend weefsel en veroorzaakt daarbij rot. Twee factoren zijn voor *Botrytis* essentieel voor succesvolle infectie: 1. het vermogen om plantencellen te doden, en 2. het vermogen om plantenweefsel af te breken en te benutten voor eigen groei. Recent zijn twee typen schimmeleiwitten onderzocht die een belangrijke rol spelen in deze processen. Van het eerste type produceert *Botrytis* twee varianten. Beide eiwitten hebben geen (bekende) enzymactiviteit maar vertoont een sterk fytoxische werking. Toediening van eiwitoplossing aan bladweefsel leidt tot celdood in het weefsel in 24-48 uur, zichtbaar als een bruine, droge necrotische zone. Het werkingsmechanisme is nog niet opgehelderd. Het tweede type eiwit is een enzym dat pectine kan afbreken, en daardoor celwandafbraak en weefseldesintegratie veroorzaakt. Pectine afbraak vergemakkelijkt schimmelgroei door de celwanden in het weefsel en levert de schimmel voedingsstoffen.

Al deze eiwitten kunnen in vitro geproduceerd worden d.m.v. expressie in een gist. De eiwitten kunnen worden gezuiverd en vervolgens toegediend aan planten, door injectie in blad met een injectiespuit of door stengels of bladstelen in een buisje met eiwitoplossing te plaatsen. De fytoxische eiwitten veroorzaken celdood in blad van *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* en tuinboon (*Vicia faba*). Andere plantensoorten worden momenteel getest. Het pectinase kan in tuinboon al binnen vijf minuten volledige weefseldesintegratie veroorzaken, leidend tot afsterven van de geïnfilteerde weefselzone. In andere planten is de reactie op het pectinase langzamer maar uiteindelijk even duidelijk.

Onze hypothese is dat plantengenotypes die (volledige of gedeeltelijke) resistentie bezitten tegen de werking van deze eiwitten, minder vatbaar zullen zijn voor botrytis. Resistentie kan zich voordoen in het stadium van primaire lesievorming (celdood) of van lesie-uitgroei (celwand- en weefselaafbraak). De beschikbaarheid van deze eiwitten biedt perspectieven voor screening van planten op botrytis resistentie zonder dat daarbij gebruik hoeft te worden gemaakt van ziekte-toetsen. Door een concentratiereeks eiwit te gebruiken kan een LD₅₀ bepaald worden. Vergelijking van de LD₅₀ waarden van verschillende genotypes kan een maat geven voor botrytis resistentie. Hoewel er resistentiemechanismen tegen botrytis

kunnen zijn die met deze screeningsmethode over het hoofd worden gezien, zou het voordeel van een simpel uitvoerbare én interpreteerbare toets met eiwitten de nadelen kunnen overtreffen. Kleine porties van beide eiwitten kunnen onder voorwaarden beschikbaar worden gesteld aan geïnteresseerde partijen voor haalbaarheidsstudies.

Het lopende onderzoek richt zich op diverse aspecten: specificiteit op meerdere plantensoorten, specificiteit op verschillende genotypes binnen één plantensoort, werkingsmechanisme, remming van werking.

Dit onderzoek wordt gefinancierd door Technologiestichting STW en Productschap Tuinbouw.

3.2 Detectie en identificatie technieken

3.2.1 Toepassingen van het pUMA systeem voor detectie van meerdere plantpathogenen in grond, water en lucht via één enkele toets

Peter Bonants, Marianna Szemes, Arjen Speksnijder, Carolien Zijlstra en Cor Schoen.

Plant Research International BV, Wageningen

Het is belangrijk om de aanwezigheid van schadelijke organismen in voedsel, water, grond en lucht of elk ander substraat vast te stellen voor de gezondheid en voor veiligheidsmanagement. Vele verschillende moleculaire technieken zijn voor de detectie van pathogenen beschreven, elk met zijn eigen protocol, evenals apparatuur, chemische reagentia en bovendien benodigde expertise. Als verschillende pathogenen tegelijkertijd moeten worden gedetecteerd, wordt deze benadering erg kostbaar. De (multiplicity) veelheid van beschikbare bepalingen voor detectie van een bepaald pathogeen leidt tot een gebrek aan consistentie tussen de diverse testlaboratoria in Europa en staat standaardisatie in de weg. Daarom wordt momenteel veel energie gestoken in het ontwikkelen van zgn multiplex testen: het tegelijkertijd detecteren van meerdere targets (pathogenen) in één monster. Micro-array technologie, waarin duizenden verschillende oligo's of eiwitten gespot kunnen worden op een vierkante cm, maakt het mogelijk dat in hetzelfde

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. Schapendonk¹

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

¹ *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-