

41

Proefstation voor de Bloemisterij  
Linnaeuslaan 2a  
1431 JV Aalsmeer  
tel. 02977-52525

ISSN 0921-710X

Ontwikkeling van een detectiemethode voor  
*Fusarium oxysporum f.sp. cyclaminis* en *dianthi*  
gebaseerd op polyacrylamidegel-elektroforese

Rapport 142

Prijs f 12,50

Ing. J.T. Everink  
september 1991

Indien U naar aanleiding van het onderzoek en het rapport vragen hebt, dan kunt U contact opnemen met Ir. A. Kerssies.

Rapport 142 is te bestellen door het storten van f 12,50 op girorekening 174855 ten name van Proefstation Aalsmeer onder vermelding van: 'Rapport 126 Detectiemethode *Fusarium*'.

## INHOUD

Voorwoord	3
Gebruikte afkortingen	4
1. Inleiding	5
2. Verschillende fasen van het project	6
2.1 Het ontwikkelen van de techniek	
2.2 Het testen van de ontwikkelde techniek	
2.3 Onderzoeken van de specificiteit van de detectiemethode voor <i>Fusarium</i> ten opzichte van andere pathogenen	
2.4 Vergelijken van de specificiteit ten opzichte van verschillende <i>F. oxysporum</i> -isolaten	
2.5 Onderzoek naar de relatie tussen lage concentraties sporen en snelheid van detectie	
2.6 Het aanpassen van de detectiemethode voor gebruik door de N.A.K.S.	
2.7 Onderzoek naar het door <i>Fusarium</i> geïnduceerde esterase-enzym	
3. Resultaten en discussie	13
3.1 Het ontwikkelen van de techniek	
3.2 Testen van de ontwikkelde techniek	
3.3 De specificiteit van het isozym patroon in vergelijking met andere pathogenen	
3.4 De specificiteit ten opzichte van verschillende <i>F. oxysporum</i> -isolaten	
3.5 De relatie tussen lage sporenconcentraties en de snelheid van detectie	
3.6 Het aanpassen van de detectiemethode voor gebruik door de N.A.K.S.	
3.7 Eigenschappen van het door <i>Fusarium</i> geïnduceerde esterase-enzym	
4. Conclusie	22
5. Slotwoord	23
6. Literatuur	25
7. Technische bijlagen / materiaal en methoden	26
7.1 Het plantmateriaal	
7.2 Isolatie van plantpathogenen	
7.3 Het inoculum en het inoculeren	
7.4 De extractiebuffer	
7.5 Extractiemethoden	
7.6 Methode voor het bepalen van de eiwitconcentratie	
7.7 Elektroforese	
7.8 Methoden voor het kleuren van gels	
7.9 Eiwitzuivering	
7.10 Bepalen van molecuulgewicht en iso-elektrisch punt van een eiwit	

## VOORWOORD

Vanaf september 1989 tot oktober 1991 is gewerkt aan een project met als doel: de ontwikkeling van een detectiemethode voor *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* en *dianthi* in plantmateriaal gebaseerd op verschillen in enzymproductie die aangetoond worden met elektroforese. Het toepassen van enzym-elektroforese als detectiemethode voor schimmels is een nieuwe methode die nog niet eerder als zodanig in de praktijk werd toegepast.

Tijdens de eerste maanden werd snel duidelijk er weinig bekend was over elektroforese bij Cyclamen en anjer en de schimmel *F.oxysporum* f.spp. Vanwege het ontbreken van een alternatieve toets was de behoefte aan een detectiemethode bij Cyclamen groter dan bij anjer. Daarom is in het begin meer aandacht besteed aan het ontwikkelen van de methode voor Cyclamen dan voor anjer. De voortgang van het project en de daarbij horende keuzes zijn in overleg met een begeleidingscommissie bepaald.

Dank aan een ieder die een bijdrage heeft geleverd aan dit project, waardoor goede resultaten zijn behaald en het doel is bereikt. Voor de dagelijkse begeleiding van het project wil ik Albert Kerssies en Hendrik-Jan van Telgen bedanken. De stagiair Luc Hornstra wil ik noemen voor zijn bijdrage aan de ontwikkeling van de detectiemethode voor anjer. Tenslotte dank ik de begeleidingscommissie de heren J. van Ruiten (NAKS), H. Huttinga (IPO), J.van Aartrijk (LBO), A. Schots (LMA), P. Boonekamp (LBO), C. Vonk Noordegraaf (PBN) voor hun inbreng in het project.

#### GEBRUIKTE AFKORTINGEN

CMA	corn meal agar
DIECA	diethyldithiocarbamaat
HD-gels	high density gels
IEF	iso-elektrische focussering
MQ-water	milli-Q water
NaHSO <sub>3</sub>	natriumsulfiet
PAA	polyacrylamide
PAGE	polyacrylamide gel elektroforese
PDA	potato dextrose agar
PVP	polyvinylpyrrolidone
SDS	natriumdodecylsulfaat

## 1. INLEIDING

Schimmels kunnen in de bloemisterij grote problemen veroorzaken. Bodemschimmels en schimmels die vaatziekten veroorzaken, komen over het algemeen de kas binnen via besmette (jonge) planten, via besmet teeltmedium, via gereedschap of via mens en dier. Vanuit enkele besmette planten kunnen deze schimmels zich zeer snel verspreiden en zo kan binnen vrij korte tijd een heel gewas aangetast raken. Het starten van een teelt met ziektevrij uitgangsmateriaal onder ziektevrrije omstandigheden is dan ook erg belangrijk. Dit geldt onder meer voor de schimmel *Fusarium oxysporum* die bij de teelt van anjer en Cyclamen veel problemen kan veroorzaken. De symptoomexpressie van deze schimmel is sterk afhankelijk van uitwendige omstandigheden van de plant. Zo kan de schimmel lange tijd latent aanwezig zijn in planten en ongemerkt worden verspreid via ogenschijnlijk gezond uitgangsmateriaal. Er is om die reden vanuit de praktijk een duidelijke behoefte ( NAKS, vermeerderaars, telers) aan detectietechnieken die op een snelle en betrouwbare manier de aanwezigheid van schimmels in uitgangsmateriaal kunnen aantonen.

Het doel van dit project is het ontwikkelen van een detectiemethode voor *Fusarium oxysporum* voor anjer en Cyclamen. In dit project is gekozen voor het detecteren van schimmels in planten met behulp van eiwit-elektroforese. Eiwit-elektroforese is een biochemische scheidingstechniek voor eiwitten, waarbij eiwitten geïsoleerd uit fijn gemalen plantmateriaal kunnen worden gescheiden op molecuulgewicht en/of lading. De eiwit-elektroforesemethode is toegesneden op de pathogeniteit van de schimmel en de reactie van de plant daarop door productie van afweereiwitten. In eerder onderzoek (De Wit et al, 1986; Hepper et al, 1986; Hepper et al, 1988a en 1988b) is aangetoond dat er al in een vroeg stadium verschil is in eiwitpatronen van gezonde en schimmelzieke planten.

De uitvoering van dit twee jaar durende project werd mogelijk gemaakt door steun van de Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. De detectiemethode zal door de Nederlands Algemene Keuringsdienst voor Siergewassen worden toegepast in de keuringssystemen voor uitgangsmateriaal van Cyclamen en anjers.

## 2. VERSCHILLENDE FASEN VAN HET PROJECT

De ontwikkeling van de detectiemethode voor *F. oxysporum* in anjer en Cyclamen is te verdelen in verschillende fasen: het ontwikkelen van de techniek, het testen van de ontwikkelde techniek, het testen van de methode op specificiteit ten opzichte van andere pathogenen of *Fusarium*-isolaten, het onderzoeken van de gevoeligheid met betrekking tot lagere sporenconcentraties en het aanpassen van de ontwikkelde methode naar een voor de N.A.K.S. uitvoerbare keuring.

Bij al deze fasen spelen verschillende aspecten een rol. In de hier volgende paragrafen wordt een min of meer chronologisch overzicht van het project gegeven en zullen die verschillende aspecten nader toegelicht worden. Het onderzoek voor anjer en Cyclamen werd gescheiden uitgevoerd en wordt daarom apart besproken.

### 2.1 Het ontwikkelen van de techniek

Om enzymactiviteit aan te kunnen tonen werd begonnen met het zoeken naar het juiste plantenweefsel waaruit het eiwit geïsoleerd moet worden. Dit isoleren wordt beïnvloed door de samenstelling van de extractiebuffer. Tevens werd gezocht naar een geschikt enzym met de bijbehorende elektroforesemethode.

#### Cyclamen

Bij deze proeven werd de selectie 'Vuurbaak' gebruikt. Deze selectie is zeer gevoelig voor *Fusarium*. Per experiment werden een of twee bakken met 66 Cyclamen gebruikt. Voor het vergelijken van gezonde en door *Fusarium* aangetaste planten werd de helft van het aantal planten geïnoculeerd en de andere helft als gezonde controle gebruikt. Bij het inoculeren werd inoculatiemethode 1 gebruikt (beschreven op blz. 28).

De huidige methode om *Fusarium* aan te tonen, maakt gebruik van de knol van Cyclamen. Voor het ontwikkelen van de elektroforesemethode werd in eerste instantie ook de knol onderzocht. De extracten van de knol werden getoetst op de enzymen  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucosidase, glutamaat oxaloacetaat transaminase (GOT), leucine amino peptidase (LAP), polygalacturonase (PG) en  $\alpha$ -esterase. Omdat weinig tot geen verschil ontstond in de enzym patronen van gezonde en zieke planten, werd de knol niet verder onderzocht maar werd het onderzoek verder uitgevoerd met de wortels. Hiermee werden betere resultaten bereikt. Als enzym om op te toetsen werd voor esterase gekozen, omdat deze bij de knol het meeste verschil vertoonde met gezonde planten. Voor de wortels werd de techniek verder ontwikkeld. De  $\alpha$ -esterase enzymkleuring werd geoptimaliseerd, de extractiemethode en extractiebuffer aangepast.

Tijdens het isoleren van eiwit uit de knol en wortels werd regelmatig de eiwitconcentratie bepaald om een beeld te krijgen van de hoeveelheid geïsoleerde eiwitten.

#### Anjer

Voor het ontwikkelen van de techniek werd als plantmateriaal de cultivar 'Lena' gekozen die geen resistentie bezit tegen *Fusarium*. Voor de eerste proef werden 100 bewortelde stekken opgepot waarvan er 50 geïnoculeerd zijn met een *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*-isolaat (inoculeren door injectie van

3.10<sup>6</sup>/ml sporen tussen de wortels). De andere 50 stekken dienden als gezonde controle van deze proef. De planten werden gebruikt voor het ontwikkelen van de extractiemethode, de extractiebuffer en het zoeken van een geschikte enzymkleuring met de bijbehorende elektroforesemethode. Uit overleg met de N.A.K.S. kwam naar voren dat zij met name de stengel van stekken gaan toetsen. Daarom werd de detectiemethode ontwikkeld voor de stengel. De extracten van anjer werden getoetst op de volgende kleuringen en enzymactiviteiten: Coomassie Brilliant Blue R250, zilverkleuring, peroxidase, GOT, LAP, PG, PL,  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucosidase en  $\alpha$ -esterase.

Met name van  $\alpha$ -esterase werd veel activiteit aangetoond, waardoor het enzym esterase werd gebruikt als controle bij het uitzoeken van de extractiemethode en de extractiebuffer. Tijdens het ontwikkelen van de methode werd regelmatig de eiwitconcentratie bepaald.

## 2.2 Het testen van de ontwikkelde techniek

In deze fase van het project werden de resultaten getoetst op reproduceerbaarheid, de cultivarinvloed op de isozym patronen en door tijdreeksen werd de infectiesnelheid en de detectiesnelheid onderzocht. Indien een methode gebaseerd wordt op isozym patronen van een plant is het noodzakelijk om te onderzoeken hoeveel variatie in een isozym patroon binnen een soort tussen verschillende cultivars voorkomt. Indien veel variatie voorkomt is een enzym niet geschikt als basis voor een detectiemethode.

### Cyclamen

In de eerste fase werd een duidelijk verschil in het esterase enzym patroon tussen gezonde en door *Fusarium* aangetaste planten aangetoond. Voor het toetsen van het resultaat op bovengenoemde aspecten werden de selectie 'Vuurbaak' en het mengsel van selecties 'Pastel gemengd' gebruikt. 'Pastel gemengd' bestaat uit een groot aantal verschillende genotypen. Door het toetsen van dit mengsel werd een goed beeld verkregen van mogelijke genetische variatie van het esterase-patroon van Cyclamen.

Het onderzoek werd als volgt opgezet. De helft van de planten van 'Vuurbaak' en 'Pastel gemengd' werd geïnoculeerd met *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis*, de rest diende als gezonde controle. Vanaf enkele dagen na inoculeren werden om de twee à drie dagen enkele gezonde en geïnoculeerde planten bemonsterd en met elektroforese getoetst.

Aan het einde van de proef was een redelijk beeld verkregen van de reproduceerbaarheid, cultivarinvloed en de snelheid van detectie.

Een doel van het project was om *Fusarium* in een beginnend stadium van de infectie (als de planten er nog gezond uitzien) aan te tonen. Door het uitvoeren van een tijdreeks werd hierover een beeld verkregen.

Van de planten die bemonsterd werden voor elektroforese werd tevens een deel op PDA uitgelegd om het resultaat van de herisolatie te kunnen vergelijken met de elektroforeseresultaten.

Alle planten werden geïnoculeerd met 10<sup>6</sup> sporen/ml volgens methode 1.

### Anjer

Voor het bepalen van de cultivarinvloed op variatie van het esterase isozym patroon werden negentien cultivars met verschillende resistentie-niveaus gebruikt. Zie voor beschrijving van de cultivars tabel 6 op blz.

27. Voor het detecteren van de infectie van de plant werd een tijdreeks gemaakt om het verloop van de aantasting te volgen en de resultaten van de eerste fase te controleren. Na het uitvoeren van deze proeven was tevens de reproduceerbaarheid bekend. De proef werd geïnoculeerd volgens methode 2 met  $3.10^6$ /ml sporen.

### 2.3 Onderzoeken van de specificiteit van de detectiemethode voor *Fusarium* ten opzichte van andere pathogenen

Het onderzoek was tot zover alleen gericht op de detectie van *Fusarium*. In de volgende proeven werd onderzocht of het gevonden verschil tussen gezonde en door *Fusarium* aangetaste planten specifiek is voor de relatie Cyclamen - *Fusarium* en anjer - *Fusarium*. In deze proeven werden planten geïnoculeerd met verschillende plantpathogenen die bij anjer en Cyclamen voorkomen.

#### Cyclamen

Voor deze proef werden in vitro opgekweekt materiaal en één keer door de vermeerderaar verspeend plantmateriaal van de selectie 'Vuurbaak' gebruikt. In deze proef werden de plantpathogenen *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis*, *Cylindrocarpon destructans*, *Thielaviopsis basicola*, *Erwinia chrysanthemi* en *E. carotovora* getoetst. Vanaf een week na inoculeren met één van de bovengenoemde pathogenen werd begonnen met een tijdreeks waarbij om de drie à vier dagen planten, geïnoculeerd met de verschillende pathogenen, werden getoetst. Deze proef werd enkele malen herhaald. Een probleem bij deze proef was het her-isoleren van de pathogenen uit de geïnoculeerde planten. *Thielaviopsis* groeide erg langzaam en werd in de groei geremd door andere schimmels en bacteriën. Tevens is het niet mogelijk om de terug geïsoleerde *Erwinia*- bacteriën te determineren op het Proefstation. Als een pathogeen geher-isoleerd werd of de plant vertoonde duidelijke symptomen van het pathogeen, was een betrouwbaar antwoord te geven over de specificiteit van de methode. Deze proef werd meerdere malen uitgevoerd, waarbij volgens methode 1 en 2 geïnoculeerd werd met 10 ml  $10^6$  sporen/ml.

#### Anjer

Voor anjer werden de pathogenen *Alternaria dianthi*, *Phialophora cinerescens* en *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* vergeleken. Voor *Alternaria* werd een tijdreeks gemaakt waarbij tot vier maanden na inoculeren getoetst werd op een verandering van het  $\alpha$ -esterase-isozympatroon. Voor *Phialophora* werden planten met duidelijke symptomen getoetst. Deze planten waren opgepot in met *Phialophora* besmette potgrond. Van het *Alternaria*-inoculum werd 5 ml per plant volgens inoculatiemethode 2 toegediend. Een probleem bij het aantonen van deze pathogenen was verhouting die optrad bij de stengels als planten drie maanden in de kas staan. Ook de stekken aan deze planten waren erg stug, waardoor er relatief weinig eiwit geïsoleerd werd.

### 2.4 Vergelijken van de specificiteit ten opzichte van verschillende *F. oxysporum*-isolaten

In deze proeven werd onderzocht of planten geïnoculeerd met andere *Fusarium oxysporum* f.sp. of niet-pathogene *Fusarium* isolaten, hetzelfde verschil in het esterase enzympatroon vertonen als planten geïnoculeerd met een



pathogeen isolaat. Voor Cyclamen zijn in tegenstelling tot voor anjers geen officiële niet-pathogene isolaten bekend. Op dit moment wordt aangenomen dat een *F.oxysporum* f.sp. geïsoleerd uit een aangetast gewas, specifiek pathogeen is voor dit gewas.

### Cyclamen

Voor Cyclamen werden twee verschillende proeven uitgevoerd. In de eerste proef werd de selectie 'Vuurbaak' geïnoculeerd met een pathogeen *F.oxysporum* f.sp. *cyclaminis*-isolaat (F5) en met een uit Cyclamen geïsoleerde *F.oxysporum* die na her-inoculatie niet pathogeen bleek (F2). De planten werden volgens methode 1 geïnoculeerd met  $10^6$  sporen/ml. De planten geïnoculeerd met F2 hebben ongeveer een volledige teelt in de kas gestaan, werden vervolgens een week in een transportsimulator geplaatst en daarna enkele weken in uitbloeiruimtes gezet. Tijdens de teelt werd eens per vier weken getoetst op de aanwezigheid van *Fusarium*. De planten geïnoculeerd met F5 waren twee maanden na inoculeren weggevallen.

In een andere proef werden isolaten van *F.oxysporum* geïsoleerd uit chrysant, Aster, roos, Pelargonium en Gerbera vergeleken met *F.oxysporum* f.sp. *cyclaminis*. Voor deze proef werd 'Pastel gemengd' als plantmateriaal gebruikt. De inocula van de verschillende isolaten werden gemaakt zoals in bijlage 7.2 beschreven. De toegepaste sporenconcentraties waren  $10^6$  sporen/ml en de plantjes werden geïnoculeerd volgens inoculatiemethode 1. Vanaf vier dagen na inoculeren werd begonnen met een tijdreeks. De monsters werden getest op  $\alpha$ -esterase- en  $\beta$ -D-glucosidase-activiteit. Deze proef werd herhaald met in vitro opgekweekte plantjes van 'Vuurbaak', 'Pastel gemengd' en 'Mini Swiss'. Deze plantjes werden tevens geïnoculeerd volgens inoculatiemethode 1. Vanaf vier dagen na inoculeren werd begonnen met de tijdreeks en het toetsen op esterase- en  $\beta$ -D-glucosidase-activiteit.

### Anjer

Voor anjer werden de isozym patronen van  $\alpha$ -esterase en  $\beta$ -D-glucosidase vergeleken van planten geïnoculeerd met een pathogeen isolaat en een niet-pathogeen isolaat. Hiervoor werd de cultivar 'White Sim' gebruikt die geen resistentie bezit tegen *Fusarium*. Voor dit experiment werden honderd planten geïnoculeerd met de niet-pathogene vorm. De planten werden geïnoculeerd door 3 ml inoculum op de potgrond te gieten of door 3 ml inoculum met een pipet in de potgrond te spuiten. Het inoculum bevatte  $10^6$  sporen/ml.

### **2.5 Onderzoek naar de relatie tussen lage concentraties sporen en de snelheid van detectie**

In dit project werden tot nu toe hoge concentraties sporen gebruikt om zeker te zijn van uitval binnen een redelijke termijn. Door sporenconcentraties te verlagen kan eventueel een idee worden gekregen over de hoeveelheid sporen die nodig is om een plant te infecteren en de tijd die ligt tussen infectie en detectie. Dit werd uitgevoerd om een vergelijking te kunnen maken met in de praktijk voorkomende situaties. In de praktijk zullen waarschijnlijk lage concentraties sporen voorkomen.

## Cyclamen

Voor deze proef werden in vitro opgekweekte plantjes gebruikt van de genotypes 'Vuurbaak', 'Pastel gemengd', 'Mini Swiss' en 'Marie Mignon'. Tevens werden drie isolaten vergeleken: het pathogene *F.oxysporum* f.sp. *cyclaminis*-isolaat (F5), het niet pathogene isolaat (F2) en *F.oxysporum* geïsoleerd uit Gerbera. Van elk isolaat werd met drie sporenconcentraties geïnoculeerd:  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  sporen/ml. Bij elke plant werd 10 ml inoculum volgens inoculatiemethode 2 toegediend.

## Anjer

Voor anjer werd de cultivar 'White Sim' geïnoculeerd met  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  en  $10^5$  sporen/ml van het pathogene *Fusarium*-isolaat. Er werd geïnoculeerd door het gieten van inoculum op de potgrond en het pipetteren in de potgrond.

### 2.6 Het aanpassen van de detectiemethode voor gebruik door de N.A.K.S.

Uit overleg met de N.A.K.S. was naar voren gekomen dat deze graag als extractiemethode de bladpers willen gebruiken en dat zij vooralsnog niet beschikken over het door het PBN gebruikte PhastSystem elektroforese-apparaat. Daarom werd geprobeerd de methode enigszins aan te passen aan hun apparatuur. Er werd een experiment uitgevoerd waarbij drie extractiemethodes en twee elektroforesesystemen werden vergeleken. De gebruikte extractiemethodes waren de bladpers, het fijnmalen in een mortier met behulp van vloeibare stikstof en de tecan-kogelmaler. Het PhastSystem werd vergeleken met een Midget-systeem van de firma Pharmacia. Voor dit verticale elektroforese-systeem moeten zelf gels gegoten worden of kunnen met aanpassingen Bio-Rad gels gebruikt worden. Dit systeem is alleen geschikt voor PAGE. De problemen met de extractiemethode speelden vooral bij Cyclamen. Voor anjer is het mogelijk eiwit te isoleren met de bladpers uit jonge stengels.

Het experiment werd als volgt opgezet. Van een partij Cyclamen werd de helft geïnoculeerd met *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis* (pathogeen) en de ander helft als gezonde controle gebruikt. Van gezonde en door *Fusarium* aangetaste planten werd volgens bovengenoemde extractiemethodes eiwit geïsoleerd. Na centrifugeren werd van de extracten de eiwitconcentratie bepaald en werden de monsters op beide elektroforese systemen geanalyseerd. De monsters werden getest op  $\alpha$ -esterase- en  $\beta$ -D-glucosidase-activiteit. Deze proef werd eenmaal herhaald. Vervolgens werd een experiment uitgevoerd waarbij voor het gebruik van de bladpers de concentratie remmers veranderd werd. De concentraties Triton-X100, PVP, DIECA, EDTA en NaHSO<sub>3</sub> werden verdubbeld. De bladpersmethode werd verder uitgevoerd als beschreven in § 7.4. Hiervoor werden zowel gezonde als door *Fusarium* aangetaste Cyclamen gebruikt. De verkregen eiwitextracten werden op beide elektroforese-systemen geanalyseerd en getest op  $\alpha$ -esterase- en  $\beta$ -D-glucosidase-activiteit. Tevens werden voor het vergelijken van de elektroforese-systemen met de bladpers gemaakte anjerextracten geanalyseerd.

### 2.7 Onderzoek naar het door *Fusarium* geïnduceerde esterase enzym

Het verschil tussen gezonde en door *Fusarium* aangetaste planten werd gedetecteerd als een extra bandje. Dit bandje had als waarneembare

eigenschappen: een laag molecuulgewicht en het had enzymactiviteit. Voor eventuele problemen bij de uitvoering van de detectiemethode is het praktisch om te weten of het enzym door de plant of door de schimmel wordt geproduceerd. Voor een volgend project is het nodig om eigenschappen als molecuulgewicht en iso-elektrisch punt te bepalen. Voor het uitzoeken van hierboven beschreven aspecten werden enkele proeven uitgevoerd, zoals proeven met verschillende C-bronnen in plaats van sucrose of glucose, vergelijken van eiwit geproduceerd door mycelium en geïsoleerd uit planten. Het enzym werd opgezuiverd en geanalyseerd.

#### Vergelijken van verschillende koolstof-bronnen

In de plant heeft de schimmel geen kant en klare suikers tot zijn beschikking. Daarom zal de schimmel koolstof-verbindingen (C-verbindingen) af gaan breken om aan energie en C-bronnen te komen. Door de schimmel te kweken in medium met een nog af te breken C-verbinding wordt een meer natuurlijke situatie verkregen. De schimmel zal in dit medium enzymen gaan uitscheiden, waarmee de aangeboden C-bron afgebroken kan worden. Deze enzymen zijn misschien te vergelijken met de enzymen die de schimmel in de plant uitscheidt. Door het vergelijken van enzymen uitgescheiden in het medium, enzymen van het mycelium uit dit medium en met een extract van een door *Fusarium* aangetaste plant, werd geprobeerd uit te zoeken of het extra esterase-enzym geproduceerd werd door de schimmel. Bij dit experiment werden als C-bron chitine, pectine, geautoclaveerde plantenwortels en cellulose aangeboden (bijlage 7.1). Nadat het medium met voldoende mycelium was volgroeid, werd de oplossing gefiltreerd. Het mycelium werd 'gedroogd' met tissue en met vloeibare stikstof in een mortier fijn gemalen. Het medium werd volgens twee methoden geconcentreerd: (1) door indampen bij lage temperaturen in een rotorvapor en (2) door dialyseren tegen polyethyleenglycol (PEG). Bij deze laatste methode werd medium in een dialyseslang gegoten. Deze slang werd in de PEG gelegd, waarna PEG het water en de laagmoleculaire componenten opneemt. Hierbij kan eventueel het zeer kleine esterase enzym door de poriën van de slang verloren gaan. Een nadeel van het indampen is de temperatuur van 30-40 °C waarbij eventuele enzymactiviteit verloren kan gaan.

Voorafgaand aan deze proef waren enzymextracten gemaakt van mycelium van *Fusarium* verzameld van PDA-voedingsbodems en extracten van door *Fusarium* aangetaste planten. Deze extracten werden met elektroforese geanalyseerd.

#### Onderzoek molecuulgewicht en iso-elektrisch punt

Met preparatieve elektroforese werd het eiwit opgezuiverd. Het molecuulgewicht werd bepaald door SDS-PAGE. Voor het bepalen van het iso-elektrische punt (pI) werden twee IEF-gels vergeleken (zie § 7.10). Een gel was gekleurd met een zilverkleuring, de tweede was gekleurd op esterase-activiteit. Door het vergelijken van deze gels kon de pI-waarde geschat worden. Op alle gels waren markers opgebracht voor het bepalen van het molecuulgewicht of voor het bepalen van het iso-elektrische punt. Deze markers worden zichtbaar op een gel door een zilverkleuring.

### 3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De resultaten van het onderzoek zullen voor Cyclamen en anjer apart besproken worden in onderstaande paragrafen. Daarbij wordt dezelfde volgorde aangehouden als bij de bespreking van de diverse fasen in hoofdstuk 2.

#### 3.1 Het ontwikkelen van de techniek

##### Cyclamen

Voor Cyclamen bleek de meest geschikte extractiemethode voor het Proefstation, het fijnmalen van het weefsel in een mortier met behulp van een vijzel en vloeibare stikstof. Voor het ontwikkelen van een detectiemethode zijn de wortels het meest geschikt. In de knol konden geen duidelijke reproduceerbare verschillen aangetoond worden in iso-enzym patronen (Tabel 1). Er werd in knollen wel een verschil in intensiteit van het isozym patroon gedetecteerd, maar geen verschil in het aantal detecteerbare isozymen. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door het feit dat de infectie in de wortels begint, waar dan ook de eerste enzymrespons optreedt. De knol begint pas te reageren in een later stadium van de infectie, wanneer de plant al duidelijk is aangetast.

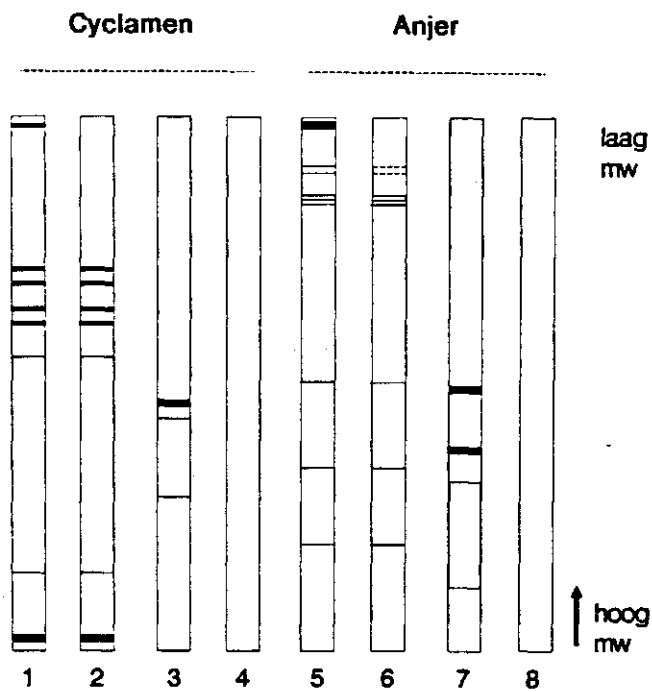
Voor de extractie van het eiwit werd de in tabel 7 beschreven extractiebuffer gebruikt. Uit de enzymkleuringen bleek dat uit extracten van de wortel de beste enzymactiviteit werd geïsoleerd. Uit alle getoetste enzymen werd voor  $\alpha$ -esterase gekozen om de toets mee te ontwikkelen. De geïsoleerde hoeveelheid enzym en enzymactiviteit waren redelijk constant en reproduceerbaar. De enzymen  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucosidase en GOT toonden wel enzymactiviteit op de gels, maar de hoeveelheden enzym en activiteit bleken niet reproduceerbaar of er was geen verschil tussen gezonde en aangetaste planten.

Tabel 1. Testen van verschillende enzymen op activiteit van het enzym en verschillen in isozym patronen van gezonde en zieke planten. De enzymactiviteit is bij anjers getoetst op de stengel en bij Cyclamen op de wortels (w) of de knol (k). + = goed, - = slecht,  $\pm$  = vaag isozym patroon en n.g. = niet getest.

Enzym	Anjer		Cyclamen		Verschil	
	Actief	Verschil	w	k	w	k
$\alpha$ -galactosidase	$\pm$	-	+	$\pm$	-	-
$\beta$ -galactosidase	-	-	-	$\pm$	-	-
$\beta$ -glucosidase	+	+	+	$\pm$	+	-
$\alpha$ -esterase	+	+	+	+	+	-
polygalacturonase	-	-	-	-	-	-
peroxidase	+	+	n.g.		n.g.	
G.O.T.	+	-	+	+	-	-
L.A.P.	$\pm$	-	-	-	-	-
pectinelyase	-	-	n.g.		n.g.	

Voor esterase werd elektroforese met High Density PAA gels uitgevoerd. De eiwithoeveelheid die geïsoleerd werd varieert van 0,5 mg/ml tot 1,5 mg/ml. Hierbij moet opgemerkt worden dat de hoeveelheid eiwit geen maat voor de enzymactiviteit is, hooguit een indicatie.

In een later stadium van het project bleek dat  $\beta$ -D glucosidase wellicht toch bruikbaar was voor het ontwikkelen van een detectiemethode. Dit omdat het waargenomen verschil in  $\beta$ -glucosidase-activiteit van anjerstekken overeen leek te komen met het waargenomen verschil in  $\beta$ -glucosidase-activiteit bij Cyclamen. Voor Cyclamen kon het verschil in glucosidase-activiteit van door *Fusarium* aangetaste en gezonde planten reproduceerbaar aangetoond worden, in tegenstelling tot anjer.  $\beta$ -D-Glucosidase is op toepasbaarheid getoetst tijdens proeven waarbij verschillende *Fusarium*-isolaten zijn toegepast (§ 3.4).



Figuur 1.

- \* a-esterase patroon: laan 1, 2, 5 en 6
- \* b-D-glucosidase patroon: laan 3, 4, 7 en 8
- \* geïnfecteerd met *Fusarium oxysporum*: laan 1, 3, 5 en 7
- \* gezonde planten: laan 2, 4, 6 en 8

### Anjer

Het eiwit uit de anjers werd geïsoleerd met behulp van vloeibare stikstof en een mortier met vijzel, waarbij eiwitconcentraties van 1,0 tot 2,0 mg/ml werden verkregen. De samenstelling van de gebruikte extractiebuffer wordt besproken in § 7.3.2. In tabel 1 worden de resultaten van de verschillende enzymkleuringen weergegeven. Bij elektroforese van extracten op 8-25% PAA gels werd een verschil gevonden tussen gezonde en door *Fusarium* aangetaste anjers voor het enzym  $\alpha$ -esterase. Tevens werd een verschil gevonden in de produktie van  $\beta$ -D-glucosidase. Een gezonde plant produceerde geen detecteerbare hoeveelheden  $\beta$ -D-glucosidase in tegenstelling tot een door *Fusarium* aangetaste plant. Omdat het leek dat het verschil in esterase-activiteit tussen zieke en gezonde planten reproduceerbaarder dan bij  $\beta$ -D-glucosidase was, werd de techniek verder ontwikkeld voor  $\alpha$ -esterase.

$\beta$ -D-Glucosidase is wel verder onderzocht voor toepassing bij Cyclamen. Het peroxidase-isozym patroon toont verschil tussen gezonde en zieke planten, maar de kleuring van dit enzym vervaagt erg snel. Daarom wordt dit enzym niet als bruikbaar beschouwd voor de ontwikkeling van de detectiemethode.

### 3.2 Testen van de ontwikkelde techniek

In deze fase zijn de cultivarinvloed, de reproduceerbaarheid, de infectiesnelheid en de detectiesnelheid getoetst. De hierbij verkregen resultaten worden in onderstaande paragrafen beschreven. Factoren als stress door droogte, temperatuurverschillen en transport zijn niet in afzonderlijke proeven onderzocht. Droogte en temperatuurverschillen hebben tijdens sommige proeven onopzettelijk meegespeeld, maar bleken in deze experimenten geen invloed te hebben op het isozym patroon. Droogte bemoeilijkt wel de isolatie van eiwitten, waardoor minder enzymactiviteit gedetecteerd wordt.

#### Cyclamen

Tijdens deze fase werden de selecties 'Vuurbaak' en 'Pastel gemengd' gebruikt. 'Pastel gemengd' is een mix van verschillende genotypes. De elektroforese patronen van deze genotypes vertoonden weinig variatie. Een gezonde plant produceerde geen extreem klein esterase-enzym zoals een door *Fusarium* aangetaste plant. In de grotere esterase-isozymen kwam wat variatie voor. Veel variatie in het isozym patroon beïnvloedt de betrouwbaarheid van de methode negatief. Als een plant geïnoculeerd werd door het hangen van de wortels in het inoculum (methode 1) kon twee à drie dagen na inoculeren, de verandering van het isozym patroon aangetoond worden. Tijdens het uitvoeren van de tijdreeksen werden goed reproduceerbare enzym patronen verkregen, waarbij het verschil tussen gezonde en zieke planten constant was. Het door *Fusarium* geïnduceerde enzym bleef detecteerbaar tot de plant afgestorven was. Uit het uitleggen van de knollen van de plantjes op PDA bleek, hoewel de schimmel met elektroforese aangetoond werd, het soms onmogelijk de schimmel uit de knol te isoleren. Voor het her-isoleren van de schimmel moet het infectieproces in de plant blijikbaar wat verder gevorderd zijn.

#### Anjer

Bij de verschillende cultivars waren nagenoeg geen verschillen aanwezig tussen het esterase isozym patroon van de verschillende cultivars. Opvallend was dat in planten met een gedeeltelijke resistentie, net zo snel als bij niet resistente planten, het extra esterase-enzym met een vergelijkbare intensiteit kon worden aangetoond. Deze resistente planten vertoonden wel veel later symptomen van *Fusarium*. De snelheid waarmee de infectie aangetoond kon worden in de plant is afhankelijk van de plaats van het gekozen te keuren gedeelte van de plant. Hoe hoger in de plant, hoe langer het duurt voordat het enzym aangetoond kan worden. Bij inoculatie van wortels door methode 2, kon na veertien dagen het extra isozym gedetecteerd worden in de stekbasis. Enkele dagen later was het mogelijk om het enzym te detecteren in de stengel (afhankelijk van de gekozen stengelhoogte). Door inoculeren in de potgrond werd het moment van infectie vertraagd ten opzichte van inoculeren door de wortelkluitjes in het inoculum te hangen.

Bij het uitvoeren van deze proeven werd de reproduceerbaarheid van elektroforese-resultaten duidelijk. Het door *Fusarium* geïnduceerde bandje was detecteerbaar tot de plant afstierf.

### 3.3 De specificiteit van het isozym patroon in vergelijking met andere pathogenen

#### Cyclamen

Uit deze proeven waarbij isozym patronen van esterase geproduceerd door *F.oxysporum* f.sp. *cyclaminis*, *Cylindrocarpon destructans*, *Thielaviopsis basicola*, *Erwinia chrysanthemi* en *E. carotovora* vergeleken zijn, bleek dat het enzym alleen voorkwam in planten die door *Fusarium* aangetast waren. Hoewel het niet in alle gevallen mogelijk was om de pathogenen te isoleren uit de knol, maar de plant wel symptomen van de aantasting had, werd toch geconcludeerd dat het extra esterase-enzym specifiek is voor door *Fusarium* aangetaste planten. Tevens kon alleen  $\beta$ -D-glucosidase-activiteit aangetoond worden in door *Fusarium* aangetaste planten.  $\alpha$ -D-Galactosidase en  $\beta$ -D-galactosidase waren bij alle pathogenen aantoonbaar, maar het isozym patroon vertoonde geen verschillen.

Tabel 2. Specificiteit van het door *Fusarium* geïnduceerde  $\alpha$ -esterase patroon vergeleken met andere pathogenen. + = extra esterase-isozym aanwezig in isozym patroon, - = extra esterase-isozym niet aanwezig.

pathogeen	extra esterase-isozym
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	-
<i>Thielaviopsis basicola</i>	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-
<i>Erwinia carotovora</i>	-
<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>cyclaminis</i>	+

Tabel 3. Specificiteit voor het door *Fusarium* geïnduceerde esterase-isozym patroon vergeleken met andere voor anjer bekende pathogenen en uitwendige symptomen veroorzaakt door deze pathogenen. + = het extra esterase bandje wordt aangetoond of duidelijke symptomen, - = het esterase bandje wordt niet aangetoond of de plant ziet er normaal uit.

pathogeen	extra esterase-isozym	symptomen plant
<i>Alternaria</i>	-	-
<i>Phialophora cinerescens</i>	-	+
<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	+	+

### Anjer

De eiwitisolaten afkomstig van door *Phialophora* aangetaste planten hadden geen detecteerbare  $\beta$ -D-glucosidase activiteit. Het esterase isozym patroon vertoonde niet het extra bandje, zoals dat wel ontstaat na infectie met *Fusarium* (Tabel 3.).

De planten geïnculeerd met *Alternaria* hadden na vier maanden geen symptomen van *Alternaria*, wel van veroudering (paarsverkleuring van het blad). Ook in dit esterase isozym patroon was het extra bandje niet detecteerbaar. Door het gebrek aan goede symptomen veroorzaakt door de schimmel is dit resultaat niet betrouwbaar. Mogelijk is dit veroorzaakt door een verkeerd *Alternaria*-isolaat. Het gebruikte isolaat veroorzaakte geen stengelrot en geen bladvlekken.

### 3.4 De specificiteit ten opzichte van verschillende *F.oxysporum*-isolaten

#### Cyclamen

Bij de eerste proef waren planten geïnculeerd met een pathogeen *Fusarium*-isolaat (F5) en met een niet-pathogeen isolaat (F2). Deze planten zijn gedurende een hele teeltperiode gevolgd, waarbij de met F5 geïnculeerde planten waren weggevallen door *Fusarium* en de met F2 geïnculeerde planten een normale teelt doorlopen hebben. Het door *Fusarium* geïnduceerde esterase-bandje kon niet aangetoond worden in met F2 geïnculeerde planten. Een nadeel bij deze langdurende proeven was, dat als na 35 weken een plant wegvalt, niet is na te gaan of dit veroorzaakt is door de inoculatie of door een nieuwe besmetting.

Bij de tweede proef waren Cyclamen geïnculeerd met een overmaat sporen ( $10^6$  sporen/ml) van *Fusarium* geïsoleerd uit roos, chrysant, Pelargonium, aster, Gerbera en Cyclamen. In veel planten werd vaag het extra enzym gedetecteerd (zie Tabel 4.). Dit kan veroorzaakt worden door de onnatuurlijke infectiedruk door de overmaat sporen.  $\beta$ -D-Glucosidase kon alleen aangetoond worden in met *F. oxysporum cyclaminis* geïnculeerde planten.

Tabel 4. Specificiteit van het  $\alpha$ -esterase-isozym patroon en  $\beta$ -D-glucosidase vergeleken met andere *Fusarium oxysporum*-isolaten. + = het extra esterase-isozym is duidelijk aantoonbaar, - = het isozym is niet aantoonbaar,  $\pm$  = het bandje verschijnt niet-reproduceerbaar en zwak.

isolaat	esterase	glucosidase-activiteit
<i>F.o. f.sp. cyclaminis</i>	+	+
<i>F.o. f.sp. uit Cyclamen</i> niet pathogeen	-	-
<i>F.o. f.sp. uit roos</i>	$\pm$	-
<i>F.o. f.sp. uit chrysant</i>	$\pm$	-
<i>F.o. f.sp. uit Pelargonium</i>	$\pm$	-
<i>F.o. f.sp. uit Gerbera</i>	$\pm$	-
<i>F.o. f.sp. uit Aster</i>	$\pm$	-



## Anjer

Bij anjer is een niet-pathogeen isolaat vergeleken met een pathogeen isolaat. Het isozym patroon van de niet-pathogene was hetzelfde als van de gezonde anjer en het extra isozymbandje van esterase kon niet gedetecteerd worden. Ook kon geen  $\beta$ -D-glucosidase aangetoond worden in planten geïnoculeerd met de niet-pathogene *Fusarium*. De verschillende inoculatiemethoden veroorzaakten geen verschillende resultaten. De isozym patronen van de met F5 geïnoculeerde planten vertoonden de normale verschillen ten opzichte van de isozym patronen van de gezonde planten.

### 3.5 De relatie tussen lage sporenconcentraties en snelheid van detectie

#### Cyclamen

Voor deze proef waren in vitro opgekweekte plantjes gebruikt met een relatief groot wortelstelsel. Deze waren geïnoculeerd door pipetteren in de potgrond. Door de grote wortelstelsels ontstonden problemen met het maken van de monsters. Bij het schoonmaken braken veel wortels af. Dit waren juist de zwakke wortels die nodig zijn voor de detectie. Hierdoor vond een ongewenste voorselectie plaats die de methode mogelijk negatief beïnvloedde. Het was niet mogelijk om van deze proef reproduceerbare resultaten te meten. Het extra esterase enzym kon alleen aangetoond worden in planten geïnoculeerd met het pathogene isolaat, die al symptomen van verwelking vertoonden. Bij planten geïnoculeerd met  $10^2$  en  $10^4$  sporen/ml traden symptomen van verwelking na enkele maanden op. Sommige planten stonden na drie maanden nog overeind. De detectie van het extra enzym bandje was een probleem bij deze planten. Bij herhaling van de proef werden dezelfde slechte resultaten verkregen, waarna de proef gestopt werd. In planten geïnoculeerd met het niet-pathogene isolaat of met het uit *Gerbera* geïsoleerde isolaat kon bij geen enkele sporenconcentratie het door *Fusarium* geïnduceerde bandje aangetoond worden. Uit deze proef kan niets geconcludeerd worden over de gevoeligheid van de methode met betrekking tot aantallen sporen die nodig zijn voor een detecteerbare infectie.

#### Anjer

Bij deze proef werd bij planten geïnoculeerd met  $10^3$  en  $10^4$  sporen/ml het extra esterase bandje aangetoond, maar een week later dan bij de controle met  $10^6$  sporen/ml. De intensiteit van het bandje was iets lager dan normaal. Het lijkt dat naarmate er meer sporen toegevoegd worden het infectieproces sneller verloopt.

### 3.6 Het aanpassen van de detectiemethode voor gebruik van de N.A.K.S.

#### Cyclamen

Naast het vergelijken van de extractiemethoden zijn tevens de elektroforesemethoden vergeleken. Van monsters gemaakt met drie verschillende extractiemethoden zijn de volgende resultaten verkregen. Voor het enzym esterase werden deze monsters op zowel HD-gels (met het PhastSystem) als BioRad-gels (Midget-systeem) gerund. Uit de HD gels kwam naar voren dat monsters bereid met vloeibare stikstof de meeste en beste esterase-activiteit vertonen. De activiteit

verkregen met de tecan-methode was iets lager, maar in de monsters gemaakt met de bladpers kon weinig tot geen esterase-activiteit gedetecteerd worden. De BioRad gels toonden voor esterase bij alle extractiemethoden zwakke, vage patronen. Hiermee was bij de methode met stikstof nog enige activiteit waarneembaar, maar bij de andere methodes weinig tot niets.  $\beta$ -D-glucosidase toonde een ander beeld. Op de 10 - 15% PAA gels van het PhastSystem kon pas na verversen van de kleuroplossing na 24 uur, na enkele uren enzymactiviteit aangetoond worden. De monsters gerund op het Midget-systeem met zelf gegoten gels toonden een zeer goede  $\beta$ -D-glucosidase activiteit. Hier bleek dat de monsters bereid met de bladpers veel glucosidase-activiteit bevatten. De monsters bereid met vloeibare stikstof bevatten minder activiteit. De glucosidase-activiteit van de tecan-methode ligt hier tussen in.

De eiwitconcentraties van de extracten van de drie extractieprocedures werden bepaald en waren laag. De eiwitconcentratie bij de extractiemethode met stikstof was tussen de 0,2 en 0,5 mg/ml. Normaal ligt dit tussen de 0,5 en 1,0 mg/ml. De concentraties eiwit geïsoleerd met de tecan-methode variëren van 0,1 tot 0,25 mg/ml. De eiwitconcentraties bij de bladpers-methode liggen tussen de 0 en de 0,15 mg/ml. Uit deze proef blijkt wel dat een eiwitconcentratie geen maat is voor enzymactiviteit. Hoewel de eiwitconcentratie bij de bladpersmethode bijna niet te meten was, kon toch goed  $\beta$ -glucosidase-activiteit op de zelfgegoten gels aangetoond worden.

Tabel 5. Vergelijken van extractiemethoden en elektroforese-apparaten waarbij op esterase en glucosidase enzymactiviteit getoetst is. + = goed isozym patroon,  $\pm$  = onduidelijk patroon, weinig enzym-activiteit, - = geen activiteit aantoonbaar.

extractie- methode	$\alpha$ -esterase		$\beta$ -D-glucosidase	
	PhastSyst	MidgetSys	PhastSys	MidgetSys
stikstof	+	$\pm$	$\pm$	+
tecan	$\pm$	-	$\pm$	+
bladpers	-	-	$\pm$	+

Tijdens het uitvoeren van de stikstofmethode werd waargenomen dat monsters in bevroren toestand zeer fijngemalen moeten worden. Indien dit niet gebeurt gaat dit ten koste van de eiwitopbrengst. Bij het herhalen van de proef werden dezelfde resultaten verkregen. Hierbij is gebleken dat geen glucosidase-activiteit gedetecteerd kon worden in BioRad gels. Dezelfde monsters vertoonden echter wel activiteit in zelf gegoten gels. Dit kan een gevolg zijn van een verdunningseffect van glucosidase in de BioRad gradiënt gels. In de zelf gegoten gels wordt alle glucosidase geconcentreerd op één plaats in de gel. Dit verdunningseffect kan tevens de mindere resultaten op het PhastSystem verklaren.

Door het toevoegen van dubbele concentraties remmers aan de extractiebuffer voor de bladpers-methode, leek het dat er meer enzymactiviteit geïsoleerd werd. Van esterase werd nu met de bladpers op HD gels een duidelijk enzympatroon verkregen. De esterase patronen op de BioRad gels waren daarentegen slecht. Op zowel de HD als de zelf gegoten gels was

glucosidase-activiteit detecteerbaar. Op de zelf gegoten gels was de intensiteit van de isozymen hoger. Hoewel ook de normale concentratie remmers in de extractiebuffer geen slechte resultaten opleverde, werd door het verdubbelen van de concentratie remmers de enzymactiviteit verbeterd. Voor het ontstaan van goede esterase-activiteit met de bladpersmethode kan geen verklaring gevonden worden.

Hiermee wordt aangetoond dat het gebruik van de bladpers niet uitgesloten is, maar nog wel verder onderzocht moet worden. Naar aanleiding van deze proeven lijkt het dat de esterase zich in de cellen van de plant bevindt, maar de glucosidase tussen de cellen of in de vaten. Dit omdat met de bladpers veel glucosidase-activiteit wordt geïsoleerd in een relatief lage concentratie eiwit. Bij de stikstofmethode worden meer cellen kapot gemaakt, waardoor meer eiwit uit de cellen wordt geïsoleerd. Een andere mogelijkheid is dat door het kapotbreken van de cellen remmers voor de glucosidase-activiteit vrijkomen.

### 3.7 Eigenschappen van het door *Fusarium* geïnduceerde esterase enzym

Met behulp van preparatieve elektroforese is het bandje opgezuiverd. Na IEF werd de pI op 4 geschat en het molecuulgewicht is ongeveer 4000 dalton. Het is onbekend of het esterase-enzym uit meerdere subunits met hetzelfde molecuulgewicht bestaat. Hierdoor zou het molecuulgewicht van het enzym toenemen. Een lager molecuulgewicht is onwaarschijnlijk voor een enzym.

#### Vergelijken van verschillende koolstof-bronnen

In de voedingsoplossing met pectine of plantenwortels groeide de schimmel goed. In de oplossingen met chitine en cellulose groeide de schimmel langzamer dan in de oplossing met de wortels. De oplossingen werden gefiltreerd en daarna geconcentreerd. Het mycelium en de geconcentreerde voedingsoplossing werden met elektroforese geanalyseerd.

De voor het enzym  $\alpha$ -esterase ontstane isozym-patroon kwam niet overeen met het patroon van een door *Fusarium* aangetaste plant. In deze monsters was niet het zeer kleine door *Fusarium* geïnduceerde esterase-enzym detecteerbaar. Indien het wel in de voedingsoplossing aanwezig was, is het mogelijk bij het concentreren verloren gegaan. Het  $\beta$ -D-glucosidase-patroon vertoonde banden die wat betreft hun plaats in de gel overeenkwamen met het glucosidase-patroon van een door *Fusarium* aangetaste plant.

De beperkende factor bij deze proef was het concentreren van de 0,5 l vloeibare media met daarin eventueel de laagmoleculaire enzymen, die door alle membranen heen gaan.

De isozym-patronen van mycelia van verschillende *Fusarium*-isolaten, gekweekt op PDA, verschilden erg in intensiteit van de patronen ondanks gelijke hoeveelheden gebruikt mycelium per PDA-plaat.

De niet-pathogene *F.oxysporum* f.sp. *cyclaminis* (F2) produceerde op PDA voldoende esterase om duidelijk op de gel te detecteren. F2 produceert een duidelijk waarneembaar zeer klein esterase-enzym dat met betrekking tot de plaats in de gel overeenkomt met het extra esterase-enzym aangetoond in door F5 aangetaste planten. In het patroon van planten geïnoculeerd met F2 was dit enzym soms detecteerbaar na inoculatie met een extreem hoge concentratie sporen. Het pathogene isolaat (F5) produceert weinig esterase, dat erg zwak op de gel is waar te nemen. Op PDA groeit de schimmel door de overmaat aan voedingsstoffen onder niet met de natuur vergelijkbare

omstandigheden. De schimmel zal dus andere enzymen produceren. Het enzympatroon van deze extracten kan dus eigenlijk niet goed vergeleken worden met een extract van door *Fusarium* aangetaste planten.

#### 4. CONCLUSIE EN SLOTWOORD

Het doel van het project was het ontwikkelen van een detectiemethode met behulp van eiwit-elektroforese. Hiermee moet een verschil aangetoond kunnen worden in het eiwitpatroon van gezonde en schimmel-zieke planten. In dit project zijn twee enzymen gevonden, waarvan het isozympatroon voor gezonde en door *Fusarium* aangetaste planten verschilt.

Bij Cyclamen is gebleken dat  $\alpha$ -esterase en  $\beta$ -D-glucosidase enzymen zijn die gebruikt kunnen worden voor een detectiemethode. Voor het toetsen van de Cyclamen kunnen het beste de wortels gebruikt worden. Uit de proeven blijkt dat planten geïnfecteerd met *Fusarium* een extra esterase-isozym hebben in hun esterase-patroon. Dit is een erg klein isozym. Gezonde planten produceren geen esterase-isozymen met een dergelijk klein molecuulgewicht. Bij Cyclamen aangetast door *Fusarium* is het mogelijk om een isozympatroon van  $\beta$ -D-glucosidase aan te tonen, terwijl bij gezonde planten geen  $\beta$ -D-glucosidase-activiteit gedetecteerd kan worden. De gevonden verschillen in isozym patronen zijn reproduceerbaar en specifiek voor *F.oxysporum* f.sp. *cyclaminis*. Omdat in het begin bewust gekozen is voor het enzym  $\alpha$ -esterase, is niet bij alle proeven getoetst op  $\beta$ -D-glucosidase-activiteit.

Voor anjer is met name  $\alpha$ -esterase geschikt gebleken voor het ontwikkelen van de detectiemethode. In dit esterase-patroon van door *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* aangetaste planten wordt eveneens een extra zeer klein esterase-isozym aangetoond. Op de gel met een isozympatroon van gezonde planten kan geen esterase aangetoond worden op de plaats van het extra esterase-isozym.  $\beta$ -D-Glucosidase activiteit bleek minder reproduceerbaar, waardoor glucosidase verder buiten beschouwing gelaten is en de methode verder getest is voor esterase. Het extra esterase-enzym is specifiek voor de pathogeen *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*. Tevens wordt de detectie van het bandje niet beïnvloed door resistentie van de plant voor *Fusarium*. Het extra enzym treedt ook op in resistente rassen, zij het op een later tijdstip.

Het extra esterase-enzym lijkt voor anjer en Cyclamen identiek. Voor dit esterase-isozym wordt het molecuulgewicht geschat op kleiner dan 4000 dalton en het iso-elektrische punt ligt ongeveer bij pH 4. Uit de proeven met verschillende koolstof-bronnen kan niet geconcludeerd worden of het enzym door de plant of door de schimmel geproduceerd wordt. De resultaten uit de vergelijking van de extractiemethode met vloeibare stikstof en de methode met bladpers, wekken de suggestie dat het esterase-enzym zich in de cellen van de plant bevindt en  $\beta$ -glucosidase tussen de cellen (in de intercellulaire holten) of in de vaten. Een bevestiging hiervoor kon tijdens het onderzoek niet verkregen worden.

Bij het vergelijken van de extractiemethoden en elektroforesemethoden blijkt dat de methode die gekozen wordt afhankelijk is van het enzym waarop getoetst moet worden. Voor esterase bij Cyclamen is de meest geschikte extractiemethode het zeer fijnmalen met vloeibare stikstof en is het PhastSystem de meest geschikte elektroforesemethode. Voor  $\beta$ -glucosidase kan de bladpers gebruikt worden en worden ook bij het Midgetsysteem goede resultaten behaald.

Het doel van dit project was om te onderzoeken of het eventueel mogelijk zou zijn om een detectietechniek te ontwikkelen waarbij elektroforese als basistechniek gebruikt wordt. Na deze twee jaar kan gesteld worden dat het mogelijk is om een detectiemethode op basis van enzymactiviteit en elektroforese te gebruiken. Wel moet in overweging worden genomen hoeveel planten per dag of per partij getoetst moeten worden.

Voor het isoleren van eiwit uit planten op praktijkschaal is de extractie met vloeibare stikstof eigenlijk te bewerkelijk. Een alternatief kunnen de bladpers of een 'Potter-Elvehjem' systeem zijn. Voor deze alternatieven moet de extractiemethode geoptimaliseerd worden door verder onderzoek. Voor het isoleren van  $\beta$ -glucosidase-activiteit lijkt de bladpers geschikt, maar voor het isoleren van esterase wordt met de bladpers niet voldoende activiteit geïsoleerd. Indien gekozen wordt om de bladpers te gebruiken, zal voor  $\alpha$ -esterase de ontwikkelde detectiemethode opnieuw geoptimaliseerd moeten worden. Voor het uitvoeren van de elektroforese heeft het PhastSystem de voorkeur door de reproduceerbare resultaten, de elektroforese-snelheid en de eenvoud van bediening. Met dit apparaat kunnen redelijke hoeveelheden monsters per dag verwerkt worden (per elektroforese-run zestien monsters en per dag ongeveer acht runs). De elektroforese-resultaten van het Midgetsysteem zijn door het gebruik van zelf gegoten gels minder reproduceerbaar. Bovendien duurt een run minimaal 15 minuten langer. Indien planten op  $\alpha$ -esterase getoetst worden, worden met het PhastSystem betere resultaten verkregen als met het Midgetsysteem. Voor  $\beta$ -D-glucosidase worden zowel met het PhastSystem als met het Midgetsysteem goede resultaten verkregen. Als er meer dan 200-300 planten per dag getoetst moeten worden, kan elektroforese een te bewerkelijke techniek worden. In dit geval zou een ELISA prettiger zijn.

De resultaten van dit project zouden eventueel gebruikt kunnen worden voor het ontwikkelen van deze ELISA, omdat de gedetecteerde enzymen specifiek lijken voor de interactie tussen *F.oxysporum* f.sp. en anjer en Cyclamen. Bij het ontwikkelen van de detectiemethode tijdens dit project is geen aandacht besteed aan fundamentele aspecten van plant - schimmel-interactie. Voor de betrouwbaarheid van de detectiemethode lijkt het noodzakelijk, een beter inzicht te krijgen in de fundamentele achtergronden van de enzymen die gedetecteerd worden. Belangrijke aspecten hierbij zijn de produktie van deze enzymen (worden deze enzymen door de schimmel of door de plant geproduceerd) en de structuur van bijvoorbeeld het esterase isozym (b.v. aminozuurvolgorde). De relatie ten opzichte van andere isozymen lijkt ook zeer belangrijk, mede in het licht van een recente publikatie over de produktie van het P14-eiwit in wortels van tomaat na infectie met *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou et al., 1991). Dit eiwit is eveneens betrokken bij de reactie van de plant op de infectie door de schimmel.

Als de resultaten van dit project in een groter verband worden geplaatst en worden vergeleken met de resultaten van andere onderzoeken om detectiemethoden te ontwikkelen, denk ik dat onze resultaten een waardevolle aanvulling kunnen zijn voor het onderzoek. Ik hoop dat met deze resultaten eventueel een studie gemaakt kan worden voor het ontwikkelen van een ELISA-toets voor het aantonen van schimmels in planten.

## 6. LITERATUUR

- Benhamou N., Grenier J. and Asselin A., 1991. Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38: 237-253.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Hepper C.M., Sen R. and Maskall C.S., 1986. Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme mobility during polyacrylamide gel electrophoresis. *New Phytologist* 102: 529-539.
- Hepper C.M., Sen R., Azion-Aguilar C. and Grace C., 1988a. Variation in certain isozymes amongst different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus clarum*, *Glomus monosporum* and *Glomus mosseae*. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 51- 59.
- Hepper C.M., Azion-Aguilar C., Rosendahl S. and Sen R., 1988b. Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). *New Phytologist* 110: 207-215.
- Murashige and Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologie Plantarum* 15:473-497.
- Tanksley S.D. and Orton T.J., 1983, Isozymes in plant genetics and breeding, part A.
- De Wit P.J.G.M., Buurlage M.B. and Hammond K.E., 1986. The occurrence of host-, pathogen- and interaction-specific proteins in the apoplast of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) infected tomato leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29: 159-172.

## 7. TECHNISCHE BIJLAGEN / MATERIAAL EN METHODEN

### 7.1 Het plantmateriaal

#### Cyclamen

Voor het uitvoeren van de proeven werden elf tot dertien weken oude Cyclamen (één keer verspeend) gebruikt. Deze werden bij vermeerderingsbedrijven besteld of zelf gekweekt.

De zelf gekweekte Cyclamen werden in vitro opgekweekt. Hiervoor werd het zaad 10 minuten in 1% actieve chloor met 0,05% Tween-20 uitwendig gesteriliseerd en uitgelegd in reageerbuizen met Murashige en Skoog basismedium (Murashige and Skoog, 1962). Bij dit medium werd een kwart van de normale concentratie zouten en spoorelementen van MS-medium toegepast. Deze buizen werden 3 weken bij 15 °C in het donker geplaatst en vervolgens bij 20 °C in het licht in een klimaatruimte. Na het ontstaan van een blad en een wortel werden de plantjes opgepot in gestoomde potgrond in bakken die met transparant folie en kaasdoek worden afgedekt. Na enkele weken werden de plantjes afgehard en in potjes (5 cm doorsnede) gezet.

Als de plantjes ongeveer 5-7 cm zijn, werden deze opgepot in gestoomde potgrond in potten met 10 cm doorsnede en op schotels geplaatst. Water werd op de schotels gegeven. Tijdens enkele proeven werden de planten aangegoten met insektenparasitaire aaltjes om de larven van de *sciaridae*-vlieg te bestrijden; tevens werden gele vangplaten opgehangen tussen het gewas. Als selecties en zaadmengsels werden voor de proeven gebruikt: 'Vuurbaak', Pastel gemengd, 'Mini Swiss' en 'Marie Mignon'. 'Mini Swiss' en 'Marie Mignon' zijn kleinere types Cyclamen.

#### Anjer

Voor deze proeven zijn bewortelde stekken gebruikt van de in tabel 6 genoemde cultivars. Met name de cultivars 'Lena' en 'White Sim' zijn gebruikt voor het ontwikkelen van de methode. Deze cultivars hebben geen resistentie tegen *Fusarium*.

De stekken werden opgepot in gestoomde potgrond en geplaatst op schotels. Het water werd op de potgrond gegeven. Tijdens de proeven zijn *sciaridae*-larven en vliegen bestreden met vangplaten, 0,5 gram/liter dimilin of met insektenparasitaire aaltjes. Bij het toetsen van de planten werden de larven aangetroffen in de stelen van de anjer. Deze larven bleken de enzymproductie van de plant te beïnvloeden.

### 7.2 Isolatie van pathogenen uit plantmateriaal

Voor het isoleren van plantpathogenen uit Cyclamen en anjers werden delen van de plant 2 min. gesteriliseerd in 2% formaline en vervolgens 2 min. in steriel water gespoeld. Het weefsel werd in stukjes verdeeld en uitgelegd op een voedingsbodem. Voor het isoleren van onbekende pathogenen en *F. oxysporum f.sp.* werden stukjes planteweefsel op Potato Dextrose Agar (PDA) of PDA met 50 mg/l chloramphenicol uitgelegd. Door het toevoegen van dit antibioticum wordt bacteriegroei geremd. Indien veel bacteriën in een monster aanwezig zijn groeien schimmels namelijk niet meer uit. PDA is een standaard-medium dat volgens het voorschrift op de verpakking bereid werd.



Tabel 6. Anjer cultivars met resistentieniveaus tegen *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* fysio 2

Cultivar	Resistentieniveau (%)
White Sim	0
Manon	0
Lena	0
Viva	0
Nora	20
Raggio di Sole	20
Nathalie	20
Parade	40
Pallas	50
Nelson	50
Miledy	50
Roma	70
Orange Triumph	70
Ivonne	70
Delta	70
Hellas	80
Roland	80
Taiga	90
White Candy	90

#### Voorschriften voor media gebruikt voor het kweken van pathogenen

PDA, CMA, Nutrient Agar en Czapek dox zijn klaargekochte media die op de volgende wijze klaargemaakt worden.

Czapek dox zonder koolstofbron:

2,0 g Natriumnitraat

0,5 g Kaliumchloride

0,5 g Magnesiumglycerofosfaat

0,01 g IJzersulfaat

0,35 g Kaliumsulfaat

Pectine, cellulose, chitine of plantenwortels worden als koolstofbron toegepast. Pectine wordt in dit medium opgelost voor het autoclaveren.

#### 7.3 Het inoculum en het inoculeren

Voor het uitvoeren van de proeven werden planten ziek gemaakt met schimmel- en sporensuspensies van verschillende schimmels en bacteriën (het inoculum).

#### *Fusarium oxysporum*-isolaten

Van een isolaat werd een reinkweek gemaakt. Het mycelium van deze kweek werd gebruikt om de schimmelkweek in vloeibaar Czapek dox medium (bereid volgens voorschrift op de verpakking) te starten. Een 0,5 liter Czapek dox medium beënt met 10 myceliumponsjes bevatte na 10 dagen voldoende sporen. De suspensie werd geschud en gefiltreerd door kaasdoek. Vervolgens werd de

sporenconcentratie bepaald en de suspensie eventueel verdund.

#### Phialophora cinerescens

Voor de proef is gebruik gemaakt van grond waarin de schimmel enige tijd geleden geënt is en waarvan de planten duidelijke symptomen hadden. Door het gebruik van deze grond is geprobeerd het hele proces van infectie van de plant en het verschijnen van symptomen te versnellen. De schimmel groeit traag. Voor het kweken van voldoende mycelium voor inoculum waren meerdere weken nodig. Voordat na inoculeren symptomen verschijnen, zijn 3 à 4 maanden verstreken. Dit is in verband met de tijdsduur van het project bezwaarlijk.

#### Alternaria dianthi

Deze schimmel sporuleert slecht. Daarom werd het inoculum als volgt bereid. Vier met mycelium volgroeide P.D.A.-voedingsbodems werden met 100 ml water fijn gemalen. Van deze suspensie werd 5 ml bij elke plant gespoten.

#### Thielaviopsis basicola

De schimmel groeit slecht in vloeibare cultures, zodat voor het bereiden van inoculum met mycelium volgroeide Corn Meal Agar (CMA) voedingsbodems werden fijn gemalen met water. Van deze suspensie wordt de concentratie infectieve deeltjes bepaald. De CMA-voedingsbodems werden gemaakt volgens voorschrift op de verpakking van de CMA.

#### Cylindrocarpon destructans

Het inoculum van deze schimmel werd op dezelfde wijze bereid als voor *T. basicola*.

#### Erwinia chrysanthemi en E. carotovora

Het inoculum werd gemaakt door de bacteriën met 0,15M P.B.S.-buffer (0,85 g NaCl in 100 ml MQ-water, pH 7,2 gesteld met Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) van de Nutriënt agar bodem te spoelen. Op de voedingsbodem werd 1 ml buffer gepipetteerd en met een gebogen glas-staaf verdeeld over de schaal. Vervolgens werd de buffer met hierin bacteriën weer verzameld. Dit werd enkele malen herhaald en de bacterieconcentratie werd bepaald.

#### Inoculeren van plantmateriaal

Het inoculeren van de planten werd volgens twee methoden uitgevoerd: De wortelplugjes van Cyclamenplantjes werden minstens 30 minuten in een bak met het inoculum gehangen, waardoor de kluitjes de suspensie opzuigen. Vervolgens werden de Cyclamen opgepot in steriele grond (methode 1). Bij de tweede methode werden de plantjes direct opgepot in steriele potgrond. Vervolgens werden enkele milliliters inoculum op de potgrond gegoten of enkele centimeters diep tussen de wortels gespoten aan weerszijden van de plant. Deze methode is voor anjers en Cyclamen toegepast. Anjers werden minimaal een week voor inoculeren opgepot, zodat de wortels kans kregen zich te herstellen. Een nadeel van deze methode is dat niet bekend is wanneer de schimmel de plant infecteert, omdat na

inoculeren de schimmel eerst de grond moet doorgroeien. Hierdoor kan het infectieproces langer duren dan bij plantjes waarvan de wortelkluitjes zelf inoculum opzuigen.

#### 7.4 De extractiebuffer

##### De extractiebuffer voor Cyclamen

Voor het isoleren van eiwitten uit Cyclamen werd een acetaat buffer met pH 5 gebruikt. De samenstelling wordt genoemd in tabel 7. Uit proeven is gebleken dat het toevoegen van stoffen zoals bv. proteaseremmers de eiwitopbrengst en enzymactiviteit bij het isoleren verbeteren.

Tabel 7. Samenstelling extractiebuffer voor Cyclamen

Chemicaliën	Concentraties	Functie
Natriumacetaat	0,05 M	bufferwerking
EDTA	1 mM	complexvormer metaalionen
Polyvinylpyrrolidone	1%	bindt fenolen
Triton X-100	0,5%	detergens, werkt op membranen
Diethyldithiocarbamaat	0,04 mM	voorkomt fenoloxidatie
NaHSO <sub>3</sub>	0,34 mM	protease remmer
β- mercaptoethanol	0,014%	breekt zwavelbruggen

##### De extractiebuffer voor anjer

Voor het isoleren van eiwitten uit anjers werd een acetaatbuffer met pH 5 gebruikt, waarvan de samenstelling vermeld wordt in tabel 8.

Tabel 8. Samenstelling van de extractiebuffer voor anjer

Chemicaliën	Concentratie	Functie
Natriumacetaat	0,05M	buffer
EDTA	1 mM	bindt metaalionen
Polyvinylpyrrolidone	1%	bindt fenolen
Triton X-100	0,5%	detergens, werkt op membranen
Diethyldithiocarbamaat	0,04 mM	voorkomt fenoloxidatie
NaHSO <sub>3</sub>	0,34 mM	protease remmer

#### 7.5 Extractiemethoden

##### Fijnmalen met behulp van vloeibare stikstof

Het plantmateriaal werd schoongemaakt en gewogen (1 à 2 g wortels maximaal werd gebruikt). Het plantenmateriaal werd met vloeibare stikstof in een mortier bevroren en in bevroren staat met een vijzel fijngemalen. Het

ontstane poeder werd in een centrifugebuisje gedaan, waaraan extractiebuffer werd toegevoegd. Na intensief mengen op een vortexschudder werden de monsters gedurende 30 minuten gecentrifugeerd bij 5 °C en 13500 g. Het supernatant werd gebruikt voor elektroforese en eiwitconcentratiebepalingen.

#### Fijnmalen met behulp van zand

Het plantmateriaal werd schoongemaakt, gewogen en in een mortier gedaan. Hier werd extractiebuffer en 0,5 g zand toegevoegd. Met een vijzel werd de inhoud van de mortier fijn gemaakt. Deze brei werd overgedaan in een centrifugebuisje en gedurende 30 min gecentrifugeerd bij 5 °C en 13500 g. Het supernatant werd gebruikt voor elektroforese en het bepalen van de eiwitconcentratie.

#### Fijnmalen met behulp van tecansysteem

Het principe van de tecan berust op kogels in een houder die bewegen door de houder heen en weer te schuiven. Door het rollen van de kogels over het plantmateriaal wordt het weefsel fijn gemaakt. Het plantmateriaal werd samen met de extractiebuffer in een zakje tot pulp verwerkt. Nadat het plantmateriaal fijn was, werden enkele druppels suspensie uit het zakje gedrukt en in een centrifugebuisje gedaan. Dit werd enkele minuten bij 5 °C en 13500 g gecentrifugeerd.

#### Fijnpersen met behulp van de bladpers

Bij deze methode werd plantenmateriaal door een pers gewerkt waarbij tijdens het persen de extractiebuffer werd toegevoegd. Het geproduceerde perssap werd in een centrifugebuisje opgevangen en 15 min. gecentrifugeerd bij 5 °C en 13500 g. Het supernatant werd gebruikt voor elektroforese en de bepaling van de eiwitconcentratie.

### **7.6 Methode voor het bepalen van de eiwitconcentratie**

Voor het bepalen van de eiwitconcentratie van een monster werd de Bio-Rad Protein Assay toegepast. De methode is gebaseerd op het principe van Bradford (Bradford, 1976). Met het eiwit Runder Serum Albumine werd een ijklijn gemaakt, waarmee de eiwitconcentraties van de monsters bepaald werden.

### **7.7 Elektroforese**

#### Het PhastSystem

De elektroforese is uitgevoerd op het PhastSystem. Het PhastSystem is een horizontaal systeem geschikt voor polyacrylamide gel elektroforese (PAGE) en voor iso-elektrische focussering (IEF). Door het gebruik van de speciale kant en klare PhastSystem gels en bufferstrips werden snelle en reproduceerbare resultaten verkregen. De samenstelling van de gels en de bufferstrips is vermeld in tabel 9 en 10. Het apparaat is programmeerbaar en computer-gestuurd, zodat elke elektroforese onder dezelfde voorwaarden plaatsvindt. Afhankelijk van de ingestelde elektroforesemethode duurt de eiwitscheiding 20 tot 45 min. De programma's

van de elektroforese staan vermeld in tabel 11.

Tabel 9. Samenstelling gels (volgens opgave Pharmacia)

gels	stacking gel		separating gel		buffer system	pH
	% T	% C	% T	% C		
gradient 10-15%	6	3	10-15	2	0,112M Acetaat 0,112M Tris	6,4
gradient 8-25%	6	3	8- 25	2	0,112M Acetaat 0,112M Tris	6,4
High Density	7,5	2	20 30% ethylene- glycol	2	0,112M Acetaat 0,112M Tris	6,4
Isoelektro- focussing pI 3-9	-	-	5	3	Pharmalyte- ampholyten	

Tabel 10. Samenstelling bufferstrips (volgens opgave Pharmacia)

Type	Chemicaliën	pH
SDS	2% agarose, 0,55% SDS 0,20M Tricine, 0,20M Tris	8,1
Natief	2% agarose, 0,25M Tris 0,88M L-Alanine	8,8

Tabel 11. Elektroforese programma's voor het PhastSystem

*Natieve PAGE voor gradiënt gels.*

SAMPLE APPL.	DOWN AT 1.2	0 Vh			
SAMPLE APPL.	UP AT 1.2	2 Vh			
SEP 1.1	400 V	10.0 mA	2.5 W	15°C	10 Vh
SEP 1.2	400 V	1.0 mA	2.5 W	15°C	2 Vh*
SEP 1.3	400 V	10.0 mA	2.5 W	15°C	180 Vh

\* Het aantal volturen is afhankelijk van de gekozen gradiënt gel.  
De 8-25% gradiënt gebruikt 130 Vh, 10-15% ongeveer 80-90 Vh.

*Natieve PAGE voor High Density gels.*

SAMPLE APPL.	DOWN AT 4.2	0 Vh			
SAMPLE APPL.	UP AT 4.3	0 Vh			
SEP 4.1	400 V	10.0 mA	2.5 W	15°C	10 Vh
SEP 4.2	400 V	1.0 mA	2.5 W	15°C	2 Vh
SEP 4.3	400 V	10.0 mA	2.5 W	15°C	300 Vh

---

Isoelektrische focussering van IEF gels pI 3-9

---

SAMPLE APPL. DOWN AT 2.2 0 Vh  
SAMPLE APPL. UP AT 2.3 0 Vh  
EXTRA ALARM SOUND AT 2.1 73 Vh  
SEP 2.1 2000 V 2.0 mA 3.5 W 15°C 75 Vh  
SEP 2.2 200 V 2.0 mA 3.5 W 15°C 15 Vh  
SEP 2.3 2000 V 5.0 mA 3.5 W 15°C 510 Vh

---

### 7.8 Methoden voor het kleuren van gels

#### Methoden voor het kleuren van eiwit

Voor het aantonen van het totale eiwitpatroon verkregen met elektroforese zijn twee verschillende methoden gebruikt. In de gelontwikkelunit van het PhastSystem kunnen gels automatisch gekleurd worden met Coomassie Brilliant Blue R-250 of met een zilverkleuring. Voor beide methodes wordt het voorschrift beschreven.

#### Voorschrift voor Coomassie Brilliant Blue kleuring

Oplösungen:

Fixeer: 20% trichloroacetic acid

Was/Ontkleuroplossing: 30% methanol en 10% azijnzuur in MQ water (3:1:6).

Kleuroplossing: 0.02 % PhastGel Blue R oplossing in 30% methanol en 10% azijnzuur in MQ water en 0,1% CuSO<sub>4</sub>.

(Stock oplossing: los 1 PhastGelBlue R tablet op in 80 ml MQ water en roer 5 tot 10 min. Voeg 120 ml methanol toe en roer 2 min, = 0,2 % oplossing)

Gebruikte oplossing: Mix 1 deel stockoplossing met 9 delen van een methanol:azijnzuur:MQ water (3:1:6) oplossing.

Bewaarplossing: 10% glycerol en 10% azijnzuur in MQ-water.

Tabel 12. Voorschrift voor kleuren van IEF gels

Stap	Oplossing	In-poort	Uit-poort	Tijd(min)	Temp.(C)
1	Fixeer	1	1	5	20
2	Was/Ontkl.	2	0	2	20
3	Kleuropl.	3	0	10	50
4	Was/Ontkl.	2	0	10	50

---

Tabel 13. Voorschrift voor kleuren van Natieve PAGE

Stap	Oplossing	In-poort	Uit-poort	Tijd(min)	Temp. (C)
1	Kleuopl.	3	0	7	50
2	Was/Ontkl.	2	0	1	50
3	Was/Ontkl.	2	0	10	50
4	Was/Ontkl.	2	0	15	50
5	Bewaaropl.	4	0	15	50

Voorschrift voor zilverkleuring

TCA = Trichloorazijnzuur

Eth = Ethanol

HAc = Azijnzuur

Glutaar = Glutaardialdehyde

Zilv.Nitr. = Zilvernitraat

Glyc = Glycerol

Ontwikkelaar = 0,015% formaldehyde in 2,5% natriumcarbonaatoplossing.

De zilvernitraat-oplossing wordt apart opgevangen.

Tabel 14. Voorschrift kleuren IEF-gels

Stap	Oplossing	In-poort	Uit-poort	Tijd(min)	Temp. (C)
1	20% TCA	1	0	5	20
2	50% Eth, 10% HAc	2	0	2	50
3	10% Eth, 5% HAc	3	0	2	50
4	10% Eth, 5% HAc	3	0	4	50
5	8,3% Glutaar	4	0	6	50
6	10% Eth, 5% HAc	3	0	3	50
7	10% Eth, 5% HAc	3	0	5	50
8	Milli-Q water	5	0	2	50
9	Milli-Q water	5	0	2	50
10	0,5% Zilv.nitr.	6	9	10	40
11	Milli-Q water	5	9	0,5	30
12	Milli-Q water	5	0	0,5	30
13	Ontwikkelaar	7	0	0,5	30
14	Ontwikkelaar	7	0	4	30
15	5% HAc	8	0	5	50

Tabel 15. Voorschrift Zilverkleuring Natieve PAGE

Stap	Oplossing	In-poort	Uit-poort	Tijd(min)	Temp.(C)
1	20% TCA	1	0	5	20
2	50% Eth, 10% HAc	2	0	2	50
3	10% Eth, 5% HAc	3	0	2	50
4	10% Eth, 5% HAc	3	0	4	50
5	8,3% Glutaar.	4	0	6	50
6	10% Eth, 5% HAc	3	0	3	50
7	10% Eth, 5% HAc	3	0	5	50
8	Milli-Q water	5	0	2	50
9	Milli-Q water	5	0	2	50
10	0,5% Zilv.nitr.	6	-	10	40
11	Milli-Q water	5	0	0,5	30
12	Milli-Q water	5	0	0,5	30
13	Ontwikkelaar	7	0	1	30
14	Ontwikkelaar	7	0	5	30
15	5% HAc	8	0	2	50
16	10% HAc, 10% Glyc	9	0	3	50

Tabel 16. Voorschrift zilverkleuring SDS-gels

Stap	Oplossing	In-poort	Uit-poort	Tijd(min)	Temp.(C)
1	8,3% Glutaar	4	9	0,5	50
2	Milli-Q water	5	0	3	30
3	0,5% Zilv.nitr.	6	1	20	40
4	Milli-Q water	5	0	0,5	30
5	Milli-Q water	5	0	0,5	30
6	Ontwikkelaar	7	0	1	20
7	Ontwikkelaar	7	0	7	20
8	10% HAc, 10% Glyc.	8	0	5	50

#### Methoden voor kleuren op aanwezigheid van enzymactiviteit

Voor het aantonen van specifieke eiwitten uit het hele patroon van eiwitten van het plantenextract kan gebruik worden gemaakt van een enzymkleuring. Het principe van een enzymkleuring is dat een eiwit zijn natuurlijke enzymactiviteit behouden heeft tijdens de isolatie en de elektroforese. Door toevoeging aan de gel van het voor de enzymreactie benodigde sustraat, dat gekoppeld is aan een kleurstof, vindt de enzymreactie plaats en ontstaat op de plaats in de gel waar het enzym zit een kleurprecipitaat. Voor het onderzoek zijn de volgende enzymen gebruikt: peroxidase, glutamaat oxaloacetaat transaminase (GOT), leucine amino peptidase (LAP),  $\alpha$ -esterase,  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucosidase, pectine lyase (PL) en endopolygalacturonase (PG) (zie paragraaf 7.8.4).



#### 7.8.4 Voorschriften voor enzymkleuringen

Voor de meeste enzymen geldt: maak en gebruik de oplossingen zo vers mogelijk. De Fast Blue-zouten verliezen hun werking onder invloed van licht. Als de gels gekleurd waren, werd de kleuroplossing afgegoten. De gel werd enkele malen met demiwater gespoeld en gefixeerd met een oplossing met 10% azijnzuur en 10% glycerol.

- $\alpha$ -Esterase: E.C. 3.1.1.2  
Los 10 mg Fast Blue RR salt op in 1 ml demi en vervolgens in 10 ml 0,15 mM fosfaatbuffer ( $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$ ) pH 6,9.  
Los 1 mg 1-Naphthylacetaat op in 0,2 ml 50% aceton, 50% water.  
Maak en meng de oplossingen vlak voor gebruik en giet over de gel.  
Incubeer bij 30 °C in donker.
- $\beta$ -D-glucosidase: E.C. 3.2.1.23  
Los 10 mg Fast Blue BB salt op in 10 ml 50mM fosfaatbuffer pH 6,5.  
Los 5 mg 6-Bromo-2-Naphthyl-2-D-Glucopyranoside op in 0,5 ml aceton.  
Meng de oplossingen en giet over de gel.  
Incubeer bij 30 °C in donker.
- $\alpha$ -D-Galactosidase: E.C. 3.2.1.22  
Los 10 mg Fast Blue RR salt op in 10 ml 0,1M acetaatbuffer pH 5,0.  
Los 3,3 mg 1-Naphthyl-2-D-galactopyranoside in 0,3 ml aceton.  
Meng de oplossingen en giet over de gel.  
Incubeer bij 30 °C in donker.
- $\beta$ -D-Galactosidase: E.C. 3.2.1.23  
Los 10 mg Fast Blue RR salt op in 10 ml 0,1M acetaatbuffer pH 5,0.  
Los 3 mg 1-Naphthyl-1-D-galactopyranoside op in 0,3 ml aceton.  
Meng de oplossingen en giet over de gel.  
Incubeer bij 30 °C in donker.
- Leucine Amino Peptidase: E.C.3.4.11.1  
Los 20 mg Fast Garnet GBC salt op in 10 ml 0,05M fosfaatbuffer pH6,0.  
Los 3 mg 1-Leucyl-2-naphthyl-amideHCL op in 0,1 ml ethanol 96%.  
Meng de oplossingen en giet over de gel.  
Incubeer bij 30 °C in donker.
- Pectin Lyase: E.C. 4.2.99.3  
Incubeer de gel 10 min in 0,02M TrisHCl-buffer pH 8,3.  
Incubeer de gel 10 min in 0,02M TrisHCl-buffer pH 8,3 met 0,9% Pectin grade 1 en 0,002M  $CaCl_2$ .  
Was de gel met kraanwater.  
Kleur de gel met 0,05% Ruthenium Red tot op de rode gel witte banden verschijnen (in donker bij 30 °C).  
Was de gel met demiwater.
- Peroxidase: E.C. 1.11.1.7  
Los 10 mg 3,3-dimethoxybenzidine op in 0,7 ml ethanol 96%.  
Meng deze oplossing met 9,3 ml 0,05M acetaatbuffer pH 4,7.  
Voeg 0,02 ml 30%  $H_2O_2$  toe.  
Giet de oplossing over de gel en incubeer bij 30 °C in het donker.  
Na het kleuren goed spoelen met demiwater en fixeren.

- Glutamaat oxaloacetaat transaminase: E.C. 2.6.1.1  
Los 10 mg 2-ketoglutaarzuur en 20 mg L-aspartaat op in 10 ml 0,1M Trisbuffer pH 7,5 (oplossing in doker roeren en tot gebruik bewaren). Voeg vlak voor gebruik 15 mg Fast Blue BB salt en 1 mg pyridoxal-5-Phosphate toe. Incubeer bij 30 °C in donker.
- Polygalacturonase: E.C. 3.2.1.15  
Incubeer de gel in 0,02M citraatbuffer pH 4,8 10 min.  
Incubeer de gel 15 min. bij 30 °C in 1,2% sodiumpolypectaat in 0,02M citraatbuffer pH 4,8. Was met kraanwater.  
Incubeer in 0,05% Ruthenium Red tot negatieve kleuring.  
Vervang kleuroplossing door MQ-water.

### 7.9 Eiwitzuivering

Voor het bepalen van eigenschappen van het specifieke esterase-enzym werd het eiwit opgezuiverd met preparatieve elektroforese.

#### Preperatieve elektroforese

Voor preparatieve elektroforese wordt een 1,5 mm dikke polyacrylamide gel gebruikt. Het monster wordt opgebracht over de hele gelbreedte en met elektroforese geanalyseerd. Na elektroforese wordt een reepje van de gel afgesneden en op esterase-activiteit gekleurd. Dit reepje is langs de gel gelegd. Op de hoogte van het te isoleren enzym wordt uit de niet gekleurde gel een bandje gesneden. Dit reepje wordt in een eppendorfcupje fijn gemaakt. Hieraan wordt 0,2 ml extractiebuffer toegevoegd, gemengd en vervolgens in de koelkast geplaatst. Op deze wijze werd 's nachts het eiwit uit de gel geëxtraheerd. Het monster werd ter controle op gel gebracht en gekleurd op esterase-activiteit.

### 7.10 Bepalen van molecuulgewicht en iso-elektrisch punt van een eiwit

#### Molecuulgewicht

Om het molecuulgewicht van een eiwit te bepalen werd het eiwit uit de natuurlijke conformatie gebracht door het toevoegen van natriumdodecylsulfaat (SDS) en  $\beta$ -mercaptoethanol. Hierdoor wordt het eiwit gelijkmatig negatief geladen en worden alle zwavelbruggen verbroken. Na koken is het eiwit uiteengevallen in subeenheden. Dit monster werd op een SDS-gel gescheiden en gekleurd met de zilverkleuringmethode. De scheiding op SDS-gels wordt alleen bepaald door de grootte van het eiwit. Door markers mee te laten lopen op de gel, kan het molecuulgewicht berekend worden.

#### Iso-elektrisch punt

Het gezuiverde eiwit wordt op een IEF-gel gebracht. Dit is in feite een pH-gradiënt. Bij het opbrengen heeft het eiwit de natuurlijke conformatie en daardoor een bepaalde elektrische lading. Onder invloed van het elektrische veld beweegt het eiwit zich door de IEF-gel. Ten gevolge van de pH-gradiënt in de gel, wordt de lading van het eiwit getitreerd tot zijn elektrische lading 0 is. Nu heeft het eiwit geen mobiliteit meer. Deze bepaalde pH-waarde waarbij de lading 0 is, wordt voor het eiwit het iso-elektrisch punt genoemd.