

Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente
Vestiging Aalsmeer
Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
Tel. 0297-352525

ISSN 0921-710X

ELEKTROFORETISCHE IDENTIFICATIE EN DETECTIE VAN PLANTPATHOGENE ORGANISMEN

Project 3102

Ing. C. van Rijn
Dr.ir. A. Kerssies
Aalsmeer, maart 1996

Rapport 29
Prijs f 15,00

Rapport 29 wordt u toegestuurd na storting van f 15,00 op gironummer 174855 ten name van PBG Aalsmeer onder vermelding van 'Rapport 29: Elektroforetische identificatie en detectie van plantpathogene organismen'.

© 1996 Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een automatisch gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder schriftelijke toestemming van de uitgever.

No part of this book may be reproduced and/or published in any form, photoprint, microfilm or by any other means without written permission from the publisher.

Het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente stelt zich niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij het gebruik van de gegevens in deze uitgave.

INHOUDSOPGAVE

1.	INLEIDING	4
2.	ONDERZOEKSTRATEGIE	5
3.	FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. CYCLAMINIS IN CYCLAMEN	7
3.1	Inleiding	7
3.2	Aanpassingen van bestaande elektroforetische toets	7
3.3	Praktijkmonsters	8
3.4	Zuivering specifiek α -esterase iso-enzym	10
3.4.1	Preparatieve elektroforese	10
3.4.2	Ion exchange chromatography	11
3.4.3	Hydrophobic interaction chromatography	12
3.4.4	De zuivering	12
3.5	Identificatie van <i>Fusarium oxysporum</i>	13
4.	FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. GLADIOLI IN GLADIOOL	15
4.1	Inleiding	15
4.2	De α -esterase iso-enzym analyse	15
4.3	Screenen van enzymkleuringen	15
4.4	De specificiteit van de enzymkleuringen	17
4.5	Besmetting van kleinbloemige gladiolen	18
5.	PHYTOPHTHORA EN GNOMONIA IN ROOS	20
5.1	Inleiding	20
5.2	Screenen van enzymkleuringen	20
5.3	Specificiteit enzymkleuringen	21
6.	PHYTOPHTHORA EN CYLINDROCLADIUM IN SPATHIPHYLLUM	24
6.1	Inleiding	24
6.2	Screenen van de enzymkleuringen	24
6.3	Homogenisatiebuffer	25
6.4	Specificiteit	26
7.	DISCUSSIE EN CONCLUSIES	30
7.1	Algemene discussie en conclusies	30
7.2	<i>Fusarium oxysporum</i> in Cyclamen	31
7.3	Identificatie van <i>Fusarium oxysporum</i> f.so. <i>Cyclaminis</i>	31
7.4	<i>Fusarium oxysporum</i> in gladiool	32
7.5	<i>Phytophthora</i> sp. in roos	32
7.6	<i>Gnomonia radicicola</i> in roos	32
7.7	<i>Phytophthora</i> sp. in Spathiphyllum	32
7.8	<i>Cylindrocladium spathiphylli</i> in Spathiphyllum	33
	PUBLIKATIE	35
	LITERATUURLIJST	35

1. INLEIDING

In de sierteelt zijn de laatste jaren vaker grote problemen ontstaan met bodemschimmelziekten bij snijbloemen geteeld op kunstmatige substraatsystemen, bij potplanten geteeld op eb/vloedsystemen en bij bolgewassen door het verbieden van bepaalde pesticiden. Voor het oplossen en voorkomen van deze problemen zijn snelle en betrouwbare detectietechnieken voor ziekteverwekkers in het uitgangsmateriaal absoluut noodzakelijk.

In het project 'Ontwikkeling van een elektroforetische detectietechniek voor *Fusarium* in bloemisterijgewassen' is aangetoond dat met behulp van eiwit-elektroforese detectie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* in wortels van Cyclamen mogelijk is. Identieke resultaten werden gevonden bij de ontwikkeling van een soortgelijke toets voor *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in anjer (Everink, 1991; Kerssies *et al.*, 1992; Kerssies *et al.*, 1994).

Op grond van deze resultaten is op 1 januari 1993 op het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente (PBG) een driejarig project gestart met als doel te inventariseren of de ontwikkelde elektroforetische detectietechniek voor *Fusarium oxysporum* in Cyclamen en anjer ook voor andere schimmel/plantcombinaties perspectieven voor gevoelige en specifieke detectie biedt. Tijdens het project zijn de volgende combinaties bestudeerd: *Fusarium oxysporum* in Cyclamen en gladiool, *Gnomonia radiculicola* en *Phytophthora* sp. in roos, *Cylindrocladium spathiphylli* en *Phytophthora* sp. in Spathiphyllum.

Het op het PBG uitgevoerde project 'Elektroforetische identificatie en detectie van plantpathogene organismen' is een onderdeel van een gezamenlijk onderzoekproject, gefinancierd uit algemene middelen door het Produktschap voor Siergewassen (PVS) en het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. Op het Laboratorium voor Bloembollen Onderzoek (LBO) in Lisse worden DNA-technieken ontwikkeld voor detectie van *Fusarium* en andere schimmels. Daarnaast vindt op het Instituut voor Plantenziekten Onderzoek (IPO-DLO) in Wageningen onderzoek plaats naar de verspreiding van fyso's van *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in de teelt- en afzetgebieden van Nederlandse anjerbedrijven en de beste identificatietechniek voor *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

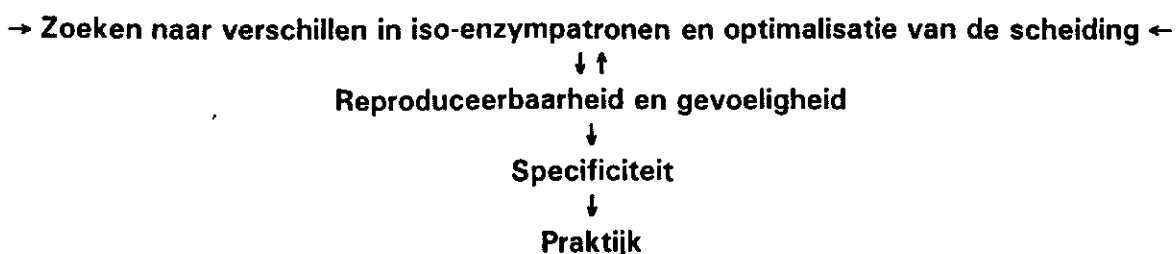
2. ONDERZOEKSTRATEGIE

Bodemschimmels kunnen hun waard passief binnendringen via wortelbeschadigingen. Daarnaast kunnen zij enzymen, zoals bijvoorbeeld pectic hydrolases en lyases, produceren die in staat zijn de structuur van de plantecelwand te veranderen of zelfs af te breken, waardoor penetratie en kolonisatie mogelijk is (Bateman, 1976).

Planten, op hun beurt, hebben allerlei mogelijkheden om binnendringende schimmels tegen te houden. In veel gevallen werpt de plant een fysieke barrière voor de schimmel op om de schade zoveel mogelijk te beperken. In andere gevallen wordt het weefsel afgegrensd van de gezonde delen van de plant, zoals door de vorming van een kurk laagje op het grensvlak. De plant kan de schimmel ook gericht aanvallen met behulp van enzymen die de schimmelcelwand aantasten (glucanases, chitinases). Kenmerkend voor pathogene schimmels is het vermogen om het afweermechanisme van de plant te kunnen omzeilen (Baayen and Silfhout, 1992).

Enzymen kunnen dus een belangrijke rol spelen tijdens infectie en kolonisatie van een pathogene schimmel in hun waardplant. De vorming van deze interactie enzymen liggen aan de basis voor de ontwikkeling van een elektroforetische detectietechniek. Het maakt voor de toepasbaarheid van de toets niet uit of het enzym wordt aangemaakt door de schimmel of de plant. Wel moet het enzym reeds in een vroeg stadium van de infectie detecteerbaar zijn en moet het specifiek zijn voor een bepaalde schimmel/gewascombinatie.

In de eerste fase van de elektroforetische toetsontwikkeling werden een groot aantal enzympatronen van visueel aangetast plantmateriaal vergeleken met die van gezond materiaal (Figuur 1). In eerste instantie worden de enzymen die mogelijk direct betrokken zijn bij de afbraak van de celwanden gescreend op een PhastGel gradient 8-25. Om de resolutie van bepaalde iso-enzymen te vergroten kan de scheiding worden geoptimaliseerd door gebruik te maken van homogene gels.



Figuur 1 - Schematische voorstelling van de diverse fasen in de ontwikkeling van een elektroforetische detectiemethode

Na optimalisering van de scheiding wordt de reproduceerbaarheid van het iso-enzym patroon en de gevoeligheid van de toets bekeken. De toets is namelijk alleen bruikbaar wanneer het enzymatische verschil tussen geïnfecteerd en gezond materiaal reeds zichtbaar is bij niet visueel aangetast materiaal. Is dit niet het geval dan moet er naar een ander enzym gezocht worden, waarbij dit wel mogelijk is.

In de derde fase van de toetsontwikkeling wordt de specificiteit van het enzym patroon getest. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van verschillende soorten schimmels die allemaal dezelfde waardplant kunnen infecteren. Om foute conclusies te vermijden moet het enzym patroon specifiek zijn voor één schimmel/gewascombinatie. Als het patroon niet specifiek is moet, op basis van een uit te voeren literatuurstudie, de eerste fase van

het onderzoek worden uitgebreid met andere enzymen om alsnog tot een specifieke detectiemethode te komen.

In de laatste fase van het onderzoek wordt in samenwerking met de Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor Bloemisterij- en Boomkwekerijgewassen (NAKB) de elektroforetische toets getest met praktijkmonsters. Afhankelijk van de resultaten moet de bruikbaarheid van de ontwikkelde elektroforetische detectietoets worden geoptimaliseerd.

3. FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. CYCLAMINIS IN CYCLAMEN

3.1 INLEIDING

Fusarium oxysporum f.sp. *cyclaminis* veroorzaakt verwelkingsziekte bij Cyclamen. De schimmel dringt de plant binnen via de wortels en groeit door de vaatbundels omhoog. Dit leidt in eerste instantie tot bladvergeling, gevolgd door bladval. Uiteindelijk zal Cyclamen als gevolg van de infectie bezwijken en wordt het dode plantmateriaal als voedselbron gebruikt door de schimmel.

3.2 AANPASSINGEN VAN BESTAANDE ELEKTROFORETISCHE TOETS

Voor de elektroforetische detectie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* in Cyclamen werden Cyclamenworteltjes fijngemalen in een mortier met een vijzel, nadat deze behandeld waren met vloeibaar stikstof. Het poeder werd opgenomen in een 50 mM natriumacetaat-buffer (pH 5,0). Na intensief mengen op een vortexschudder werd de suspensie 30 minuten gecentrifugeerd bij 13500 g (5°C). De in het supernatant aanwezige eiwitten werden van elkaar gescheiden met behulp van natieve-PAGE op PhastGel high density. Na elektroforese werd de gel gekleurd met de α -esterase enzymkleuring. Met *Fusarium oxysporum* geïnfecteerde Cyclamen hebben op deze gel bij een R_f -waarde van 0,97 een extra α -esterase bandje (Everink, 1991).

Bij het in gebruik nemen van de toets door de NAKB bleek dat het α -esterase enzympatroon in de zomermaanden niet te reproduceren was. Aangezien Cyclamen van oorsprong een winterbloeiër is, transporteert deze in de zomer de eiwitten naar de knol om te overleven (Maatsch, 1955). Dit kan mogelijk de oorzaak zijn dat in de zomermaanden het enzympatroon niet te reproduceren is, gebruik makend van wortelmateriaal. Tevens is gebleken dat de ontwikkelde homogenisatiemethode niet bruikbaar was op praktijkschaal (te bewerkelijk).

Om de toets toepasbaar te maken voor de NAKB (praktijkklaar), moest ten eerste de homogenisatiemethode van het plantmateriaal aangepast worden. Cyclamenwortels werden hiervoor fijngemalen met behulp van een ULTRA TURRAX T25. Het α -esterase patroon op PhastGel high density na natieve-PAGE werd vergeleken met resultaten behaald na het fijnmalen met mortier en vijzel.

Homogenisatie met een ULTRA TURRAX T25 is qua opbrengst van het α -esterase isoenzym vergelijkbaar met fijnmalen met mortier en vijzel. Het gebruik van 20 mM Tris-HCl, pH 7, resulteerde in een aanzienlijk grotere opbrengst van de α -esterase isoenzymen.

Om een toets te ontwikkelen die zowel in de zomer- als wintermaanden te gebruiken is, werd de invloed van het te toetsen materiaal op het α -esterase patroon bekeken met *Fusarium oxysporum* besmette Cyclamen. De Cyclamen werden opgedeeld in drie stukken:

- onderste gedeelte wortels
- middenstuk (bovenste gedeelte wortels en onderste helft knol)
- bovenste helft knol.

Alle drie delen werden op identieke wijze gehomogeniseerd met een ULTRA TURRAX T25, waarbij 20 mM Tris-HCl (pH 7) met 15 mM β -mercaptoëthanol, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 5% (w/v) Polyvinylpolypyrrolidone en 0,5% (w/v) Triton X-100 als homogenisatiebuffer werd gebruikt. Uit de resultaten bleek dat met name in het middenstuk het voor *Fusarium oxysporum* in Cyclamen specifieke α -esterase iso-enzym het duidelijkste zichtbaar is (Foto 1). Aangezien infectie plaats vindt via de wortels, is detectie van de schimmel in het middenstuk pas in een iets later stadium mogelijk, omdat de schimmel hiervoor eerst omhoog moet groeien naar de knol. Vandaar dat voor detectiedoeleinden het beste zowel de wortels als de onderste helft van de knol, deze bevat ook in de zomermaanden voldoende eiwit, gebruikt kunnen worden.

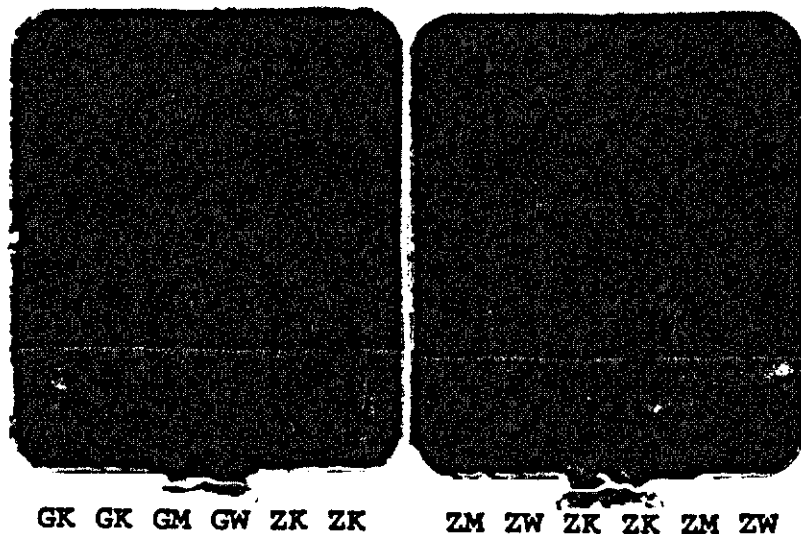


Foto 1 - Detectie van *Fusarium oxysporum* f.sp *cyclaminis* in Cyclamen met de α -esterase enzymkleuring in diverse onderdelen van de plant, te weten knol (K), wortels (W) en middenstuk (M). De met *Fusarium oxysporum* besmette Cyclamen (Z) zijn vergeleken met een gezonde Cyclamen (G). In het middenstuk (M) van geïnfecteerde Cyclamen is het specifieke α -esterase bandje het duidelijkste detecteerbaar.

3.3 PRAKTIJKMONSTERS

Na het aanpassen van de homogenisatie moest de elektroforetische toets getest worden onder praktijkomstandigheden. In samenwerking met de NAKB zijn een aantal experimenten uitgevoerd. Op de NAKB werden de Cyclamen via de bio-toets geanalyseerd. De knol werd ontdaan van de worteltjes en de bladeren en vervolgens uitwendig ontsmet. Het knolletje werd fijngeperst in een vloeibaar medium. Na een aantal dagen werd een klein gedeelte van de vloeistof overgeënt op PDA. In het geval er op het PDA *Fusarium oxysporum* aanwezig was, werd een reïncultuur van dit isolaat gemaakt. Van de reïncultuur werd een inoculum bereid en gebruikt om de pathogeniteit van het isolaat

vast te stellen door Cyclamen kunstmatig te besmetten. De hele procedure duurt circa 6 tot 8 weken.

De op de NAKB verwijderde worteltjes, samen met een klein stukje van de knol, werden op het PBG onderworpen aan de elektroforetische toets. Deze methode nam één à twee dagen in beslag. Het resultaat van beide methoden werd vergeleken.

Voor het eerste experiment werden bij zeven verschillende bedrijven 125 Cyclamen (totaal 875 Cyclamen) weggehaald. Vervolgens werden vijf Cyclamen 'gepooled' tot één monster (totaal 175 monsters). Ook werd er één positieve controle (kunstmatig besmette Cyclamen; monster 176) meegenomen. Na elektroforetische detectie bleken de monsters 1, 175 en 176 besmet te zijn met *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* (Tabel 1). Op de NAKB werden slechts twee monsters met pathogeen *Fusarium oxysporum* gevonden; monsters 1 en 176. Een mogelijke verklaring voor het feit dat de NAKB in monster 175 geen *Fusarium oxysporum* heeft gevonden kan zijn dat de infectie zich in een heel vroeg stadium bevond, waardoor de schimmel alleen nog in de wortels aanwezig was en nog niet in de knol.

Tabel 1 - Overzicht van de resultaten van de experimenten waarin detectie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* in praktijkmonsters heeft plaats gevonden met behulp van de bio-toets (NAKB) en de elektroforetische toets (PBG)

Exp.	Totaal aantal Cyclamen	Totaal aantal monsters	Monsters besmet met pathogeen <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cyclaminis</i>	
			Bio-toets	Elektroforese
1	876	176	1 en 176	1, 175 en 176
2	126	78	9 en 41	9
3	20	20	1, 2, 3, 5 t/m 13, 16, 18 en 20	2, 3, 6 t/m 13, 16, 18 en 20

Voor het tweede experiment werden Cyclamen bemonsterd op een bedrijf met een hoog percentage uitval, wat vermoedelijk veroorzaakt werd door *Fusarium oxysporum*. In totaal zijn 126 Cyclamen getoetst. Van 60 Cyclamen werden vijf Cyclamen 'gepooled' tot één monster. De overige 66 Cyclamen werden apart getoetst, omdat de knol van deze plantjes al redelijk groot was (totaal 78 monsters). Met de bio-toets werd in twee monsters (9 en 41) pathogeen *Fusarium oxysporum* gevonden. Met de elektroforetische toets kon slechts in monster 9 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* gedetecteerd worden. Mogelijke oorzaken voor het feit dat er in monster 41 geen *Fusarium oxysporum* gedetecteerd is, zijn:

- *Fusarium oxysporum* is latent aanwezig, waardoor er geen interactie eiwitten geproduceerd worden en elektroforetische detectie niet mogelijk is. Om latente infecties ook met behulp van de elektroforetische toets aan te kunnen tonen moet een extra incubatiestap uitgevoerd worden bij voor de schimmel optimale omstandigheden.
- *Fusarium oxysporum* is via een wond in de knol de Cyclamen binnengedrongen en daardoor afwezig in de wortels, waardoor elektroforetische detectie nu niet mogelijk was. Om infecties die via de knol plaatsvinden ook te kunnen detecteren moet naast de wortels ook de hele knol getoetst worden. Dit is echter alleen mogelijk als de plantjes die getoetst worden niet al te groot zijn.

Het laatste experiment werd uitgevoerd met Cyclamen afkomstig uit een tray met visueel aangetast materiaal. In totaal zijn 20 Cyclamen getoetst. De bio-toets wees uit

dat 75% van het getoetste materiaal besmet was met pathogeen *Fusarium oxysporum* (monster 1, 2, 3, 5 t/m 13, 16, 18 en 20). Ook met de elektroforetische toets werd een hoog besmettingspercentage gescoord (monster 2, 3, 6 t/m 13, 16, 18 en 20). In monster 1 en 5 werd met de elektroforetische toets geen *Fusarium oxysporum* aangetoond. Bij deze monsters waren visueel ook nog geen symptomen zichtbaar (geen bladvergeling en geen vaatverkleuring in de knol), waardoor het aannemelijk is dat de schimmel latent aanwezig was. Een extra incubatiestap kan voor dit probleem de oplossing bieden.

Op basis van deze drie experimenten kan geconcludeerd worden dat met behulp van de elektroforetische toets ook onder praktijkomstandigheden pathogeen *Fusarium oxysporum* snel en betrouwbaar aangetoond kan worden in Cyclamen. Om latente infecties ook te kunnen detecteren is het noodzakelijk een extra incubatiestap uit te voeren voordat de Cyclamen fijngemalen worden.

3.4 ZUIVERING SPECIFIEK α -ESTERASE ISO-ENZYM

Het grote voordeel van de elektroforetische toets ten opzichte van de bio-toets (6 tot 8 weken) is de snelheid waarmee kan worden vastgesteld of Cyclamen besmet zijn met *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis*. Als nadeel van de elektroforetische toets kan worden aangegeven dat de toets nogal arbeidsintensief en moeilijk te automatiseren is. Om detectie van *Fusarium oxysporum* in Cyclamen te automatiseren kan gedacht worden aan een ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Bij deze methode wordt een eiwit specifiek gebonden door een antilichaam en vindt detectie plaats met een tweede antilichaam die gelabeld is met een enzym dat in staat is een kleurloos substraat om te zetten in een bepaalde kleur. De intensiteit van de kleur kan spectrofotometrisch bepaald worden en is een maat voor de infectiegraad.

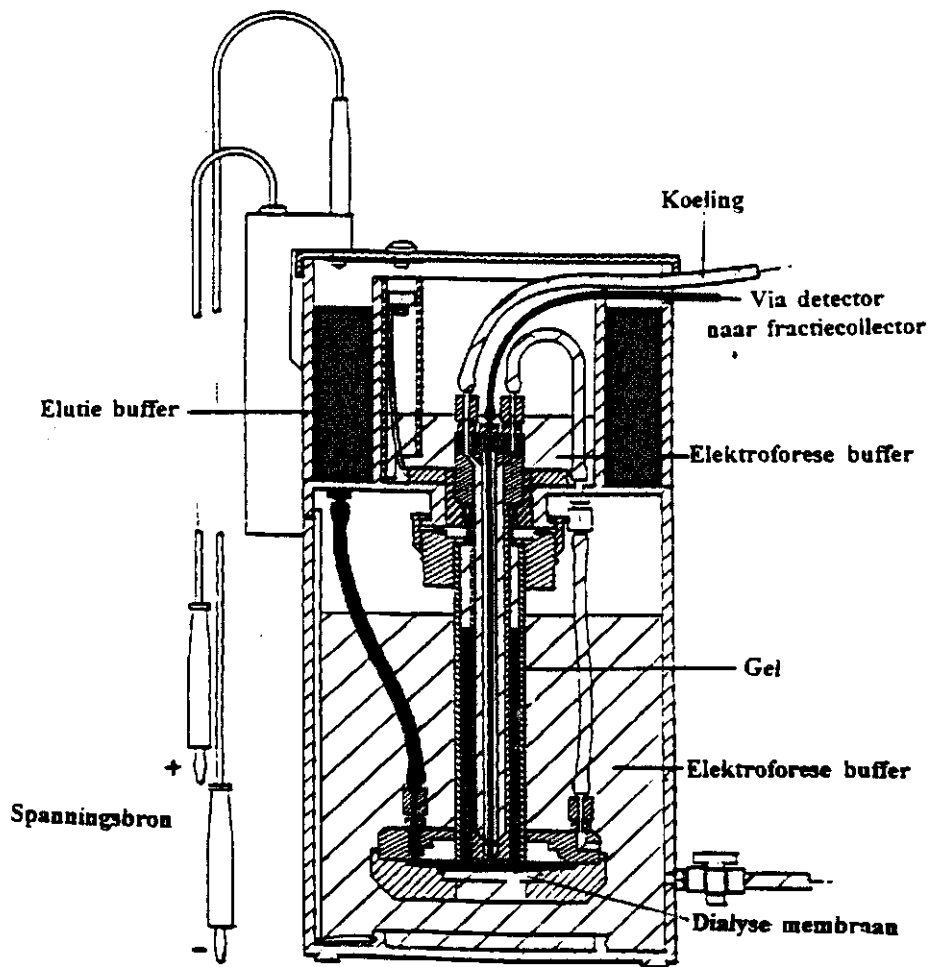
Bij een ELISA vindt detectie dus plaats met behulp van specifieke antilichamen. Om deze antilichamen te kunnen produceren moet het voor *Fusarium oxysporum* in Cyclamen specifieke α -esterase iso-enzym gezuiverd worden. Naast de productie van antilichamen kan het gezuiverde enzym ook gebruikt worden om de aminozuursequentie van het eiwit te bepalen. Aan de hand van de aminozuurvolgorde kan de bijbehorende DNA-sequentie afgeleid worden en kan een specifieke probe ontwikkeld worden. Met behulp van deze probe kunnen mogelijk ook latente infecties van *Fusarium oxysporum* in Cyclamen aangetoond worden zonder een extra incubatiestap.

3.4.1 Preparatieve elektroforese

Van het voor *Fusarium oxysporum* in Cyclamen specifieke α -esterase iso-enzym zijn maar weinig eigenschappen bekend:

- Zuivering van het enzym is mogelijk in aanwezigheid van Triton X-100 (hydrofoob eiwit).
- Eiwit heeft een R_f -waarde van 0,97 bij natieve-PAGE op PhastGel high density. Aangezien de plaats van het iso-enzym bij natieve-PAGE bekend is, werd besloten voor de zuivering gebruik te maken van preparatieve elektroforese (Prep Cell, model 491).

Bij de Prep Cell (Figuur 2) vindt verticale elektroforese plaats in een pijpgel. Aan de onderkant (anode) van de polyacrylamide gel, die zich geheel in elektroforesebuffer bevindt, stroomt een elutiebuffer die de eiwitten die uit de gel stromen transporteert naar een fractiecollector. De fracties worden geanalyseerd op aanwezigheid van het α -esterase iso-enzym via natieve-PAGE op PhastGel high density.



Figuur 2. Schematisch voorstelling van de Prep Cell, model 491

Het monstervolume dat op de Prep Cell geladen kan worden is beperkt. Het Cyclamenextract moet daarom geconcentreerd worden met behulp van ammoniumsulfaat precipitatie. Experimenteel is aangetoond dat het te zuiveren iso-enzym precipiteert tussen de 30 en 60% ammoniumsulfaat-verzadiging. Het pellet dat ontstaat na precipitatie wordt opgenomen in 25 mM Tris-HCl (pH 7) en ontzout via dialyse. Na het laden van het gedialyseerde monster op de polyacrylamide gel wordt de elektroforese gestart. Het te zuiveren iso-enzym elueert vlak na het broomfenolblauw (frontmarker) van de gel, maar de opbrengst is zeer laag (Koster, 1994).

Om meer enzym te kunnen zuiveren is het noodzakelijk de hoeveelheid uitgangsmateriaal te vergroten. Aangezien het bij vloeistof chromatografie mogelijk is meer monster-volume te verwerken dan bij preparatieve elektroforese werd in de volgende experimenten van deze techniek gebruik gemaakt. Een tweede voordeel van vloeistof-chromatografie is dat er niet alleen scheiding op basis van lading, zoals bij preparatieve elektroforese het geval is, maar ook op grond van hydrofobiciteit en moleculemassa kan plaatsvinden.

3.4.2 Ion exchange chromatography

Ion exchange chromatography is een uitermate geschikte techniek om het te zuiveren eiwit te concentreren. Het enzym is in de homogenisatiebuffer (Tris-HCl, pH 7) negatief geladen en kan daardoor gebonden worden aan positief geladen kolom materiaal (anion

exchange chromatography). De aanwezigheid van Triton X-100 (detergent om het hydrofobe eiwit oplosbaar te maken in waterige oplossingen) in de homogenisatiebuffer bleek de binding tussen eiwitten uit het monster en het kolommateriaal te verhinderen (Esser, 1995).

Triton X-100 is moeilijk via dialyse uit een monster te verwijderen, omdat de micellen te groot zijn om het membraan te passeren. Andere niet-ionogene detergentia zoals diethyleen glycol monopentyl ether en *n*-octyl β -D-glucopyranoside kunnen wel eenvoudig uit een monster verwijderd worden met behulp van dialyse. Homogenisatie van het α -esterase iso-enzym blijkt ook mogelijk als Triton X-100 in de homogenisatiebuffer wordt vervangen door *n*-octyl β -D-glucopyranoside. Na dialyse tegen 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) bleken de negatief geladen eiwitten uit het monster wel te binden aan het positief geladen kolommateriaal. In totaal zijn twee typen anion kolommaterialen getest:

- Macro-Prep Q-support (strong anion exchanger)
- Macro-Prep DEAE-support (weak anion exchanger).

Elutie van de negatief geladen eiwitten vindt plaats door een lineaire gradient van 0 tot 1,0 M NaCl op te bouwen. Op basis van het eiwitchromatogram (E_{280} tegen elutievolume) en de analyse van de fracties op PhastGel high density werd besloten gebruik te maken van de Macro-Prep Q-anion exchanger, omdat de α -esterase iso-enzymen redelijk geïsoleerd van de kolom elueerden. Uit de zilverkleuring na SDS-PAGE is gebleken dat zich een groot aantal eiwitten bevinden in de fracties waarin het te zuiveren α -esterase iso-enzym zit. Om het α -esterase enzym te scheiden van de rest van deze eiwitten is een tweede zuiveringsstap nodig. Bij deze kolomstap wordt gebruik gemaakt van het hydrofobe karakter van het α -esterase enzym.

3.4.3 Hydrophobic interaction chromatography

Bij Hydrophobic Interaction Chromatography worden, bij een hoge ionsterkte, hydrofobe eiwitten of hydrofobe gedeelten van eiwitten gebonden aan het kolommateriaal. Er zijn drie typen kolommaterialen getest:

- Macro-Prep methyl HIC-support (bindt sterk hydrofobe eiwitten)
- Macro-Prep *t*-butyl HIC-support (bindt ook matig hydrofobe eiwitten)
- PhenylSephacryl CL-4B (heeft een aromatische ring in plaats van een alkylketen).

Elutie van de hydrofobe eiwitten geschiedt door de ionsterkte te verlagen via een lineaire gradient van 0,5 tot 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De Macro-Prep methyl HIC-kolom bleek, op basis van het eiwitchromatogram en de analyse van de diverse fracties op PhastGel high density, het meest geschikt voor de zuivering van het α -esterase enzym.

Afhankelijk van de zuiverheid van de α -esterase fracties na de Macro-Prep methyl HIC-kolom kan nog een derde kolomstap uitgevoerd worden, namelijk gelfiltratie. Bij deze techniek worden natieve eiwitten van elkaar gescheiden op basis van grootte. Voor het te zuiveren α -esterase enzym kan het beste een HiPrep Sephacryl S-100 HR kolom (Pharmacia) gebruikt worden, omdat het moleculegewicht van het te zuiveren enzym, circa 33 kDa (Esser, 1995), binnen het fractioneringsgebied van deze kolom valt (1-100 kDa).

3.4.4 De zuivering

Voor een aminozuurbepaling (3 à 5 μg) en de productie van monoclonale antilichamen (30 μg) is in totaal circa 35 μg gezuiverd enzym nodig. Om deze hoeveelheid eiwit te verkrijgen zijn op 3 en 4 augustus 1995 in totaal 1056 Cyclamen (cultivar Pastel

gemengd) geïnoculeerd met *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis*. Per Cyclamen zijn $2.5 \cdot 10^7$ sporen (isolaat Foc 90-4) tussen de wortels geïnjecteerd met behulp van een pipet. Vier weken na inoculatie vertoonde 95% van de Cyclamen bovengroondse aantastingssymptomen.

Voor de zuivering zijn op 4 september 1995 van 986 Cyclamen met visuele aantasting de wortels en de onderste helft van de knol fijngesneden met een scalpel. Het fijngesneden materiaal (1378 gram) is vervolgens gemalen met behulp van een ULTRA TURRAX T25 in 1125 ml homogenisatiebuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5 met 0,5 mM PMSF, 1 mM EDTA, 15 mM β -mercaptoëthanol en 0,4% (w/v) n-octyl β -D-glucopyranoside). Na centrifugatie en filtratie (0,45 μ m membraanfilter) is het monster overnacht gedialyseerd tegen 25 mM Tris-HCl, pH 7,5. Het gedialyseerde monster (1070 ml) werd vervolgens op een Macro-Prep Q-kolom geladen (2,0 ml/min.). Elutie van de aan de kolom gebonden eiwitten vond plaats door in 50 minuten een lineaire gradient van 0 tot 1 M NaCl op te bouwen. Het te zuiveren α -esterase enzym elueerde van de kolom vanaf circa 0,18 M NaCl. Alle fracties met het te zuiveren α -esterase enzym werden gepoold (112 ml) en voor circa 10% verzadigd met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (7,39 gram). Na centrifugatie werd het supernatant op de Macro-Prep methyl HIC-kolom geladen (2,0 ml/min.). De aan het kolommateriaal gebonden eiwitten werden weer van de kolom gewassen door in 15 minuten via een lineaire gradient van 0,5 tot 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ te komen. Het α -esterase enzym elueerde van de kolom vanaf circa 0,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De fracties met het te zuiveren enzym zijn gepoold (80,0 ml) en voor 80% verzadigd met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Deze oplossing is overnacht bewaard bij 4°C en vervolgens gecentrifugeerd. Het gevormde pellet is opgenomen in 2,5 ml 10 mM Na_2HPO_4 met 0,15 M NaCl en 0,4% (w/v) β -D-glucopyranoside (pH 7,5). De oplossing is gefiltreerd (0,45 μ m membraanfilter) en ontgast alvorens 2,15 ml op de HiPrep Sephacryl S-100 HR kolom te laden. Na gelfiltratie zijn de fracties met het α -esterase iso-enzym overnacht gedialyseerd tegen 5 mM Na_2HPO_4 (pH 7,2). De gedialyseerde fracties zijn vervolgens gevriesdroogd en opgeslagen bij -80°C.

Op basis van het elutie-volume van het α -esterase iso-enzym op de HiPrep Sephacryl S-100 kolom is aan de hand van een calibratie-curve vastgesteld dat het enzym in natieve vorm een moleculegewicht heeft van circa 26 kDa.

Een klein gedeelte van de fracties na gel-filtratie met het α -esterase enzym zijn gedena-tureerd met SDS. De gedena-tureerde eiwitten zijn van elkaar gescheiden op een ExcelGel SDS gradient 8-18. De eiwitten in de gel zijn zichtbaar gemaakt met behulp van een zilverkleuring. In de fracties met het α -esterase enzym zijn verschillende bandjes te zien. Deze bandjes zijn niet detecteerbaar na een Coomassie-kleuring.

3.5 IDENTIFICATIE VAN *FUSARIUM OXYSPORUM*

Bij de NAKB bestaat het vermoeden dat *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* zich ook kan verspreiden via het Cyclamenzaad. Detectie van *Fusarium oxysporum* direct op zaad is (nog) niet mogelijk. Elektroforetische identificatie van isolaten kan mogelijk een oplossing bieden om pathogene en niet-pathogene isolaten snel van elkaar te onderscheiden. De bruikbaarheid van elektroforese voor identificatie-doeleinden is in de literatuur uitvoerig beschreven (Bonde *et al.* 1993, Bosland & Williams 1987, Reddy & Stahman 1972 en Somé & Tivoli 1993).

Het fijnmalen van isolaten gebeurt in een mortier met een vijzel in aanwezigheid van carborundum. Na centrifugatie van het homogenaat wordt een gedeelte van het supernatant op gel gezet (natieve-PAGE en IEF). Na de elektroforetische scheiding wordt een α -esterase enzymkleuring uitgevoerd.

Op basis van het α -esterase patroon na natieve-PAGE is het moeilijk om onderscheid te

maken tussen pathogene en niet-pathogene isolaten. Bij isoelectric focussing (IEF) daarentegen is er een duidelijk verschil in het α -esterase patroon tussen pathogene en niet-pathogene isolaten. In totaal zijn 53 *Fusarium oxysporum* isolaten getest (35 pathogene en 18 niet-pathogene isolaten). Op grond van de resultaten behaald met deze isolaten kan geconcludeerd worden dat de niet-pathogene isolaten een extra α -esterase iso-enzym bezitten bij pI 4,2, die bij de pathogene isolaten ontbreekt (Foto 2).

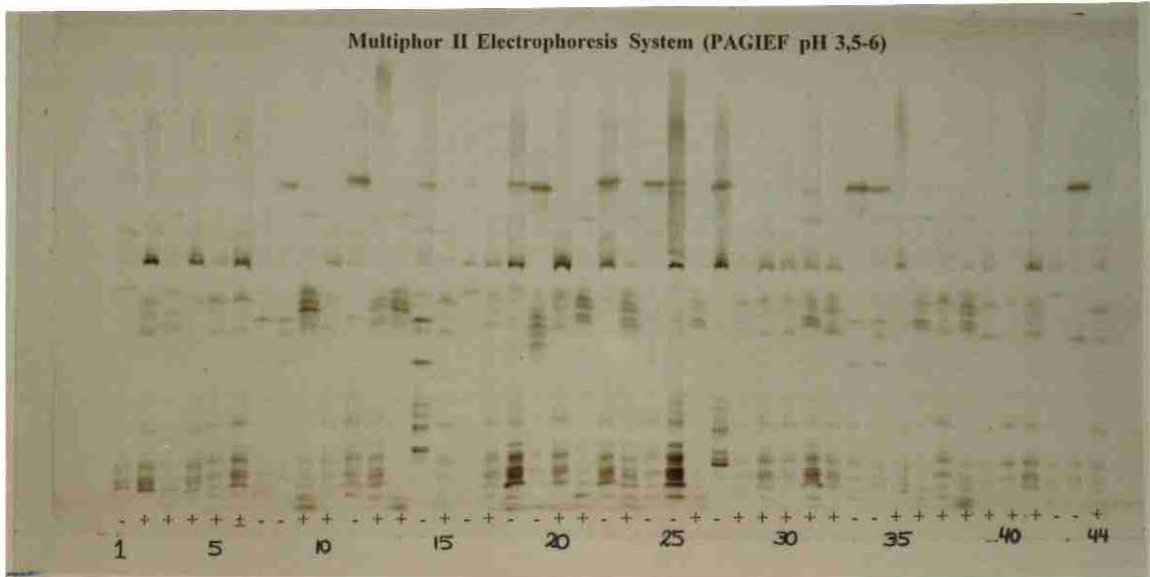


Foto 2. Identificatie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* (geïsoleerd uit Cyclamen) met behulp van de α -esterase enzymkleuring. Het iso-enzym patroon van niet-pathogene isolaten (-) en pathogene isolaten (+) is met elkaar vergeleken. Niet-pathogene isolaten (-) hebben een extra band bij pI 4,2

4. FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. GLADIOLI IN GLADIOOL

4.1 INLEIDING

Fusarium oxysporum f.sp. *gladioli* kan grote problemen in de gladiolenteelt veroorzaken. Een kleine besmetting op een gladiolenknol kan er voor zorgen dat een hele partij besmet raakt. Niet alle *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*-isolaten zijn echter pathogeen. Isolaten van fysio 2 zijn namelijk alleen pathogeen voor kleinbloemige gladiolen. Fysio1-isolaten daarentegen kunnen zowel groot- als kleinbloemige gladiolen besmetten. Fysio1-isolaten zijn dus in staat om de door de gladiool na de infectie met *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* gevormde barrière (kurklaagje) te doorbreken, wat uiteindelijk zal leiden tot bovengrondse schade.

Aangezien in Nederland voornamelijk grootbloemige gladiolen worden geteeld is er dringend behoefte aan een snelle detectiemethode die een besmetting van grootbloemige gladiolen met fysio1-isolaten kan onderscheiden van een besmetting met fysio2-isolaten.

4.2 DE α -ESTERASE ISO-ENZYM ANALYSE

Bij Cyclamen en anjer is het mogelijk om een pathogene besmetting van *Fusarium oxysporum* aan te tonen met behulp van de α -esterase enzymkleuring na natieve-PAGE (Everink, 1991). Mogelijk kan deze kleuring ook gebruikt worden voor de detectie van pathogene *Fusarium oxysporum* in gladiool.

Grootbloemige gladiolen (cultivar 'Peter Pears') werden op het Laboratorium voor Bloembollen Onderzoek (LBO) geïnfecteerd met verschillende *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*-isolaten door deze te mengen door de potgrond (10^6 sporen per liter potgrond). Voor dit experiment zijn zowel isolaten uit fysio 1 (G2, G4 en Ir7) als fysio 2 (G5, G6, G14, Cr1 en Ir1) gebruikt. Tevens is er een besmetting uitgevoerd met het G10-isolaat; deze behoort niet tot fysio 1 en 2.

Na een inoculatieperiode van vier weken werden de gladiolen uit de potgrond verwijderd en in drie stukken verdeeld:

- wortels
- middenstuk (stukje wortels met stukje knol)
- knol.

Per isolaat zijn twee gladiolen opgesplitst in de drie onderdelen en onderworpen aan de α -esterase enzymkleuring na natieve-PAGE op PhastGel high density. Het voor *Fusarium oxysporum* bij Cyclamen en anjer specifieke α -esterase iso-enzym is ook bij gladiolen in het middenstuk detecteerbaar. In de wortels en de knol daarentegen is het iso-enzym niet of nauwelijks waar te nemen. Ondanks dat het specifieke iso-enzym ook ontbreekt in het middenstuk van onbesmette gladiolen, is de kleuring niet bruikbaar voor de detectie van pathogene *Fusarium oxysporum*, omdat zowel isolaten uit fysio 1 en 2 hetzelfde enzym induceren.

De analyse van de gladiolenknollen is herhaald zes weken na inoculatie. Het resultaat was identiek aan het resultaat van vier weken na inoculatie.

4.3 SCREENEN VAN ENZYMKLEURINGEN

Het is dus niet mogelijk om met de α -esterase enzymkleuring onderscheid te maken

tussen een besmetting met een isolaat uit fysio 1 of 2. In het volgende experiment werden daarom andere enzymen gescreend die mogelijk wel betrokken zijn bij het doorbreken van het door de gladiool gevormde kurklaagje. Voor dit experiment zijn op het LBO 200 gladiolenknollen (cultivar 'Peter Pears') besmet met het G2-isolaat (fysio 1) en het G6-isolaat (fysio 2) door deze te dompelen in een sporensuspensie (10⁶ sporen per ml). Na het dompelen vond een incubatieperiode plaats:

1 week vochtig, 20°C
2 weken droog, 20°C
8-10 weken droog, 9°C.

Na de incubatie zijn visueel aangetaste knollen geschild. De schil is gehomogeniseerd met een ULTRA TURRAX T25, waarbij Tris-HCl (pH 7) met 0,5% Triton X-100 als buffer is gebruikt. Na centrifugatie zijn de monsters, een G2- en een G6-besmetting en een controle, op PhastGel gradient 8-25 geladen. Na natieve-PAGE zijn diverse enzymkleuringen uitgevoerd waarbij de enzym patronen van de drie monsters met elkaar werden vergeleken (Tabel 2).

Tabel 2 - Overzicht van de uitgevoerde enzymkleuringen en waargenomen verschillen in enzym patroon na natieve-PAGE op PhastGel gradient 8-25. + = wel verschil waargenomen. - = geen verschil waargenomen

Enzymkleuring	Fysio 1 vs. controle	Fysio 1 vs. fysio 2
α -Esterase	+	-
α -D-Galactosidase	+	+
β -D-Galactosidase	-	-
β -D-Glucosidase	+	+
Glutamaat oxaloacetaat transaminase	-	-
Leucine aminopeptidase	-	-
Pectin lyase	+	+
Peroxidase	+	+
Polygalacturonase	+	+
Zure fosfatase	-	-

Uit de resultaten blijkt dat α -D-galactosidase, β -D-glucosidase, peroxidase, pectin lyase en polygalacturonase mogelijk bruikbaar zijn voor detectie van *Fusarium oxysporum* op fysio-niveau. Het iso-enzym patroon van pectin lyase en polygalacturonase is erg vaag en daarom waarschijnlijk niet zo geschikt voor detectie-doeleinden. De overige drie kleuringen, α -D-galactosidase, β -D-glucosidase en peroxidase, zijn verschillende keren herhaald. Bij α -D-galactosidase-kleuring was er bij de besmetting met het G2-isolaat een reproduceerbaar bandje zichtbaar op de overgang tussen stacking- en resolvinggel. Dit bandje ontbrak in de andere twee monsters. Bij de β -D-glucosidase en de peroxidase kleuring was alleen een bandenpatroon zichtbaar als de gladiool besmet was met het G2-isolaat. Bij besmetting met het G6-isolaat en in de controle was geen iso-enzym patroon detecteerbaar.

Tevens zijn de iso-enzym patronen verkregen met behulp van isoëlektrische focussing bestudeerd. Bij α -D-galactosidase en β -D-glucosidase waren nauwelijks banden

zichtbaar en daarom niet bruikbaar voor detectiedoeleinden. Peroxidase daarentegen laat zich ook goed detecteren op PhastGel IEF 3-9. Ook nu is er alleen in geval van een G2-besmetting een iso-enzym patroon zichtbaar.

Het gebruik van Triton X-100 (detergent) tijdens homogenisatie moet indien mogelijk vermeden worden, omdat detergentia een storend effect kunnen hebben bij diverse processen. Experimenteel is aangetoond dat voor de homogenisatie van de drie enzymen Triton X-100 in de homogenisatie-buffer vervangen kan worden door 80 mM NaCl. In de volgende experimenten werd daarom NaCl in plaats van Triton X-100 in de homogenisatie gebruikt.

4.4 DE SPECIFICITEIT VAN DE ENZYMKLEURINGEN

Infectie van grootbloemige gladiolen met het G2- of G6-isolaat kunnen van elkaar worden onderscheiden op basis van het α -D-galactosidase, β -D-glucosidase of peroxidase iso-enzym patroon. Voordat deze drie kleuringen gebruikt kunnen worden voor detectie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* op fysio-niveau in gladiool, moesten er eerst meer isolaten getoetst worden.

Op het LBO zijn grootbloemige gladiolen (cultivar 'Peter Pears') besmet met verschillende isolaten uit fysio 1 (G2, G15, G31, G57, G70 en Ir7) en fysio 2 (G5, G6, Cr1, Ir1 en X1). Daarnaast zijn er drie isolaten gebruikt die niet tot fysio 1 en 2 behoren (G76, Cr3 en Cr8). Het G76-isolaat is ondanks het feit dat deze niet tot fysio 1 behoort toch zeer zwak pathogeen voor zowel groot- als kleinbloemige gladiolen. Het Cr3- en Cr8-isolaat daarentegen zijn niet pathogeen voor groot- en kleinbloemige gladiolen. Per isolaat zijn twee besmettingsmethoden uitgevoerd:

- knollen dompelen in een sporensuspensie (10^4 sporen/ml) en vervolgens in potgrond planten. Na een incubatieperiode van circa zes weken werden vijf knollen per isolaat getoetst.
- knollen dompelen in een sporensuspensie (10^6 sporen/ml) en vervolgens incuberen:
 - 1 week vochtig, 20°C
 - 2 weken droog, 20°C
 - 6-8 weken droog, 9°C.

Na de incubatie werden vijf knollen per isolaat getoetst.

Ongeacht de besmettingsmethode kon geconcludeerd worden dat de α -D-galactosidase-kleuring niet specifiek genoeg is voor detectie op fysio-niveau. Een aantal fysio 2 (X1 en Ir1) isolaten vertoonden namelijk op PhastGel gradient 8-25 ook een band op de overgang van de stacking- naar de resolvinggel.

De β -D-glucosidase (op PhastGel gradient 8-25) en de peroxidase-kleuring (op PhastGel gradient 8-25 en PhastGel IEF 3-9) bleken wel geschikt voor detectie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* op fysio-niveau. Bij β -D-glucosidase ontstaat na een besmetting met een fysio1-isolaat een specifiek iso-enzym patroon. Dit patroon wijkt duidelijk af van een besmetting met een isolaat uit fysio 2. Voor peroxidase geldt dat alleen bij grootbloemige gladiolen besmet met een fysio1-isolaat een iso-enzym patroon te zien is, terwijl bij onbesmette gladiolen en bij gladiolen besmet met een fysio2-isolaat geen patroon zichtbaar is.

Om grootschalige detectie van *Fusarium oxysporum* in gladiool mogelijk te maken is getracht de kant-en-klare PhastGels te vervangen door zelfgegoten Multiphor II-gels. Bij native-PAGE was met name het produceren van scherpe bandjes, zowel bij β -D-glucosidase als peroxidase, een probleem. Met isoëlektrische focussing daarentegen konden op Multiphor-gels wel uitstekende patronen geproduceerd worden die identiek waren aan de patronen op PhastGel IEF 3-9.

Zowel met peroxidase als met β -D-glucosidase kan detectie van *Fusarium oxysporum*

op fysio-niveau plaatsvinden. Na vergelijking van beide kleuringen moet geconcludeerd worden dat het aantonen van een fysio1-besmetting met de peroxidase kleuring eenvoudiger is dan met de β -D-glucosidase-kleuring, omdat bij de laatst genoemde kleuring ook de fysio2-besmettingen patronen te zien geven (deze zijn wel afwijkend). Daarnaast is het mogelijk de peroxidase-kleuring uit te voeren op Multiphor II-gels (PAGIEF pH 3-10), waardoor toetsing op grote schaal uitgevoerd kan worden (per gel maximaal 104 monsters, variërend van 5-20 μ l, gelijktijdig analyseren).

4.5 BESMETTING VAN KLEINBLOEMIGE GLADIOLEN

Bij detectie van *Fusarium oxysporum* op grootbloemige gladiolen is het noodzakelijk dat het iso-enzym patroon van een fysio1-besmetting (pathogeen) duidelijk verschilt van een fysio2-besmetting (niet pathogeen). Isolaten uit fysio 1 en 2 zijn echter beide pathogeen voor kleinbloemige gladiolen. Mogelijk kan met behulp van de peroxidase enzymkleuring, het marker enzym voor pathogene *Fusarium oxysporum*-besmettingen bij grootbloemige gladiolen, ook een pathogene besmetting bij kleinbloemige gladiolen aangetoond worden.

Het voorgaande experiment, waarbij grootbloemige gladiolen op twee manieren besmet waren met diverse *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* isolaten uit zowel fysio 1 als 2, is herhaald, maar in plaats van grootbloemige gladiolen zijn kleinbloemige gladiolen (cultivar 'Nymph') gebruikt.

Na homogenisatie is het peroxidase patroon van de verschillende monsters bekeken na natieve-PAGE (op Multiphor II-gel [17.5% T en 2%C] en PhastGel gradient 8-25) en isoëlektrische focussing (op PAGIEF pH 3,5-10 en PhastGel IEF 3-9). Met beide elektroforetische technieken, ongeacht het type gel, kunnen pathogene besmettingen (fysio 1 en 2) worden onderscheiden van niet-pathogene besmettingen (isolaat Cr3 en Cr8) en onbesmette gladiolen (foto 3). Bij kleinbloemige gladiolen is het niet mogelijk om op basis van het peroxidase patroon onderscheid te maken tussen fysio1- en 2-besmettingen, omdat voor beide fysio's het patroon identiek is.

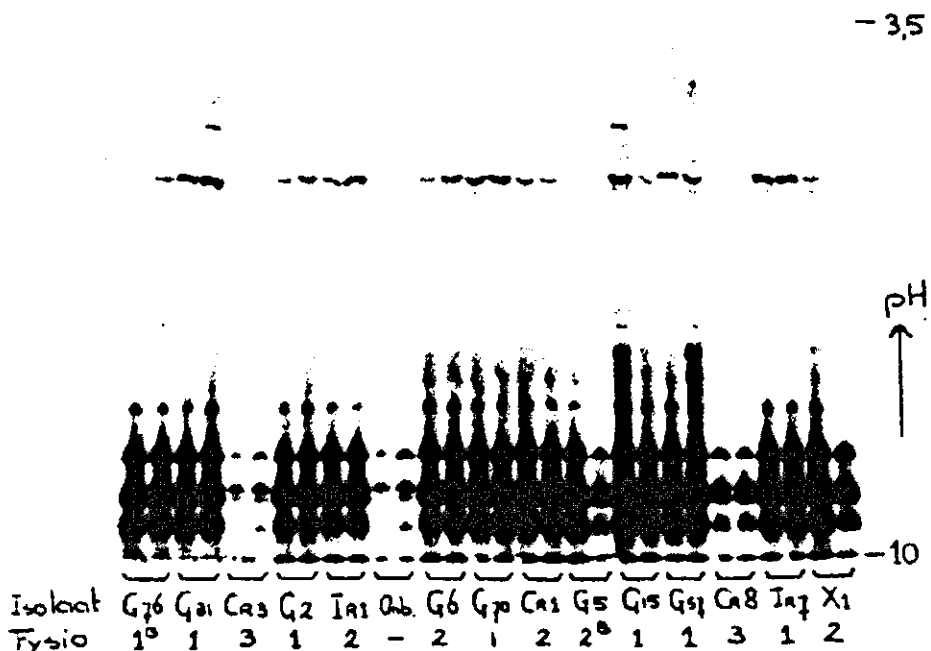


Foto 3. Detectie van pathogeen *Fusarium oxysporum* in kleinbloemige gladiolen (cultivar 'Nymph') met de peroxidase enzymkleuring op PAGIEF 3,5-10, + = pathogeen isolaat. - = niet-pathogeen isolaat

Op grond van de resultaten lijkt het aannemelijk dat besmetting met pathogene *Fusarium oxysporum*-isolaten, in zowel groot- als kleinbloemige gladiolen, aangetoond kan worden met behulp van de peroxidase enzymkleuring. De detectie kan het beste uitgevoerd worden met behulp van isoëlektrische focussering op PAGIEF pH 3,5-10, omdat op deze gel het patroon op eenvoudige wijze te produceren is en het benodigde elektroforese systeem, Multiphor II Electrophoresis System, tevens geschikt is voor grootschalige analyses.

5. PHYTOPHTHORA EN GNOMONIA IN ROOS

5.1 INLEIDING

Bij de teelt van rozen op substraat zijn het met name de bodemschimmels *Gnomonia radicola* en *Phytophthora* sp. die voor problemen zorgen. Aantasting door *Gnomonia* en *Phytophthora* veroorzaken dezelfde soort bovengrondse symptomen. Onderin het gewas ontstaat bladvergeling en -verbruining, gevolgd door bladval. Meer naar boven ontstaan gebreksverschijnselen. Aantasting gaat altijd gepaard met sterke groeivermindering: minder bloemtakken die dunner en korter zijn en kleinere bladeren hebben. Ondergronds veroorzaken beide schimmels bruine wortels. Op grond van deze symptomen is het niet mogelijk onderscheid te maken tussen beide schimmels. Dit kan alleen gebeuren door isolatie en visueel onderzoek van de wortels (Amsing en Kerssies, 1992).

Om aantasting met één van beide schimmels te voorkomen is het absoluut noodzakelijk om het uitgangsmateriaal, alvorens het in de kas te plaatsen, te controleren op aanwezigheid van *Phytophthora* sp. en *Gnomonia radicola*. Een snelle en betrouwbare detectiemethode voor *Gnomonia radicola* en *Phytophthora* sp., waarmee beide schimmels ook van elkaar onderscheiden kunnen worden, is dus gewenst.

5.2 SCREENEN VAN ENZYMKLEURINGEN

In het eerste experiment zijn diverse enzym patronen van gezonde en met *Gnomonia radicola* of *Phytophthora* sp. besmette rozenwortels met elkaar vergeleken. Voor dit onderzoek zijn rozen (cultivar 'Kiss') geteeld in plastic bakken (39 (l) x 29 (b) x 20 (h) cm) met daarin 20 liter voedingsoplossing. In een bak kunnen maximaal tien steenwolkjes met rozenstekken geplaatst worden. Voor de besmetting van rozen met *Gnomonia radicola* werden vier met *Gnomonia* volgroeide voedingsplaten (circa twee weken) fijngemalen in een Blender en werd de suspensie aan een bak met rozen toegevoegd. Aangezien het *Phytophthora* sp.-isolaat moeilijk te isoleren is, vond inoculatie plaats door per bak twee met *Phytophthora* besmette rozenstekjes en 2 liter besmette voedingsoplossing toe te voegen. In beide gevallen zijn er binnen een week bruine worteltjes waar te nemen.

Visueel aangetaste wortels zijn afgeknipt onder het steenwolkje en gehomogeniseerd in 20 mM Tris-HCl (pH 7) met 0,5% Triton X-100 met behulp van een ULTRA TURRAX T25. Tevens is op identieke wijze een monster bereid, uitgaande van gezonde wortels. Van alle drie monsters is 4 μ l geladen op PhastGel gradient 8-25. Na de elektroforetische scheiding van de in de monsters aanwezige eiwitten zijn diverse enzymkleuringen uitgevoerd. De resulterende iso-enzym patronen van gezonde en met *Gnomonia radicola* of *Phytophthora* sp. besmette rozenwortels zijn met elkaar vergeleken (Tabel 3).

Tabel 3 - Overzicht van de uitgevoerde enzymkleuringen en waargenomen verschillen in enzympatroon na natieve-PAGE op PhastGel gradient 8-25. + = wel verschil waargenomen. - = geen verschil waargenomen

Enzymkleuring	Gezond vs. Gnomonia	Gezond vs. Phytophthora	Gnomonia vs. Phytophthora
α -Esterase	+	+	+
α -D-galactosidase	+	-	+
β -D-galactosidase	+	-	+
β -D-Glucosidase	+	±	+
Glutamaat oxaloacetaat transaminase	?	-	?
Leucine aminopeptidase	-	-	-
Pectin lyase	?	-	?
Peroxidase	+	+	--
Polygalacturonase	?	-	?
Zure fosfatase	-	-	-

Uit de tabel blijkt dat voor de detectie van *Phytophthora* sp. in rozenwortels gebruik kan worden gemaakt van α -esterase, β -D-glucosidase en peroxidase. Voor *Gnomonia radiculicola* kunnen naast de bovengenoemde enzymen ook α - en β -D-galactosidase mogelijk als marker-enzym fungeren. De peroxidase-kleuring is niet geschikt voor detectie, omdat het patroon van een met *Gnomonia* of *Phytophthora* besmette rozenwortel vrijwel identiek is, waardoor geen onderscheid tussen beide schimmels kan worden gemaakt.

Herhalingen van de overige vier kleuringen hebben aangetoond dat de α -esterase, α -D-galactosidase en β -D-galactosidase enzympatronen reproduceerbaar zijn. Dit kan niet gezegd worden voor de β -D-glucosidase-kleuring voor met *Phytophthora* sp. besmette wortels. Voor de detectie van *Phytophthora* sp. moet daarom gebruik worden gemaakt van de α -esterase enzymkleuring. Ondanks dat de iso-enzym patronen van alle vier de mogelijke marker enzymen voor *Gnomonia radiculicola* reproduceerbaar zijn, kan voor de detectie het beste gebruik worden gemaakt van de α -D-galactosidase-kleuring. Op PhastGel homogeneous 12,5% kan met behulp van deze kleuring op eenvoudige wijze detectie worden uitgevoerd. Rozenwortels besmet met *Gnomonia radiculicola* bezitten op deze gel bij een R_f -waarde van 0,3 een dominante band die bij gezonde wortels niet detecteerbaar is.

5.3 SPECIFICITEIT ENZYMKLEURINGEN

Andere schimmels, zoals *Pythium* sp., *Cylindrocladium destructans* en *Verticillium* kunnen ook wortelrot bij roos veroorzaken. De α -esterase (detectie *Phytophthora* sp.) en de α -D-galactosidase-kleuring (detectie *Gnomonia radiculicola*) zijn alleen bruikbaar voor detectie-doeleinden als de iso-enzym patronen specifiek zijn voor één bepaalde schimmel/gewascombinatie. Voor de bepaling van de specificiteit van beide kleuringen

werden rozen besmet met diverse schimmels die ook wortelrot bij roos veroorzaken:

- *Phytophthora capsici*; rozen besmet door steenwolblokje te plaatsen in een vaas met 700 ml niet-steriele voedingsoplossing met daarin 17 ponsjes met mycelium van *Phytophthora capsici*.
- *Phytophthora citrophthora*; rozen besmet door steenwolblokje te plaatsen in een vaas met 700 ml niet-steriele voedingsoplossing met daarin 17 ponsjes met mycelium van *Phytophthora citrophthora*.
- *Cylindrocladium destructans*; rozen besmet door steenwolblokje te plaatsen in een vaas met 700 ml niet-steriele voedingsoplossing met daarin $1.2 \cdot 10^8$ sporen van *Cylindrocladium destructans*.
- *Pythium* sp.; rozen besmet door steenwolblokje te plaatsen in een vaas met 700 ml niet-steriele voedingsoplossing waaraan $1\frac{1}{2}$ schaal met mycelium van *Pythium* sp. is toegevoegd.
- *Verticillium dahliae*; geïnfecteerd materiaal afkomstig van NAKB.

Vier van deze vijf schimmels veroorzaakten visuele aantasting (bruine wortels). Alleen *Cylindrocladium destructans* was niet in staat bruine wortels te produceren.

De visueel aangetaste wortels (indien mogelijk) zijn gebruikt om de specificiteit van de twee enzymkleuringen te testen.

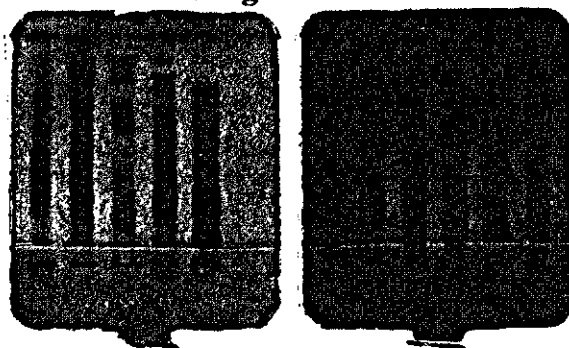
Het α -esterase iso-enzym patroon van een met *Phytophthora* sp. besmette rozenwortel verschilt van alle andere besmettingen. Het is echter moeilijk aan te geven welke band als specifieke marker kan dienen. Het beste kan voor de detectie van *Phytophthora* sp. in roos het gehele enzym patroon gebruikt worden (Foto 4).

Detectie van *Gnomonia radicola* bij roos is veel eenvoudiger, omdat alleen met *Gnomonia radicola* besmette rozenwortels één extra α -D-galactosidase bandje zichtbaar is die bij alle andere besmettingen ontbreekt. Dit extra bandje met een R_f -waarde van 0,3 op PhastGel homogeneous 12,5% kan zeer goed als marker gebruikt worden voor *Gnomonia radicola* infectie bij roos (Foto 5).

***Phytophthora* in roos.**

De specificiteit van het α -esterase patroon.

PhastGel gradient 8-25%.



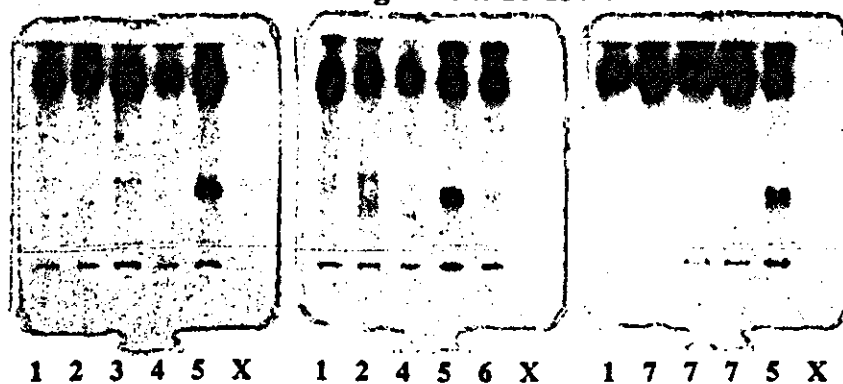
1. 'gezond'
2. *Phytophthora* sp.
3. *Phytophthora citrophthora*
4. *Gnomonia radicola*

5. *Pythium* sp.
6. *Phytophthora capsici*
7. *Cylindrocarpon destructans*

Foto 4. Detectie van *Phytophthora* sp. in roos met behulp van α -esterase. Het iso-enzym patroon verschilt duidelijk per schimmel

***Gnomonia radicicola* in roos.**
De specificiteit van het α -galactosidase patroon.

PhastGel gradient 10-15%.



- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 'gezond' | 5. <i>Gnomonia radicicola</i> |
| 2. <i>Phytophthora</i> sp. | 6. <i>Phytium</i> sp. |
| 3. <i>Phytophthora capsisi</i> | 7. <i>Verticillium</i> |
| 4. <i>Phytophthora citrophthora</i> | |

Foto 5. Detectie van *Gnomonia radicicola* in roos met behulp van α -D-galactosidase. In het iso-enzym patroon van met *Gnomonia radicicola* besmette rozen is één extra bandje zichtbaar met een R_f -waarde van 0,3

6. PHYTOPHTHORA EN CYLINDROCLADIUM IN SPATHIPHYLLUM

6.1 INLEIDING

Bij de teelt van *Spathiphyllum* doen zich veel problemen voor met wortelaantasting. Dit leidt tot verwelking en afsterving van de planten. Het ziektebeeld wordt met name veroorzaakt door de schimmels *Phytophthora* sp. en *Cylindrocladium spathiphylli*. Laatst genoemde tast de wortels en de basis van de bladstengels aan, terwijl *Phytophthora* sp. via de wortels het vaatbundelsysteem in de plantvoet vernietigt. In de praktijk kunnen aantastingen door *Phytophthora* sp. en *Cylindrocladium spathiphylli* op basis van een aantal kenmerken van elkaar onderscheiden worden. De belangrijkste verschillen zijn:

- Zodra de eerste bovengrondse symptomen van *Phytophthora* sp. verschijnen, zijn de vaatbundels in de plantvoet al bruin verkleurd. In tegenstelling tot *Phytophthora* sp. veroorzaakt *Cylindrocladium spathiphylli* nauwelijks of geen inwendig, bruine plantvoet.
- *Cylindrocladium spathiphylli* groeit van buiten naar binnen, waarbij al het plantenweefsel dat het tegenkomt wordt vernietigd. Bij *Phytophthora* sp., een vaatparasiet, is de volgorde waarin de vaatbundels verstopt raken niet voorspelbaar.
- Het wortelstelsel wordt door *Cylindrocladium spathiphylli* zeer ernstig aangetast. Er blijven slechts weinig wortels over. De aangetaste wortels zijn bruin van kleur. *Phytophthora* sp. tast het wortelstelsel aan en heeft lichtbruine verkleuring van de wortels tot gevolg (Amsing et al., 1991).

Ondanks de verschillen tussen beide schimmels is er toch behoefte aan een snelle en specifieke toets. Met name in het begin van de aantasting is er niet of nauwelijks onderscheid te maken tussen beide schimmels.

6.2 SCREENEN VAN DE ENZYMKLEURINGEN

Voor het ontwikkelen van een elektroforetische toets voor *Cylindrocladium spathiphylli* en *Phytophthora* sp. zijn 150 jonge *Spathiphyllum*planten opgepot en weggezet op drie losse eb/vloed-tafels. Vijftig planten zijn besmet met *Cylindrocladium spathiphylli*. In totaal zijn 20 PDA-platen met *Cylindrocladium spathiphylli* fijngemalen in een Blender in aanwezigheid van leidingwater. De suspensie werd gefiltreerd over kaasdoek en aangevuld tot 2 liter. Van deze sporensuspensie is vier keer 10 ml (totaal 40 ml) tussen de wortels gepipetteerd.

Ook zijn er 50 planten geïnoculeerd met een *Phytophthora* sp.-isolaat. Hiertoe zijn 30 PDA-platen met *Phytophthora* sp. gehomogeniseerd met een Blender in leidingwater. De suspensie is verdund tot 3 liter. Per plant is 60 ml inoculum aangegoten.

Visueel aangetaste planten zijn gebruikt voor het screenen van de enzymkleuringen. De wortels en de plantvoet van de planten zijn fijngemalen met een ULTRA TURRAX T25, waarbij Tris-HCl met onder andere Triton X-100 als homogenisatiebuffer is gebruikt. De diverse iso-enzym patronen van deze visueel aangetaste planten zijn onderling en ten opzichte van niet-geïnoculeerde *Spathiphyllum*planten vergeleken (Tabel 4).

Tabel 4 - Overzicht van de uitgevoerde enzymkleuring en waargenomen verschillen in enzympatroon na natieve-PAGE op PhastGel gradient 8-25 en na IEF op PhastGel IEF 3-9. + = wel verschil waargenomen. - = geen verschil waargenomen. ± = marginaal verschil waargenomen

Kleuring	Cylindrocladium vs. gezond	Phytophthora vs. gezond	Cylindrocladium vs. Phytophthora
α -Esterase	+	+	±
β -Esterase	+	+	-
α -D-Galactosidase	+	-	+
β -D-Galactosidase	-	±	±
α -D-Glucosidase	-	-	-
β -D-Glucosidase	+	+	+
Glutamaat oxaloacetaat transaminase	-	-	-
Leucine aminopeptidase	-	-	-
Pectin lyase	±	±	±
Peroxidase	-	-	-
Polygalacturonase	+	-	+
Polyphenoloxidase	-	-	-
Shikimate dehydrogenase	-	-	-
Zure fosfatase	-	-	-

In totaal zijn 14 kleuringen uitgevoerd met behulp van natieve-PAGE en IEF. Op grond van de resultaten met visueel aangetast plantmateriaal kan voor detectie van *Cylindrocladium spathiphylli* het beste gebruik gemaakt worden van α -esterase, α -D-galactosidase, β -D-glucosidase of polygalacturonase. Voor *Phytophthora* sp. ligt de zaak iets gecompliceerder, omdat de reproduceerbaarheid van bepaalde kleuringen te wensen overliet. Daarnaast is er het probleem dat het verkrijgen van visueel met *Phytophthora* aangetaste planten moeilijk is. Ondanks de problemen met de reproduceerbaarheid van de kleuringen en de pathogeniteit van het *Phytophthora* sp.-isolaat lijkt het erop dat dat α -esterase, β -D-galactosidase, β -D-glucosidase en pectin lyase mogelijkheden bieden voor detectie.

6.3 HOMOGENISATIEBUFFER

Experimenteel is aangetoond dat Triton X-100 problemen veroorzaakt bij elektroforese (smeervorming). De invloed van Triton X-100 op het α -esterase, α -D-galactosidase, β -D-galactosidase, β -D-glucosidase en pectin lyase patroon is daarom bestudeerd. Op grond van een aantal experimenten is aangetoond dat het weglaten van Triton X-100 wel van

invloed is op de enzym patronen, maar de detectiemogelijkheden niet negatief be-
invloedt.

6.4 SPECIFICITEIT

Voordat één of meer van de enzymkleuringen in de praktijk gebruikt kunnen worden voor detectie-doeleinden, moest de specificiteit van de patronen nader bekeken worden. Hiertoe werden 450 jonge *Spathiphyllum* planten (cultivar 'Luna') opgepot en op losse schalen geplaatst. In totaal werden zeven verschillende inoculaties uitgevoerd met:

- *Cylindrocladium spathiphylli*, isolaat CBS 538-87
- *Cylindrocladium spathiphylli*, isolaat CBS 578-88
- *Phytophthora* sp., isolaat PD 90/1924
- *Phytophthora* sp., isolaat PD 91/458
- *Phytophthora drechsleri*, isolaat PD 94/65
- *Phytophthora nicotianae*, isolaat PD 93/1339
- *Myrothecium roridum*.

Voor de *Cylindrocladium spathiphylli*-besmettingen zijn 15 PDA-schalen met *Cylindrocladium spathiphylli* gehomogeniseerd in een Blender in aanwezigheid van kraanwater. De suspensie is aangevuld tot 3 liter. Per plant is er 50 ml inoculum tussen de wortels gespoten.

Aangezien de pathogeniteit van de *Phytophthora* sp.-isolaten lager is dan die van *Cylindrocladium spathiphylli* is bij *Phytophthora* voor een hogere infectie-druk gezorgd. Per isolaat zijn 25 PDA-schalen met *Phytophthora* gemalen in een Blender in aanwezigheid van kraanwater. De suspensie is aangevuld tot 5 liter. Per plant is er twee keer 50 ml inoculum bij de plant gegoten.

Het *Myrothecium* inoculum ($1 \cdot 10^7$ sporen/ml) werd bereid door de sporen van PDA-platen te wassen. Per plant is 50 ml van de sporensuspensie toegevoegd (bij 25 planten is het inoculum aangegoten en bij de andere helft is het tussen de wortels gespoten). Daarnaast is met 50 planten een droogtestress-behandeling uitgevoerd. Dit hield in dat deze planten alleen water kregen als de bladeren slap gingen hangen. Tevens zijn er 50 planten geteeld onder standaard-omstandigheden (controle).

Twee dagen na inoculatie is per behandeling willekeurig één plant bemonsterd. Geen van de planten vertoonde visuele aantastingsymptomen. De wortels en de plantvoet zijn apart gehomogeniseerd met een ULTRA TURRAX T25. Na centrifugereren zijn de monsters geanalyseerd op diverse Multiphor II-gels en zijn er verschillende kleuringen uitgevoerd (Tabel 5). Echter op geen enkele gel was een verschil te zien.

Tabel 5 - Overzicht van de kleuringen en de bijbehorende Multiphor II-gels voor de specificiteitsbepaling van de iso-enzym patronen

Kleuring	Multiphor II-gel
α -Esterase	20 %T en 3 %C
α -D-Galactosidase	10 %T en 3 %C
β -D-Galactosidase	15 %T en 3 %C
β -D-Glucosidase	15 %T en 3 %C
Pectin lyase	Ampholine PAGplate 3.5-9.5
Polygalactorunase	Ampholine PAGplate 3.5-9.5

β -Glucosidase kleuring

wortels

middenstuk

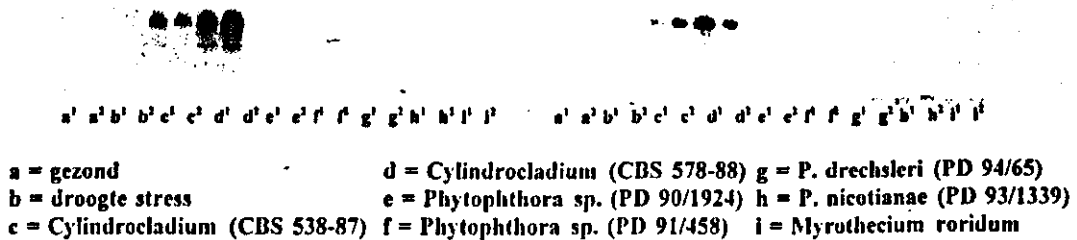


Foto 8. Detectie van *Cylindrocladium spathiphylli* in *Spathiphyllum* met behulp van de β -D-glucosidase enzymkleuring. Alleen bij planten besmet met *Cylindrocladium spathiphylli* (laantjes c en d) is, zowel in de wortels als in het middenstuk, een bandje zichtbaar in het iso-enzympatroon

De bemonstering is herhaald op 9, 14 en 16 dagen na inoculatie. De resultaten waren identiek aan die van 7 dagen na inoculatie. Op 22 dagen na inoculatie is de bemonstering nog eenmaal uitgevoerd, alleen zijn de planten nu niet willekeurig gekozen, maar zijn visueel aangetaste planten geselecteerd. Bij de α -D-galactosidase- en β -D-glucosidase-kleuring is, met name in de wortel-extracten, alleen een ander bandenpatroon zichtbaar dan in de controle als de planten besmet zijn met *Cylindrocladium spathiphylli*. In alle andere gevallen is het iso-enzympatroon identiek aan de controle. Voor α -esterase geldt dat bij een *Cylindrocladium spathiphylli*-besmetting een specifiek bandenpatroon ontstaat. Ook als de planten besmet zijn met *Phytophthora nicotianae* is er een iso-enzympatroon zichtbaar dat duidelijk afwijkt van de controle en de met *Cylindrocladium spathiphylli* besmette planten. De laatste kleuring die is uitgevoerd, is de β -D-galactosidase-kleuring. Met dit enzym is het niet mogelijk één van de besmettingen aan te tonen. Aangezien de pectin lyase en de polygalactorunase-kleuring in de voorgaande bemonsteringen (2, 7, 9, 14 en 16 dagen na inoculatie) niet de gewenste patronen gaven (veel a-specifieke vlekken op de gel waardoor interpretatie niet mogelijk was) zijn deze kleuringen nu (22 dagen na inoculatie) niet uitgevoerd.

Elf weken na inoculatie is de proef afgerond en is het aantal visueel aangetaste planten per behandeling geteld (Tabel 6). Direct valt op dat er nauwelijks aantasting van *Phytophthora* te realiseren is. Mogelijk is de manier van inoculeren niet goed en kunnen er beter aangetaste wortels door de potgrond gemengd worden.

Tabel 6 - Overzicht van het aantal visueel aangetaste planten op 11 weken na inoculatie

Schimmel	# visueel aangetaste planten	% aantasting
<i>Cylindrocladium</i> , CBS 538-87	50	100
<i>Cylindrocladium</i> , CBS 578-88	50	100
<i>Phytophthora</i> sp., PD 90/1924	2	4
<i>Phytophthora</i> sp., PD 91/458	18	36
<i>P. drechsleri</i> , PD 94/65	2	4
<i>P. nicotianae</i> , PD 93/1339	7	14
<i>Myrothecium roridum</i>	0	0

7. DISCUSSIE EN CONCLUSIES

7.1 ALGEMENE DISCUSSIE EN CONCLUSIES

Met elektroforetische iso-enzym analyse is het mogelijk plantpathogene organismen aan te tonen in diverse bloemisterij- en bolgewassen. De methode ontwikkeld voor *Fusarium oxysporum* in Cyclamen en anjer (Everink, 1991; Kerssies *et al.*, 1992; Kerssies *et al.*, 1994) is, met hier en daar een kleine aanpassing, ook bruikbaar voor andere schimmel-plant-combinaties.

Iedere schimmel-plant combinatie heeft zijn eigen specifieke iso-enzym patroon. Detectie van *Gnomonia radicola* in roos kan het beste uitgevoerd worden met behulp van de α -D-galactosidase enzymkleuring, terwijl voor het opsporen van *Phytophthora* sp. in het zelfde gewas gebruik moet worden gemaakt van de α -esterase enzymkleuring.

Het aantonen van *Cylindrocladium spathiphylli* in Spathiphyllum kan zowel gedaan worden met de β -D-glucosidase- als de α -D-galactosidase-kleuring. De β -D-glucosidase-kleuring is echter het gevoeligste van de twee kleuringen. Voor *Phytophthora* sp. in spathiphyllum daarentegen is nog geen goed marker enzym gevonden, waarmee een toets zou kunnen worden opgezet.

De peroxidase-kleuring is uitermate geschikt voor het detecteren van pathogene *Fusarium oxysporum*-isolaten in groot- en kleinbloemige gladiolen. Ook op het Laboratorium voor Bloembollen Onderzoek is een toets ontwikkeld voor deze schimmel/plant-combinatie, waarbij gebruik is gemaakt van DNA-technieken. Na vergelijking van de iso-enzym analyse met de DNA-methode moet geconcludeerd worden dat beide toetsen in staat zijn pathogene *Fusarium oxysporum*-isolaten in gladiolen aan te tonen, maar dat de iso-enzym analyse goedkoper, eenvoudiger en sneller is dan de DNA-methode.

Naast onderzoek aan bovenstaande schimmel/plant-combinaties is de toets voor *Fusarium oxysporum* in Cyclamen (Everink, 1991; Kerssies *et al.*, 1992; Kerssies *et al.*, 1994), in samenwerking met de NAKB, praktijkklaar gemaakt. Om de detectie mogelijk te kunnen automatiseren (ELISA of PCR) is een begin gemaakt met de zuivering van het voor *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* in Cyclamen specifieke α -esterase enzym.

Op grond van de resultaten lijkt het mogelijk, na optimalisering van de diverse chromatografische kolomstappen, een redelijke hoeveelheid van het enzym te kunnen zuiveren. Op verzoek van de NAKB is ook een elektroforetische toets ontwikkeld voor de identificatie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* geïsoleerd uit Cyclamen. Op basis van het α -esterase iso-enzym patroon, na scheiding van de schimmel-eiwitten met isoëlektrische focussing, is het mogelijk voor Cyclamen pathogene en niet-pathogene *Fusarium oxysporum*-isolaten van elkaar te onderscheiden.

De resultaten behaald in het project 'Elektroforetische detectie en identificatie van plantpathogene organismen' tonen aan dat met behulp van een relatief goedkope en eenvoudige techniek detectie van bodemschimmels in diverse bloemisterij- en bolgewassen mogelijk is. Hiermee heeft het PBG een methode tot haar beschikking die snel en betrouwbaar ziekteverwekkers in uitgangsmateriaal kan opsporen. Dit is absoluut noodzakelijk om problemen met bodemschimmels tijdens de teelt op te lossen en mogelijk zelfs te voorkomen.

7.2 *FUSARIUM OXYSPORUM* IN CYCLAMEN

Aanpassing van de door Everink (1991) ontwikkelde elektroforetische methode heeft er toe geleid dat de toets zowel in de zomer als winter bruikbaar is. In samenwerking met de NAKB is de betrouwbaarheid van de methode gecontroleerd door Cyclamen uit de praktijk zowel elektroforetisch als met de bio-toets te analyseren. Op basis van de resultaten kon aangetoond worden dat er een goede correlatie tussen beide methoden bestaat.

Als nadeel van de elektroforetische methode zou kunnen worden aangevoerd dat de detectie plaats vindt op het PhastSystem, waarbij het aantal monsters dat in één keer geanalyseerd kan worden, beperkt is. Voor grootschalige toetsing kan beter gebruik worden gemaakt van het Multiphor II Electrophoresis System. Met dit systeem kunnen 52 monsters simultaan getoetst worden. De omzetting van het PhastSystem naar het Multiphor II System echter is in dit geval niet zo eenvoudig. De omstandigheden waaronder de scheiding mogelijk is moet ook nog vastgesteld worden. Voor het oplossen van deze problemen is het verstandig Pharmacia Biotech in te schakelen. Om de detectie van *Fusarium oxysporum* volledig te kunnen automatiseren is getracht het specifieke α -esterase enzym te zuiveren. Voor de zuivering van het enzym zijn chromatografische methoden (ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography en gel filtration) gebruikt. De opbrengst aan gezuiverd enzym was onvoldoende voor de productie van antilichamen. De zuiverheid liet ook te wensen over, waardoor het niet mogelijk was de aminozuursequentie van het specifieke α -esterase enzym te bepalen. Wel was het mogelijk de grootte van het enzym vast te stellen in natieve (26 kDa met behulp van gelfiltratie) en gedatureerde vorm (17 kDa met behulp van SDS-PAGE).

Om meer enzym te kunnen zuiveren moeten manieren gezocht worden om de recovery voor alle kolomstappen te verhogen. Een tweede mogelijkheid om de opbrengst te verhogen is om nog meer met *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* geïnfecteerde Cyclamen te homogeniseren. Concentratie van het homogenaat, bijvoorbeeld met behulp van ultrafiltratie, is dan absoluut noodzakelijk, omdat anders het volume veel te groot wordt.

Het verhogen van de zuiverheid kan mogelijk gerealiseerd worden door een vierde chromatografische techniek, chromatofocussing, te gebruiken. Chromatofocussing geeft scheiding op grond van verschillen in iso-elektrisch punt. De techniek kan het beste gebruikt worden voor de gelfiltratie.

7.3 IDENTIFICATIE VAN *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *CYCLAMINIS*

Identificatie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* vindt plaats op basis van het ontbreken van een α -esterase iso-enzym waarvan de pI-waarde 4,2 bedraagt. Ondanks dat er circa 50 *Fusarium oxysporum*-isolaten getest zijn, is deze manier van identificeren niet de meest ideale. Beter zou zijn een isolaat pathogeen voor Cyclamen te noemen op grond van bepaalde iso-enzymen die juist wel aanwezig zijn. Echter zolang experimenteel niet kan worden aangetoond dat de hypothese niet klopt, moeten alle *Fusarium oxysporum*-isolaten zonder het α -esterase iso-enzym met pI 4,2 als f.sp. *cyclaminis* beschouwd worden.

7.4 *FUSARIUM OXYSPORUM* IN GLADIOOL

Bij grootbloemige gladiolen (cultivar 'Peter Pears') die besmet zijn met een *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*-isolaat uit fysio 1 (pathogeen voor 'Peter Pears') zijn verschillende dominante banden detecteerbaar tussen pl 4 en 6. Dit in tegenstelling tot isolaten uit fysio 2 (niet pathogeen voor 'Peter Pears') waarbij geen of nauwelijks banden detecteerbaar zijn.

Op kleinbloemige gladiolen (cultivar 'Nymph') is het ook mogelijk om pathogeen *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* te detecteren. In tegenstelling tot grootbloemige gladiolen is het in dit geval echter niet mogelijk onderscheid te maken tussen isolaten uit fysio 1 en 2. Dit is niet zo verwonderlijk, omdat beide isolaten pathogeen zijn voor 'Nymph'.

De detectie kan zowel bij groot- als kleinbloemige gladiolen plaatsvinden op knollen besmet tijdens opslag of via potgrond. Voordat de toets in de praktijk kan worden gebruikt moeten een aantal zaken onderzocht worden, zoals bijvoorbeeld:

- Is het peroxidase patroon bij groot- en kleinbloemige gladiolen cultivar-afhankelijk?
- Is het peroxidase patroon afhankelijk van de leeftijd van de knollen?
- Wat is de detectiegrens van de methode?

7.5 *PHYTOPHTHORA* SP. IN ROOS

Het aantonen van *Phytophthora* sp. in roos is niet eenvoudig. Detectie vindt plaats op grond van een heel enzympatroon en niet via één bepaalde band. Het is daarom verstandig om een groot aantal van met *Phytophthora* sp. besmette rozen te analyseren en het α -esterase enzympatroon door een computer te laten scannen. Het op deze manier verkregen, voor *Phytophthora* sp. in roos, specifieke iso-enzympatroon kan als referentie fungeren voor een praktijktoetsing.

7.6 *GNOMONIA RADICICOLA* IN ROOS

Het detecteren van *Gnomonia radicicola* in roos is erg gemakkelijk. Op de PhastGel homogeneous 12,5% is bij een R_f -waarde van 0,3 een specifiek α -D-galactosidase iso-enzym te zien. De intensiteit van dit bandje is met name in het begin van de infectie erg hoog. Naarmate de infectie vordert neemt de intensiteit af, maar blijft duidelijk waarneembaar.

Om de detectietechniek geschikt te maken voor grootschalige analyses moet de eiwitscheiding uitgevoerd kunnen worden op het Multiphor II Electrophoresis System. Om ook met behulp van dit systeem detectie van *Gnomonia radicicola* in roos mogelijk te maken is het absoluut noodzakelijk de juiste samenstelling van de gel (%T en %C) en het elektroforese-programma zo snel mogelijk experimenteel vast te stellen.

7.7 *PHYTOPHTHORA* SP. IN SPATHIPHYLLUM

In totaal zijn 14 verschillende enzymkleuringen getest die mogelijk betrokken zijn bij het infectie-proces. Geen van deze kleuringen gaf een reproduceerbaar verschil met gezonde Spathiphyllumplanten te zien. Vandaar dat geconcludeerd kon worden dat er

tot op heden nog geen specifieke elektroforetische detectiemethode beschikbaar is voor *Phytophthora* sp. in *Spathiphyllum*. Om toch een toets te kunnen ontwikkelen is een literatuursearch uitgevoerd in DIMDI (CAB PLANT PROTECTION; C673), waarbij het volgende zoekprofiel is gebruikt:

1. *Phytophthora* not *Phytophthora infestans*
2. protein or enzyme
3. detection or identification
4. 1 and (2 or 3)

Dit resulteerde in 46 artikelen. Op grond van de samenvattingen van deze artikelen zijn er zeven opgevraagd die mogelijk perspectieven bieden voor specifieke detectie. De artikelen, hieronder weergegeven, konden echter niet meer worden bestudeerd vanwege tijdgebrek.

Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. and Ryals, J. (1993)

Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (15), pp. 7327-7331.

Cahill, D.M. and Hardham, A.R. (1994)

Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 84 (2), pp. 193-200.

McCracken, A.R. and Cooke, L.R. (1984)

Horticultural crop diseases. *Annual Report on Research and Technical Work of the Department of Agriculture for Northern Ireland 1983*, pp. 202-204.

McCracken, A.R., Cooke, L.R., Brown, A.E. and Seaby, D.A. (1985)

Horticultural crop diseases. *Annual Report on Research and Technical Work of the Department of Agriculture for Northern Ireland 1984*, pp. 207-210.

Mohan, S.B. (1988)

Evaluation of antisera raised against *Phytophthora fragariae* for detecting the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Pathology*, 37 (2), pp. 206-216.

Sanden, G.E. and Moore, L.D. (1978)

Effect of heat-induced susceptibility of tobacco to black shank on protein content and on activity of peroxidases. *Phytopathology*, 68 (8), pp. 1164-1167.

Zentmeyer, G.A., Jefferson, L., Hickman, C.J. and Yung, C.H. (1974)

Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea americana*. *Mycologia*, 66 (5), pp. 830-845.

7.8 *CYLINDROCLADIUM SPATHIPHYLLI* IN *SPATHIPHYLLUM*

Cylindrocladium spathiphylli in *Spathiphyllum* laat zich zowel detecteren met de α -D-galactosidase als de β -D-glucosidase enzymkleuring. De laatste genoemde is de meest gevoelige kleuring en kan dus het beste gebruikt worden voor praktijktoetsing. De β -D-glucosidase- en de α -D-galactosidase-kleuring kunnen zowel uitgevoerd worden op PhastGel als op een Multiphor-gel.

Het verschil tussen besmetting met *Phytophthora* sp. en *Cylindrocladium spathiphylli* is bovengronds nogal moeilijk te zien. De β -D-glucosidase- en de α -D-galactosidase-kleuring kunnen in dit geval uitkomst bieden, voor zowel stekmateriaal als oudere planten. Aangezien de toets ontwikkeld is met en voor jonge *Spathiphyllum*-planten en duidelijk ook gewenst is voor de controle van oudere planten, moet de relatie tussen het

enzympatroon en de leeftijd van de plant nader bestudeerd worden. Met uit de praktijk afkomstige *Spathiphyllum*planten is aangetoond dat de methode ook werkt met éénjarig plantmateriaal. Wel is gebleken dat de monsterbereiding van deze planten extra aandacht nodig heeft. Tijdens de homogenisatie komen vetten vrij die na centrifugatie op het supernatant drijven. De vetten moeten zorgvuldig verwijderd worden, omdat deze een negatieve invloed hebben op de elektroforetische scheiding.

PUBLIKATIE

- Dreven, F. van, Haan, L.A.M. de, Rijn, K. van en Kerssies A. (1995)
Snelle opsporingstechnieken geven schimmels minder kans. *Vakblad voor de bloemisterij*, 2, pp. 33.

LITERATUURLIJST

- Amsing, J.J. en Kerssies, A. (1992)
Meer duidelijkheid over wortelrot. *Gnomonia* en *Phytophthora* in roos onderzocht. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 32, pp. 26-29.
- Amsing, J.J., Kerssies, A. en Verberkt, H. (1991)
Duidelijk onderscheid tussen *Cylindrocladium* en *Phytophthora*. Onderzoek naar schimmels bij *Spathiphyllum*. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 29, pp. 46-48.
- Baayen, R.P. and Silfhout, C.H. (1992)
Fusarium oxysporum, a versatile fungus. In: *Annual report 1992 IPO-DLO*, pp. 9-23. Grafisch bedrijf Ponsen & Looijen B.V., Wageningen.
- Bateman, D.F. (1976)
Plant cell wall hydrolyses by pathogens. In: *Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships*, ed. J. Friend & D.R. Threlfall, pp. 79-113. Academic Press, New York.
- Benedettelli, S. and Hart, G.E. (1988)
Genetic analysis of Triticeae shikimate dehydrogenase. *Biochemical Genetics*, 26, pp. 287-301.
- Bonde, M.R., Micales, J.A. and Peterson, G.L. (1993)
The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. *Plant Disease*, 77, pp. 961-968.
- Bosland, P.W. and Williams, P.H. (1987)
An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.*, 65, pp. 2067-2073.
- Decker, L.E. and Rau, E.M. (1963)
Multiple forms of tamic-oxalacetic transaminase in tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, pp. 144-149.
- Esser, R. (1995)
Het zuiveren van α -esterase met behulp van vloeistof chromatografie. *Verslag van een op het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente (lokatie Aalmeer) uitgevoerde HLO-afstudeeropdracht*.
- Everink, J.T. (1991)
Ontwikkeling van een detectiemethode voor *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* en *dianthi* gebaseerd op polyacrylamidegel-elektroforese. *Rapport 142 van Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland*.
- Heukeshoven J. and Dernick R. (1986)
In: *Electrophoresis-Forum '86*, ed. B.J. Radola, pp. 22-27.
- Hucklesby, D.P. and Hageman, R.H. (1973)
A staining method for nitrate reductase on polyacrylamide gels after electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 56, pp. 591-592.

- Kerssies, A., Everink A. en van Telgen H.J. (1992)
Nieuwe toetsmethode *Fusarium oxysporum*. Snelle test voor cyclamen en anjers. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 33, pp. 46-47.
- Kerssies, A., Everink A., Hornstra L. and van Telgen H.J. (1994)
Electrophoretic detection method for *Fusarium oxysporum* species in Cyclamen and carnation by using isoenzymes. In: *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification*, ed. A. Schots, F.M. Dewey and R. Oliver, pp. 57-62. University Press, Cambridge.
- Koster, N. (1994)
Detectie en zuivering van een voor *Fusarium oxysporum* specifiek interactie-eiwit in Cyclamen. *Verslag van een op het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroenten (lokatie Aalmeer) uitgevoerde HLO-afstudeeropdracht*.
- Lisker, N. and Retig N. (1974)
Detection of polygalacturonase and pectin lyase isoenzymes in polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography*, 96, pp. 245-249.
- Maatsch, R. (1955)
Cyclamen. Paul Parey in Berlin und Hamburg.
- Mastropaolo, W. and Yourno J. (1981)
An ultraviolet spectrophotometric assay for α -naphthyl acetate and α -naphthyl butyrate esterases. *Analytical Biochemistry*, 115, pp. 188-193.
- Reddy, M.N. and Stahmann, M.A. (1972)
Isozyme patterns of *Fusarium* species and their significance in taxonomy. *Phytopath. Z.*, 74, pp. 115-125.
- Sato, M. and Hasegawa, M. (1976)
The latency of spanish chloroplast phenolase. *Phytochemistry*, 15, pp. 61-65.
- Scandalios, J.G. (1969)
Genetic control of multiple forms of enzymes in plants, a review. *Biochem. Genet.*, 3, pp. 37-79.
- Somé, A. and Tivoli, B. (1993)
Fusarium spp from potato: polymorphism of esterase phenotypes on polyacrylamide gel electrophoresis. *Agronomie*, 13, pp. 637-649.
- Stuber, C.W., Goodman, M.M. and Johnson, F.M. (1977)
Genetic control and racial variation of β -glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Biochem. Genet.*, 15, pp 383-394.
- Tanksley, S.D. and Rick, C.M. (1980)
Genetics of esterases in species of *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.*, 56, pp. 209-219.
- Wallner, S.F. and Walker, J.E. (1975)
Glycosidases in cell wall-degrading extracts of ripening tomato fruits. *Plant Physiol.*, 55, pp. 94-98.