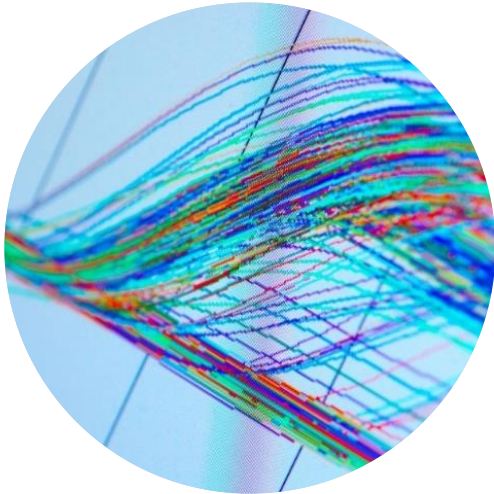


# Ontwikkelingen in Diagnostiek

KNPV 100 jaar Fytopathologie in Wageningen

16 november 2023, Anne van Diepeningen, [anne.vandiepeningen@wur.nl](mailto:anne.vandiepeningen@wur.nl)



# Stelling 1

*Fusarium solani* aantasting in Amaryllis

Hebben we diagnostiek nodig om vast te stellen dat dit Fusarium is?

- Ja/eens (staan)
- Nee/oneens (blijf zitten)



# Stelling 2

De enige goede diagnostiek onder alle omstandigheden is moleculaire diagnostiek

- Ja/eens (staan)
- Nee/oneens (blijf zitten)



# Inhoud

- Diagnostiek en Detectie
- Ontwikkelingen in detectiemethoden
- Handelingsperspectief
- Toekomst



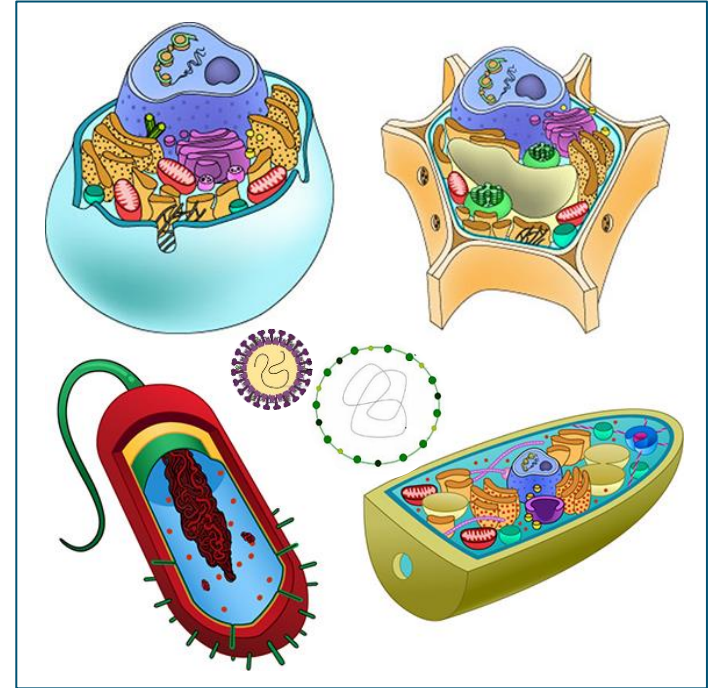
# Diagnostiek

- Verzamelen en interpreteren van informatie over [patiënt] met doel vast te stellen welke benoembare problemen bij de [patiënt] aanwezig zijn.
- ... is voorbehouden aan gekwalificeerde personen die zich beroepsmatig met [gezondheidszorg] bezig houden
- Detectie
- Behandeling



# Detectie-Diagnose

1. Verschijnselen in de plant
  2. Pathogene organisme
  3. Componenten
    - Eiwitten
    - DNA
    - Andere componenten
- >Moleculaire detectie



Dierlijke, plant-, bacterie- en schimmelcel and virus  
[www.askabiologist.asu.edu](http://www.askabiologist.asu.edu), fytoplasma  
(Saguez *et al.*, 2015)

# 1. Verschijnselen in de waardplant

- Visuele waarnemingen



Pieter Breughel sr.



Metropolitan Museum of Art



2x Wikipedia, American society of Phytopathology 7

# 1. Verschijnselen in de waardplant

- Visuele waarnemingen
- Niet altijd duidelijkheid pathoogeen of pathogenen
- Aspecifieke symptomen plant



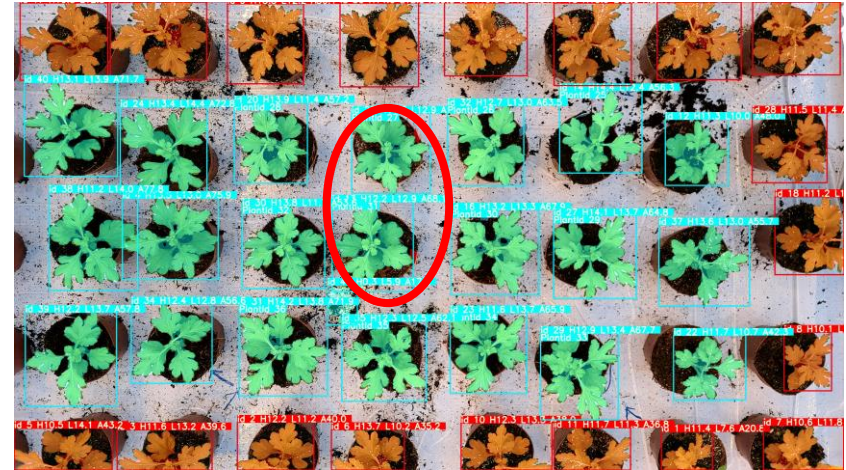
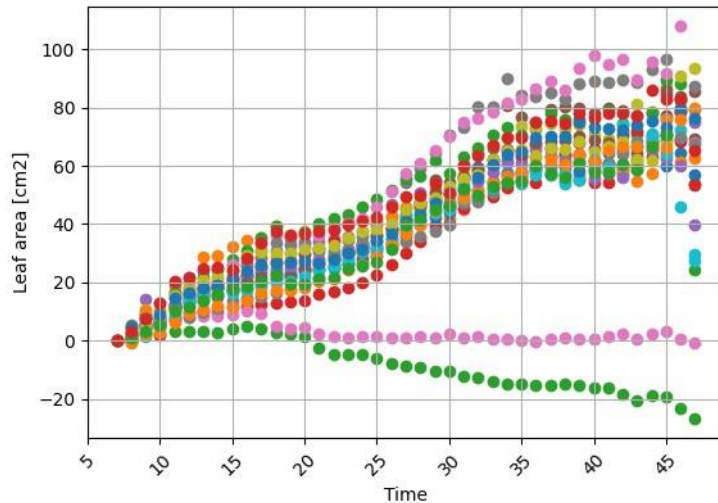


# 1. Verschijnselen in de plant

- Hoe sneller symptomen herkend worden, des te beter te beheersen

# 1. Verschijnselen in de plant

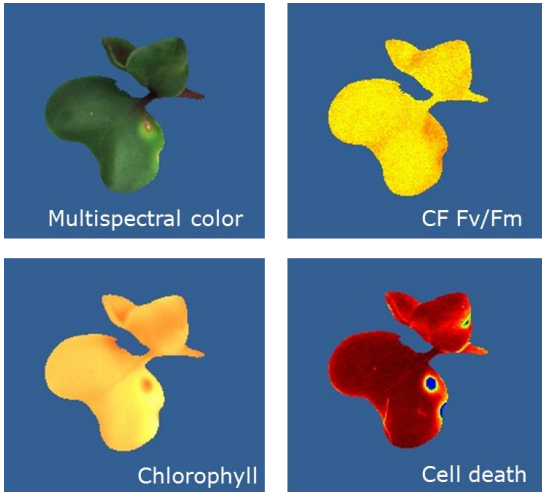
- Camera observatie, RGB 1h
- Chrysant + *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi*



LNV Kennisimpuls groene gewasbescherming  
casus potplanten  
Bart van Marrewijk & Jos Ruizendaal

# 1. Verschijnselen in de plant

- *Spectral Imaging*



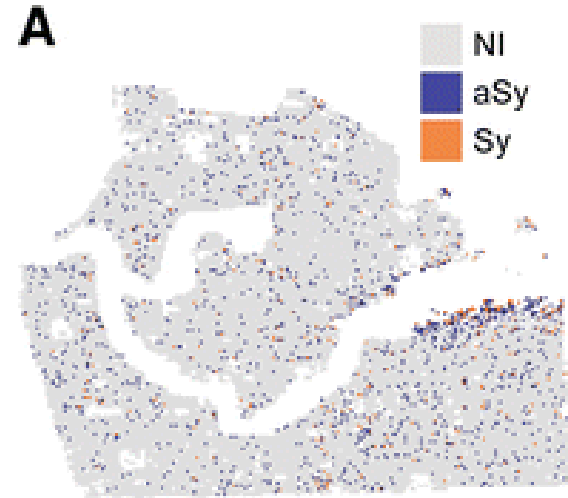
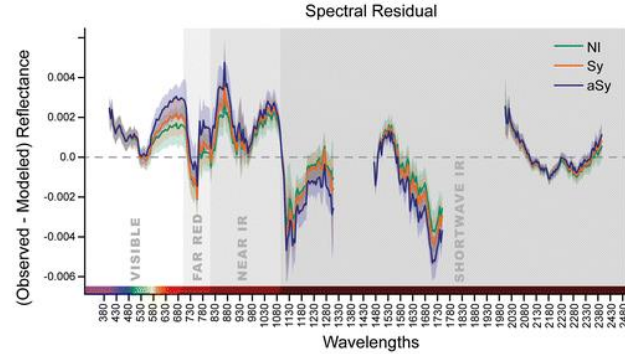
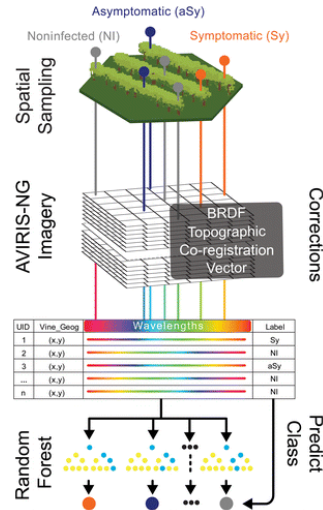
- Mobiele detectie -> wagens, drones...



[www.npec.nl](http://www.npec.nl)

# 1. Verschijnselen in de plant

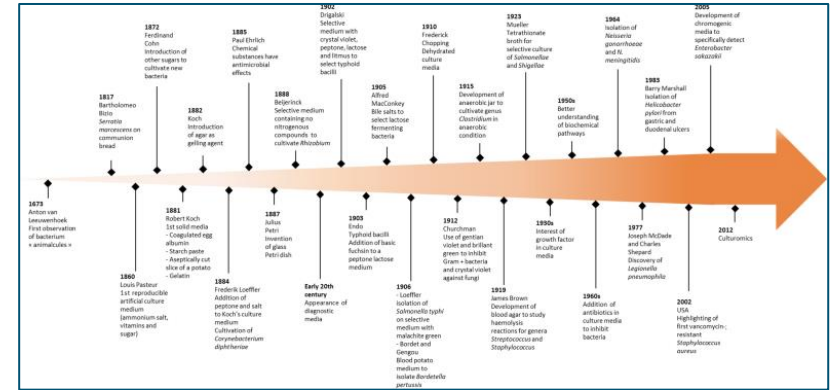
## ■ Satelliet beelden



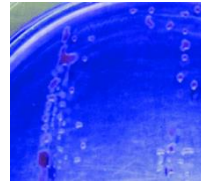
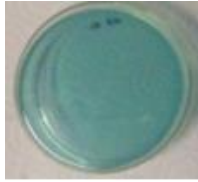


# 2. Detectie pathogene organismen

- Vloeibaar medium, Pasteur 1860
- Vast medium, Koch 1881
- -> Selectieve media

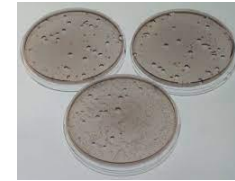
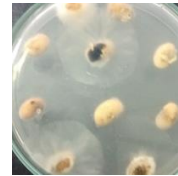


Komada, 1976:  
*Fusarium*  
e.a. media met  
bijv. Rose Bengal >



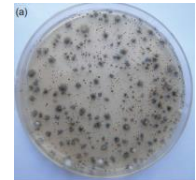
SMSA,  
Elphinstone et al.,  
1996:  
*Ralstonia*

V8A +PARP  
*Pythium*



CVP  
Bdliyaie et al., 2004:  
*Pectobacterium* e.a.

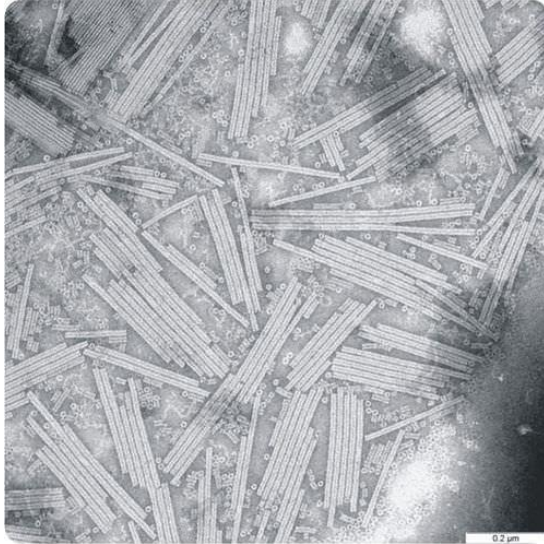
Mansoori, 2011;  
*Verticillium*



Bonnet et al., 2020

## 2. Detectie pathogene organismen

- (Electronen) Microscopie



TMV

Kristallisatie 1935 Stanley

EM 1939 Kausche, Pfankuch & Ruska

Fytoplasmas 1967

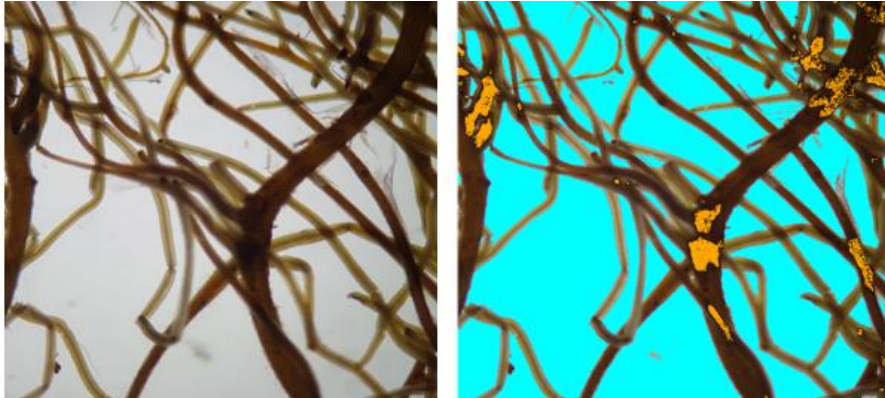


Museum Imperial Collections



# 2. Detectie pathogene organismen

## ■ Visualisatie van het pathogeen



Petra van der Goes & Willemijn Steijsiger  
Plant Quality Solutions



<p><b>1. Sporen</b></p> <p>Bij infectie van de wortel groeien de kiemende schimmelsporen naar en rondom de wortel van de plant.</p>  <p>* kiemende <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>eustomae</i> sporen</p> <p>In een zwaar besmette grond vinden we rondom de wortel honderden sporen per cm<sup>3</sup> grond of meer.</p> <p>De meeste sporen zitten in de bovenste lagen grond. Maar op 60-80 cm diepte zitten nog steeds tientallen sporen/ cm<sup>3</sup> grond.</p>	<p><b>2. Infectie wortel</b></p> <p>Fusarium groeit naar de wortel onder invloed van stoffen die de plant uitscheidt in de bodem.</p>  <p>* myceliumgroei rondom de wortel</p> <p>De schimmel moet nu door de epidermis, de buitenste laag van de wortel heendringen.</p> <p>Beschadigingen van de wortel maken het de schimmel makkelijker om binnen te dringen.</p>	<p><b>3. Groei in grondweefsel wortel</b></p> <p>Zodra de schimmel de plant is binnengedrongen begint de groei tussen de cellen van het grondweefsel (buitenrand van de wortel, rondom de vaatbundel).</p>  <p>* groei in het grondweefsel van een wortel, lengtedoorsnede.</p> <p>Terwijl de schimmelgroei zich in de wortel verder verspreidt, dringt de schimmel steeds meer plantencellen binnen en sterven deze af.</p>	<p><b>4. Verspreiding via vaatweefsel</b></p> <p>Als de schimmel door de beschermende endodermis rondom de vaatbundels weet heen te dringen, volgt een snelle verspreiding door de rest van de plant.</p>  <p>* opwaartse groei in de vaatbundel.</p> <p>Stengel en bovengrondse plantendelen kunnen nu geïnfecteerd worden. De vaatbundel verkleurt roodbruin en verwelking treedt op (foto boven).</p>	<p><b>5. Sporenvorming</b></p> <p>In en op de door de schimmel begroeide plantendelen worden zowel onder- als bovengronds grote hoeveelheden sporen gevormd. Dikwandige chlamydosporen kunnen lang overleven in de grond.</p>  <p>* chlamydospore en conidiosporen</p> <p>Duizenden een- of meercellige conidiosporen worden aan de buitenkant van de plant gevormd. Klaar voor verspreiding.</p>
--	--	---	---	--

Anne van Diepeningen en Marta Streminska, WUR 2021

PPS Masterplan Fusarium  
WUR

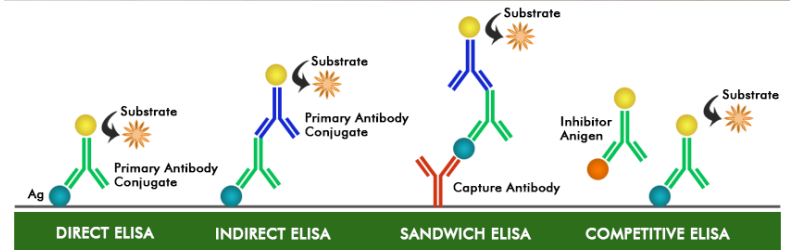
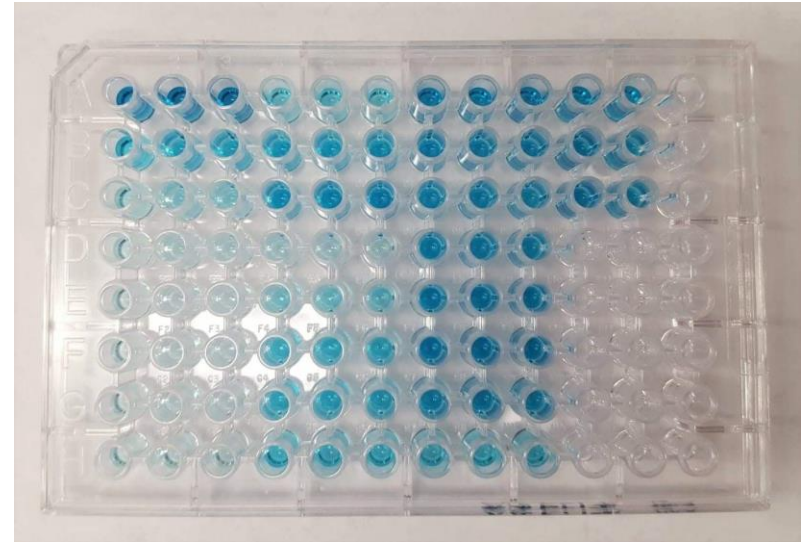


# 3. Moleculaire Detectie

Antilichamen

Tegen allerhande celcomponenten

- Behring & Litasato 1890 isolatie
- Ehrlich 1900 *-side chain theory*
- Flocculatie/precipitatie-testen
- Engvall & Perlmann 1971 ELISA

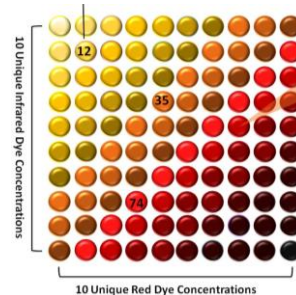
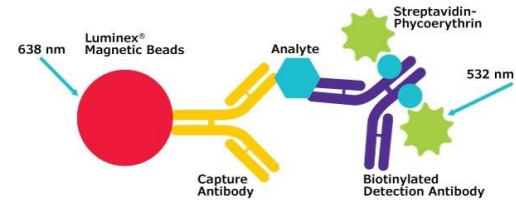


# 3. Moleculaire Detectie

Antilichamen

Tegen allerhande celcomponenten

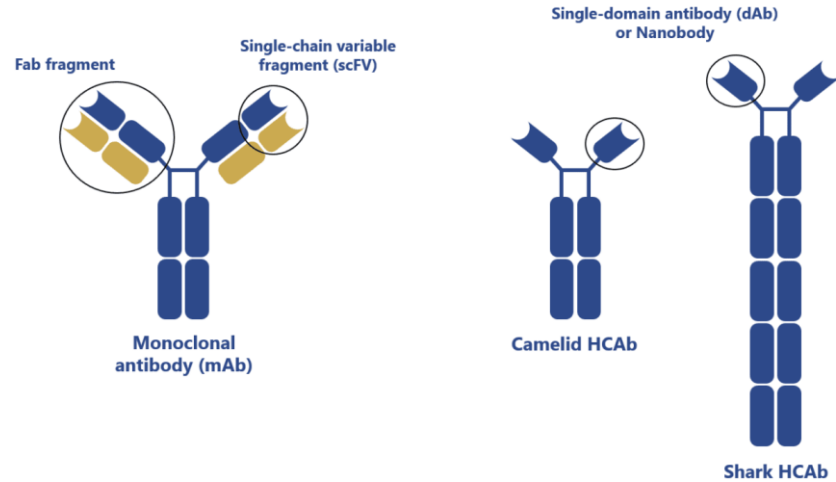
- Lateral flow devices
- Multiplex - Luminex X-map



# 3. Moleculaire Detectie

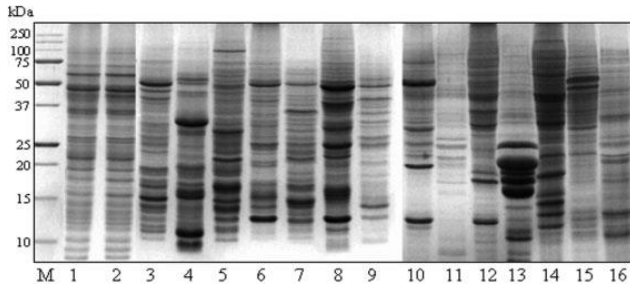
## Antilichamen

- Nu antilichamen kameelachtigen

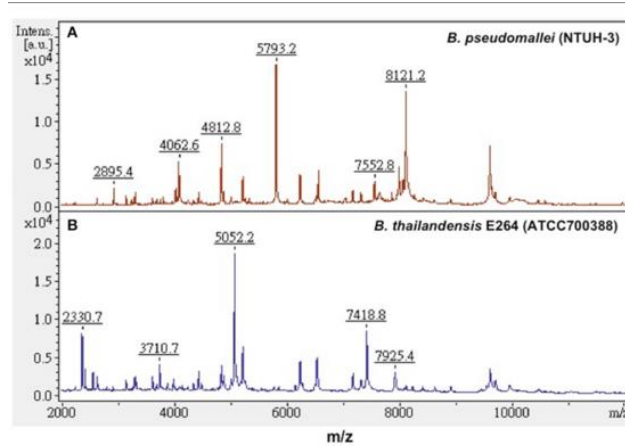


# 3. Moleculaire detectie

## ■ Op eiwitten



Eiwit gel electroforese



Database

Maldi-tof:  
matrix assisted laser  
desorption/ionisation – time of flight

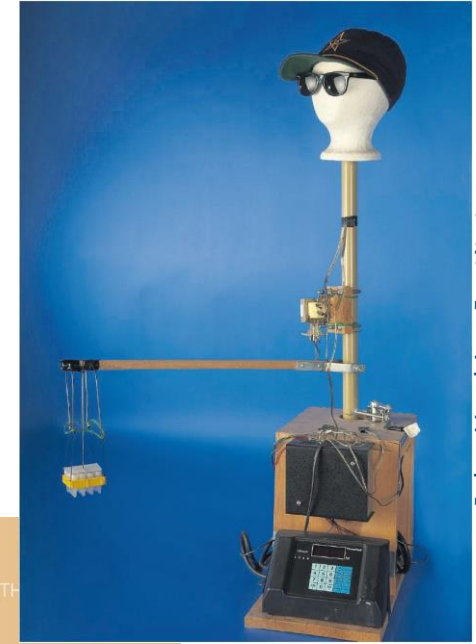
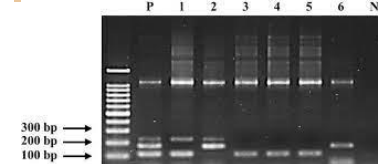
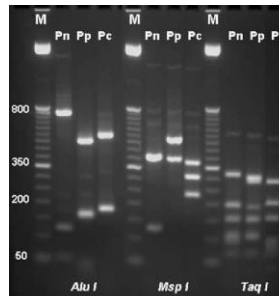


ms/ms ... → sequentiedatabase

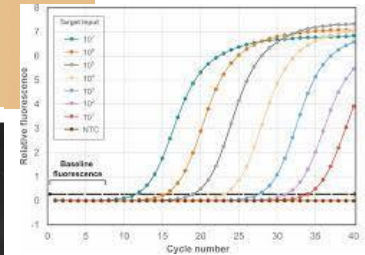
# 3. Moleculaire detectie

## DNA

- Miescher DNA 1869
- Watson & Crick Dubbele helix 1953
- Kary Mullis PCR 1980s
- PCR-> real time PCR



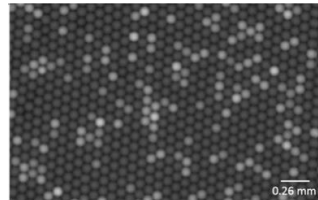
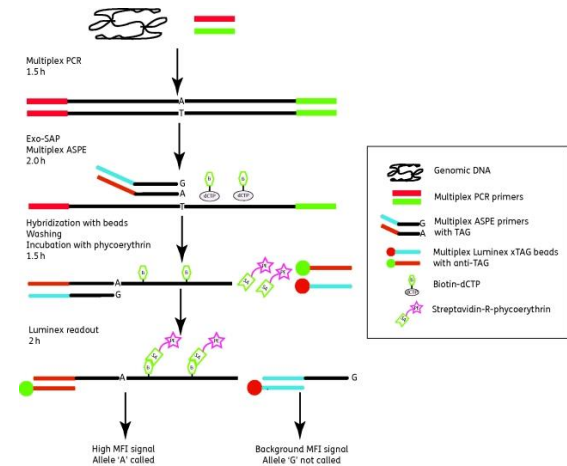
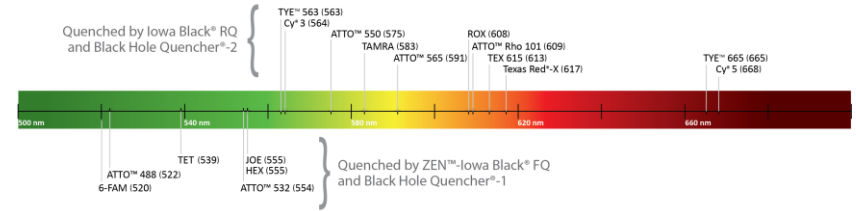
John Hopkins Institute  
foto Smithsonian Institute



# 3. Moleculaire detectie

## DNA

- RNA - RT-PCR
- qPCR Single/simplex - > multiplex
- Luminex – X tag
- Steeds kleinere volumina
- Steeds sneller

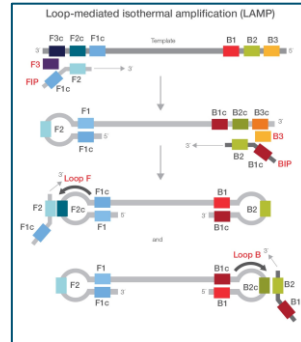


# 3. Moleculaire detectie

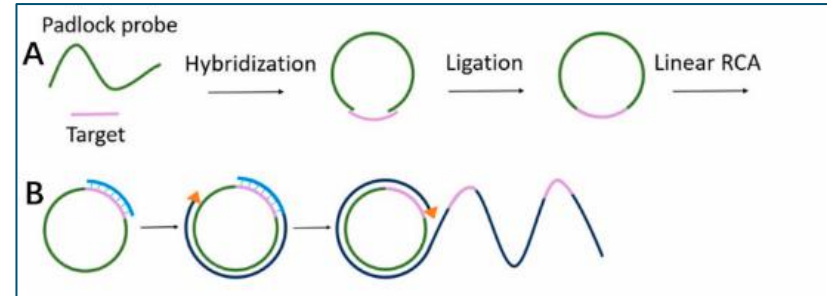
## DNA

- Isothermale vermeerdering

### LAMP



### RCA

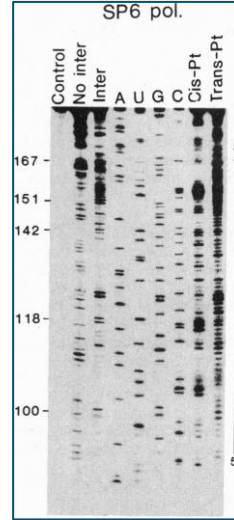


- Hybridisatie, CRISPR-Cas

# 3. Moleculaire detectie

## DNA (RNA) sequencing

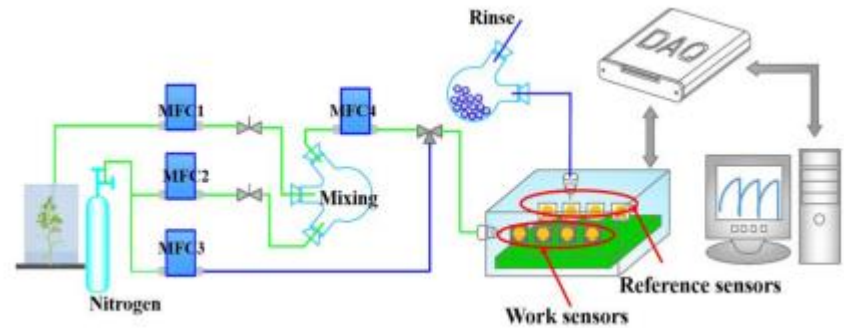
- Verbetering apparatuur
- Minion
- Steeds meer data  
pathogeen -> metagenoom
- Steeds betere databases





# 3. Moleculaire detectie

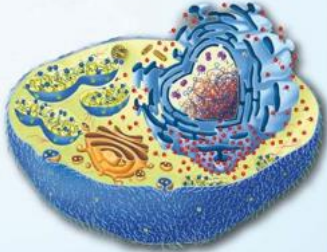
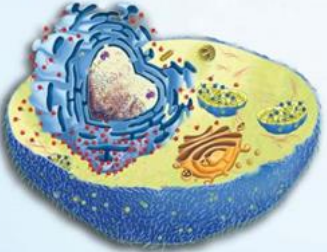
- Biosensors - Volatiles - (Electronische) neus

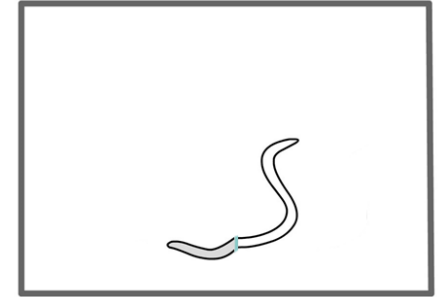


Cui *et al.*, 2018

# 3. Moleculaire detectie

## ■ Dood of levend

	<u>Levend</u>	<u>Dood</u>
<u>Processen</u>		
<u>Metabolisme</u>	+ to +++	-
<u>Membraan Integriteit</u>	+	-
<u>DNA</u>	+	+
<u>mRNA</u>	+	± / -
<u>Mitochondriën</u>	Actief, veel kopieën	± / -
<u>(Specifiek) mRNA</u>	Huishoudgenen & levensstadium specifieke genen	± / -



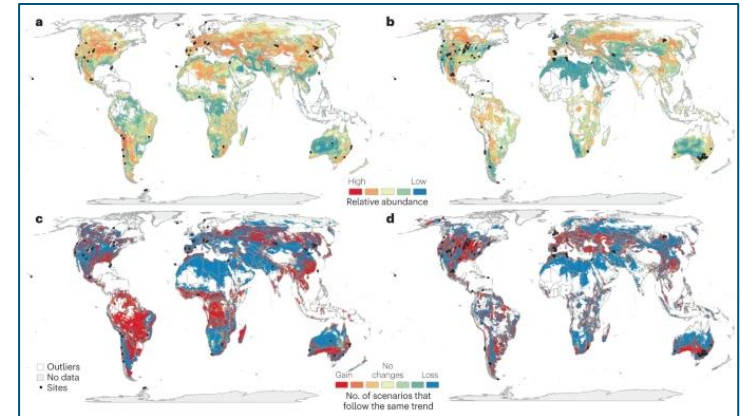
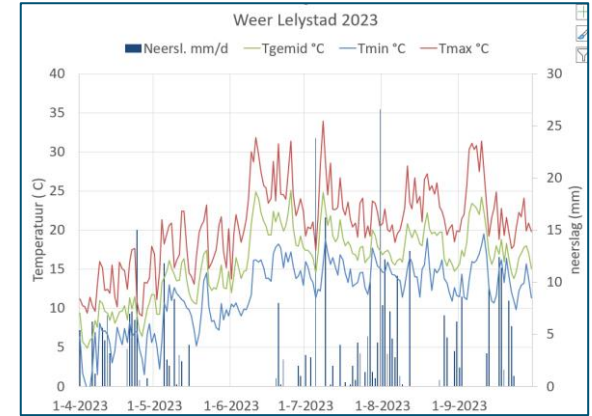
- Kweekstap (selectief medium)
- Living/dead dyes binding aan DNA
- Specifieke primers - intron

# Handelingsperspectief

- Drempelwaardes
- Beslissingsondersteunende tools
- Alternatieve teelt, alternatieve rotaties
- Epidemiologie - Hygiëne
- Resistente cultivars
- (Preventieve) inzet (duurzame) middelen

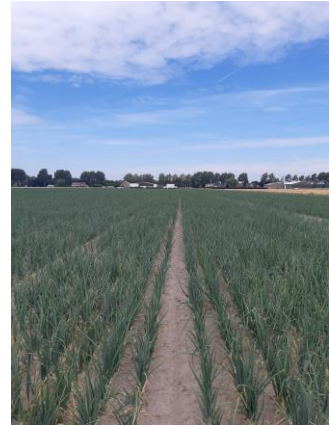
# Toekomstige praktijk

- Klimaatverandering
- Migratie en evolutie van 'nieuwe' pathogenen
- Veranderend middelenpakket
- Curatief -> Preventieve inzet



# Toekomstige praktijk voor diagnostiek+

- Meer inzet gerichte detectie gelinkt aan handelingsperspectieven
- Enkelvoudige -> meervoudige detectie van pathogenen
- Combinatie van detectiemethoden & monsternamen
- Gevoeligere, kwantitatieve detectie levende pathogenen
- Meer gedetailleerde detectie, bijvoorbeeld ook resistenties, toxines



# Stelling 1 - opnieuw

*Fusarium solani* aantasting in Amaryllis

Hebben we diagnostiek nodig om vast te stellen dat dit Fusarium is?

- Ja/eens (staan)- 3 pathogenen-handelingsperspectief: hygiëne, remmende (preventieve) middelen
- Nee (zitten)- nee geen curatieve middelen over- gooi maar weg



# Stelling 2

De enige goede diagnostiek onder alle omstandigheden is moleculaire diagnostiek

- Ja/eens (staan)
- Nee/oneens (blijf zitten)



# Met dank aan

- BU Biointeracties en plantgezondheid



- Collega's BU Glastuinbouw en Bollen en BU Open teelten



- PPS Levend of Dood, PPS Masterplan Fusarium, PPS Masterplan Verticillium, PPS Uireka (2), PPS Biorationals

- (excuses aan alle andere fantastische collega's hier niet getoond)



# Dank u voor uw aandacht

- Zijn er nog vragen?
- <https://soundcloud.com/plant-pathology-wur>

