

GREEN LEAF VOLATILES, WHAT MAKES THEM TOXIC, WHAT MAKES THEM EFFECTIVE

Aantal woorden: 18.875

Bianca Meuninck

Stamnummer: 01509512

Promotor: Prof. Dr. Ir. Kris Audenaert

Co-promotor: Dr. Ir. Maarten Ameye

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2018 - 2019

GREEN LEAF VOLATILES, WHAT MAKES THEM TOXIC, WHAT MAKES THEM EFFECTIVE

Aantal woorden: 18.875

Bianca Meuninck

Stamnummer: 01509512

Promotor: Prof. Dr. Ir. Kris Audenaert

Co-promotor: Dr. Ir. Maarten Ameye

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2018 - 2019



Auteursrechtelijke bescherming

De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de scriptie te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

The author and the promotor give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this thesis.

23/05/2019

Auteur

Bianca Meuninck

Promotor

Prof. Dr. Ir. Kris Audenaert

Co-promotor

Dr. Ir. Maarten Ameye

“Sola dosis facit venenum”

Latijn: De dosis maakt het vergif

~ Paracelsus (1493–1541) ~

Voorwoord

De verandering van het gewasbeschermingsbeleid vormt de basis van deze masterproef. Deze is er gekomen door het duurzaam denken en innoverend vermogen van de mens. Een academisch veel onderzochte techniek van alternatieve gewasbescherming is het primen van planten met volatiele groene bladcomponenten (Eng. Green Leaf Volatiles). In deze thesis wordt eerst een overzicht gegeven over het gebruik van gewasbescherming, waarna dieper wordt ingegaan op het plantendefensiemechanisme en volatiele groene bladcomponenten. Tijdens de praktijkstudie wordt nagegaan wat de fytotoxische concentratie van Z-3-hexenyl acetaat (Z-3-HAC), een volatiel groene bladcomponent, is. Daarnaast zal ook gezocht worden naar de oorsprong van deze schade en de pathways die hierbij geactiveerd worden.

Ik heb voor dit onderwerp gekozen, omdat plantenonderzoek mij erg interesseert. Een tewerkstelling in deze sector zou ik dan ook absoluut niet afslaan. Tijdens het schrijven van deze masterproef verbaasde het me iedere keer opnieuw hoe goed planten zich hebben ontwikkeld om indringers af te schudden. In het begin zag ik het bos door de bomen niet, omdat er zoveel verschillende pathways betrokken zijn bij het plantdefensiemechanisme. Door me erin te verdiepen, vielen uiteindelijk alle puzzelstukjes in mekaar.

Bij deze zou ik graag mijn promotor Prof. dr. Ir. Kris Audenaert willen bedanken voor het meerdere keren nalezen van deze masterproef en het geven van goede tips. Ook mijn co-promotor dr. Ir. Maarten Ameye verdient veel dank. Hij stond me bij met raad en daad tijdens mijn praktische proeven. Bij hem kon ik terecht met al mijn vragen. Ook las hij enkele keren dit volledige werk na, waarna hij uitgebreide feedback gaf. Zonder hun medewerking had ik deze thesis nooit tot een goed einde kunnen brengen.

Tevens wil ik alle medewerkers van het laboratorium *LAMP* bedanken. Gedurende de hele experimentele periode leerde ik iedereen beter kennen en kon ik altijd bij hen terecht met vragen over bepaalde experimenten en toestellen. In het bijzonder wil ik Jiang Tan bedanken. Hij deed zijn uiterste best om de praktische kant van RT-qPCR uit de doeken te doen. Hij wees aan waarop ik moest letten en waar het eventueel fout kon gelopen zijn tijdens een vorig experiment.

Tot slot wil ik ook mijn ouders, zus en vrienden bedanken. Van hen mocht ik wijze raad ontvangen. Hun motiverende woorden hebben me geholpen om te blijven verdergaan, ook na een tegenslag. Mede dankzij hen heb ik deze masterproef tot een goed einde gebracht.

Bianca Meuninck
Poeke, 21 april 2019

Abstract

Door de klimaatsverandering, de toenemende bevolkingsgroei en de veranderende perceptie van de mens ten opzichte van de huidige chemische beschermingsmiddelen wordt al langer ingezet op onderzoek naar duurzamere oplossingen voor gewasbescherming.

Z-3-HAC is een Green Leaf Volatile (GLV) dat vrijgesteld wordt wanneer een plant in contact komt met een pathoog/plaag of mechanische schade ondervindt. Er werd reeds onderzocht of deze component kan gebruikt worden om planten te primen. Echter het mechanisme waarop deze mode-of-action steunt, is nog niet helemaal duidelijk. Het doel van deze masterproef bestaat erin dit mechanisme te ontrafelen en te achterhalen wat precies de fytoxische reactie veroorzaakt. Om dit volledig in kaart te kunnen brengen, wordt de kieming en groei van tarwe en tomaat geanalyseerd. Ook wordt gebruik gemaakt van de PathoViewer die via multispectraal beelden de planten kunnen fenotyperen. Daarnaast worden diaminobenzidine (DAB) -kleuringen uitgevoerd om H₂O₂ zichtbaar te maken. Bovendien zullen de uitgevoerde enzymtesten en een RT-qPCR (Reverse transcription real-time polymerase chain reaction) meer inzicht kunnen geven in de mogelijke betrokkenheid van reactieve zuurstofcomponenten (Eng. Reactive Oxygen Species, ROS).

Na het analyseren van de bekomen resultaten van de praktijkstudie blijkt dat er een fytoxisch effect bestaat van Z-3-HAC op tarwe en tomaat. Dit effect is afhankelijk van de concentratie aan Z-3-HAC, maar ook van het groeistadium van de plant. Uit onderzoek blijkt dat een hoge concentratie aan Z-3-HAC een negatieve werking had op de kieming. Er kon geen impact aangetoond worden op de groeisnelheid, maar dit resultaat is slechts geldig voor lagere concentraties. Deze informatie kan meegenomen worden bij de commercialisatie van het product. Het in werking treden van het geïnduceerde afweersysteem met een stijging in expressie van de genen die coderen voor ROS-productie ligt aan de oorzaak van deze nevenwerkingen. Pas daarna worden de enzymen die de ROS-verwijderingsreacties katalyseren, geactiveerd.

Kernwoorden: *Groene Blad Volatielen, Z-3-hexenyl acetaat, primen, fytoxiciteit, werkingsmechanisme.*

Abstract

Because of the climate change, the increasing population and the changing perception with regard to current chemical crop protection products, research into more sustainable solutions for crop protection has been gained interest.

Z-3-hexenyl acetate (Z-3-HAC) is a Green Leaf Volatile (GLV) which is released when a plant encounters a pathogen/pest or suffers from mechanical damage. There has been done a lot of research whether this component can be used to prime plants. However, the mechanism on which this mode-of-action is based, is not entirely clear yet. The aim of this master's thesis is to unravel this mechanism and to find out what exactly causes the phytotoxic reaction. In order to fully elucidate this, the germination and growth of wheat and tomato is analysed. Also, the PathoViewer is used to capture multispectral imaging used for phenotyping. Diaminobenzidine (DAB) staining is performed to make H₂O₂ visible. Furthermore, enzyme tests and a RT-qPCR (Reverse transcription real-time polymerase chain-reaction) were performed to gain more insight into the possible involvement of reactive oxygen species (ROS).

After analysing the results of the experimental work, it appears that there exists a phytotoxic effect of Z-3-HAC on wheat and tomato. This effect depends on the concentration of Z-3-HAC, but also on the growth stage of the plant. Research shows that a high concentration of Z-3-HAC had a negative effect on germination. No impact could be shown on the rate of growth, but this result is only valid for lower concentrations. This information can be used for the commercialisation of the product. The activation of the induced immune system with an increase in expression of the genes coding for ROS production underlies these side-effects. Subsequently, the enzymes that catalyse the ROS removal reactions are activated.

Keywords: *Green Leaf Volatiles, Z-3-hexenyl acetate, to prime, phytotoxicity, mode-of-action.*

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	V
Inleiding	1
1 Literatuurstudie	4
1.1 Evolutie van de gebruikte gewasbeschermingsmiddelen	4
1.1.1 Chemische gewasbescherming en de veranderende perceptie	5
1.1.2 Biologische gewasbescherming blijkt toch niet zo duurzaam te zijn	6
1.1.3 Geïntegreerde gewasbescherming biedt een oplossing	8
1.2 Duurzamere land- en tuinbouw	10
1.2.1 Het gebruik van door de natuur uitgescheiden vluchtige componenten	10
1.2.2 De voor- en nadelen van primen	12
1.3 Een strenger wetgevend kader	14
1.4 Mechanisme van plantendefensie tegen plagen, pathogenen en mechanische schade	15
1.4.1 De activatie van het induceerbare afweersysteem	16
1.4.2 ROS-productie: een tweesnijdend zwaard	19
1.5 GLV's van naderbij bekeken	23
1.5.1 De functies van GLV's	23
1.5.2 De biosyntheseroute van GLV's	24
2 Probleem- en doelstelling	26
3 Materiaal en methoden	27
3.1 Plantmateriaal en proefopzet	27
3.2 Kiemtest	28
3.3 Fytotoxiciteitstest	29
3.4 Pathoviewer: multispectrale beeldvorming	30
3.5 DAB-kleuring en lichtmicroscopie	32
3.6 Enzymtesten	33
3.6.1 Superoxide Dismutase Assay Kit	34
3.6.2 Catalase Assay Kit	35
3.6.3 Phenolic Compounds Assay Kit	36
3.6.4 Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit	37
3.7 RNA extractie en RT-qPCR	38

4	Resultaten en bespreking	40
4.1	<i>Kiemtest</i>	40
4.2	<i>Fytotoxiciteitstest</i>	41
4.3	<i>Multispectraal beelden: PathoViewer</i>	46
4.4	<i>DAB-kleuring en lichtmicroscopie</i>	50
4.5	<i>Enzymtesten</i>	52
4.6	<i>RT-qPCR</i>	53
5	Algemene discussie	56
6	Besluit	62
	Bibliografie	65
	Bijlagen	I

Lijst met afkortingen

<i>Afkorting</i>	<i>Engelse betekenis</i>	<i>Nederlandse betekenis</i>
AAT	Alcohol acyltransferase	Alcohol acyltransferase
ADH	Alcohol dehydrogenase	Alcohol dehydrogenase
AOS	Allene oxide synthase	Alleenoxidesynthase
AOX	Alternative oxidase	Alternatieve oxidase
APX	Ascorbate peroxidase	Ascorbaat peroxidase
ARI	Aflatoxin Risk Index	Aflatoxine risico-index
Asc	Ascorbate	Ascorbaat
Avr-factor	Avirulence factor	Avirulentiefactor
BABA	β -Aminobutyric acid	β -Aminoboterzuur
BHT	Butylated hydroxytoluene	Gebutyleerd hydroxytoulleen
BTH	Benzothiadiazole	Benzothiadiazool
CAT	Catalase	Catalase
CCD	Charge-Coupled Devices	Ladinggekoppelde Component
CDC	Cell Division Control Protein	Celdelingscontroleproteïne
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	Complementair desoxyribonucleïnezuur
CDPK	Calcium Dependent Protein Kinase	Calcium-afhankelijk proteïnekinase
CK	Cytokinin	Cytokinine
Cu/ZnSOD	Copper/zinc-containing superoxide dismutase	Koper/zink-bevattende superoxide dismutase
DAB	Diaminobenzidine	Diaminobenzidine
DAG	Day(s) after germination	Dag(en) na kieming
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern	Schade-geassocieerd moleculair patroon
DAS	Day(s) after sowing	Dag(en) na zaaien
ddH ₂ O	Double-distilled water	Dubbel gedestilleerd water
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane	Dichloordifenyltrichloroethaan
DES	Divinyl ether synthase	Divinylether synthase
DHA(R)	Dehydroascorbate (Reductase)	Dehydroascorbaat (reductase)
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	Complementair desoxyribonucleïnezuur
DNOC	Dinitro-ortho-cresol	Dinitro-ortho-cresol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EF	Helix E-loop-helix F	Helix E-lus-helix F

<i>Afkorting</i>	<i>Engelse betekenis</i>	<i>Nederlandse betekenis</i>
EFN	Extrafloral nectar	Extrafloraal nectar
ET	Ethylene	Ethyleen
ETI	Effector Triggered Immunity	Effector-getriggerde immuniteit
ETS	Effector Triggered Susceptibility	Effector-getriggerde gevoeligheid
F ₀	Minimum fluorescence	Minimale fluorescentie
FeSOD	Iron-containing superoxide dismutase	Ijzer-bevattende superoxide dismutase
F _M	Maximum fluorescence	Maximale fluorescentie
F _V	Variable fluorescence	Variabele fluorescentie
GC	Gas Chromatography	Gaschromatografie
GLV	Green Leaf Volatile	Groene vluchtige bladcomponenten
GPX	Glutathione Peroxidase	Glutathionperoxidase
GR	Glutathione Reductase	Glutathionreductase
GSH	Glutathione	Glutathion
GSSG	Glutathione disulfide	Glutathiondisulfide
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosinetrifosfaat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine- ethaansulfonzuur
HIPV	Herbivore induced plant volatiles	Herbivoorgeïnduceerde plantvolatielen
HPL	Hydroperoxide lyase	Hydroperoxide lyase
HPODE	Hydroperoxy-octadecadienoic acid	Hydroperoxy-octadecadiëenzuur
HPOTE	Hydroperoxy-octadecatrienoic acid	Hydroperoxy-octadecatrienoïnezuur
HR	Hypersensitive response	Overgevoelighedsreactie
IF	(3Z):(2Z)-enol isomerase	(3Z):(2Z)-enol isomerase
IPM	Integrated Pest Management	Geïntegreerde gewasbescherming
IR	Induced resistance	Geïnduceerde resistentie
JA	Jasmonic acid	Jasmonzuur
LOX	Lipoxygenase	Lipoxygenase
MAMP	Microbe Associated Molecular Pattern	Microbe-geassocieerd moleculair patroon
MDA	Malondialdehyde	Malondialdehyde
MDAR	Monodehydroascorbate Reductase	Monodehydroascorbaat reductase
MeJa	Methyl jasmonate	Methyljasmonaat
MnSOD	Manganese-containing superoxide dismutase	Mangaan-bevattende superoxide dismutase

<i>Afkorting</i>	<i>Engelse betekenis</i>	<i>Nederlandse betekenis</i>
MS	Murashige and Skoog	-
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamide-adenine-dinucleotide-fosfaat
NB-LRR	Nucleotide binding domain leucine rich repeat	Nucleotide bindend leucine-rijke herhaling
ND	Not determined	Niet gedetermineerd
NO	Nitric oxide	Stikstofoxide
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern	Pathogeen-geassocieerd moleculair patroon
POX	Peroxygenase	Peroxygenase
PR	Pathogenesis related	Pathogenese gerelateerd
PRR	Pattern Recognition Receptor	Patroon herkenningsreceptor
PRT-MS	Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry	Proton-transferreactie-massaspectrometrie
PSII	Photosystem II	Fotosysteem II
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Polytetrafluorethyleen
PTI	Pattern Triggered Immunity	Patroon-getriggerde immuniteit
Rboh	Respiratory burst oxydase homolog	Respiratoire oxidase uitbarstingshomoloog
R-gen	Resistance gene	Resistentiegen
RGB	Red-Green-Blue	Rood-Groen-Blauw
RNA	Ribonucleic Acid	Ribonucleïnezuur
ROI	Region of Interest	Interessegebied
ROS	Reactive Oxygen Species	Reactieve zuurstofsoorten
RT-qPCR	Reverse transcription real-time polymerase chain reaction	Omgekeerde transcriptie polymerase kettingreactie in real time
SA	Salicylic acid	Salicylzuur
SIFT-MS	Selected-Ion Flow-Tube Mass Spectrometry	Massaspectrometrie met geselecteerde ionenstromingsbuis
SOD	Superoxide dismutase	Superoxide dismutase
Ta	Wheat (Latijn: <i>Triticum aestivum</i>)	Tarwe
UV	Ultraviolet	Ultraviolet
VOC	Volatile organic compound	Vluchtige organische component
XOD	Xanthine oxidase	Xanthine oxidase
Z-3-HAC	Z-3-hexenyl acetate	Z-3-hexenyl acetaat

Inleiding

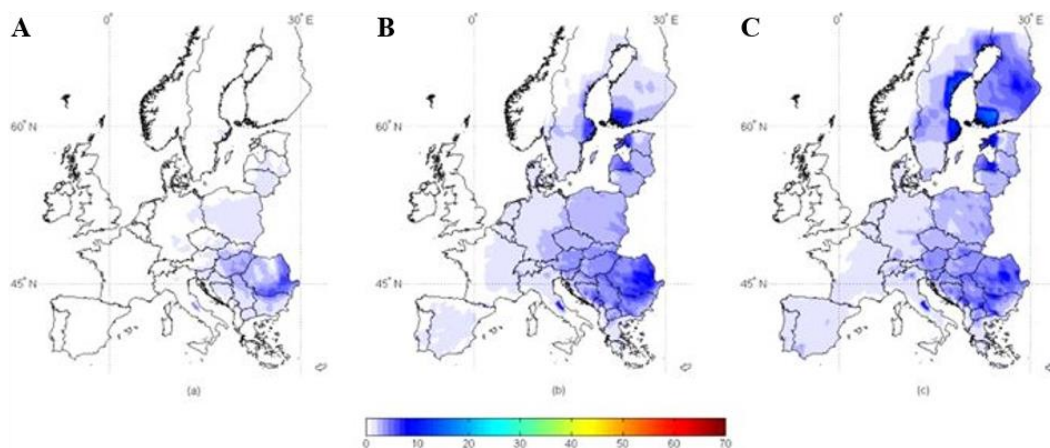
Plantenziekten en plagen zijn van alle tijden en hebben in de geschiedenis al tal van epidemieën veroorzaakt, denk maar aan de aardappelplaag die in 1845 vooral in Ierland een grote impact had op de samenleving. In juni van dat jaar was de plaag voor het eerst te zien in België. Met een razende snelheid verspreidde deze zich over heel West-Europa. Midden oktober had ze Ierland bereikt, een land waar vele arme bevolkingsgroepen voor hun dagelijkse voedsel enkel konden rekenen op de opbrengst van de aardappelteelt. Doordat deze plaag de hele oogst vernietigde, brak hier een hongersnood uit, de ‘Great Irish Famine’ genaamd. Er vielen honderdduizenden slachtoffers en meer dan een miljoen mensen emigreerden naar Amerika. Op dat moment was nog niet gekend dat deze plaag werd veroorzaakt door de oömyceet *Phytophthora infestans*. Het was dankzij M. J. Berkeley in 1946 dat deze ontdekking nieuw licht op de zaak wierp en dit bijna 20 jaar voordat Louis Pasteur de Kiemtheorie van ziektes achterhaalde (Fry, 2008; Birch & Cooke, 2013; Lugtenberg, 2014).

Plantenziekten verwekkers kregen in het verleden alsmaar meer de kans om zich te verspreiden. Door het domesticeren van plantensoorten en het continu selecteren op gewenste eigenschappen, zoals een hoge opbrengst, verdween de variabiliteit binnen een soort en dit ten koste van de resistentie tegen plagen en ziektes (Mitchell *et al.*, 2016). Ook werden gewassen vaker gekweekt in monocultuur, waardoor de ziektes die bijvoorbeeld het jaar ervoor tarwe hadden aangetast, het volgend jaar opnieuw dat perceel tarwe konden aantasten. Door de mondialisering werden gewassoorten meegenomen naar andere gebieden om ze daar te verbouwen. Deze soorten waren echter niet aangepast aan de lokale ziekten, plagen en onkruiden, waardoor ze toen en nu nog steeds een zwak concurrerend vermogen hebben (Loomans, 2000). De vroegere onwetendheid over de werking van het plantdefensiemechanisme ligt aan de oorzaak van dit alles.

De chemische gewasbeschermingsmiddelen deden hun intrede pas in de recente geschiedenis, omdat voordien de ziekteverwekkers van plantenziekten nog niet gekend waren. Rond het begin van vorige eeuw kwamen de eerste chemische bestrijdingsmiddelen op de markt, waarvan het insecticide DDT (dichloordifenyltrichloroethaan) en het herbicide DNOC (dinitro-ortho-cresol) twee voorbeelden zijn. In het begin werd weinig aandacht besteed aan de veiligheid van deze bestrijdingsmiddelen voor mens en milieu. Later kwam dit besef echter wel en door het oprukken van resistente stammen kreeg de ontwikkeling van alternatieven alsmaar meer de aandacht (Hollander, 2012). Het zoeken naar betere alternatieve bestrijdingsmiddelen of het geïntegreerd duurzaam gebruik van bestaande middelen is daarom een belangrijke onderzoeksdiscipline binnen de landbouw geworden. Het aantal actieve ingrediënten is immers beperkt en de combinatie van ‘een sterke impact op het target organisme en geen nevenschade voor andere organismen’ is niet makkelijk te vinden. Bovendien heeft het agro-ecosysteem te

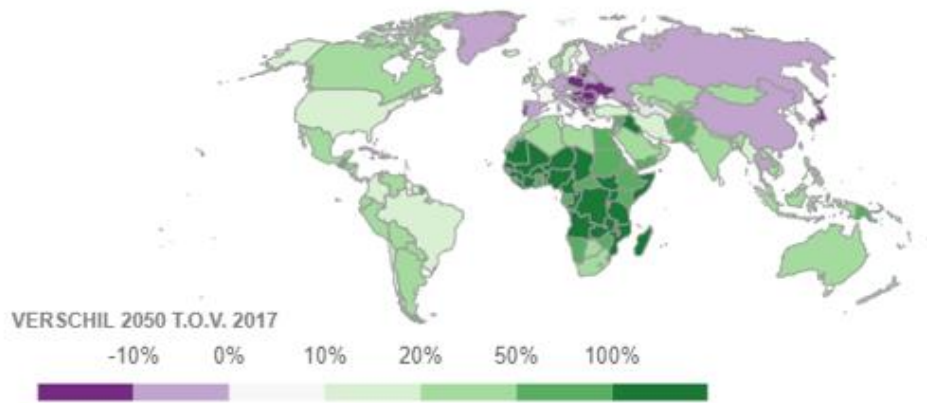
kampen met een zeer dynamische pathogeenpopulatie waarbij steeds agressievere isolaten voorkomen (Ishii & Hollomon, 2015).

De negatieve gevolgen van chemische gewasbeschermingsmiddelen zijn niet het enige probleem binnen de landbouwsector. Uit onderzoek blijkt dat door de klimaatsverandering, die gekenmerkt wordt door een stijgende temperatuur en een toenemende incidentie van extreme weersomstandigheden zoals neerslag en droogte, ziektes zullen oprukken vanuit het zuiden met een toenemende ziektedruk in het noorden als gevolg (Bebber *et al.*, 2013). Battilani *et al.* (2016) onderzochten dit voor *Aspergillus flavus*, de producent van het mycotoxine aflatoxine B1. Aflatoxines zijn de meest carcinogene natuurlijke producten die gekend zijn. Uit voorspellingsmodellen blijkt dat een klimaatsopwarming van 2°C in 100 jaar zal leiden tot en verspreiding van *A. flavus* tot in Noord-Europa, terwijl de schimmel momenteel enkel in Zuid-Europa een probleem vormt (Figuur 1).



FIGUUR 1: RISICO UITGEDRUKT IN DE AFLATOXINE RISICO-INDEX (ARI) OP EEN SCHAALE VAN 0 TOT 70 WAARBIJ DE AFLATOXINECONTAMINATIE VAN TARWE UITGETEKEND WORDT VOOR DRIE VERSCHILLENDE KLIMAATSCENARIO'S. (A) DE SITUATIE BINNEN 100 JAAR WANNEER ER GEEN KLIMAATSOPWARMING PLAATSGEVONDEN ZOU HEBBEN. (B) DE SITUATIE BINNEN 100 JAAR WANNEER DE TEMPERATUUR GEMIDDELD 2°C ZOU TOENEMEN. DIT IS DE MEEST WAARSCHIJNLIJKE SITUATIE VOLGENS DE VOORSPELLINGSMODELLEN. (C) DEZE KAART STELT DE SITUATIE VOOR BINNEN 100 JAAR WANNEER DE GEMIDDELDE TEMPERATUUR 5°C ZOU TOENEMEN. HOE BLAUWER HET GEBIED, HOE MEER RISICO OP AFLATOXINES IN DE GEWASSEN (BATTILANI *ET AL.*, 2016).

Naast de problemen in verband met de chemische gewasbeschermingsmiddelen en het klimaat kan ook de stijgende wereldbevolking ervoor zorgen dat de voedselvoorziening van de toekomst in het gedrang komt (Figuur 2). Om de bevolking te kunnen blijven voeden, zal meer plantaardig en dierlijk voedsel geproduceerd moeten worden. Doordat meer mensen meer plaats innemen en hierdoor het landbouwareaal nog zal afnemen, zal vooral moeten ingezet worden op het verhogen van de productie-efficiëntie. Hierbij kunnen opbrengstverliezen gereduceerd worden dankzij het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen (Marques *et al.*, 2018).



FIGUUR 2: AANGROEI OF INKRIMPING VAN HET BEVOLKINGSAANTAL PER LAND TUSSEN 2017 ÉN 2050. HET BEVOLKINGSAANTAL ZOU IN 2050 STIJGEN TOT ONGEVEER 10 MILJARD VOLGENS EEN VOORSPELLING VAN DE VERENIGDE NATIES (MARQUES *ET AL.*, 2018).

Om tegemoet te komen aan de bezorgdheid over de gezondheid van de mens, de veiligheid voor het milieu, de toekomstige uitdagingen zoals de klimaatverandering, de bevolkingsgroei en de resistentie tegen huidige bestrijdingsmiddelen, kan de mens niet blijven terugvallen op chemische gewasbeschermingsmiddelen. Er is nood aan duurzame alternatieven.

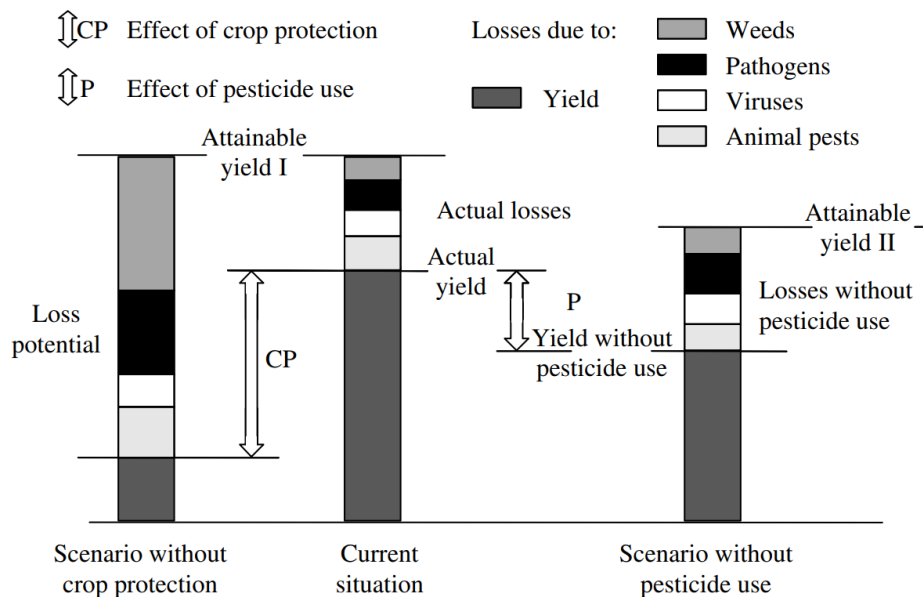
In deze masterproef worden GLV's als alternatief bestrijdingsmiddel tegen pathogenen onder de loep genomen. Het kan een ideale oplossing bieden in de zoektocht naar plantenbescherming. GLV's zijn vluchtige organische componenten (VOC's) die planten kunnen afscheiden wanneer ze aangevallen worden door een pathogeen of mechanische schade oplopen. Dit doen ze om andere plantendelen te beschermen of om naburige planten te waarschuwen voor gevaar (primen). Op die manier kan het immuunsysteem van de geprimeerde planten sneller in werking treden en wordt de kans op ziekte veel kleiner. Deze componenten zorgen niet alleen voor een snellere reactie bij planten, maar dankzij hun *dual mode-of-action* kunnen ze ook antibacteriële of (insect-) afstotende eigenschappen vertonen (Stenberg *et al.*, 2015). Sommige vluchtige componenten zijn bovendien in staat om carnivoren aan te trekken die de aanvallende herbivoor verdrijven of verorberen (Heil, 2007).

In deze thesis wordt onderzocht of er problemen ontstaan bij de kieming en groei van geprimeerde planten. Daarnaast zal nader bestudeerd worden welke pathways worden getriggerd door het primen met GLV's. Uiteindelijk zal het toepassen van deze techniek een hele uitdaging zijn. Bij de insectenbestrijding maken land- en tuinbouwers al vaak gebruik van volatiele componenten, zoals feromonen en semiochemicaliën. De technieken die hiervoor gebruikt worden, kunnen een inspiratiebron zijn voor het toepassen van GLV's tegen pathogenen en plagen.

1 Literatuurstudie

1.1 Evolutie van de gebruikte gewasbeschermingsmiddelen

Uit een studie van Oerke (2005) is het belang van gewasbescherming gebleken. Met gewasbescherming wordt het beschermen van een gewas tegen onkruiden en schadelijke organismen, zoals insecten, ongedierte en plantpathogenen, bedoeld. Deze laatste worden allemaal gecategoriseerd onder de termen 'ziekten en plagen'. Wanneer geen gewasbescherming wordt toegepast, liggen de opbrengsten veel lager (Figuur 3).



FIGUUR 3: HET NIET TOEPASSEN VAN GEWASBESCHERMING GAAT GEPAARD MET OPBRENGSTVERLIEZEN. BIJ HET ONDERZOEK NAAR DE EFFICIËNTIE VAN GEWASBESCHERMING, ZAL EEN TE VERWACHTEN OPBRENGST OPGESTELD WORDEN. WANNEER GEEN FYSIEKE, BIOLOGISCHE EN CHEMISCHE GEWASBESCHERMING WORDT TOEGEPAST, ZAL ER OPBRENGSTVERLIES OPTREDEN, NAMELIJK 'LOSS POTENTIAL'. WANNEER ECHTER WEL AAN GEWASBESCHERMING WORDT GEDAAN, ZAL HET OPBRENGSTVERLIES BEDUIDEND KLEINER ZIJN ('ACTUAL LOSSES'). HET EFFECT VAN GEWASBESCHERMING WORDT AANGEGEVEN MET CP. HIERBIJ DIENT OPGEMERKT TE WORDEN DAT HET GEWAS IN BEIDE SITUATIES ONDER DEZELFDE OMSTANDIGHEDEN WERD OPGEKWEKT (DEZELFDE IRRIGATIE, CULTIVAR EN FERTILISATIE). WANNEER VERVOLGENS HET EFFECT VAN HET PESTICIDEGEBRUIK BEKEKEN WORDT, ZAL EEN ANDERE VERWACHTE OPBRENGST MOETEN OPGESTELD WORDEN. DIT KOMT OMDAT ER BIJ HET GEBRUIK VAN PESTICIDEN, NOOD IS AAN EEN CULTIVAR DIE RESISTENT IS TEGEN HET PESTICIDE. DIT KAN ECHTER GEPAARD GAAN MET EEN VERMINDERDE OPBRENGST. WANNEER GEEN GEBRUIK WORDT GEMAAKT VAN PESTICIDEN, MAAR WEL VAN ANDERE BESCHERMINGSMIDDELEN, WORDT HET VERLIES WEERGEGEVEN ALS 'LOSSES WITHOUT PESTICIDE USE'. HET VERSCHIL TUSSEN DE OPBRENGST ZONDER PESTICIDEGEBRUIK EN DE ACTUELE OPBRENGST WANNEER WEL GEWASBESCHERMING WORDT TOEGEPAST, WORDT WEERGEGEVEN ALS P (OERKE, 2005).

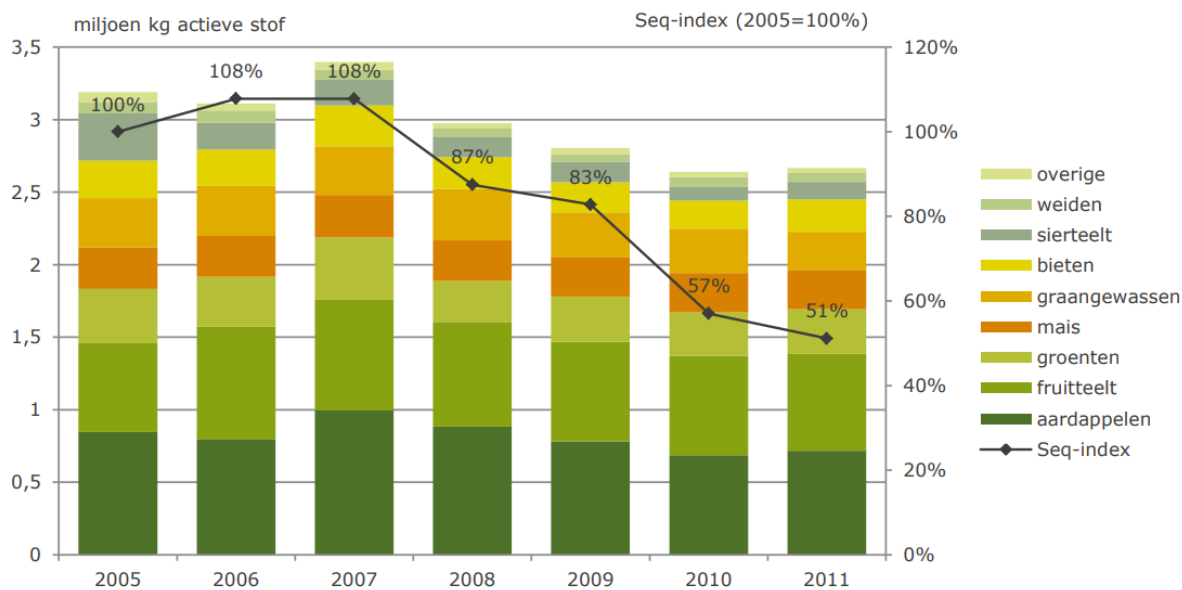
Gewasbescherming kan grofweg ingedeeld worden in drie domeinen: chemische, biologische en geïntegreerde gewasbescherming. Al deze methoden beogen het reduceren en bestrijden van onkruiden, ziektes en plagen bij verschillende gewassen. Terwijl chemische bescherming gebruik maakt van chemische middelen waarin actieve stoffen aanwezig zijn, probeert een

biologische bestrijding natuurlijke vijanden van de pathogeen in te zetten, maken ze gebruik van natuurlijke bestrijdingsmiddelen of gebruiken ze mechanische bestrijding. Geïntegreerde gewasbescherming heeft tot doel om duurzamer te zijn en combineert de twee bovengenoemde methoden.

1.1.1 Chemische gewasbescherming en de veranderende perceptie

Zoals eerder aangehaald, bestaan chemische gewasbeschermingsmiddelen (pesticiden) uit actieve stoffen die schadelijk zijn voor pathogenen en insecten. Daarbij wordt ook gebruik gemaakt van hulpstoffen die ervoor zorgen dat de actieve stof optimaal benut wordt. Er bestaan verschillende soorten chemische bestrijdingsmiddelen waarbij telkens het doelwitorganisme anders is: acariciden, algiciden, fungiciden, herbiciden, insecticiden, mollusciciden, nematiciden en rodenticiden (Royal Brinkman, z.d.-a). Het belang van deze pesticiden werd eerder aangetoond in Figuur 3.

Aanvankelijk leidde het gebruik van pesticiden niet tot waarneembare problemen, omdat de schadelijke effecten ervan nog niet gekend waren. In de jaren '70 kwam hier verandering in en wijzigde de perceptie van de mens ten opzichte van deze middelen. Carson (1962) schreef het boek '*Silent Spring*' dat handelt over het overmatig gebruik van pesticiden, met het insecticide DDT in het bijzonder. Ze liet de impact onderzoeken op zowel de mens als het milieu. Wanneer niet goed afbreekbare pesticiden in het milieu terecht komen, kunnen ze opgenomen worden in de voedselketen en zich daar opstapelen. Naast de niet afbreekbare pesticiden bestaan er ook middelen die wel goed afgebroken worden, maar dit wil niet automatisch zeggen dat de gevormde afbraakproducten minder giftig zijn. Op die manier is het mogelijk dat mensen en dieren grote hoeveelheden pesticiden of afbraakproducten binnenkrijgen (VanLoon & Duffy, 2017). Deze bewustwording zorgde ervoor dat DDT uit de markt verdween (Kamrin, 1997). Geleidelijk aan veranderde de Europese wetgeving inzake pesticidegebruik (§1.3). Door het uit de handel nemen van verschillende toxische pesticiden, kan een reductie van het gebruik ervan waargenomen worden tussen 2005 en 2011 (Lenders *et al.*, 2013) (Figuur 4).



FIGUUR 4: DE EVOLUTIE VAN HET ALGEMENE GEBRUIK VAN GEWASBESCHERMINGSMIDDELEN TUSSEN 2005 ÉN 2011. HIERBIJ WORDT HET JAAR 2005 ALS 100% GENOMEN. DANKZIJ DE STRENGE WETGEVING INZAKE GEWASBESCHERMINGSMIDDELEN VAN DE LAATSTE JAREN KAN EEN AFNAME VAN HET ALGEMENE GEBRUIK VAN CHEMISCHE BESTRIJDINGSMIDDELEN WAARGENOMEN WORDEN TUSSEN 2005 ÉN 2011. DE TUINBOUW EN AARDAPPELTEELT BLIJVEN ECHTER WEL HET GROOTSTE AANDEEL INNEMEN (LENDERS ET AL., 2013).

Desondanks blijft het gebruik van pesticiden hoog. De landbouwers willen er zeker van zijn dat geen teeltschade optreedt door ziekte. De kosten die ze moeten maken om het middelen aan te schaffen wegen niet op tegen de risico's die ze lopen wanneer ze dit niet doen. Wanneer pesticiden echter in te hoge concentraties gebruikt worden, bestaat het gevaar dat er resistentie ontstaat bij de pathogeen. Daarom is het van belang dat het pesticidegebruik gereduceerd wordt tot het minimum door het voorspellen van toekomstige ziekteschade (Jørgensen *et al.*, 2017).

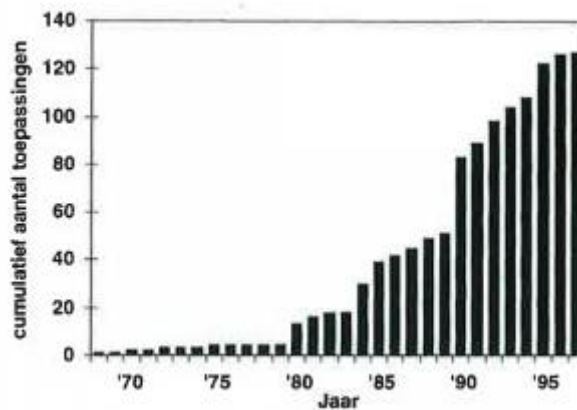
1.1.2 Biologische gewasbescherming blijkt toch niet zo duurzaam te zijn

Tegenwoordig wordt het gebruik van macro- (aaltjes en insecten) en micro-organismen (bacteriën, virussen en schimmels) die de ziekteverwekker kunnen aanvallen en afdoden al veelvuldig toegepast. Deze techniek heet biologische bestrijding of biocontrole. Natuurlijke vijanden worden ingezet op of gelokt naar velden waar gewassen gekweekt worden die te kampen hebben met een plaag of een bepaald ziekteverwekkend pathogeen. Deze natuurlijke vijanden kunnen insecten zijn die het plaaginsect verorberen, zoals een roofmijt die dol is op spintmijt en deze zal uitzuigen. Daarnaast kan het ingezette organisme zorgen voor nichecompetitie, waardoor de plaag of de pathogeen verdrongen wordt. Het is een milieuvriendelijke manier van pest- en pathogeenbeheersing, wat maatschappelijk meer aanvaard wordt dan het gebruik van pesticiden.

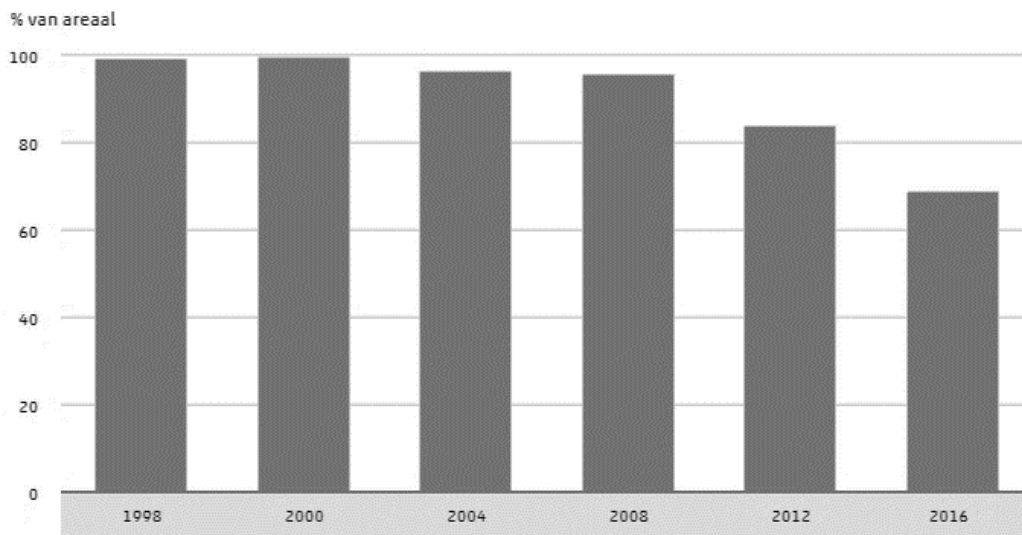
Een voorbeeld van biologische bestrijding kwam recent nog in de actualiteit. In de zomer van 2018 werd Vlaanderen getroffen door de buxusmot (*Cydalima perspectalis*). Deze mot

consumeert de zachte delen van de plant, waardoor hij veel schade bij buxussen kan aanrichten. De plaag is erg invasief, omdat de mot nauwelijks natuurlijke vijanden kent in Vlaanderen. Bovendien worden natuurlijke vijanden afgeschrikt door de toxiciteit van de waardplant. Daarnaast is de waardplant vaak terug te vinden in de Vlaamse tuinen, waardoor hij zich makkelijk kan verspreiden (Matošević, 2013). De bestrijding van de buxusmot kan naast chemisch ook biologisch gebeuren. Het is een product op basis van de bacterie *Bacillus thuringiensis* ssp. *Aizawai*. Wanneer de rupsen van de buxusmot eten van buxussen die behandeld werden met dit bestrijdingsmiddel (FlorBac®) zullen de bacteriën in de darmen van de rups Bt-toxines vormen. Dit zijn eiwitkristallen die spiervlamming veroorzaken, waardoor de rups stopt met eten en uiteindelijk sterft. In tegenstelling tot het chemische bestrijdingsmiddel, zal dit biologische product niet schadelijk zijn voor vlinders, bijen, wespen, vliegen of andere insecten die geen schade berokkenen aan de buxus en niet onnodig afsterven (Buxusworld, z.d.).

Het inzetten van biologische bestrijding zat op het einde van vorige eeuw in de lift (Figuur 5). Het Centraal Bureau voor de Statistiek (2018) concludeert echter uit recent onderzoek dat er de laatste jaren een dalende trend waarneembaar is bij het toepassen ervan in de glasgroenteteelt (Figuur 6). Deze daling kan het gevolg zijn van een aantal bedenkingen die kunnen gemaakt worden bij het gebruik van deze biologische bestrijding.



FIGUUR 5: DE EVOLUTIE IN HET GEBRUIK VAN BIOLOGISCHE BESTRIJDINGSMIDDELEN OP HET EINDE VAN DE TWENTIGSTE EEUW. ER IS EEN STIJGING WAAR TE NEMEN IN HET GEBRUIK VAN BIOLOGISCHE BESTRIJDING OP HET EINDE VAN DE TWENTIGSTE EEUW (VAN LENTEREN, 1997).



FIGUUR 6: DE EVOLUTIE VAN HET GEBRUIK VAN BIOLOGISCHE BESTRIJDING IN DE GLASGROENTETEELT TUSSEN 1998 EN 2016. TUSSEN 1998 EN 2000 WORDT NOG BIJNA IN ALLE KASSEN BIOLOGISCHE BESTRIJDING TOEGEPAST. ECHTER VANAF 2004 IS HIERIN EEN DALING WAAR TE NEMEN. IN 2016 WERD NOG SLECHTS IN 70% VAN DE KASSEN DEZE TECHNIEK TOEGEPAST. DE ONDERVRAGING GEBEURDE BIJ 725 GLASGROENTETELERS (CENTRAAL BUREAU VOOR DE STATISTIEK, 2018).

De ingezette organismen zijn vaak heel specifiek, wat zijn voor- en nadelen heeft. Het voordeel hiervan is dat een bepaalde plaag of een bepaald ziekteverwekkend micro-organisme specifiek kan behandeld worden, zonder andere ‘goede’ organismen te doden. Het nadeel is echter dat bij een pathogeen- of insectenaanval vaak verschillende soorten natuurlijke vijanden dienen ingezet te worden om deze volledig onder controle te kunnen krijgen (Chernin & Chet, 2002). Loomans (2000) vermeldde in zijn werk dat wanneer niet-inheemse soorten worden ingezet om ziekteverwekkers te bestrijden, deze ook een effect kunnen uitoefenen op niet doelwitorganismen. Op die manier kunnen zeldzame/bedreigde soorten uitsterven en bijgevolg de biodiversiteit doen afnemen. Bovendien is landbouw gebaseerd op biologische bestrijding niet zo duurzaam, want er is veel meer land nodig om eenzelfde hoeveelheid voedsel te kunnen produceren. Dit komt omdat deze aanpak veel minder effectief is in het bestrijden van plagen en pathogenen dan wanneer gebruik wordt gemaakt van pesticiden. Overigens is het veel arbeidsintensiever en werd het positieve gezondheidseffect nooit bewezen (Phytofar, 2018). Tot slot halen Stenberg *et al.* (2015) aan dat carnivoren niet preventief kunnen ingezet worden, omdat ze afhankelijk zijn van voedsel om te kunnen overleven en zich te reproduceren. Wanneer de plaag of pathogeen bestreden is, zal de ingezette populatie instorten of naar omringende natuurgebieden trekken indien er geen alternatieve voedselbron wordt geplaatst.

1.1.3 Geïntegreerde gewasbescherming biedt een oplossing

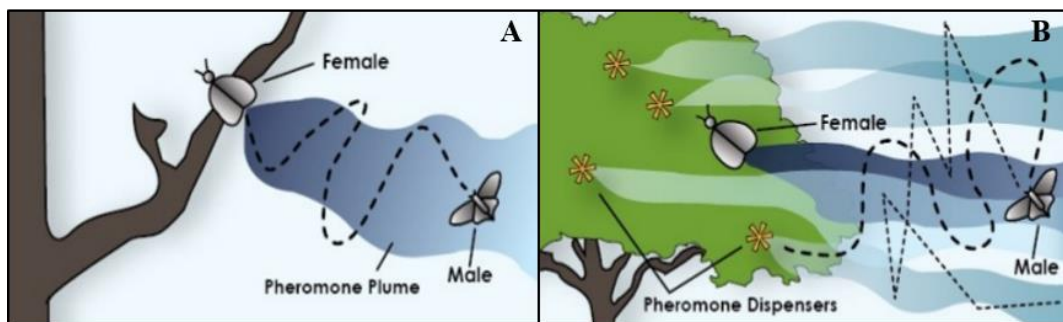
De duurzaamheid van de twee bovenstaande methoden kan duidelijk in vraag gesteld worden. Wanneer deze twee technieken gecombineerd worden, zal de resistentie tegen chemische bestrijdingsmiddelen worden onderdrukt. Daarnaast zal ook de biologische bestrijding veel

effectiever verlopen. Deze aanpak krijgt de naam ‘geïntegreerde gewasbescherming’ (Eng. Integrated Pest Management, IPM) en bestaat in het algemeen uit drie stappen: preventie, waarnemen en ingrijpen. Eerst dient voorkomen te worden dat er een ziekte of een plaag ontstaat door natuurlijke vijanden te lokken, hygiënisch te werken en het onkruid af en toe manueel te verwijderen. Daarenboven kan voor een resistente cultivar gekozen worden om de ziektedruk te reduceren. Alsook kan aan teeltafwisseling gedaan worden om zo soortspecifieke pathogenen die op de bodem achtergebleven zijn, te reduceren (preventie). Hierbij dient alles nauwlettend gecontroleerd te worden door af en toe steekproeven te nemen (waarnemen). Wanneer een plaag of ziekte toch dreigt uit te breken, kunnen chemische bestrijdingsmiddelen ingezet worden die het liefst de biologisch ingezette natuurlijke vijanden minimaal beïnvloeden (ingrijpen) (Royal Brinkman, z.d.-b; Lamichhane *et al.*, 2016; Phytofar, 2018).

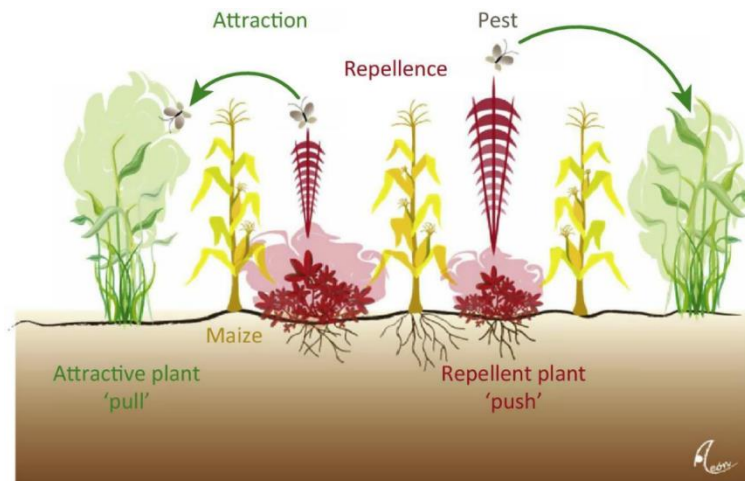
1.2 Duurzamere land- en tuinbouw

1.2.1 Het gebruik van door de natuur uitgescheiden vluchtige componenten

Om synthetische pesticiden duurzamer te maken, kunnen deze gecombineerd worden met semiochemicaliën (= infochemicaliën). Dit zijn chemische signaalstoffen die al dan niet vluchtig zijn en worden geproduceerd door insecten en planten. Het gebruik van volatiele natuurlijke componenten heeft reeds zijn introductie binnen de in plantenbescherming gekend. Zo worden feromonenvallen geplaatst om het paargedrag van schadelijke insecten te verstoren (Heuskin *et al.*, 2011) (Figuur 7). Ook kan er gebruik gemaakt worden van *push-pull systemen* waarbij VOC's geproduceerd door planten ingezet worden in strijd tegen plaagaanvallen (Figuur 8). Tussen het gewas staan plantensoorten (andere dan de gewassoort) die bepaalde vluchtige stoffen afgeven, waardoor de plaagsoort weggejaagd wordt uit het veld. Aan de rand van het veld staan andere soorten die componenten produceren waar de plaagsoort zich door aantrekken voelt. Op die manier wordt de indringer geweerd uit het veld (Stenberg *et al.*, 2015). Wanneer het niet mogelijk is om andere plantensoorten tussen het gewas te plaatsen, kan een dispenser de oplossing bieden. Dispensers kunnen naast stoffen die de plaag weggagen ook vluchtige stoffen vrijgeven die carnivoren lokken om vervolgens de plaag onder controle te kunnen houden. Wanneer carnivoren gelokt worden naar een gewas, moet er echter wel voor gezorgd worden dat er voedsel, zoals extrafloraal nectar (EFN), ter beschikking wordt gesteld voor hen (Stenberg *et al.*, 2015).

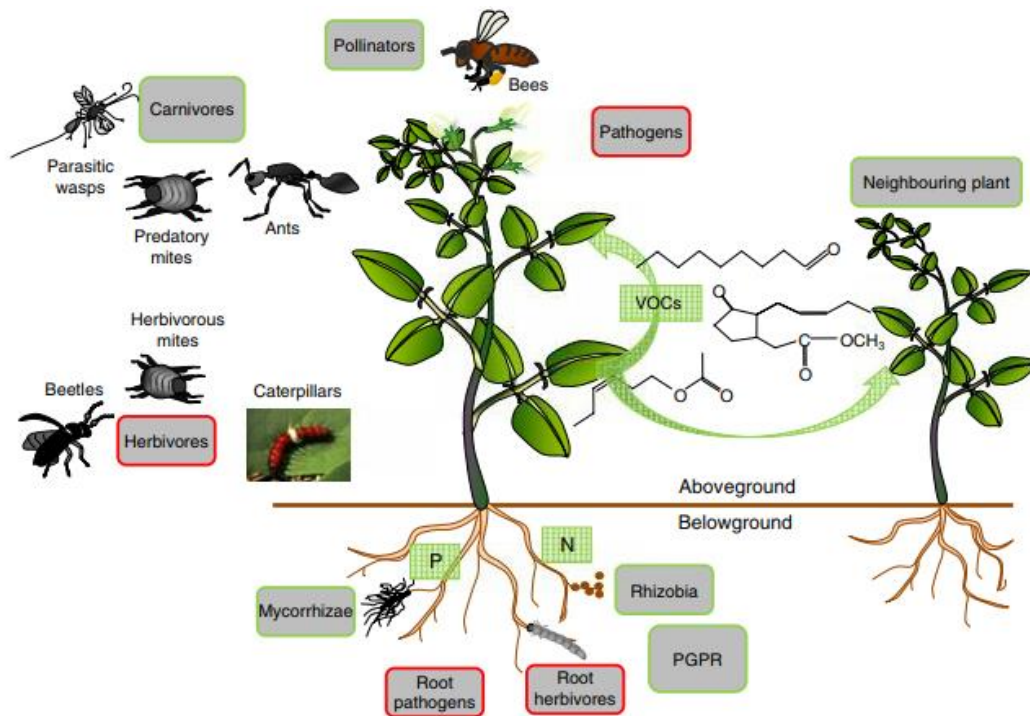


FIGUUR 7: HET GEBRUIK VAN SEKSFEROMONEN OM MANNELIJKE INSECTEN TE MISLEIDEN. (A) SOMMIGE VROUWELIJKE INSECTEN SCHEIDEN FEROMONEN UIT OM MANNETJES TE LOKKEN VOOR DE PARING. **(B)** WANNEER ER IN EEN BOOMHAARD ENKELE HOUDERS WORDEN GEPLAATST DIE EXACT DEZELFDE FEROMONEN UITSCHIEDEN, ZAL HET MANNELIJKE INSECT MISLEIDT WORDEN EN KAN HIJ ZIJN PARINGSPARTNER NIET MEER VINDEN. ZO ZAL DE KANS OP VOORTPLANTING DRASTISCHE VERMINDEREN EN EEN EVENTUELE INSECTENPLAAG KAN HIERDOOR ONDER CONTROLE GEHOUDEN WORDEN (HEUSKIN *ET AL.*, 2011).



FIGUUR 8: HET PUSH-PULL SYSTEEM OM PLAGEN UIT GEWASSEN TE WEREN. TUSSEN HET GEWAS STAAN PLANTENSOORTEN DIE VLUCHTIGE ORGANISCHE COMPONENTEN (VOC'S) AFSCHEIDEN OM DE PLAAGSOORT TE VERJAGEN UIT HET VELD. DIT WORDT OOK WEL DE 'REPELLER PLANT' OF 'PUSH' GENOEMD. AAN DE RAND VAN HET VELD WORDEN VERVOLGENS PLANTEN GEPLAATST DIE DE PLAAGSOORT AANTREKKEN. DEZE PLANTEN WORDEN DE 'ATTRACTIVE PLANTS' OF 'PULL' GENOEMD. BIJKOMEND KUNNEN DEZE PLANTENSOORTEN ERVOOR ZORGEN DAT DE PLAAGSOORT ZICH NIET MEER KAN VOORTPLANTEN (STENBERG *ET AL.*, 2015).

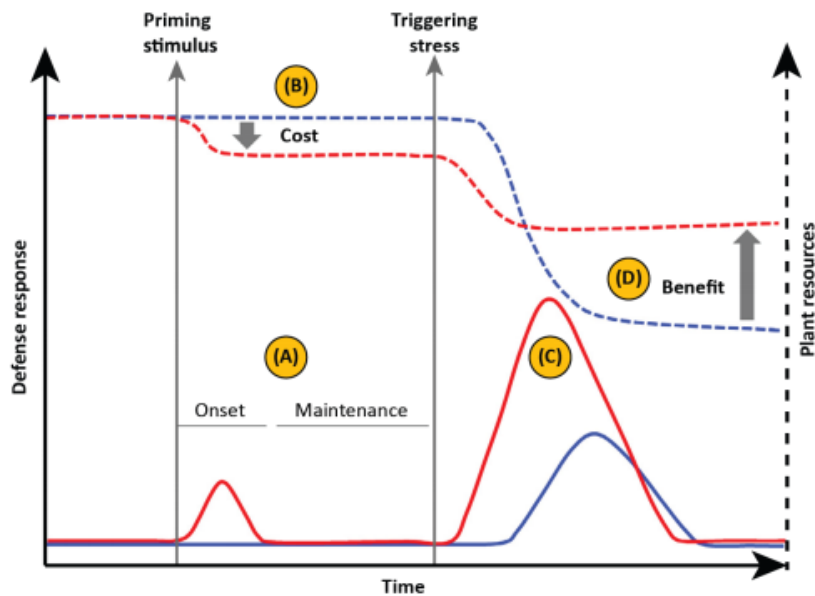
In de hierboven beschreven technieken worden planten beschermd door volatiele componenten die een rechtstreeks effect hebben op de pathogeen of een natuurlijke vijand ervan. In de literatuur zijn reeds verschillende manieren beschreven om de weerstand van planten zelf tegen pathogenen te verhogen. Dit wordt ook wel geïnduceerde resistentie (Eng. Induced resistance, IR) genoemd en kan verkregen worden door planten te primen. Wanneer een plant aangevallen wordt door een plaagsoort of een pathogeen zullen verschillende vluchtige signaalmoleculen, zoals GLV's, geproduceerd worden (§ 1.4). Deze componenten kunnen migreren doorheen de plant en naar naburige planten, waardoor deze in een geprimeerde toestand worden gebracht. Hierdoor wordt een lagere gevoeligheid voor een eventuele plaag- of pathogeenaanval gecreëerd, omdat ze zorgen voor de inductie van resistentie (Figuur 9). Steunend op dit mechanisme kunnen planten die beschermd dienen te worden tegen insecten of pathogenen blootgesteld (geprimed) worden aan exogene GLV's. In een onderzoek van Engelberth *et al.* (2004) bleek dat een half uur na het blootstellen van maïszaad aan de GLV's Z-3-hexenal, Z-3-hexenol en Z-3-HAC een jasmonzuur (JA) -burst voorkwam. Daarnaast tonen ook verschillende onderzoeken aan dat primen met GLV's een positieve invloed heeft op de biosynthese van ethyleen (ET) (Scala *et al.*, 2013). GLV's kunnen dus beschouwd worden als weerstandsbevorderende middelen of elicitors. Naast deze natuurlijke componenten, kunnen elicitors ook natuurlijk-synthetische middelen zijn (Derkx *et al.*, 2012). De meest gekende zijn BTH (benzothiadiazool; commerciële naam: actigard®, bion®), een synthetisch analoog van salicylzuur, en BABA (β -aminoboterzuur). Uit onderzoek is gebleken dat de primingscapaciteit afhangt van zowel de dosis als de plantensoort waarop dit toegepast wordt (Jakab *et al.*, 2001). In bijlage 1 is een onlimiterende lijst terug te vinden met een opsomming van een aantal mogelijke primingscomponenten (Tabel 3) (Ameye, 2017).



FIGUUR 9: WEERGAVE VAN DE INTERACTIE TUSSEN DE DOOR EEN PLANT AFGEGEVEN VLUCHTIGE ORGANISCHE COMPONENTEN (VOC'S) EN ANDERE ORGANISMEN. DE ORGANISMEN IN EEN ROOD KADER ZULLEN DE PLANT BESCHADIGEN, TERWIJL DE ORGANISMEN WEERGEGEVEN IN EEN GROEN KADER EEN GUNSTIG EFFECT HEBBEN. WANNEER EEN PLANT AANGEVALLEN WORDT DOOR ÉÉN OF MEERDERE VAN DE ONGUNSTIGE ORGANISMEN, ZAL DE PLANT VOC'S, ZOALS GREEN LEAF VOLATILES (GLV'S), AFGEVEN. DEZE VOLATIELE COMPONENTEN KUNNEN ANDERE PLANTENDELEN VAN DEZELFDE PLANT OF NABURIGE PLANTEN EEN VERHOOGDE RESISTENTIE BEZORGEN. OOK KUNNEN DEZE VOC'S, SAMEN MET NECTAR, GUNSTIGE ORGANISMEN AANTREKKEN EN ZO DE PLANT HELPEN BIJ DE VERDEDIGING TEGEN PATHOGENEN EN PLAGEN (CIPOLLINI & HEIL, 2010).

1.2.2 De voor- en nadelen van primen

Het voordeel van primen, is dat de verdediging enkel in werking zal treden wanneer dit nodig blijkt te zijn. (Stenberg *et al.*, 2015). Bovendien ligt de energiekost lager, terwijl de gecreëerde immuunrespons veel sterker is (Martines-Medina *et al.*, 2016) (Figuur 10). Het primen zorgt er bij limaboonplanten (*Phaseolus lunatus*) niet alleen voor dat de defensiereactie sneller verloopt, maar ook dat er meer EFN geproduceerd wordt. Op die manier worden natuurlijke vijanden van de plantpathogenen aangetrokken (Kost & Heil, 2006). Bovendien is er een stijging in VOC-productie, plantenhormonen (Engelberth *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2008) en PR (pathogenese gerelateerde) -eiwitten waarneembaar (Yi *et al.*, 2009). Volgens Derkx *et al.* (2012) hebben elicitors vaak een langdurige en brede werking tegen verschillende soorten micro-organismen. Conventionele chemische middelen werken vaak in op één mechanisme binnen de plant, waardoor de pathogeen hier makkelijk resistentie tegen kan opbouwen. Omdat deze primingstoffen inwerken op verschillende mechanismen, zal de opbouw van resistentie veel moeizamer verlopen. Het duurzame aspect van deze middelen zit hem in het feit dat ze niet toxisch zijn en geen invloed hebben op de biodiversiteit.



FIGUUR 10: HET EFFECT VAN PRIMEN VAN PLANTEN OP DE DEFENSIERESPONS. DE VOLLE LIJNEN GEVEN AAN HOE STERK DE DEFENSIERESPONS VAN DE PLANT ZAL ZIJN. DE STIPPELLIJNEN GEVEN EEN WEERGAVE VAN DE HOEVEELHEID NUTRIËNTEN DIE WORDEN GEÏNVESTEERD TIJDENS DE DEFENSIERESPONS. DE RODE LIJNEN STELLEN DE REACTIE VAN DE GEPRIMEDE PLANT VOOR, TERWIJL DE BLAUWE DEZE VAN DE ONGEPRIMEDE PLANT WEERGEEFT. DE EERSTE PIEK BIJ DE RODE VOLLE LIJN (A) IS HET GEVOLG VAN HET PRIMEN ZELF, DIT GAAT GEPAARD MET EEN KLEINE NUTRITIONELE KOST (B). WANNEER DE TE TESTEN PLANTEN DAARNA IN CONTACT KOMEN MET EEN STRESSFACTOR, ZULLEN DE GEPRIMEDE PLANTEN SNELLER EN STERKER REAGEREN DAN DE CONTROLEPLANTEN (C). OOK ZAL EEN GEPRIMEDE PLANT MINDER NUTRIËNTEN EN DUS MINDER ENERGIE VERGEN OM DEZE DEFENSIERESPONS TOT STAND TE BRENGEN IN VERGELIJKING MET EEN CONTROLEPLANT (D) (MARTINES-MEDINA *ET AL.*, 2016).

Fytotoxiciteit is een samenstelling van twee woorden, namelijk ‘*fyto*’ en ‘*toxiciteit*’. ‘*Fyto*’ staat voor ‘van plantaardige oorsprong’ en ‘*toxiciteit*’ is een synoniem voor ‘schadelijk’, dus hieruit kan afgeleid worden dat fytotoxiciteit staat voor een schadelijk effect dat komt van plantaardige oorsprong. Dit schadelijk effect kan gecreëerd worden door pesticiden, maar ook wanneer gewerkt wordt met GLV’s (zijn van plantaardige oorsprong) om planten te primen. Dit kon waargenomen worden tijdens een onderzoek uitgevoerd door Cannoot *et al.* (2018). Wanneer een te hoge concentratie van deze vluchtige component werd toegediend aan een plant, was een verminderde groei waar te nemen en in meer extreme gevallen viel de groei volledig stil. Daarnaast werden de blootgestelde plantendelen minder fotosynthetisch actief. Veel is nog niet gekend over de betrokken pathways en waar dit fytotoxisch karakter vandaan komt wanneer planten blootgesteld worden aan hoge concentraties GLV’s. In deze thesis wordt getracht dit nader te onderzoeken.

Naast het fytotoxisch karakter van GLV’s, moet ook opgemerkt worden dat deze vluchtige componenten niet erg stabiel zijn en degraderen onder invloed van zuurstof en UV (ultraviolet). Hiermee moet rekening gehouden worden op het moment dat deze techniek wordt geïmplementeerd in een gewasbeschermingssysteem (Heuskin *et al.*, 2011).

1.3 Een strenger wetgevend kader

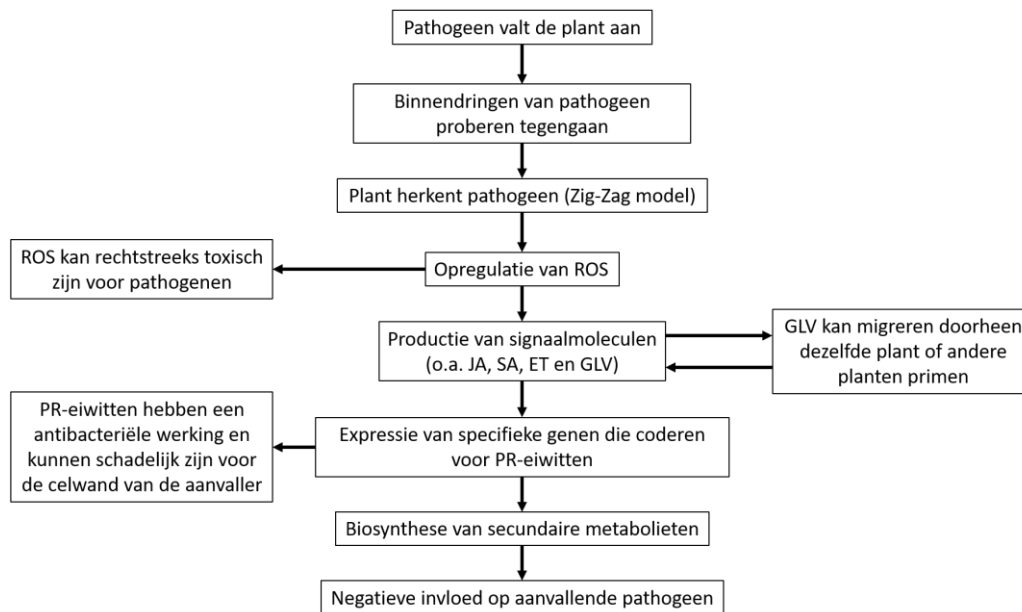
Zoals reeds vermeld werd (§1.1.1), is de perceptie ten aanzien van de chemische bestrijdingsmiddelen de laatste jaren erg negatief geworden. Zo werd aangetoond dat deze middelen een negatieve impact hebben op de gezondheid en het milieu, maar aan de andere kant lijken ze ook onmisbaar om de stijgende wereldbevolking te kunnen blijven voeden. Dit laatste inzicht maakt het dan ook zo moeilijk om pesticiden volledig te bannen. Op 21 oktober 2009 heeft de Europese Unie ervoor gezorgd dat de Richtlijn 2009/128/EG werd ingevoerd, waarbij duurzaam gebruik van pesticiden centraal staat. Deze richtlijn tracht het gebruik van pesticiden te verlagen en IPM aan te moedigen. Ook zal op zoek gegaan worden naar nieuwe en betere biologische gewasbeschermingsmiddelen. Daarenboven is er een verbod op het sproeien van openbare ruimten en beschermde zones. Door deze richtlijn nam het economisch concurrentievermogen van Europa af daar pesticiden wel nog in andere delen buiten Europa gebruikt mogen worden. Dit heeft voor grote uitdagingen gezorgd (Lamichhane *et al.*, 2016; Ameys, 2017).

Vooraleer nieuwe gewasbeschermingsmiddelen op de markt kunnen komen, moeten deze voldoen aan verschillende richtlijnen en aan de vordering 1107/2009/EG. Gecertificeerde instellingen dienen te onderzoeken of het gewasbeschermingsmiddel veilig kan worden gebruikt. Hierbij wordt eerst en vooral gekeken naar de samenstelling, de eigenschappen en werkzaamheid van het middel. Daarnaast wordt beoordeeld of het nieuwe gewasbeschermingsmiddel schadelijk is voor de gezondheid van de mens en het milieu. Wanneer het middel moeilijk afbreekbaar is en dus ophoping tot gevolg kan hebben, wordt het niet toegelaten. Indien het wel kan worden afgebroken, mogen de afbraakproducten niet schadelijk zijn voor mens en milieu. Voor natuurlijke gewasbeschermingsmiddelen, ook biologicals genoemd, geldt dezelfde Europese regelgeving. Bij deze middelen is het echter niet de wetgeving, maar de opschaalbaarheid en de effectiviteit die de fabrikanten moeilijkheden bezorgen (Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, 2017).

1.4 Mechanisme van plantendefensie tegen plagen, pathogenen en mechanische schade

Planten en herbivore organismen kunnen al eeuwenlang naast elkaar bestaan en dit komt niet louter door gebruik te maken van gewasbeschermingsmiddelen die plagen en plantpathogenen weren. Er bestaan modes-of-action waarbij de defensie vanuit de plant zelf komt. Het geheel van bescherming en verdediging bij planten maakt deel uit van het secundaire metabolisme en is in evenwicht met het primaire metabolisme voor fotosynthese en groei. Het constitutief afweersysteem is de eerste verdedigingslinie van het secundaire metabolisme en zal een fysieke barrière vormen die continu in werking is. Het kan bestaan uit een celwand, trichomen, een waslaag (cuticula) en eventueel ook uit schors en doornen (ul Hassan *et al.*, 2015). Onder invloed van het induceerbare afweersysteem (tweede verdedigingslinie) zullen planten verschillende verdedigingsmechanismen aansturen die in veel gevallen de oorzaak kunnen zijn van de productie van allerlei chemische stoffen en een geprogrammeerde celdood. Dit afweersysteem zal pas in werking treden wanneer bepaalde signalen hiertoe leiden (Bown *et al.*, 2002). Deze signalen kunnen voortvloeien uit de herkenning van een pathogeen. Wanneer de plant geen extra bescherming nodig heeft, zal het primaire metabolisme in werking zijn. Pas wanneer er gevaar is, schakelt de plant over naar het secundaire metabolisme (constitutieve afweer is echter altijd werkzaam). Dit komt omdat geïnduceerde verdedigingsreacties een zekere energiekost met zich meebrengen. Deze energie kan op dat moment niet gebruikt worden voor de groei en ontwikkeling van de plant (Pieterse & Dicke, 2007).

IR, als een meer duurzame gewasbeschermingstechniek (§1.2), is gebaseerd op het induceerbare afweersysteem. Om het principe van deze techniek volledig te kunnen begrijpen, wordt aangehaald hoe het mechanisme van plantendefensie werkt. Dankzij de geboekte vooruitgang op het vlak van moleculaire, biochemische en genetische ontwikkelingen, was het mogelijk om al een groot deel hiervan te identificeren en te definiëren. Figuur 10 geeft een samenvattend schema weer dat als leidraad kan dienen voor wat in de volgende paragrafen beschreven wordt.



FIGUUR 11: PLANTENDEFENSIEMECHANISME. WANNEER EEN PATHOGEEN EEN PLANT AANVALT, ZAL DE PLANT HET BINNENDRINGEN VAN DAT ORGANISME TRACHTEN TE VERHINDEREN. INDIEN DE PATHOGEEN DIT KAN OMZEILEN, ZAL DEZE HERKEND WORDEN DOOR DE PLANT. HET ZIG-ZAG MODEL BESCHRIJFT HOE PLANTEN PATHOGENEN KUNNEN HERKENNEN EN HOE DEZE PATHOGENEN DE PLANTENVERDEDIGING TELKENS OPNIEUW HEBBEN PROBEREN ONTWIJKEN. ALS REACTIE OP DE HERKENNING VAN DE PATHOGEEN, ZAL EEN OPREGULATIE VAN ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES) PLAATSVINDEN. DIT KAN GEBEUREN VIA VERSCHILLENDE WEGEN, ZOALS DOOR IONENFLUXEN MET Ca^{2+} , VIA MEMBRAANGEBONDEN PEROXIDASEN OF SAMEN MET HET METABOLISME VAN DE PLANT. ROS KAN VERVOLGENS OFWEL RECHTSTREEKS TOXISCH ZIJN VOOR DE PATHOGEEN, MAAR KAN OOK ZORGEN VOOR DE BIOSYNTHESE VAN SIGNAALMOLECULEN. VOORBEELDEN VAN DEZE MOLECULEN ZIJN JASMONZUUR (JA), ETHYLEEN (ET), SALICYLZUUR (SA) EN GREEN LEAF VOLATILES (GLV's). ZE KUNNEN AL DAN NIET VLUCHTIG ZIJN EN ALS ZE VLUCHTIG ZIJN (VOC's) KUNNEN ZE NAAR ANDERE PLANTDELEN MIGREREN OF ZELFS ANDERE PLANTEN PRIMEN. OP DE PLAATS WAAR DEZE SIGNAALMOLECULEN INWERKEN, KUNNEN ZE LEIDEN TOT EXPRESSIE VAN SPECIFIEKE GENEN. NA TRANSLATIE VORMEN DEZE GENEN PR (PATHOGENESE GERELATEERDE) -EIWITTEN. DEZE PR-EIWITTEN KUNNEN EEN ANTIMICROBIËLE WERKING HEBBEN OF SCHADELIJK ZIJN VOOR DE CELWAND VAN DE AANVALLER, MAAR ZE KUNNEN OOK EEN ROL SPELEN BIJ DE BIOSYNTHESE VAN SECUNDAIRE METABOLIETEN. DEZE METABOLIETEN HEBBEN VERVOLGENS EEN NEGATIEVE INVLOED OP DE PATHOGEEN.

1.4.1 De activatie van het induceerbare afweersysteem

Het induceerbare afweersysteem kan ingedeeld worden in twee (opeenvolgende) interacties. Eerst en vooral wordt een primaire immuunrespons gerealiseerd, namelijk de Pattern Triggered Immunity (PTI). Wanneer een plant aangevallen wordt door een pathogeen die reeds door de fysieke barrière gedrongen is, zijn er verschillende receptoren (Pattern Recognition Receptors of PRR's) aanwezig op het celmembraan van plantencellen die evolutionair geconserveerde pathogeen-geassocieerd moleculaire patronen (Eng. Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP's) van de aanvaller kunnen herkennen (Figuur 12). Voorbeelden van PAMP's zijn flagellinen, lipopolysachariden, peptidoglycaan, glucaan en chitosan (Jones & Dangl, 2006; Gouveia *et al.*, 2017). Microben bezitten Microbe Associated Molecular Patterns (MAMP's) en insecten en herbivoren Damage Associated Molecular Patterns (DAMP's). Hoe de

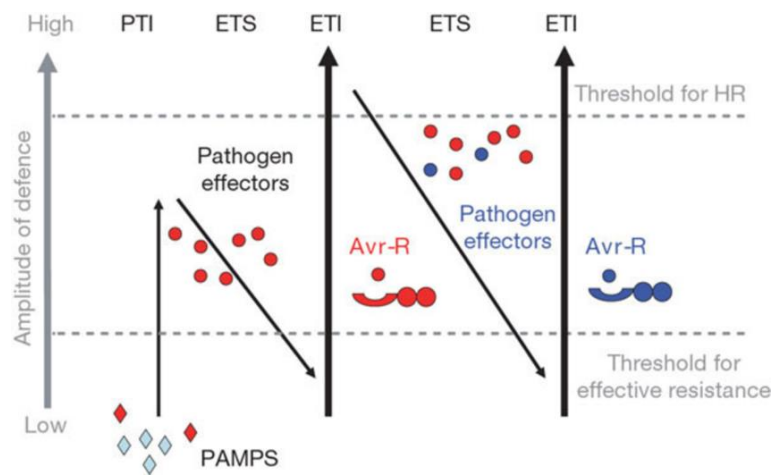
herkenning van MAMP's gebeurt, is voorlopig nog niet gekend. De identificatie van DAMP's zal op dezelfde manier als bij PAMP's gebeuren (Henry *et al.*, 2012). Door binding van de PAMP's aan de receptor zal er een verandering optreden in hun kinasedomein (Chisholm *et al.*, 2006; Hohmann *et al.*, 2017). Deze verandering kan op zijn beurt verschillende verdedigingsreacties veroorzaken, zoals een depolarisatie van het plasmamembraan en het openen van ionenkanalen (Jeworutzki *et al.*, 2010). Daarnaast kunnen ook ROS (superoxides (O_2^-), hydroxylradicalen ($OH\cdot$), singlet zuurstof (1O_2), waterstofperoxides (H_2O_2)) vrijgesteld worden (§ 1.4.2) en het is mogelijk dat er een versterking van de celwand met callose en lignine optreedt om het verder binnendringen van de pathogeen te bemoeilijken (Nürnberg *et al.*, 2004). Daarenboven is de kans reëel dat stomata sluiten en verschillende antimicrobiële verbindingen gevormd worden (Jones & Dangl, 2006).

Om de PTI van planten te omzeilen, hebben succesvolle pathogenen zich zodanig ontwikkeld dat ze effectoren kunnen produceren die afgescheiden worden in het cytoplasma van de plantencel om daar de PTI te blokkeren. Dit zal leiden tot virulentie, met als gevolg dat de ziekte zich toch zal kunnen ontwikkelen. Dit fenomeen wordt aangeduid met de term 'Effector Triggered Susceptibility' (ETS) en de effectoren die de pathogeen hiervoor aanwendt, worden virulentiefactoren genoemd (Jones & Dangl, 2006; Gouveia *et al.*, 2017) (Figuur 12).

De activering van het tweede onderdeel van het induceerbare afweersysteem wordt veroorzaakt door de herkenning van deze specifieke pathogene effectoreiwitten, nu avr-factoren (avirulentiefactoren) genoemd. Dit afweersysteem staat bekend als Effector Triggered Immunity (ETI) (Gao *et al.*, 2014; Gouveia *et al.*, 2017). De herkenning van deze factoren gebeurt door NB-LRR-eiwitten (nucleotide bindend leucine-rijke herhaling). Deze eiwitten worden gecodeerd door resistentiegenen (R-genen) (Chisholm *et al.*, 2006). Over de regulatie van de genexpressie van deze R-genen is echter niet veel gekend. Vermoedelijk worden deze genen op een laag niveau constitutief tot expressie gebracht, aangezien op een heel snelle manier moet gereageerd kunnen worden bij een pathogeeaanval (McHale *et al.*, 2006). Als reactie op een herkenning worden eveneens een reeks afweerreacties geactiveerd. Zo zal onder andere de Ca^{2+} -stroom over de membranen veranderen, zal ROS geproduceerd worden en kan een HR (hypersensitieve respons) plaatsvinden. HR is een typisch gevolg binnen de ETI en zal ervoor zorgen dat geïnfecteerde en omliggende gezonde cellen zichzelf opofferen (apoptose). Op die manier kan de verdere verspreiding van de pathogeen voorkomen worden en zal de beschikbaarheid van nutriënten voor de pathogeen beperkt blijven (Jones & Dangl, 2006; Mchale *et al.*, 2006). ETI is een sterkere en pathogeen specifiekere versie van PTI die effectief is tegen een breed scala aan pathogeeaanvallen. (Jones & Dangl, 2006; Walters *et al.*, 2007) (Figuur 12).

De pathogeen zal hier opnieuw op kunnen reageren door de specifiek herkende effectorgenen af te werpen of te veranderen, zodat ze niet meer geïdentificeerd kunnen worden door de NB-

LRR-eiwitten. Hierdoor wordt de ETS terug gestimuleerd. Natuurlijk selectie bij planten zal vervolgens de voorkeur geven aan nieuwe NB-LRR-allelen die de aangepaste effectoren opnieuw kunnen herkennen. Het is de continue wedloop tussen plant en pathogeen die ervoor zorgt dat deze twee organismen toch naast elkaar kunnen blijven bestaan. Het bovenstaande beschreven defensiemodel staat beter gekend als het *Zig-Zag model* van Jones en Dangl (2006) weergegeven in Figuur 12. Planten hebben doorheen de evolutie gereageerd op een scala aan effectoren vrijgegeven door de pathogenen, waardoor ze de mogelijkheid hebben gehad een uitgebreid arsenaal aan R-genen te verzamelen. Tijdens de veredeling en domesticatie werd vooral gebaseerd op het optimaliseren van de groei, vruchtgrootte en resistentie tegen abiotische factoren. Waar echter minder rekening mee gehouden werd, is het behouden en eventueel verbeteren van de resistentie tegen indringers, omdat dit veel energie vergt van de plant (Andersen *et al.*, 2015).

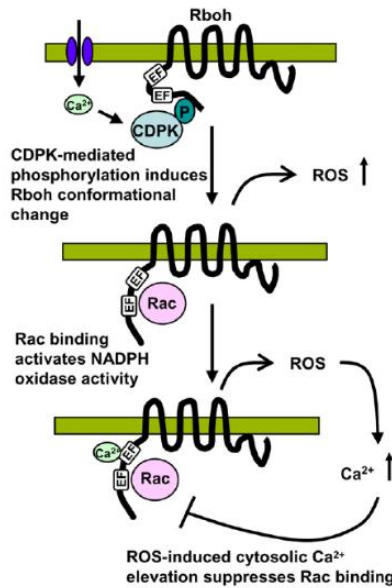


FIGUUR 12: HET ZIG-ZAG MODEL BESCHRIJFT HOE PLANTEN PATHOGENEN KUNNEN HERKENNEN EN HOE DEZE PATHOGENEN DE PLANTENVERDEDIGING TELKENS OPNIEUW TRACHTEN TE OMZEILEN. WANNEER EEN PATHOGEEN EEN PLANT AANVALT, KAN DEZE PATHOGEEN HERKEND WORDEN DOOR DE PLANT DOORDAT PATTERN RECOGNITION RECEPTORS (PRR'S) AANWEZIG OP HET CELMEMBRAAN VAN PLANTENCELLEN BEPAALDE DELEN OF STOFFEN (PATHOGEN ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS, PAMP'S) VAN DE PATHOGEEN KUNNEN HERKENNEN. ALS REACTIE HIEROP ZULLEN VERSCHILLENDE VERDEDIGINGSREACTIES INGANG GEZET WORDEN. HET GEHEEL VAN PAMP'S HERKENNEN EN HIEROP REAGEREN, WORDT PATTERN TRIGGERED IMMUNITY (PTI) GENOEMD. PATHOGENEN ZIJN ECHTER ZODANIG GEËVOLUEERD DAT ZE DE PTI KUNNEN BLOKKEREN MET EFFECTOREN EN ALSNOG DE PLANT KUNNEN INFECTEREN. DIT WORDT EFFECTOR TRIGGERED SUSCEPTIBILITY (ETS) GENOEMD. ALS REACTIE HIEROP HEBBEN PLANTEN RESISTENTIEGENEN (R-GENEN) VERWORVEN DIE TOT EXPRESSIE KUNNEN GEBRACHT WORDEN. DE TOT EXPRESSIE GEBRACHTE NUCLEOTIDE BINDEND LEUCINE-RIJKE HERHALINGSEIWITTEN (NB-LRR) KUNNEN DE EFFECTOREN VAN DE PATHOGEEN HERKENNEN. ALS ANTWOORD OP DEZE HERKENNING WORDEN EVENEENS EEN REEKS AFWEERREACTIES GEACTIVEERD. DEZE MANIER VAN IMMUNITEIT WORDT EFFECTOR TRIGGERED IMMUNITY (ETI) GENOEMD EN IS STERKER DAN DE PTI. DE PATHOGEEN ZAL HIER OPNIEUW OP KUNNEN REAGEREN DOOR DE SPECIFIEK HERKENDE EFFECTORGENEN AF TE WERPEN OF TE VERANDEREN, ZODAT ZE NIET MEER GEÏDENTIFICEERD KUNNEN WORDEN DOOR DE NB-LRR-EIWITTEN. HIERDOOR WORDT DE ETS OPNIEUW GESTIMULEERD. NATUURLIJK SELECTIE BIJ PLANTEN ZAL VERVOLGENS DE VOORKEUR GEVEN AAN NIEUWE NB-LRR-ALLELEN DIE DE AANGEPASTE EFFECTOREN TERUG KUNNEN HERKENNEN. ER IS DUS EEN CONTINUE WEDLOOP TUSSEN PLANTEN EN PATHOGENEN (JONES & DANGL, 2006).

1.4.2 ROS-productie: een tweesnijdend zwaard

ROS zijn gedeeltelijk gereduceerde of geëxciteerde vormen van zuurstof (Mittler, 2017). Er vindt typisch een (plaatselijke) productie plaats wanneer de plant een interactie aangaat met een ander organisme, dus ook wanneer een plaag of een pathogeen de plant probeert aan te vallen (biotisch). Daarnaast kunnen verschillende abiotische factoren, zoals UV-licht, ongunstige temperaturen, droogte, ozon, bodemverontreiniging en een tekort aan voedingsstoffen voor ROS-productie zorgen. ROS zijn belangrijke regulatoren voor zowel groei, ontwikkeling als verdediging binnen een organisme (Mittler *et al.*, 2004). In deze thesis zal enkel de ROS-productie bij de plant-pathogeeninteractie besproken worden. Deze productie vindt plaats wanneer de plant een pathogeen herkent via PTI of ETI (Torres, 2010). O_2^- , H_2O_2 en $OH\cdot$ zijn een paar ROS-verbindingen, maar het is vooral H_2O_2 dat gedetecteerd wordt tijdens onderzoeken (Piedras *et al.*, 1998; Grant & Loake, 2000).

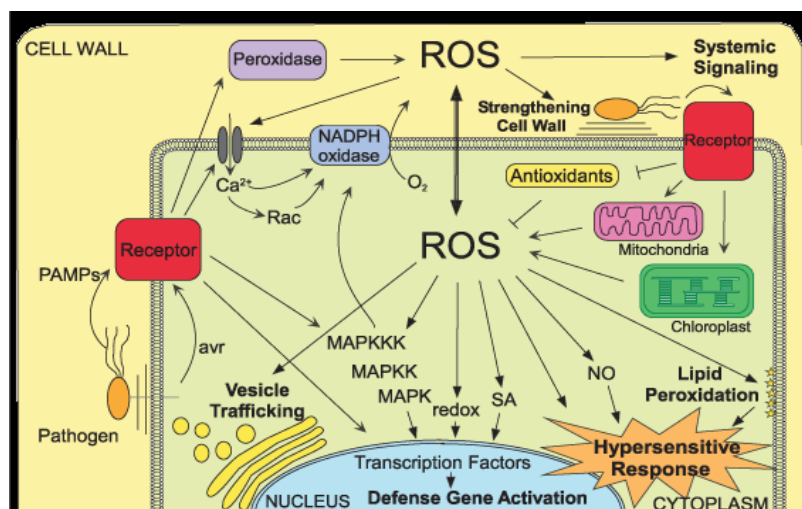
Door herkenning van een pathogeen via verschillende receptoren (PRR's of NB-LRR's) zullen inwendig tal van reacties ingang gezet worden (Figuur 13 & 14). NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) -oxidase, ook wel Rboh (Respiratory burst oxydase homolog) genoemd, is gelokaliseerd in het plasmamembraan van plantencellen en zorgt voor een primaire apoplastische oxidatieve burst na succesvolle herkenning van een pathogeen (Lamb & Dixon, 1997). Door deze herkenning zal een Ca^{2+} -influx gecreëerd worden, met als gevolg dat de concentratie aan Ca^{2+} in het cytoplasma stijgt (Torres, 2010). Deze stijging zal waargenomen worden door Calcium Dependent Protein Kinases (CDPK's) die vervolgens fosforylatie van het N-terminale uiteinde van Rboh veroorzaken. Daarna zal Rac GTPase (guanosinetriphosfaat) binden aan de twee EF (helix E-loop-helix F) -hand motifs van Rboh, waardoor het enzym in de nabijheid wordt gebracht van de katalytische bindingsplaats. Hierdoor zal NADPH-oxidase geactiveerd worden, wat zal leiden tot ROS-productie (Sanders *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2013). Onder invloed van de ROS-productie zullen nog meer Ca^{2+} -ionen in het cytoplasma vrijgesteld worden (Pei *et al.*, 2000). Wanneer de concentratie aan cytoplasmatische Ca^{2+} -ionen een bepaalde threshold heeft bereikt, zal de binding van Rac GTPase met de EF-hand motifs geïnhibeerd worden. Dit komt omdat ook Ca^{2+} kan binden aan de twee EF-hand motifs, waardoor deze ionen eigenlijk een negatief feedbackmechanisme teweegbrengen (Torres & Dangl, 2005). Door NADPH-oxidase wordt O_2^- gevormd uit O_2 (Lamb & Dixon, 1997) (Figuur 13). Apoplastische H_2O_2 -productie kan ook gemedieerd worden door celwand peroxidasen, oxalaatoxidasen of amino-oxidasen (Apel & Hirt, 2004). Naast de apoplastische ROS-productie, kunnen ROS ook voorkomen als bijproduct bij verschillende metabole processen, zoals fotosynthese en respiratie in de chloroplasten, mitochondriën en peroxisomen. Hierbij wordt O_2^- -en/of H_2O_2 geproduceerd.



FIGUUR 13: REGULATIE VAN NADPH (NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE) -OXIDASE VOOR DE PRODUCTIE VAN REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS). BIJ HET HERKENNEN VAN EEN PATHOGEEN OF EEN INSECT DOOR EEN PLANTENCCEL, ZAL HIERBIJ EEN CA²⁺-INFLUX GECREËERD WORDEN. DEZE ZAL CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASES (CDPK) AANSPOREN OM HET N-TERMINALE UITEINDE VAN RBOH (RESPIRATORY BURST OXYDASE HOMOLOG) TE FOSFORILEREN. HIERDOOR ZAL RAC GTPASE (GUANOSINETRIFOSFAAT) DE MOGELIJKHEID HEBBEN OM TE BINDEN MET DE TWEE EF (HELIX E-LOOP-HELIX F)-HAND MOTIFS VAN RBOH, WAARNA ROS-PRODUCTIE ZAL PLAATSVINDEN DOOR NADPH OXIDASE. DOOR DE ROS-PRODUCTIE ZULLEN EXTRA CA²⁺-IONEN VRIJGESTELD WORDEN IN HET CYTOPLASMA. DEZE KUNNEN EVENEENS BINDEN MET DE EF-HAND MOTIFS VAN RBOH EN FUNGEREN DUS ALS EEN NEGATIEF FEEDBACKMECHANISME (TAKAHASHI *ET AL.*, 2012).

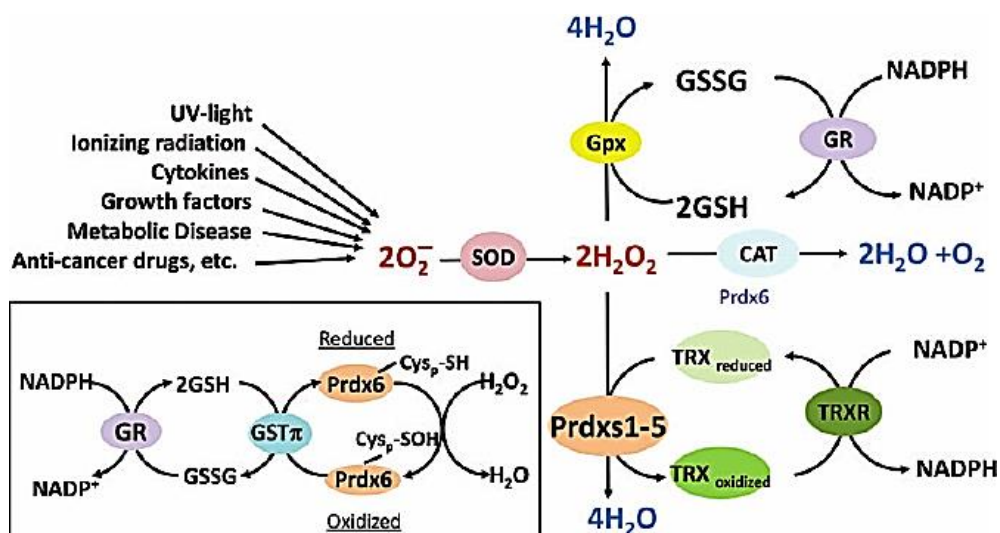
Downstream zal ROS zowel direct als indirect interageren met de aanvallende pathogeen. Chen en Schopfer (1999) konden uit hun onderzoek concluderen dat pathogenen direct werden gedood door reactieve zuurstofcomponenten en dan vooral door OH[•]. Uit onderzoek van Segal (2008) is echter gebleken dat ROS enkel indirect verantwoordelijk kan zijn voor het afdoden van pathogenen. Er zullen verschillende signaalroutes, zoals deze voor de productie van stikstofdioxide (NO), salicylzuur (SA), JA, ET en GLV, aangeschakeld worden. Deze signaalmoleculen hebben verschillende functies binnen het plantendefensiemechanisme. Zo kan NO samen met ROS in verband gebracht worden met de HR (Torres, 2010). GLV's zijn signaalmoleculen die een systemische reactie kunnen veroorzaken, waardoor deze component als primingsstof gebruikt kan worden (§1.5). SA, JA en ET zijn plantenhormonen die verschillende transcriptiefactoren in de celkern kunnen activeren, zodat defensiegenen worden afgeschreven. Deze defensiegenen coderen voor PR-eiwitten die een antimicrobiële werking kunnen hebben of schadelijk kunnen zijn voor de celwand van de aanvaller. Denk hierbij aan chitinase en glucanase die de celwanden van fungi en oömyceten kunnen afbreken (Pieterse *et al.*, 2009). De PR-eiwitten kunnen ook bijdragen tot de biosynthese van secundaire metabolieten. Dit zijn defensieve chemische verbindingen, waarvan terpenoïden, N-houdende alkaloiden en fenolverbindingen (flavonoïden) de belangrijkste zijn. Deze secundaire

metabolieten kunnen een invloed uitoefenen op de pathogeen. Zo zullen terpenoïden ervoor zorgen dat de membranen van pathogenen hun functie verliezen (Mithöfer & Boland, 2012). Samen met de plantenhormonen en PR-eiwitten worden secundaire metabolieten in de vacuole of de apoplast opgeslagen en via vesicle trafficking naar het celmembraan gebracht (Overmyer *et al.*, 2003; Torres, 2010). Dit is noodzakelijk om autotoxiciteit te verhinderen, want deze componenten zijn niet alleen schadelijk voor de pathogeen, maar kunnen ook een negatief effect hebben op de plantencel zelf (Gu *et al.*, 2017). Daarnaast is het mogelijk dat ROS zorgt voor celwandversterking, waardoor de pathogeen moeilijkheden ondervindt bij het binnendringen of verderzetten van zijn infectieweg in de plantencel (Overmyer *et al.*, 2003; Torres, 2010) (Figuur 14).



FIGUUR 14: OORZAKEN EN GEVOLGEN VAN ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES) -PRODUCTIE. WANNEER EEN PATHOGEEN HERKEND WORDT DOOR SPECIEFIEKE RECEPTOREN IN PLANTENCELMEMBRANEN, GAAT DIT GEPAARD MET EEN STIJGING IN CONCENTRATIE VAN CYTOPLASMATISCHE Ca²⁺-IONEN. DOOR DEZE IONEN ZAL RAC GTPASE (GUANOSINETRIFOSFAAT) KUNNEN BINDEN AAN RBOH (RESPIRATORY BURST OXYDASE HOMOLOG) EN NADPH (NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE) -OXIDASE ACTIVEREN. DOOR DIT ENZYM ZAL O₂ OMGEZET WORDEN NAAR O₂⁻ (ROS). ROS-PRODUCTIE ZAL NIET ALLEEN GEMEDIEERD WORDEN DOOR NADPH-OXIDASE, MAAR OOK CELWAND PEROXIDASEN KUNNEN ROS GENEREREN. NAAST DE APOPLASTISCHE ROS-PRODUCTIE, KUNNEN ROS OOK VOORKOMEN ALS BIJPRODUCT BIJ VERSCHILLENDE METABOLE PROCESSEN, ZOALS FOTOSYNTHESE EN RESPIRATIE IN DE CHLOROPLASTEN, MITOCHONDRIËN EN PEROXISOMEN. DEZE ROS ZULLEN DOWNSTREAM LEIDEN TOT ALLERHANDE REACTIES. ONDER INVLOED VAN ROS ZAL NO (STIKSTOF-OXIDE), SALICYLZUUR (SA), JASMONZUUR (JA) EN ETHYLEEN (ET) GEPRODUCEERD WORDEN. NO ZAL, NET ALS ROS ZELF, AANLEIDING GEVEN TOT EEN HYPERSENSITIEVE RESPONS (HR), TERWIJL SA, JA EN ET PLANTENHORMONEN ZIJN DIE PR (PATHOGENESE GERELATEERDE) -GENEN KUNNEN ACTIVEREN. DEZE PLANTHORMONEN, MAAR OOK PR-EIWITTEN KUNNEN DAN VIA VESICLE TRAFFICKING NAAR HET CELMEMBRAAN VAN DE GETROFFEN PLANTENCCEL GEBRACHT WORDEN OM DAAR AL DAN NIET DIRECT TE REAGEREN MET DE PATHOGEEN. ROS ZAL DAARNAAST OOK LIPIDE PEROXIDATIE VAN HET CELMEMBRAAN IN DE HAND WERKEN. HIERDOOR ZULLEN GREEN LEAF VOLATILES (GLV's) VRIJKOMEN DIE VERVOLGENS KUNNEN MIGREREN NAAR ANDERE PLANTENDELEN EN KUNNEN ZELFS ANDERE PLANTEN PRIMEN. ROS KAN BOVENDIEN LEIDEN TOT HET STERKER WORDEN VAN DE CELWAND, WAARDOOR DE PATHOGEEN DE CEL NIET MEER KAN BINNENDRINGEN OF MOEILIKHEDEN ONDERVINDT BIJ HET VERDERZETTEN VAN ZIJN INFECTIEWEG. OOK KAN ROS EEN SYSTEMISCHE SIGNALERING TEWEEG BRENGEN. NABURIGE CELLEN ZULLEN GEWAARSCHUWD WORDEN VOOR GEVAAR EN EVENTUEEL OOK EEN HR (HYPERSENSITIEVE RESPONS) ONDERGAAN (TORRES, 2010).

Bij een te lage ROS-productie bestaat het risico dat planten te weinig weerstand kunnen bieden tegen schimmels en bacteriën, waardoor een remming van celgroei en vermenigvuldiging ontstaat (cytostase). Echter bij een te hoge ROS-productie zal een oxidatieve vernietiging van de lichaamseigen gezonde cellen plaatsvinden door het erg reactieve en toxische karakter van ROS (cytotoxiciteit). Om een optimale ROS-concentratie te kunnen handhaven, staat de productie ervan in evenwicht met het antioxidantmechanisme in de plant. Dit mechanisme zorgt ervoor dat ROS terug wegreageert (Gill & Tuteja, 2010). De verwijdering van ROS wordt geïllustreerd in Figuur 15 en kan worden uitgevoerd door ROS-afvoerende antioxidantenzymen zoals superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) ascorbaat peroxidase (APX) en glutathionperoxidase (GPX). Dit wordt ook wel het ‘reactive oxygen gene netwerk’ genoemd (Mitter *et al.*, 2004). Een onvolledige lijst met enkele antioxidantenzymen is terug te vinden in bijlage 2 (Tabel 4). De intensiteit, lokalisatie en duur van ROS is dus een samenspel tussen ROS-producerende en ROS-afvoerende enzymen. In normale steady state omstandigheden is er altijd een minimale basisproductie van ROS op een basaal niet-toxisch niveau (Mittler *et al.*, 2004).



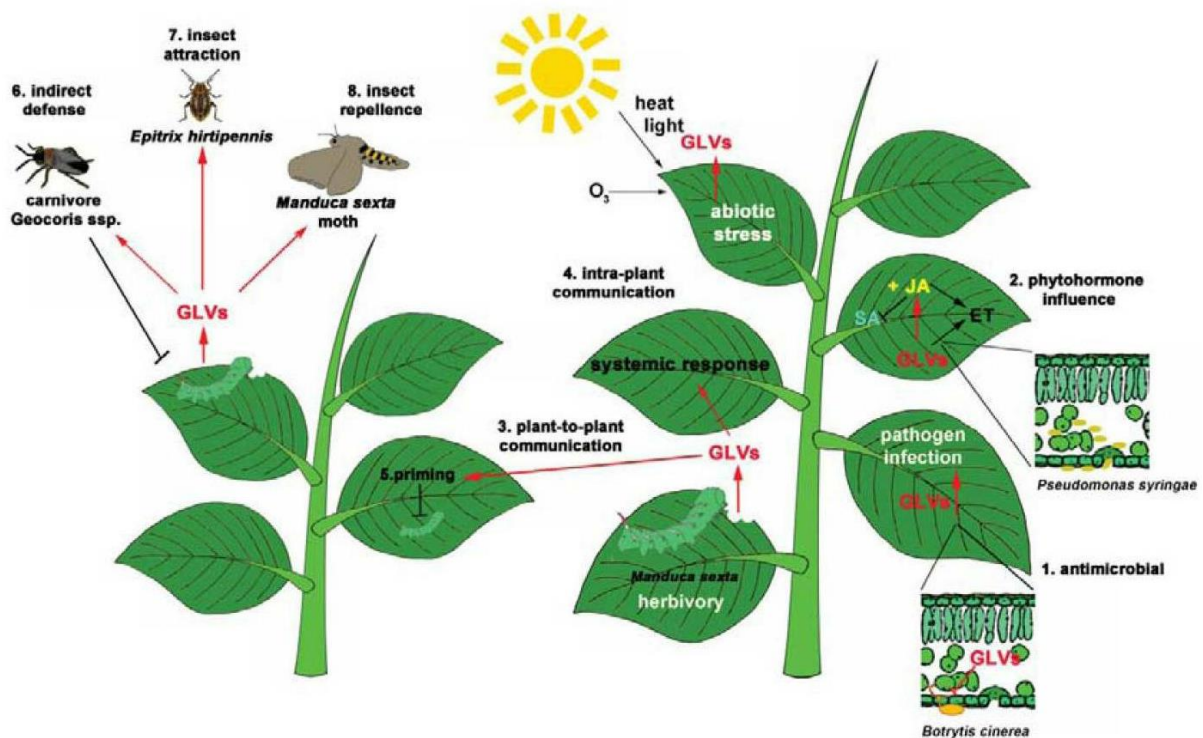
FIGUUR 15: VERWIJDERING VAN ROS (REACTIVE OXIGEN SPECIES) AAN DE HAND VAN VERSCHILLENDE ENZYMEN. VERSCHILLENDE (A)BIOTISCHE PRIKKELS KUNNEN ROS-PRODUCTIE STIMULEREN. DEZE ROS KUNNEN HET VERDEDIGINGSMECHANISME VAN DE PLANT PRIKKELLEN, MAAR ZIJN TEGELIJKERTIJD SCHADELIJK VOOR DE PLANTENCELLEN ZELF. HIERDOOR DIENT EEN OVERPRODUCTIE VERMEDEEN TE WORDEN. DIT KAN VERWEZENLIJKT WORDEN DOOR VERSCHILLENDE ANTIOXIDANTENZYMEN, ZOALS SOD (SUPEROXIDE DISMUTASE), CAT (CATALASE) EN GPX (GLUTATHIONPEROXIDASE) (HAMADA *ET AL.*, 2014). VOOR EEN GEDETAILLEERDE BESCHRIJVING VAN DE REACTIES WORDT VERWEZEN NAAR BIJLAGE 2.

1.5 GLV's van naderbij bekeken

1.5.1 De functies van GLV's

GLV's zijn vluchtige C6 semiochemicaliën (signaalmoleculen) die behoren tot de klasse van de VOC's. Een verhoogde afgifte vindt plaats wanneer planten in contact komen met een pathogeen of een insect en reageren daarnaast ook op abiotische stress (Scala *et al.*, 2013). Ze hebben verschillende functies binnen de plantenverdediging (Figuur 16). Zo oefenen ze een antibacteriële en -fungale werking uit en hebben ze een invloed op de productie van verschillende fytohormonen (ET, JA en SA). Daarnaast kunnen ze binnen dezelfde plant een systemische respons veroorzaken, maar ook andere planten primen. Ten slotte kunnen deze vluchtige componenten vijandelijke insecten afstoten en natuurlijke vijanden van aanvallende pathogenen lokken, wat indirecte verdediging wordt genoemd. Er kan besloten worden dat GLV's instaan voor de wisselwerking tussen planten onderling en bovendien aanzien kunnen worden als boodschappers bij tritrofe interacties. Daarnaast fungeren ze ook als signaalmoleculen voor de introductie van verhoogde resistentie (Scala *et al.*, 2013; Ameye, 2017).

In sectie 1.2.1 werd reeds aangehaald dat GLV's gebruikt kunnen worden om planten te primen. Hierdoor zullen planten veel sneller en/of sterker kunnen reageren op het moment dat plantenetende insecten of pathogenen een plant aanvalt.

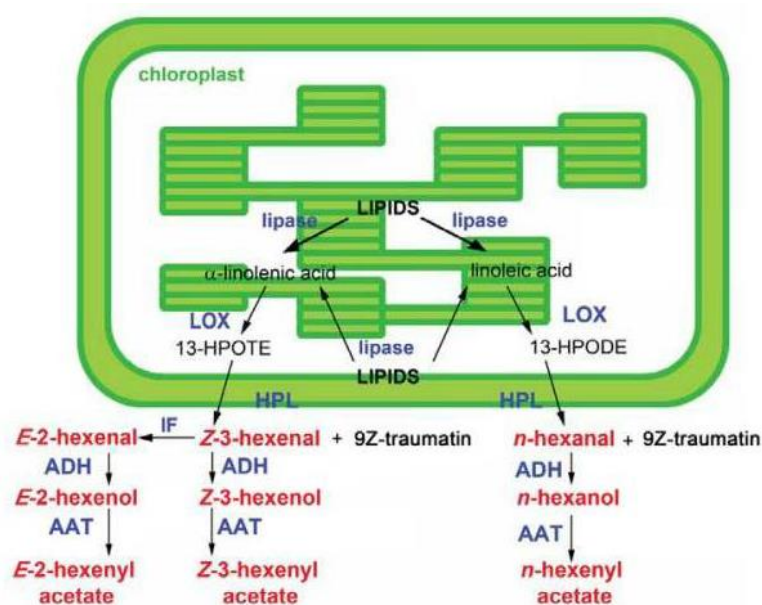


FIGUUR 16: VERSCHILLENDE MODES-OF-ACTION VAN GREEN LEAF VOLATIELES (GLV's). WANNEER EEN PLANT WORDT AANGEVALLEN DOOR EEN PATHOGEEN OF ABIOTISCHE STRESS ONDERVINDT, ZAL DEZE ONDER ANDERE GLV'S (SIGNAALMOLECULEN) VRIJSTELLEN. DEZE HEBBEN VERSCHILLENDE FUNCTIES BINNEN DE PLANTENBESCHERMING. ZO KUNNEN ZE EEN ANTIBACTERIËLE WERKING HEBBEN (1) EN GAAN ZE EEN INVLOED UITOEFENEN OP DE BIOSYNTHESEWEG VAN PLANTENHORMONEN (JASMONZUUR (JA) EN ETHYLEEN (ET)) (2). GLV'S ZIJN VLUCHTIGE COMPONENTEN DIE SYSTEMISCHE KUNNEN WERKEN. DIT WIL ZEGGEN DAT ZE ANDERE PLANTENDELEN VAN DEZELFDE PLANT KUNNEN WAARSCHUWEN VOOR GEVAAR (INTRA-PLANT COMMUNICATIE) (4). DAARNAAST KUNNEN ZE OOK ANDERE PLANTEN PRIMEN, WAARDOOR DEZE 'GEVACCINEERD' ZIJN TEGEN EEN LATERE AANVAL (3 & 5). BOVENDIEN IS HET MOGELIJK DAT ZE INDIRECTE DEFENSIE AANSCHAKELLEN DOOR NATUURLIJKE VIJANDEN VAN PATHOGENEN TE LOKKEN (6 & 7). TOT SLOT ZIJN ZE OOK IN STAAT OM VIJANDELIJKE INSECTEN AF TE STOTEN (8) (SCALA ET AL., 2013).

1.5.2 De biosyntheseroute van GLV's

De biosynthese van GLV's gebeurt via de hydroperoxide lipasetak (HPL) van de oxylipineroute (Porta & Rocha-Sosa, 2002) (Figuur 17). Hierbij worden lipiden uit het celmembraan oxidatief afgebroken doordat vrije radicalen (ROS) op die plaats elektronen weghalen. Dit resulteert in celbeschadiging en de vorming van GLV's. Eerst worden galactolipiden gedeacyleerd, deze reactie wordt gekatalyseerd door lipases. Hierdoor wordt enerzijds α -linoleenzuur en anderzijds linolzuur vrijgesteld (Matsui *et al.*, 2000). Vervolgens zullen deze twee gevormde chemische stoffen de substraten vormen voor de niet-heem ijzerbindende enzymen C13-lipoxygenasen (LOX). Deze zullen ervoor zorgen dat de toevoeging van een zuurstofmolecule gekatalyseerd wordt. Op die manier kunnen linoleenzuur 13-hydroperoxide en linolzuur 13-hydroxyperoxide gevormd worden (Kombrink, 2012). Deze twee zijn niet enkel het substraat van HPL, maar kunnen in andere takken van de oxylipine-route ook het substraat zijn van onder andere peroxygenase (POX), divinylether synthase (DES) en alleenoxidesynthase (AOS). Deze laatste

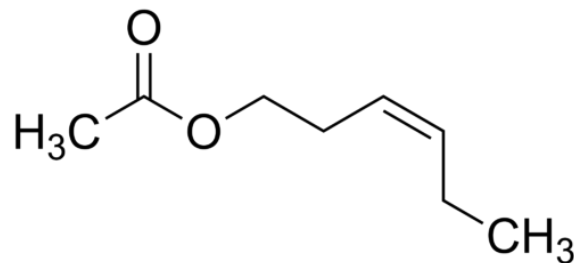
route zal aanleiding geven tot JA-synthese. Om GLV's te kunnen vormen, zal het enzym 13-HPL gebruikt worden om 13-hydroperoxide te splitsen in een C12 verbinding (9Z-taumatine) en een C6 verbinding. Welke C6 verbinding gevormd wordt, is afhankelijk van het voorlopermolecule. α -linoleenzuur zal aanleiding geven tot de synthese van Z-3-hexenal, terwijl linolzuur zal leiden tot n-hexanal (Matsui, 2006). Z-3-hexenal is een vrij onstabiele molecule en zal spontaan of door (3Z):(2Z)-enal isomerase (IF) deels omgezet worden naar E-2-hexenal (Noordermeer *et al.*, 1999). De drie ontstane C6 verbindingen kunnen door alcohol dehydrogenase (ADH) en alcohol acyltransferase (AAT) omgezet worden naar de uiteindelijke GLV-moleculen, waarvan Z-3-HAC er één is (Matsui, 2006).



FIGUUR 17: DE BIOSYNTHESEROUTE VAN GREEN LEAF VOLATILES (GLV's). EERST WORDT DE REACTIE DIE ZORGT VOOR DE DEACYLERING VAN GALACTOLIPIDEN IN CHLOROPLASTEN GEKATALYSEERD DOOR LIPASEN. HIERBIJ ONTSTAAT ENERZIJD A-LINOLEENZUUR EN ANDERZIJD LINOLZUUR. DOOR 13-LIPOXYGENASEN (LOX) -ACTIVITEIT ZULLEN DEZE STOFFEN RESPECTIEVELIJK OMGEZET WORDEN NAAR 13(S)-HYDROPEROXY 9Z,11E,15Z- OCTADECATRIENOÏNEZUUR (13-HPOTE) EN 13(S)-HYDROPEROXY 9Z,11E-OCTADECADIËNZUUR (13-HPODE). SAMEN WORDEN ZE 13-HYDROXYPEROXIDEN GENOEMD. HYDROPEROXIDE LIPASE (HPL) ZAL VERVOLGENS DE OMZETTINGSREACTIES VAN DE 13-HYDROXYPEROXIDEN KATALYSEREN, WAARBIJ Z-3-HEXENAL EN N-HEXANAL WORDT VRIJGESTELD. Z-3-HEXENAL ZAL DOOR (3Z):(2Z)-ENAL ISOMERASE (IF) OF SPONTAAN OMGEZET WORDEN NAAR E-2-HEXENAL (DEELS). DEZE DRIE GEVORMDE C6-VERBINDINGEN ZULLEN DOOR ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH) EN ALCOHOL ACYLTRANSFERASE (AAT) OMGEZET WORDEN IN HUN RESPECTIEVELIJKE GLV-PRODUCTEN: E-2-HEXENYL ACETAAT (HAC), Z-3-HAC EN N-HAC (SCALA *ET AL.*, 2013).

2 Probleem- en doelstelling

Alvorens het GLV Z-3-HAC (Figuur 18) kan gebruikt worden als duurzaam alternatief voor pesticiden, zal eerst hun werking op planten grondig onderzocht moeten worden. In voorgaande onderzoeken op tarwe werd reeds de fytotoxische concentratie bepaald. Hieruit blijkt dat er zich bij een concentratie van 100 μM Z-3-HAC een verminderde groei voordoet (Cannoot *et al.*, 2018). Aanvullend hierop zal in dit proefschrift onderzocht worden welke pathways activatie ondervinden na blootstelling van tarwe aan Z-3-HAC (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ zuiverheid). Eerst dient achterhaald te worden welke plantendelen een invloed ondervinden van deze component, waarna gekeken wordt of er een verhoogde activiteit van een aantal geselecteerde enzymen plaatsgrijpt. Om deze resultaten te kunnen bevestigen, wordt uiteindelijk nog een RT-qPCR van de vermoedelijke enzymproducerende genen uitgevoerd.



FIGUUR 18: DE STRUCTUURFORMULE VAN Z-3-HEXENYL ACETAAT.

Onderzoeksvragen

- Vanaf welke concentratie aan Z-3-HAC is er een negatief effect op de kieming en de groei van tarwe en tomaat?
- Indien er een fytotoxisch effect is, welk orgaan wordt hierbij aangetast?
- Welke pathways worden opgereguleerd wanneer Z-3-HAC toegevoegd wordt? Welk mechanisme veroorzaakt de toxiciteit?

Hypothese

- Wanneer planten worden blootgesteld aan de component Z-3-HAC wordt het induceerbare afweersysteem gestimuleerd. Hierdoor komt ROS vrij, waarbij de productie van allerlei signaalmoleculen en secundaire metabolieten stijgt. Wanneer de concentratie van deze stoffen te hoog wordt, zal dit zorgen voor een fytotoxisch effect.

3 Materiaal en methoden

3.1 Plantmateriaal en proefopzet

In de eerste fase van het onderzoek worden monocotylen vergeleken met dicotylen, waarna later meer wordt toegespitst op de monocotylen. Voor ieder experiment met een monocotyl wordt tarwe (*Triticum aestivum* L. var. Sahara) van *AVEVE Zaden* opgekweekt. Bij het testen van een dicotyl zal gekozen worden voor tomaat (*Solanum lycopersicum* L. var. Moneymaker) van *Vereecken's Zaden*. Voor het opkweken van het plantmateriaal wordt gebruik gemaakt van Weckbokalen met een inhoud van 1500 mL. De tarwezaden worden gegroeid op MS (Murashige and Skoog) -medium dat bestaat uit drie bestanddelen, namelijk 4,4 gram per liter MS zouten met vitaminen, 8,0 gram plant agar per liter medium en 10 gram sucrose per liter medium. Het MS-medium waarin tomaten gezaaid worden, is bijna identiek. In plaats van 8,0 gram plant agar per liter medium wordt hier 5,0 gram per liter gebruikt. Hierdoor zal het medium weker zijn, waardoor de tomatenplanten makkelijker kunnen wortelen. Het mengsel wordt vervolgens aangelengd met gedestilleerd water en op pH 5,7 gebracht met KOH (1 M).

Net als de Weckbokalen, wordt het medium geautoclaveerd om de kans op bacteriële contaminaties of schimmelinfecties te reduceren. Vervolgens wordt 250 mL medium per bokaal gegoten. Vooraleer gezaaid kan worden, dienen de tarwe- en tomatenzaden eerst gesteriliseerd te worden. Dit gebeurt door de zaden te weken in sodium hypochloriet (javel, 14%) en daarna goed te spoelen met gedestilleerd water. Tarwezaden worden tien minuten in javel geweekt, terwijl tomatenzaden slechts vijf minuten worden geweekt.

Voor het zaaien, wordt gewerkt in een verticale flow eveneens om ongewenste micro-organismen te vermijden. Breng zes à zeven zaden in een bokaal samen met een klein Petrischaaltje. Deze laatste zal fungeren als houder voor het doekje met GLV (Z-3-HAC, Sigma-Aldrich). Op die manier zullen de vluchtige componenten gelijkmatig en verdeeld over de hele periode afgegeven worden en is er geen rechtstreeks contact met het medium of de plant. De plant zal afhankelijk van het experiment, onmiddellijk of pas na enkele dagen behandeld worden met Z-3-HAC. In de appendix (Bijlage 3) kan de hoeveelheid toegevoegde component in functie van de gewenste concentratie teruggevonden worden (Tabel 5). Na het zaaien worden de Weckbokalen afgesloten door middel van een glazen deksel. Het openen van het deksel is niet meer mogelijk door de PTFE (polytetrafluorethyleen) tape en parafilm die errond gedaan worden. Figuur 19 geeft de opstelling van een Weckbokaal weer. Daarna worden de bokalen met tomatenzaden gewikkeld in zilverpapier, omdat tomaten enkel ontkiemen in het donker. Voor tarwezaden blijkt dit niet nodig te zijn. Uiteindelijk ontkiemen en groeien de gezaaide (en geprimede) planten op onder labocondities (T: 21°C, 16 uur-8 uur licht-donker regime).

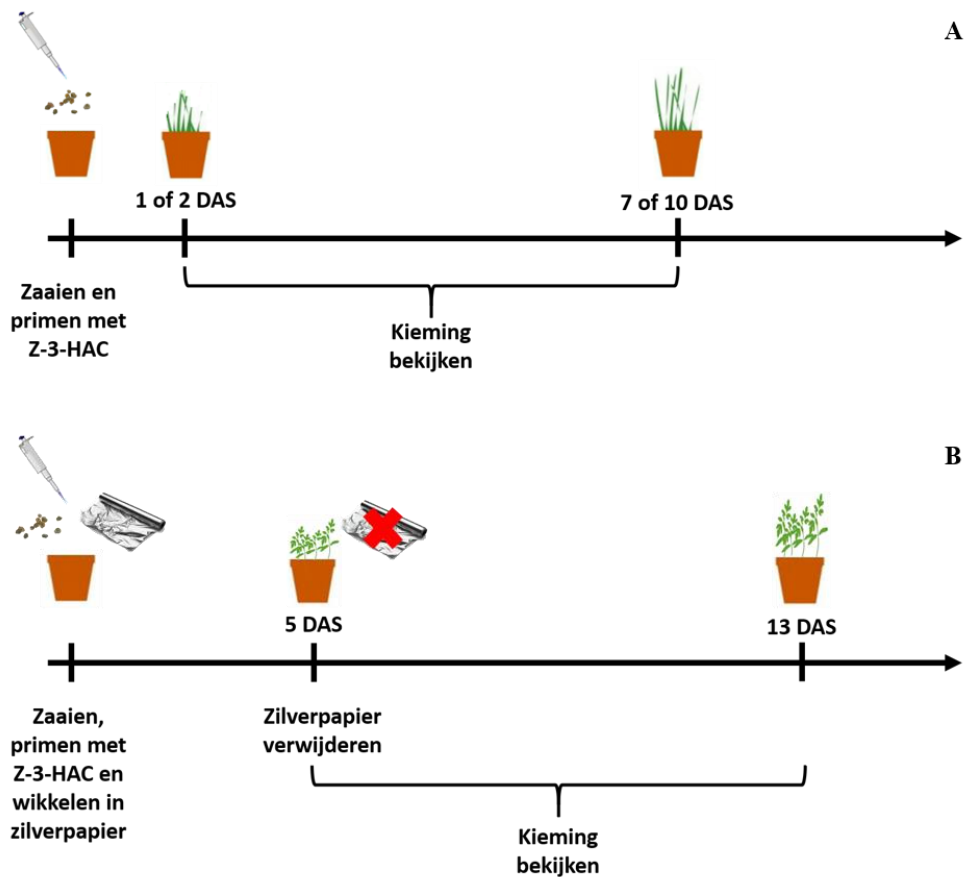


FIGUUR 19: OPSTELLING WECKBOKAAL. GEAUTOCLAVEERD MS (MURASHIGE AND SKOOG) -MEDIUM WORDT AANGEBRACHT IN DE EVENEENS GEAUTOCLAVEERDE WECKBOKAAL. ER WORDEN ZES À ZEVEN GESTERILISEERDE ZADEN GEPLAATST IN DE BOKAAL SAMEN MET EEN PETRISCHAALTJE. DIT PETRISCHAALTJE ZAL DIENST DOEN ALS HOUDER VOOR EEN DOEKJE MET GREEN LEAF VOLATILES (GLV). OM CONTAMINATIE TE VOORKOMEN WORDT GEWERKT IN EEN VERTICALE FLOW. UITEINDELIJK WORDT DE BOKAAL AFGESLOTEN DOOR EEN GLAZEN DEKSEL, PTFE (POLYTETRAFLUORETHYLEEN) TAPE EN PARAFILM.

3.2 Kiemtest

Met een kiemtest kan aangetoond worden of zaden ontkiemen onder bepaalde groeiomstandigheden. In deze proefopzet wordt zowel tarwe als tomaat opgekweekt op de manier zoals hierboven beschreven (§3.1). Op het schaalpje wordt onmiddellijk na het zaaien Z-3-HAC aangebracht. Er werd op voorhand een standaardreeks van deze volatiele component aangemaakt. Bij tarwe wordt in een eerste test gevarieerd tussen 0 μM en 500 μM (0, 50, 100, 250 en 500 μM), om dan bij een tweede analyse in te zoomen op het bereik tussen 0 μM en 100 μM Z-3-HAC (0, 25, 50, 75 en 100 μM). De resultaten van deze proeven worden later samengenomen. De kieming wordt gescoord vanaf de eerste dag tot zeven à tien dagen na het zaaien (DAS). Het scoren zal gebeuren door het aantal kiemende planten per behandeling op te tellen.

Bij de tomatenplantjes werd onmiddellijk met alle concentraties aan GLV gewerkt (0, 25, 50, 75, 100, 250 en 500 μM). Het geheel wordt gedurende de eerste vijf dagen van de kieming in het donker gehouden. Het scoren van de kieming gebeurt tot 13 dagen na het zaaien op dezelfde manier als bij tarwe. Een schematische voorstelling van beide testen wordt weergegeven in Figuur 20.



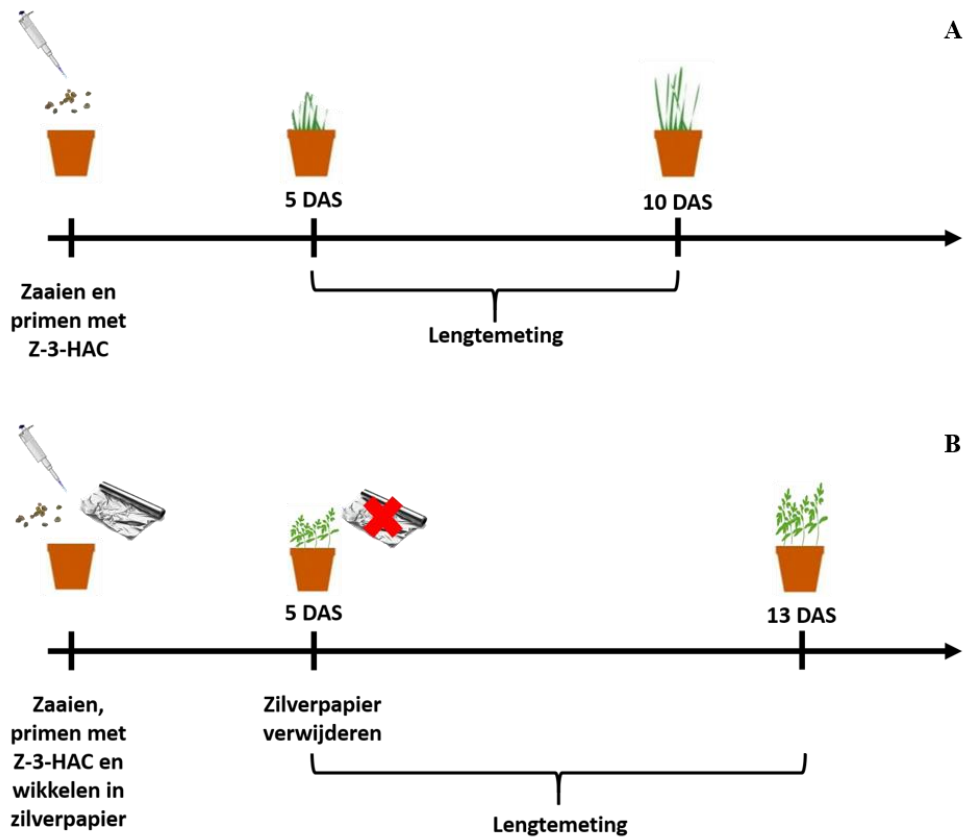
FIGUUR 20: SCHEMATISCHE VOORSTELLING KIEMTEST (TARWE EN TOMAAT). (A) TARWE WORDT ONMIDDELIJK NA HET ZAAIEN, GEPRIMED MET VERSCHILLENDE CONCENTRATIES AAN Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). VANAF ÉÉN À TWEE DAGEN TOT EN MET ZEVEN À TIEN DAGEN NA ZAAIEN (DAS) WORDT DE KIEMING GESCOORD DOOR HET AANTAL KIEMENDE PLANTEN PER BEHANDELING OP TE TELLEN. (B) NA HET ZAAIEN VAN DE TOMATEN EN HET ONMIDDELIJK PRIMEN MET Z-3-HAC WORDEN DE WECKBOKALEN GEWIKKELD IN ZILVERPAPIER OM ZO DE KIEMING TE BEVORDEREN. NA VIJF DAGEN WORDT HET ZILVERPAPIER VERWIJDERD EN KAN DE KIEMING OP DEZELFDE MANIER GESCOORD WORDEN ALS BIJ TARWE, TOT 13 DAS.

3.3 Fytotoxiciteitstest

Door het uitvoeren van een fytotoxiciteitstest kan onderzocht worden of bepaalde leefomstandigheden een invloed hebben op de groei en ontwikkeling van planten. Tijdens deze testen wordt tarwe opgekweekt zoals aangegeven in sectie 3.1. Er wordt een test uitgevoerd waarbij direct na het zaaien Z-3-HAC toegevoegd worden (0, 25, 50, 75 en 100 μM). Vijf dagen na het toevoegen van de component start de lengtemeting. De groei wordt gedurende enkele dagen geëvalueerd door de lengte van iedere tarweplant te meten en statistisch te verwerken via SPSS (version 25.0.0.2, IBM) (Figuur 21 (A)).

Er wordt eveneens een gelijkaardige test op tomaat uitgevoerd. Onmiddellijk na het zaaien wordt Z-3-HAC toegevoegd (0, 25, 50, 75, 100, 250 en 500 μM) en het geheel wordt gedurende vijf dagen in zilverpapier gehouden. De lengtemeting start op de zevende dag na het zaaien en

loopt tot dag dertien. Het scoren en verwerken van de resultaten gebeurt op dezelfde manier als bij de tarweplanten. Figuur 21 (B) geeft een overzicht van de gevolgde procedure.



FIGUUR 21: SCHEMATISCHE VOORSTELLING FYTOTOXICITEITSTEST (TARWE EN TOMAAT). (A) ONMIDDELIJK NA HET ZAAIEN VAN TARWE WORDT Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) IN VERSCHILLENDE CONCENTRATIES AAN DE WECKBOKAAL TOEGEVOEGD. VANAF 5 DAS (DAYS AFTER SOWING) TOT EN MET 10 DAS WORDT DE LENGTE VAN DE TARWEPLANTEN GESCOORD. (B) OP 0 DAS WORDEN TOMATEN GEZAAID EN ONMIDDELIJK GEPRIMED MET DE VOLATIELE COMPONENT. HET GEHEEL WORDT GEWIKKELD IN ZILVERPAPIER OM DE KIEMING TE BEVORDEREN. NA VIJF DAGEN WORDT DIT VERWIJDERD EN VANAF DAN START DE LENGTEMETING TOT EN MET 13 DAS.

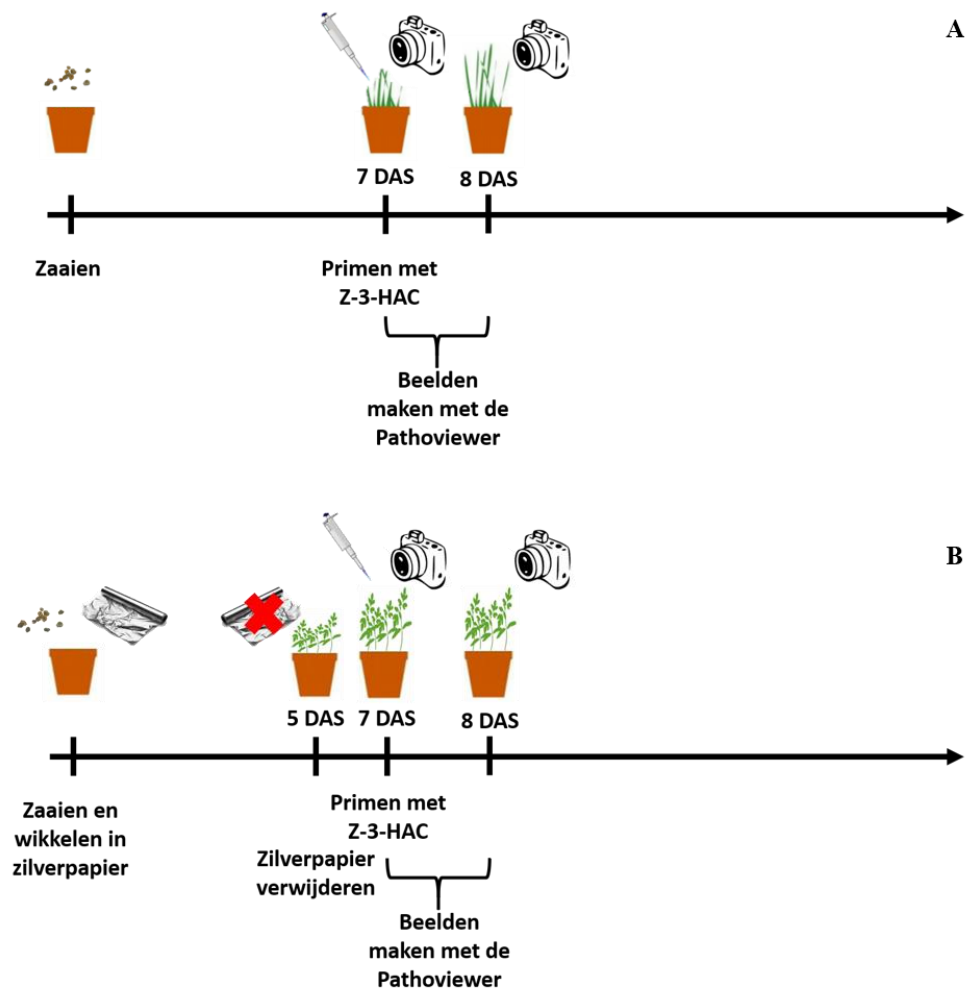
3.4 Pathoviewer: multispectrale beeldvorming

Om automatisch de gezondheidsstatus van een blad of plant te kunnen analyseren, wordt gebruik gemaakt van een op maat gemaakt fenotyping en micro-dispenser platform: de *PathoViewer*. De *PathoViewer* maakt het mogelijk om diverse fysiologische kenmerken in real time te visualiseren, gebaseerd op specifieke absorptie-, reflectie- en emissiepatronen. Deze omvatten kleurbeelden (Rood-Groen-Blauw: RGB), anthocyaaniveaus, chlorofyl (fluorescentie), nabij infrarood en groene en rode fluorescerende eiwit gemerkte organismen. Het centrale deel van het platform bestaat uit een 3CCD (Charge-Coupled Devices) camera, uitgerust met twaalf optische interferentiefilters (CropReporter, Phenovation, Wageningen, Nederland), gemonteerd op een Cartesiaanse coördinatenrobot die in een geacclimatiseerde omgeving werd ondergebracht. De RGB-beelden werden genomen en de maximale efficiëntie

van PSII (fotosysteem II) (F_V/F_M) (Baker, 2008) werden gemeten volgens de specificaties van de fabrikant.

Wanneer lichtenergie (foton) invalt op een plant, kan dit gebruikt worden voor drie doeleinden, namelijk fotosynthese, chlorofyl fluorescentie en warmteproductie. Indien de plant stress ondervindt door bijvoorbeeld een pathogeeninfectie, zal de fotosynthese dalen. De opgenomen energie moet echter wel terug kunnen afgevoerd worden, met als gevolg dat de chlorofyl fluorescentie zal stijgen. Via de PathoViewer kan de minimale fluorescentie (F_0) gemeten worden door ervoor te zorgen dat PSII volledig geoxideerd of beschikbaar is. Op dat moment is er een minimum aan fluorescentie. Wanneer een korte felle lichtflits wordt blootgesteld aan de plant, zal PSII onmiddellijk en volledig gereduceerd worden. Alle energie die dan extra door de plant wordt opgenomen, zal terug vrijgesteld worden. Dit gebeurt onder de vorm van fluorescentie. Bijgevolg wordt hier de maximale fluorescentie (F_M) gemeten. De variabele fluorescentie (F_V) kan vervolgens bepaald worden door F_0 af te trekken van F_M . De factor F_V/F_M wordt verkregen door F_V te delen door F_M en geeft de maximale efficiëntie van PSII weer. Het kan bovendien ook gezien worden als een indicator voor fysiologische stress (Baker, 2008).

Via de PathoViewer kan met behulp van het F_V/F_M -beeld de precieze schade aan de plant bepaald worden. Voor het uitvoeren van deze testen worden tarwe en tomaten opgekweekt op de manier zoals eerder aangegeven (§3.1). Op het moment dat de kiemplanten één week oud zijn, wordt een concentratie van 50 μM Z-3-HAC aan iedere bokaal toegevoegd. Na 0 uur, 1 uur, 2 uur, 4 uur, 8 uur, 24 uur en 32 uur wordt een multispectraal beeld (ROI (Region of Interest) tarwe: 200 x 500 pixels; ROI tomaat: 250 x 450 pixels) gemaakt met de PathoViewer om de hoogte van de schade in functie van de duur van de blootstelling in beeld te brengen. Alle verkregen data worden eveneens verwerkt via SPSS (version 25.0.0.2, IBM). Figuur 22 geeft een overzicht van de te ondernemen stappen.



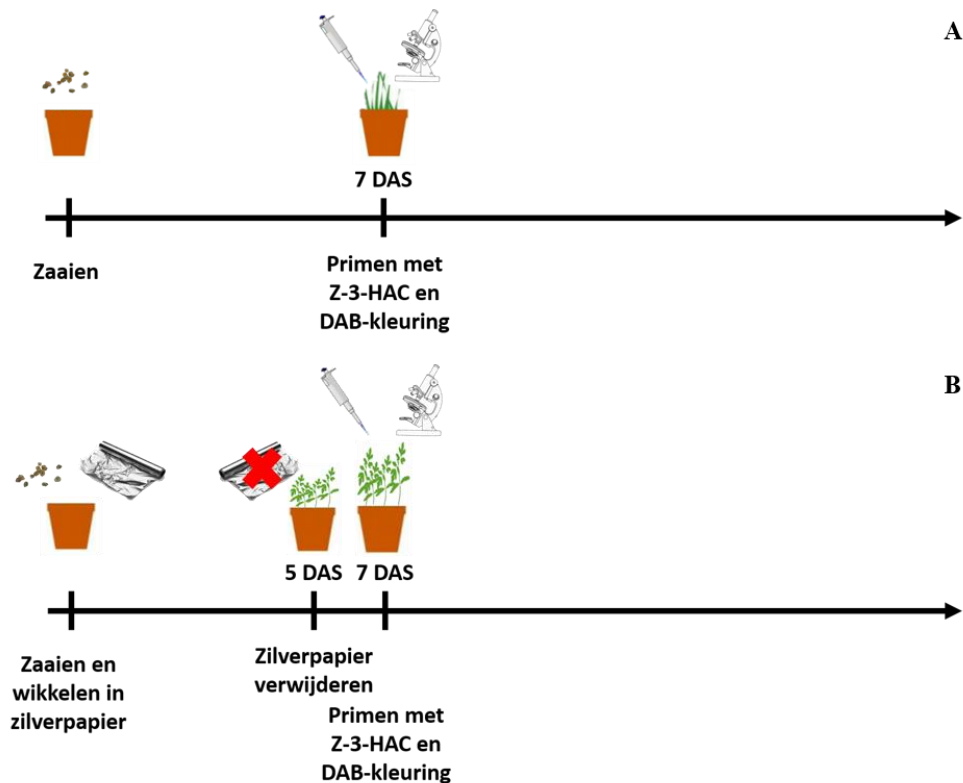
FIGUUR 22: SCHEMATISCHE VOORSTELLING MULTISPECTRALE BEELDVORMING (TARWE EN TOMAAT). (A) ZEVEN DAGEN NA HET ZAAIEN (DAS) VAN TARWE WORDT 50 μM Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) TOEGEVOEGD AAN IEDERE WECKBOKAAL. OP VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN NA DE BEHANDELING WORDT EEN MULTISPECTRAAL BEELD GENOMEN MET DE PATHOVIEWER. (B) TOMAAT WORDT GEZAAID EN DE BOKAAL WORDT GEWIKKELD IN ZILVERPAPIER. VIJF DAGEN LATER WORDT HET ZILVERPAPIER ER TERUG AFGEHAALD EN OP 7 DAS WORDT 50 μM Z-3-HAC TOEGEVOEGD AAN IEDERE BOKAAL. DAARNA WORDEN OP VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN MULTISPECTRAAL BEELDEN GENOMEN MET DE PATHOVIEWER.

3.5 DAB-kleuring en lichtmicroscopie

De tarwe- en tomatenplanten worden één week opgegroeid zonder Z-3-HAC. Daarna wordt 50 μM van deze vluchtige component toegevoegd en via een 1 mg mL^{-1} 3,3'-DAB-HCl-kleuring kan vervolgens de vrijstelling van H_2O_2 aangetoond worden ($\text{pH} = 3,8$). De lage pH is nodig om DAB te stabiliseren (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). DAB wordt geoxideerd door H_2O_2 , waardoor deze vervolgens een bruine neerslag vormt. Via een lichtmicroscop kunnen de verkleurde regio's in het blad duidelijker zichtbaar gemaakt worden (Abcam, z.d.).

In praktijk (Figuur 23) worden delen van het blad die 0 uur, 1 uur en 2 uur werden blootgesteld aan 50 μM Z-3-HAC afgesneden en in een epje gebracht. Daarna wordt DAB toegevoegd totdat

ieder bladdeel volledig ondergedompeld is. Plaats dit open epje 30 minuten in een vacuümzuiger. Verwijder daarna alle DAB-kleurstof uit het epje en voeg Clearing Solution Alcoholic Lactophenol (samenstelling: 24,39 mL fenol, 16 mL melkzuur en 31 mL glycerol) toe tot alles onder zit. Plaats het geheel in een warmwaterbad bij 80°C tot de bladeren voldoende ontkleurd zijn (\pm 45 minuten). Maak een preparaatje en bekijk het onder de lichtmicroscop. Plaatsen met een donkerdere bruine kleur duiden op de plaatselijke productie van H₂O₂.



FIGUUR 23: SCHEMATISCHE VOORSTELLING DAB (DIAMINOBENZIDINE) -KLEURING (TARWE EN TOMAAT). (A) ZEVEN DAGEN NA HET ZAAIEN (DAS) VAN TARWE WORDEN DE PLANTEN GEPRIMED MET Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) EN NA BEPAALDE TIJDSTIPPEN WORDT DE DAB-KLEURING UITGEVOERD. (B) TOMAAT WORDT GEZAAID EN DE WECKPOTTEN WORDEN OMWIKKELD MET ZILVERPAPIER. NA VIJF DAGEN WORDT DIT TERUG VERWIJDERD. OP 7 DAS DIENT Z-3-HAC TOEGEVOEGD TE WORDEN (VERSCHILLENDE INWERKINGSTERMIJNEN) WAARNA DE DAB-KLEURING WORDT UITGEVOERD.

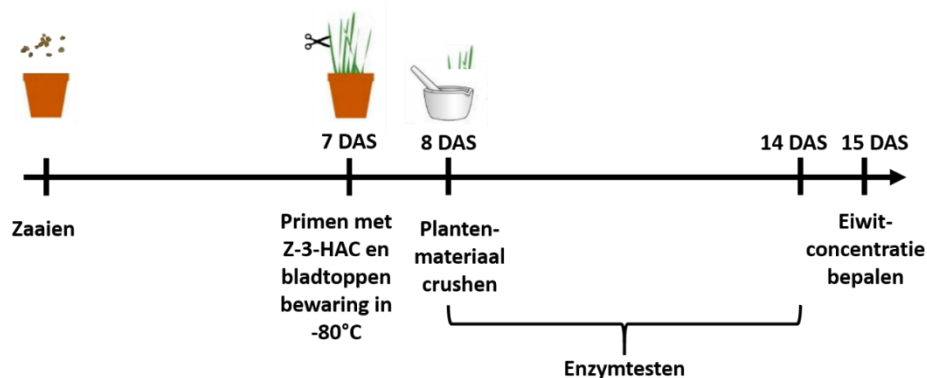
3.6 Enzymtesten

Via enkele enzymtesten kan de ROS-productie en -scavenging in de bladeren van planten aangetoond worden. Twee van deze enzymtesten werden gekozen op basis van Figuur 15 uit de literatuurstudie.

Tarwe wordt een week opgegroeid in afwezigheid van Z-3-HAC. Op 7 DAS worden bij bepaalde bokalen 50 μ M van deze component toegevoegd. Na verschillende inwerkingsperiodes (0 uur, 0,5 uur, 1 uur, 2 uur en 4 uur) wordt samen met een controle een PathoViewerbeeld gemaakt om te kijken tot waar de schade zich uitgespreid heeft. Vervolgens

worden de beschadigd plantendelen eraf geknipt en onmiddellijk in vloeibaar stikstof gebracht, zodat de reacties direct zouden stoppen. Tot slot worden de stalen bewaard bij -80°C tot de enzymtest uitgevoerd wordt (Figuur 24). Uit iedere bokaal kunnen door gebrek aan biologisch materiaal slechts twee herhalingen gehaald worden. Na het analyseren van alle stalen is het bijgevolg onmogelijk om de verworven data via SPSS (version 25.0.0.2, IBM) te verwerken.

Bij iedere enzymtest wordt op hetzelfde plantenmateriaal een bijhorende eiwitconcentratiebepaling uitgevoerd via de Bradfordmethode. Op die manier kunnen de bekomen enzymactiviteiten of eiwitconcentraties uitgezet worden ten opzichte van de totale hoeveelheid eiwit aanwezig in elk staal. Hierbij wordt telkens gestart vanuit hetzelfde supernatant als bij de enzymtesten. Er wordt gewerkt volgens de richtlijnen zoals die beschreven zijn in het protocol ‘Protein quantitation assay K880’ van Carl Roth (z.d.). Om de stalen te verdunnen, wordt gewerkt met de buffer die eerder gebruikt werd bij iedere enzymtest in plaats van met double-distilled water (ddH_2O) zoals aangegeven in het protocol. Omdat de buffers van de Phenolic Compounds Assay en de Lipid Peroxidation Assay niet compatibel zijn met deze test, wordt enkel verder gerekend met de gemiddelde eiwitconcentraties bekomen bij de SOD- en de CAT-test.

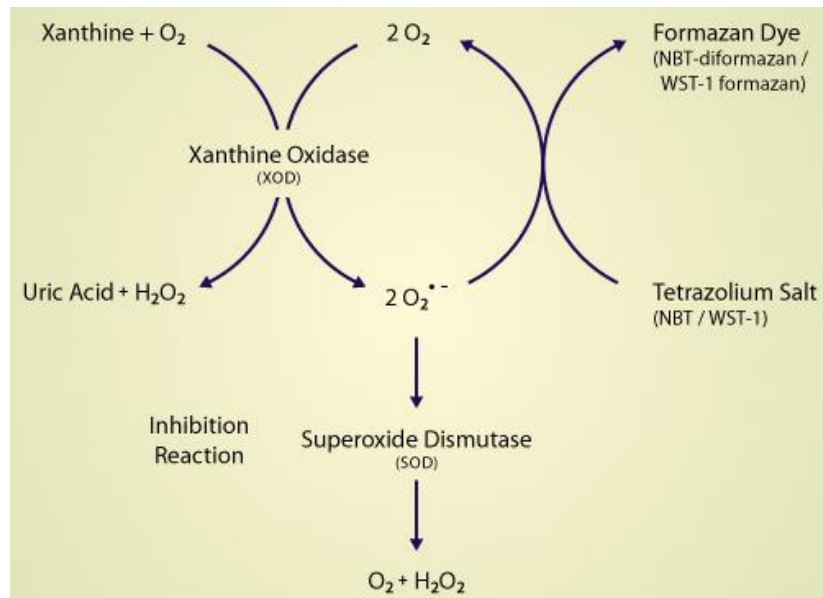


FIGUUR 24: SCHEMATISCHE VOORSTELLING ENZYMTTESTEN (TARWE). ZEVEN DAGEN NA HET ZAAIEN (DAS), WORDT TARWE GEPRIMED MET $50 \mu\text{M}$ Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). NA VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN WORDEN DE TARWEPLANTEN BEKEKEN VIA PATHOVIEWERBEELDEN OM DE PLAATS VAN DE SCHADE TE KUNNEN IDENTIFICEREN. DIT DEEL VAN DE PLANT WORDT VERVOLGENS IN EEN EPJE GEBRACHT EN BEWAARD BIJ -80°C . DE DAG ERNA WORDT HET PLANTMATERIAAL GEGRUSHED EN KUNNEN DE ENZYMTTESTEN UITGEVOERD WORDEN. TOT SLOT WORDT VAN IEDER STAAL DE EIWITCONCENTRATIE BEPAALD VIA DE BRADFORDMETHODE.

3.6.1 Superoxide Dismutase Assay Kit

Tijdens deze masterproef wordt gebruik gemaakt van de Superoxide Dismutase Assay Kit geproduceerd door Cayman Chemical (Artikelnummer: 706002). De omzetting van $\text{O}_2^{\cdot-}$ naar H_2O_2 wordt gekatalyseerd door SOD (EC 1.15.1.1). De SOD-activiteit kan bepaald worden doordat tetrazoliumzout uit de kit reageert met $\text{O}_2^{\cdot-}$ tot formazan kleurstof. Hoe meer verkleuring er optreedt, hoe minder SOD aanwezig is. Dit kan verklaard worden doordat de

snelheid van de Formazan kleurstof vorming verlaagd wordt bij een hogere SOD-activiteit (Figuur 25). De verkleuring kan gemeten worden via spectrofotometrie bij een golflengte van 450 nm. Via deze kit kunnen drie vormen van SOD (koper/zink-bevattende superoxide dismutase (Cu/ZnSOD), mangaan-bevattende superoxide dismutase (MnSOD) en ijzer-bevattende superoxide dismutase (FeSOD)) gemeten worden.



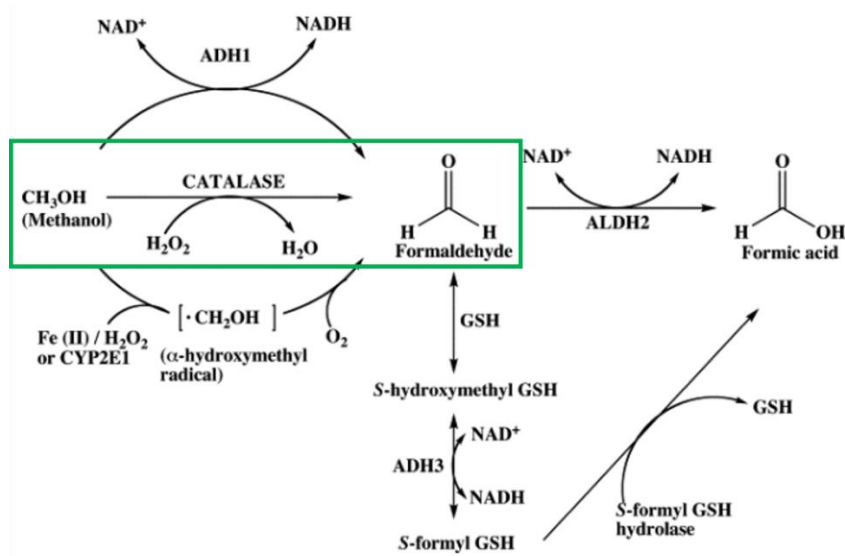
FIGUUR 25: CHEMISCHE REACTIES BIJ DE SUPEROXIDE DISMUTASE ASSAY KIT. DE OMZETTING VAN XANTHINE EN O₂ NAAR URINEZUUR EN H₂O₂ WORDT GEKATALYSEERD DOOR XANTHINE OXIDASE (XOD). HIERBIJ ONTSTAAN O₂^{•-}-RADICALEN DIE VERVOLGENS VIA EEN ANTIOXIDANTREACTIE MET SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) NAAR O₂ EN H₂O₂ KUNNEN WORDEN OMGEZET. DOOR GEBRUIK TE MAKEN VAN DE SUPEROXIDE DISMUTASE ASSAY KIT WORDT TETRAZOLIUMZOUT TOEGEVOEGD AAN DE SAMPLES. WANNEER WEINIG SOD AANWEZIG IS, KAN VEEL TETRAZOLIUMZOUT OMGEZET WORDEN NAAR FORMAZAN DYE EN OMGEKEERD. NA SPECTROFOTOMETRISCHE ANALYSE BIJ 450 NM KAN DE SOD-ACTIVITEIT BEPAALD WORDEN.

Om de enzymtest te kunnen uitvoeren worden eerst de stappen uitgelegd in sectie 3.6 opgevolgd, waarna de geselecteerde bladeren verbrijzeld worden in een mortier met behulp van vloeibaar stikstof. Er is per sample minimaal 4 mg plantmateriaal nodig dat vervolgens wordt opgelost in de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) -buffer (1 mM EDTA (ethyleendiaminetetra-azijnzuur); 210 mM mannitol; 70 mM sucrose; pH 7.2) en gecentrifugeerd bij 10.000 x g gedurende één minuut. Eén gram plantmateriaal wordt geresuspendeerd in 10 mL buffer. Daarna wordt het SOD-protocol verder uitgevoerd volgens de richtlijnen zoals die in de kit beschreven staan.

3.6.2 Catalase Assay Kit

CAT (EC 1.11.1.6) is een enzym dat eveneens betrokken is bij het antioxidantmechanisme van planten. De enzymatische activiteit kan rechtstreeks gemeten worden via de Catalase Assay Kit van Cayman Chemical (Artikelnummer: 707002) doordat het enzym reageert met methanol in

aanwezigheid van een optimale concentratie H_2O_2 . Er wordt formaldehyde gevormd (Figuur 26) dat op zijn beurt kan reageren met 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald). Deze molecule is een chromogeen dat van kleurloos naar paars zal kleuren wanneer het reageert met formaldehyde. Via spectrofotometrie bij een golflengte van 540 nm kan vervolgens de activiteit van de aanwezige CAT-enzymen bepaald worden.

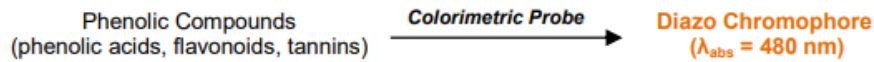


FIGUUR 26: METHANOLPATHWAY. METHANOL WORDT ONDER ANDERE DOOR CATALASE (CAT) OMGEZET NAAR FORMALDEHYDE (GROEN KADER). DE CATALASE ASSAY KIT MAAKT VAN DEZE CHEMISCHE REACTIE GEBRUIK OM DE CAT-ACTIVITEIT SPECTROFOTOMETRISCH TE KWANTIFICEREN BIJ 540 NM (MACALLISTER *ET AL.*, 2011).

De staalvoorbereiding gebeurt op dezelfde manier als hierboven beschreven (§3.6.1), maar in plaats van met een HEPES-buffer te werken, wordt minimum 6 mg plantmateriaal opgelost in een koude buffer (50 mM potassiumfosfaat; pH 7; 1 mM EDTA). Per gram poeder, wordt 10 mL buffer gebruikt. Daarna wordt de CAT-enzymtest uitgevoerd volgens de richtlijnen van de kit. Voor het samenstellen van de welletjes, wordt gemaakt van 30 μ L 70% methanol in plaats van 30 μ L 100% methanol.

3.6.3 Phenolic Compounds Assay Kit

Fenolische componenten zijn fytochemische secundaire metabolieten die een antioxidantfunctie hebben. In iedere plantencel wordt gestreefd naar een evenwicht tussen antioxidanten en oxidanten. Wanneer de ROS-productie (oxidant) stijgt door bijvoorbeeld een (a)biotische stressfactor, zal bijgevolg de concentratie aan antioxidanten toenemen. Wanneer deze concentratie gemeten wordt, kan op een indirecte manier de ROS-productie bepaald worden. De Phenolic Compounds Assay Kit (BioVision; catalog # K527-200) maakt gebruik van een methode waarbij de fenolische componenten reageren met een colorimetrische probe die op zijn beurt een diazo chromofoor vormt met een absorptiemaximum van 480 nm (Figuur 27). Door gebrek aan deze golflengte wordt gebruik gemaakt van 490 nm.

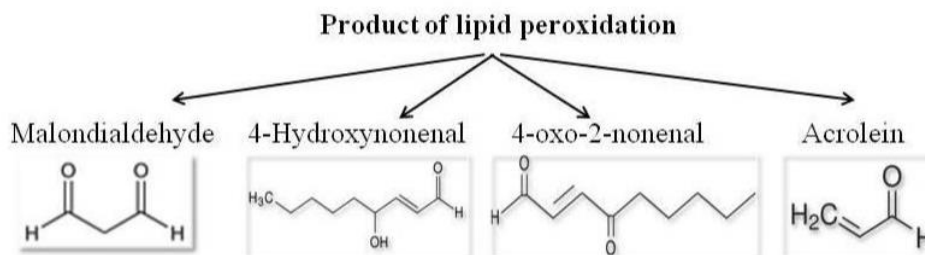


FIGUUR 27: CHEMISCHE REACTIE MET FENOLISCHE COMPONENTEN. WANNEER GEBRUIK WORDT GEMAAKT VAN DE PHENOLIC COMPOUNDS ASSAY KIT ZULLEN FENOLISCHE COMPONENTEN (ANTIOXIDANTEN) REAGEREN MET EEN COLORIMETRISCHE PROBE. HIERDOOR ZAL EEN DIAZO CHROMOFOOR GEVORMD WORDEN DAT ABSORBEERT BIJ 480 NM. OP DIE MANIER KAN DE ANTIOXIDANTCONCENTRATIE BEPAALD WORDEN. TIJDENS HET UITVOEREN VAN HET EXPERIMENT WERD GEBRUIK GEMAAKT VAN EEN GOLFLENGTE VAN 490 NM BIJ GEBREK AAN 480 NM.

Voor de staalvoorbereiding wordt verwezen naar de Superoxide Dismutase Assay Kit (§3.6.1). Bij de Phenolic Compounds Assay Kit wordt minimum 12 mg plantmateriaal opgelost in een acid/methanol buffer (Methanol:ddH₂O:1M HCl in ratio 70:29.5:0.5). Er wordt 10 mL buffer gebruikt per gram plantmateriaal. Voor de verdere uitvoering van de test wordt gewerkt volgens de richtlijnen aangegeven in de kit. Voor het bereiden van de sample wells wordt 50 µL sample gebruikt dat vervolgens aangelengd wordt tot 100 µL met ddH₂O.

3.6.4 Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit

GLV's kunnen gevormd worden uit vetzuren via lipide peroxidatie als gevolg van oxidatieve stress. Hierbij ontstaat onder andere malondialdehyde (MDA) (Figuur 28). Via de Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Sigma-Aldrich; catalog number: MAK085) wordt de concentratie aan vrijgesteld MDA kwantitatief bepaald door reactie met thiobarbituurzuur (TBA). Dit geheel absorbeert normaal maximaal bij 532 nm, maar door gebrek aan deze golflengte wordt de absorbantie gemeten bij 540 nm. Er zijn echter nog andere bronnen van MDA, waardoor deze kit niet volledig specifiek is voor lipide peroxidatie.



FIGUUR 28: CHEMISCHE VERBINDINGEN DIE ONTSTAAN ALS PRODUCT VAN LIPID PEROXIDATIE. VLUCHTIGE ORGANISCHE COMPONENTEN WORDEN GEVORMD UIT LIPIDEN DOOR LIPID PEROXIDATIE. BIJ DEZE REACTIE ONTSTAAT MALONDIALDEHYDE, 4-HYDROXYNONENAL, 4-OXO-2-NONENAL EN ACROLEÏNE (WADHWA ET AL., 2012).

De staalvoorbereiding wordt uitgevoerd zoals beschreven bij de SOD-test (§3.6.1). Er wordt minstens 30 mg plantmateriaal opgelost in MDA lysis buffer met BHT (butylated hydroxytoulene) (100x). 10 mg plantmateriaal wordt op ijs gehomogeniseerd in 300 µL buffer. Het verdere protocol wordt uitgevoerd volgens de richtlijnen aangegeven in de kit.

3.7 RNA extractie en RT-qPCR

Tarweplanten worden opgegroeid zoals hierboven beschreven (§3.1). De onderzochte tijdstippen zijn 0 uur, 0,5 uur, 1 uur, 2 uur, 4 uur en 8 uur. Uit iedere weckbokaal kunnen vervolgens twee herhalingen genomen worden. Voor de RNA (ribonucleïnezuur) -extractie wordt gebruikt gemaakt van TRI reagent® volgens het protocol beschreven door Sigma-Aldrich (z.d.). RNA kan bewaard worden bij -80°C, maar dient best zo snel mogelijk omgezet te worden naar cDNA (complementair desoxyribonucleïnezuur). RNA is namelijk erg gevoelig voor degradatie door onder andere RNase, terwijl cDNA veel stabiel is. Deze omzetting gebeurt met de kit en het protocol van GoScript (Promega, z.d.) Tot slot kan een qPCR worden uitgevoerd, gebruik makende van een CFX96 systeem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). De gekozen genen en overeenkomstige primers worden opgelijst in Tabel 1. Het temperatuurprofiel bestaat uit een initiële denaturatiestap van 2 minuten bij 95°C, gevolgd door 40 cyclussen van 95°C voor 15 seconden en 60°C gedurende 1 minuut. Tot slot wordt ook een smeltcurve-analyse uitgevoerd met een temperatuurprofiel van 60°C gedurende 5 seconden, waarna verwarmd wordt tot 95°C met een snelheid van 0,5°C per 10 seconden. Door gebrek aan herhalingen kunnen de resultaten niet via SPSS (version 25.0.0.2, IBM) verwerkt worden.

Eén van de genen waarvoor gekozen wordt bij de qPCR, is het TaRboh-gen, waarbij ‘Ta’ staat voor ‘*Triticum aestivum*’. Het gen codeert voor NADPH-oxidase (EC 1.6.3.1) (NCBI, z.d.). Dit enzym heeft een belangrijke functie bij het genereren van ROS (Figuur 13). Het is gekend dat er verschillende homologen van dit gen bestaan, waarvan er tijdens deze thesis drie onderzocht werden. Deze zijn ontstaan door genduplicaties waarna deze duplicaten kleine mutaties ondergingen (Cheng *et al.*, 2013). Het CAT-gen wordt gebruikt als merker-gen voor de biosynthese van catalase. Dit enzym katalyseert de omzetting van H₂O₂ naar H₂O en O₂. Het GPX-gen codeert voor glutathionperoxidase (EC 1.11.1.9), wat de reactie tussen het monomeer glutathion (GSH) en H₂O₂ naar glutathiondisulfide (GSSG) en H₂O katalyseert. Het APX-gen zorgt voor de productie van ascorbaat peroxidase (EC 1.11.1.11), een enzym dat net als GPX helpt bij de H₂O₂-detoxificatie. SOD-genen coderen voor superoxide dismutase enzymen die gekend staan als metalloproteïnen en instaan voor het katalyseren van de omzetting van O₂⁻ naar H₂O₂. De SOD-familie kan ingedeeld worden in drie groepen, namelijk Cu/ZnSOD, MnSOD en FeSOD (Culotta *et al.*, 2006). Het actine-gen dat codeert voor actine en het Ta54227-gen dat zorgt voor Cell Division Control Proteins (CDC) worden beide gebruikt als referentiegenen.

TABEL 1: GEBRUIKTE PRIMERS VOOR RT-qPCR (REVERSE TRANSCRIPTION REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION). ACTIN: ACTINE; TA54227: *TRITICUM AESTIVUM* CDC (CEL DIVISION CONTROL PROTEIN); CAT: CATALASE; GPX: GLUTATHIONPEROXIDASE; APX: ASCORBAAT PEROXIDASE; SOD: SUPEROXIDE DISMUTASE; CuSOD: KOPER-GEBOONDEN SUPEROXIDE DISMUTASE; MnSOD: MANGAAN-GEBOONDEN SUPEROXIDE DISMUTASE; TaRboh: *TRITICUM AESTIVUM* RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG. DE NORMALISATIE VAN DE TARWE-AFWEERGENEN WORDT UITGEVOERD MET ACTINE EN TA54227 ALS REFERENTIEGENEN.

Genen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Referentie
Actin	CGAAACCTTCAGTTGCCAGCAAT	ACCATCACCAGAGTCGAGCACAAT	Wang <i>et al.</i> , 2016
Ta54227	CAAATACGCCATCAGGGAGAATC	CGCTGCCGAAACCACGAGAC	Paolacci <i>et al.</i> , 2009
CAT	CACCTGGTGGAGAAGATCGC	TS ¹ ACCTCGAAGAAGCCCTTG	Dudziak <i>et al.</i> , 2019
GPX	GCGGTGACACCAACATCAAC	GTCCAGGTTCK ² CCAGGTTGG	Dudziak <i>et al.</i> , 2019
APX	CAAGGCTCTGACCACCTCAG	CATCTTCCCAGGGTGTGACC	Dudziak <i>et al.</i> , 2019
SOD	GCCATTGATGAGGATTTTGG	TTCCAGTTCACCACCTTCC	(Kumar <i>et al.</i> , 2019)
CuSOD	AGAAGCACCACGCCACCTA	CACCCATCCAGATCCTTGTAAG	Jiang & Yang, 2009
MnSOD	ATGGCAGGGAAACCCG	TTAAACAGCAGGTTGAATTCC	Wang <i>et al.</i> , 2016
TaRboh1	GAGGAAGACGAGCACCAAA	TTTCCTCGCGAAAAGAGAAA	Wang <i>et al.</i> , 2016
TaRboh2	GTCGGCAGATTTACCCA	CCTGATGAAGCATGGCATAG	Wang <i>et al.</i> , 2016
TaRboh3	CTAACAAAGGAGCTGCGTGA	AGAAGTTAAAAATTCTCCTTGTGG	Wang <i>et al.</i> , 2016

¹ S: G of C

² K: G of T

4 Resultaten en bespreking

4.1 Kiemtest

Bij deze test wordt onderzocht hoeveel zaden tarwe en tomaat ontkiemd zijn zeven dagen na het zaaien bij welbepaalde concentraties aan Z-3-HAC. De bekomen resultaten van de telling kunnen worden teruggevonden in Tabel 2. Hieruit kan visueel afgeleid worden dat de frequentie van kieming afhankelijk is van de concentratie aan volatiele component. Bijgevolg kan besloten worden dat er een effect is van de behandeling op de kieming van tarwe en tomaat. Bij tarwe is dit effect reeds merkbaar vanaf 100 μM Z-3-HAC, terwijl tomaat pas een duidelijke afname in kieming ondervindt vanaf 250 μM .

TABEL 2: RESULTATEN VAN DE KIEMTEST. IN IEDERE WECKBOKAAL WERDEN ZES ZADEN GEZAAID. 7 DAGEN NA ZAAIEN WERDEN ALLE GEKIEMDE TARWE- EN TOMATENZADEN GETELD. DE EERSTE KOLOM GEEFT WEER WELKE CONCENTRATIE AAN Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) IN DE WECKBOKAAL AANWEZIG WAS. KOLOMMEN TWEE EN DRIE GEVEN RESPECTIEVELIJK HET AANTAL KIEMENDE ZADEN WEER VAN TARWE EN TOMAAT. DE TARWE-EXPERIMENTEN LIEPEN VAN 17 SEPTEMBER 2018 TOT EN MET 24 SEPTEMBER 2018 EN VAN 25 SEPTEMBER 2018 TOT EN MET 2 OKTOBER 2018. HET EXPERIMENT OP TOMAAT VOND PLAATS OP 17 OKTOBER 2018 TOT EN MET 24 OKTOBER 2018.

Concentratie Z-3-HAC	Gekiemde tarwezaden	Gekiemde tomatenzaden
0 μM	6	5
25 μM	6	6
50 μM	5	6
75 μM	6	6
100 μM	2	6
250 μM	2	2
500 μM	0	1

Tijdens verschillende observaties viel het op dat bij een hoge concentratie aan Z-3-HAC de kieming van tarwe en tomaat soms slechts deels werd onderdrukt. Sommige kiemwortels ontwikkelden hierbij gedeeltelijk, terwijl de cotylen niet tevoorschijn kwamen. Op Figuur 32 (F en G) werd deze wortelontwikkeling bij tomaat in beeld gebracht. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat wanneer het zaadje toevallig met zijn dorsale zijde op het groeimedium lag, de kiemwortel genoodzaakt was om over het zaadje heen naar beneden te groeien. Hierbij kwam

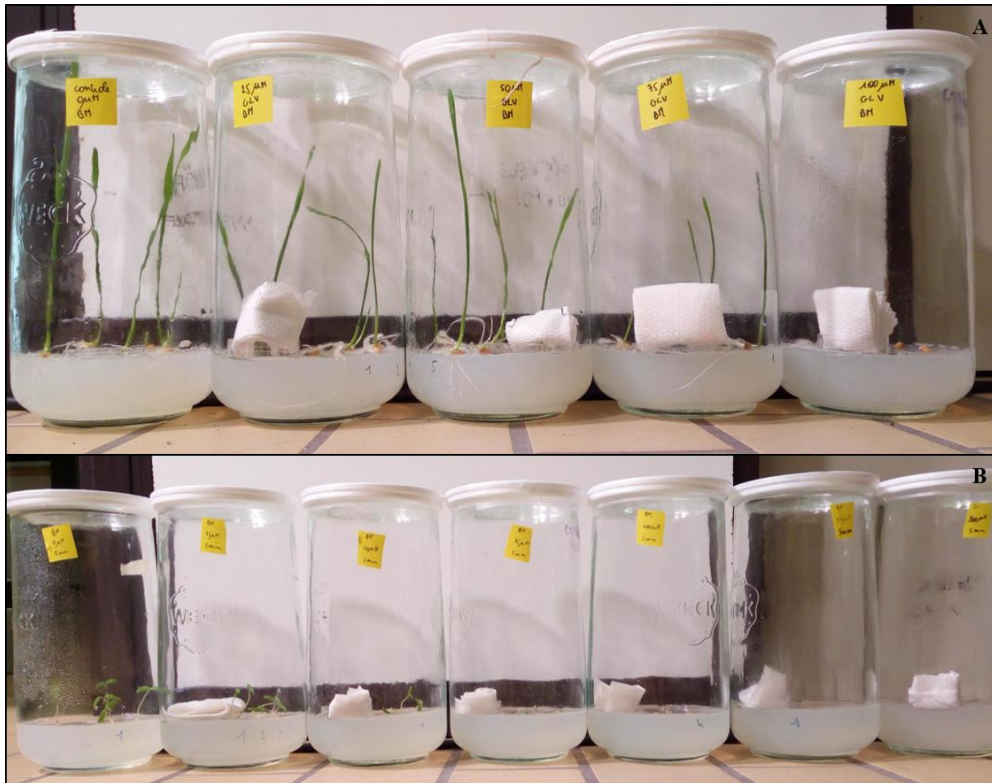
het een langere tijd direct in contact met de component, waardoor de kiemwortel zich niet verder ontwikkelde en in plaats daarvan een witte smeer vormde (Figuur 29).



FIGUUR 29: KIEMING VAN TARWEZAAD BIJ EEN CONCENTRATIE VAN 250 μ M Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). DE RODE PIJL DUIDT DE WITTE SMEER AAN DIE GEVORMD WERD WANNEER DE KIEMWORTEL IN CONTACT KWAM MET DE VOLATIELE COMPONENT.

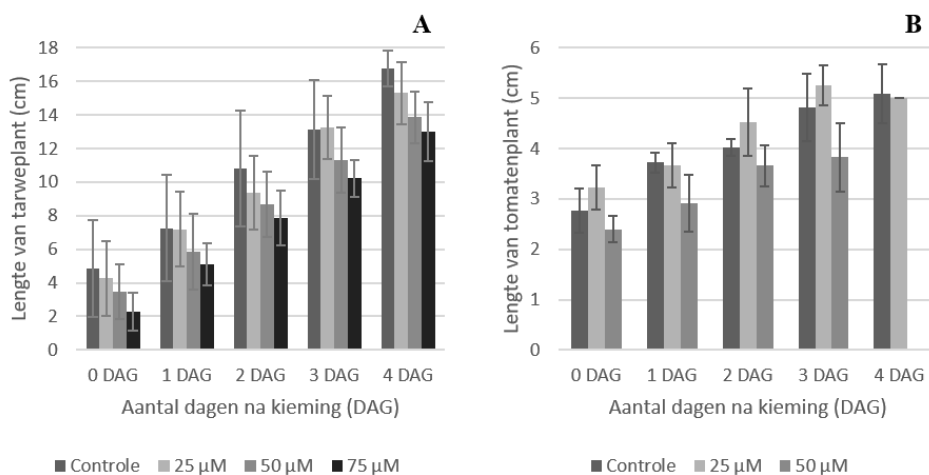
4.2 Fytotoxiciteitstest

Om de fytotoxiciteit van Z-3-HAC te kunnen beoordelen, werden de lengtes van de tarwe- en tomatenplanten iedere dag gemeten om dan te bepalen of verschillende concentraties aan volatile component een invloed hadden op de *lengtegroei*. De bekomen resultaten werden verwerkt via een One-Way ANOVA-test. Bij tomaat werd op 1 DAG (day after germination) niet voldaan aan de homoscedasticiteitsvoorwaarde, waardoor voor deze datasets een Welch-correctie werd uitgevoerd. Via Two-Way ANOVA kon vervolgens geanalyseerd worden of tarwe anders reageerde op Z-3-HAC dan tomaat, met andere woorden of er een ander dosis-respons curve verkregen wordt voor beide plantensoorten. Daarnaast werd ook onderzocht of de *relatieve groei* van tarwe en tomaat anders was wanneer de te testen planten gegroeid werden bij andere concentraties aan vluchtige component. Hierbij werd gebruik gemaakt van de One-Way ANOVA-analyse. Indien niet voldaan was aan de normaliteitsvoorwaarde, werd een Kruskal-Wallis test uitgevoerd. Wanneer de homoscedasticiteitswaarde niet aanvaard kon worden, werd een Welch-correctie toegepast. Voor iedere test werd gewerkt met een betrouwbaarheidsniveau van 95%. Figuur 30 geeft een eerst visuele weergave van de bekomen resultaten.



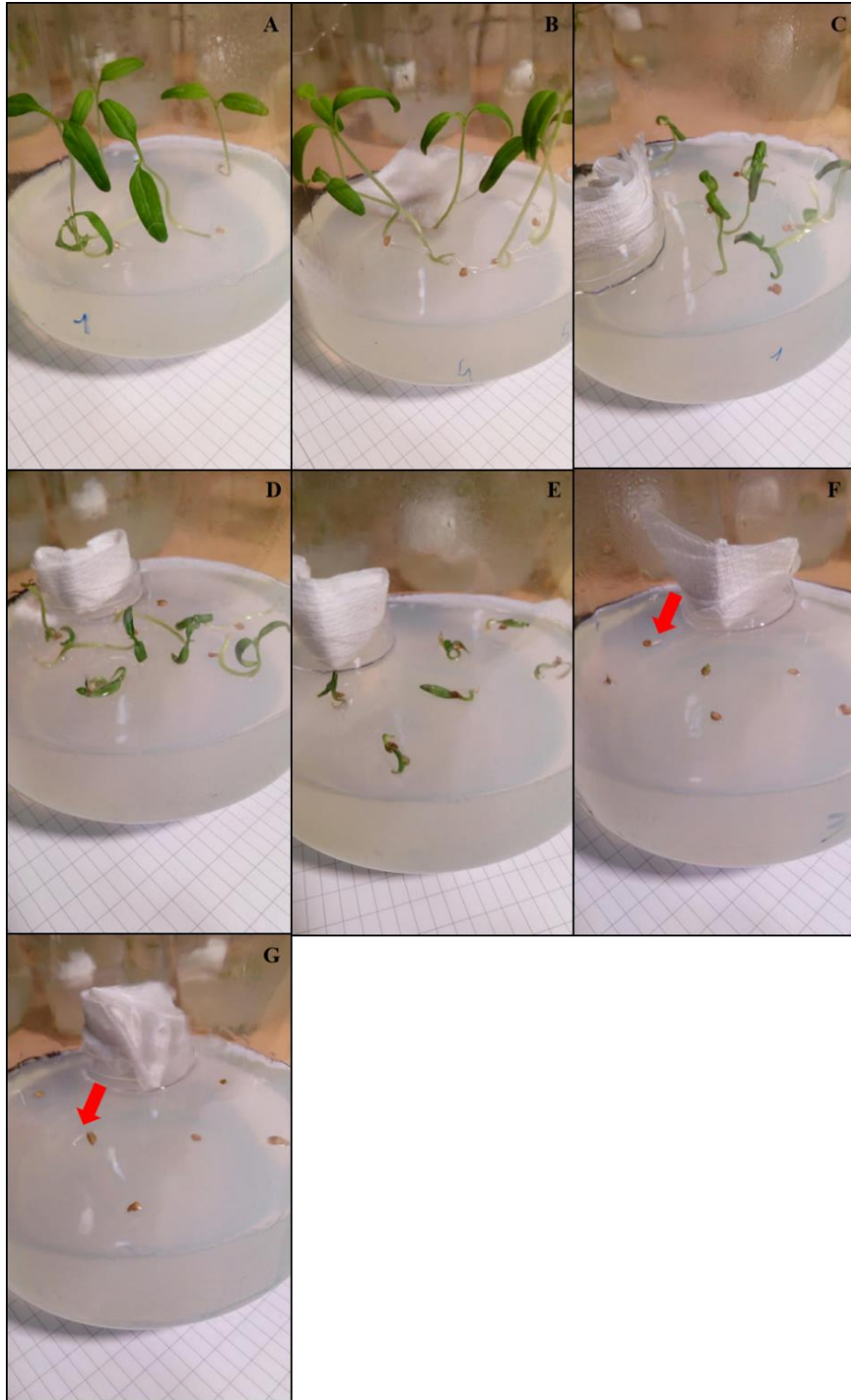
FIGUUR 30: VISUELE WEERGAVE VAN DE LENGTEGROEI BIJ TARWE EN TOMAAT TIJDENS EEN FYTOTOXICITEITSTEST. (A) DEZE TARWE WERD GEZAAD OP 25 SEPTEMBER 2018 EN DE FOTO WERD GENOMEN OP 4 OKTOBER 2018. ER IS EEN AFNAME TE ZIEN IN LENGTE WANNEER DE CONCENTRATIE AAN Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) TOENEEMT (VAN LINKS NAAR RECHTS RESPECTIEVEELIJK 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M EN 100 μ M). (B) DEZE TOMATEN WERDEN GEZAAD OP 17 OKTOBER 2018 EN DE FOTO WERD GENOMEN OP 25 OKTOBER 2018. NET ALS BIJ TARWE KAN OOK HIER EEN AFNAME IN LENGTE GEDETECTEERD WORDEN. DIT KOMT OMDAT DE CONCENTRATIE VAN Z-3-HAC IN DE BOKALEN TOENEEMT VAN LINKS NAAR RECHTS (RESPECTIEVEELIJK 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 250 μ M EN 500 μ M). ER IS ECHTER EEN STATISTISCHE ANALYSE NODIG OM DE SIGNIFICANTIE VAN DEZE VERSCHILLEN IN LENGTE BIJ ZOWEL TARWE ALS TOMAAT TE KUNNEN AANTONEN.

Na het analyseren van de lengte bij tarwe (Figuur 31) blijkt dat Z-3-HAC hierop geen significante invloed had op 0 DAG ($p = 0,397$). Dit resultaat kan doorgetrokken worden tot en met 4 DAG ($p = 0,667$; $0,440$; $0,315$; $0,067$). Bij het analyseren van de resultaten van tomaat is er bij de lengte echter wel een significant verschil waarneembaar op 0 DAG ($p = 0,014$) en 3 DAG ($p = 0,031$). Hierbij behoort de controlebehandeling tot de behandelingen met 25 μ M en 50 μ M, terwijl deze laatste onderling significant verschillen van elkaar. De tomatenplanten die behandeld werden met 25 μ M Z-3-HAC zijn voor deze dagen dus significant verschillend van de 50 μ M-behandeling. Een eerste verklaring hiervoor is dat 25 μ M geen negatief effect heeft op de groei van tomaat. Een tweede mogelijke verklaring ligt bij het feit dat het meten van de lengte bij de tomatenplanten niet eenvoudig was. Hoe hoger de concentratie aan Z-3-HAC werd, hoe meer de tomatenplanten zich oprolden (Figuur 32). Hierdoor werden onbetrouwbare metingen bekomen. Daarnaast kan natuurlijke variatie ook een rol hebben gespeeld. Bij 1 DAG ($p = 0,056$), 2 DAG ($p = 0,051$) en 4 DAG ($p = 0,938$) werd geen significant verschil aangetoond tussen de verschillende Z-3-HAC-behandelingen.



FIGUUR 31: LENGTE VAN TARWE EN TOMAAT IN VERBAND MET FYTOTOXICITEITSTEST. (A) GRAFIEK VAN TARWE WAARBIJ DE LENGTE VAN DE PLANTEN IN FUNCTIE VAN HET AANTAL DAGEN NA KIEMING (DAG) WORDT WEERGEGEVEN. ER IS PER DAG GEEN SIGNIFICANT ONDERSCHIED IN LENGTE TUSSEN DE VERSCHILLENDE BEHANDELINGEN WAARNEEMBAAR. 100 µM IS NIET TERUG TE VINDEN OP DEZE GRAFIEK, OMDAT DE TARWELENGTE BIJ DEZE CATEGORIE NIET MEETBAAR WAS. (B) GRAFIEK VAN TOMAAT WAARBIJ DE LENGTE VAN DE PLANTEN IN FUNCTIE VAN HET AANTAL DAGEN NA KIEMING WORDT WEERGEGEVEN. BIJ DE PROEFOPZET MET 25 µM LIJKEN DE LENGTES HET GROOTST TE ZIJN, DIT IS ECHTER NIET SIGNIFICANT TEN OPZICHTE VAN DE CONTROLE. VANAF EEN CONCENTRATIE VAN 75 µM BEGONNEN DE ONTKIEMDE TOMATENPLANTEN VOLLEDIG OP TE KRULLEN, WAARDOOR HET METEN VAN DE LENGTES ONMOGELIJK WERD. VANDAAR DAT DEZE CONCENTRATIES NIET TERUG TE VINDEN ZIJN OP DE GRAFIEK. OP BEIDE GRAFIEKEN WERDEN FOUTVLAGGEN BEREKEND OP BASIS VAN DE STANDAARDDEVIATIE.

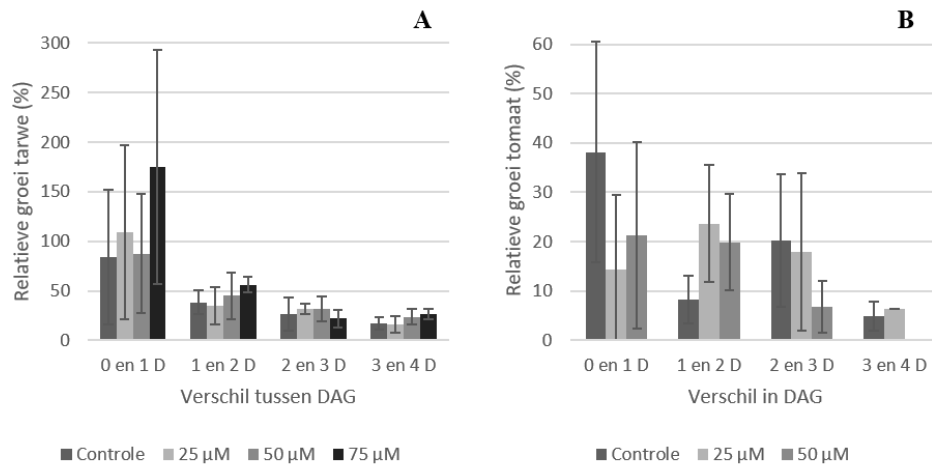
De interactie tussen de plantensoort (tarwe of tomaat) en de behandeling (verschillende concentraties aan Z-3-HAC) kan geanalyseerd worden via een Two-way ANOVA-analyse. Indien er interactie is, betekent dit dat afhankelijk van het gewas een ander effect wordt gecreëerd door de Z-3-HAC-behandeling. Tomaat geeft een dosis-respons curve die laat vermoeden dat 25 µM bevorderlijk is voor de lengte. Tarwe daarentegen krijgt met stijgende concentratie aan Z-3-HAC waarschijnlijk een nadelig effect. Na statistische analyse kunnen deze vermoedens echter niet bevestigd worden. Er is geen interactie tussen de behandeling en de plantensoort ($p > 0,05$). Dit wijst erop dat de dosis-respons curve niet significant verschillend is tussen tarwe en tomaat, waardoor kan besloten worden dat tarwe tijdens de behandeling niet significant anders reageert dan tomaat de eerste drie dagen na kieming.



FIGUUR 32: FYTOTOXICITEITSTEST VAN TOMAAT. DIT IS EEN WEERGAVE VAN DE GROEI EN ONTWIKKELING VAN TOMATENPLANTEN BIJ BLOOTSTELLING AAN VERSCHILLENDE CONCENTRATIES Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). DEZE PLANTEN WERDEN GEZAAID OP 17 OKTOBER 2018 EN ER WERDEN FOTO'S GENOMEN OP 30 OKTOBER 2018. HET VALT DUIDELIJK OP DAT DE PLANTEN BIJ HOGERE CONCENTRATIES AAN GREEN LEAF VOLATILES (GLV's) MINDER GOED KIEMEN EN ONTWIKKELEN. VANAF 50 μM TOT 100 μM GLV BEGINNEN DE KIEMPLANTEN ZELFS OP TE KRULLEN. BIJ CONCENTRATIES VAN 250 μM EN 500 μM IS, BUITEN DE ONTWIKKELING VAN ENKELE KLEINE KIEMWORTELS, HAAST GEEN KIEMING WAARNEEMBAAR. RODE PIJL: KIEMWORTEL; A: 0 μM ; B: 25 μM ; C: 50 μM ; D: 75 μM ; E: 100 μM ; F: 250 μM ; G: 500 μM .

Uit de grafieken van Figuur 33 blijkt dat de relatieve groei tussen iedere DAG tot en met 4 DAG bij tarwe niet significant anders is bij verschillende Z-3-HAC-behandelingen ($p = 0,329$; $0,390$; $0,724$; $0,244$). Tussen 1 en 2 DAG van tomaat is de relatieve groei ten opzichte van de verschillende behandelingen wel significant verschillend ($p = 0,047$). Bij de relatieve groei tussen de andere dagen kon dit effect niet statistisch aangetoond worden ($p = 0,158$; $0,478$; $0,687$). De grote standaarddeviaties bij 0 DAG – 1 DAG kunnen verklaard worden doordat pas vijf dagen na zaaien werd gestart met de lengtemeting. Hierdoor konden planten die reeds eerder waren gekiemd niet zomaar tot een andere klasse dan ‘0 DAG – 1 DAG’ gerekend worden zonder aan *testing into compliance* te doen. De aanhoudende grote standaarddeviaties bij de relatieve groei van tomaat (Figuur 33 (B)) kunnen verklaard worden doordat de bladeren opkrulden vanaf $50 \mu\text{M}$ Z-3-HAC. Hierdoor werden geen precieze lengtemetingen bekomen.

Daarnaast werd met de dataset van de relatieve groei eveneens onderzocht of de relatieve groei over de hele analyseperiode verandert bij eenzelfde dosis aan Z-3-HAC. Uit de resultaten blijkt dat de relatieve groei van tarwe over de hele periode significant verschilt ($p = 0,022$; $0,011$; $0,012$; $0,009$). Hierbij werd voor iedere behandeling een significant verschil teruggevonden tussen 0 DAG – 1 DAG en 3 DAG – 4 DAG. Enkel bij $75 \mu\text{M}$ kwam een extra significant verschil voor tussen 0 DAG – 1 DAG en 2 DAG – 3 DAG. Tarwe neemt dus snel af in groei, maar aangezien deze afnamen ook bij de controlebehandeling significant is, kan niet aangetoond worden dat Z-3-HAC zorgt voor deze afname. Bij tomaat blijft voor iedere concentratie het groeipercentage constant, want er kon geen significant verschil aangetoond worden per behandeling over de dagen heen ($p = 0,054$; $0,661$; $0,424$). Er dient echter opgemerkt te worden dat de foutenvlaggen relatief groot zijn, waardoor geen eenduidig besluit kan gevormd worden voor tomaat.



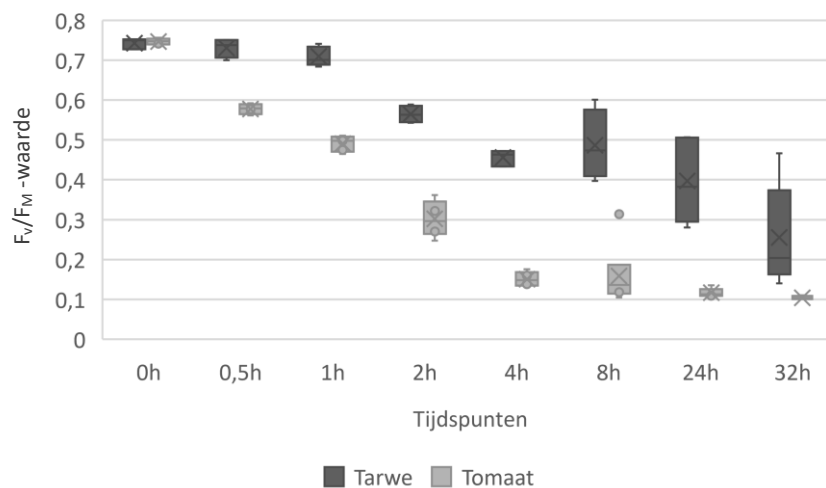
FIGUUR 33: RELATIEVE GROEI VAN TARWE EN TOMAAT IN VERBAND MET FYTOTOXICITEITSTEST. (A) DE WEERGAVE VAN DE RELATIEVE GROEI VAN TARWE TOONT AAN DAT ER BIJ DE VERSCHILLENDE Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) -BEHANDELINGEN GEEN SIGNIFICANTE VERSCHILLEN ZIJN TUSSEN IEDERE DAG (DAY AFTER GERMINATION). NAARMATE DE KIEMING VORDERT, DAALT DE RELATIEVE GROEI. DE GROTE VARIATIES BIJ 0 EN 1 D (= DAG) KUNNEN VERKLAARD WORDEN DOORDAT PAS VIJF DAGEN NA ZAAIEN WERD GESTART MET DE LENGTEMETING. HIERDOOR KONDEN PLANTEN DIE REEDS EERDER WAREN GEKIEMD NIET ZOMAAR TOT EEN ANDERE KLASSE DAN 0 EN 1 D GEREKEND WORDEN ZONDER AAN *TESTING INTO COMPLIANCE* TE DOEN. **(B)** WEERGAVE VAN DE RELATIEVE GROEI VAN TOMAAT. ENKEL TUSSEN 1 EN 2 D IS ER EEN SIGNIFICANT VERSCHIL TUSSEN DE BEHANDELINGEN, TERWIJL VOOR EENZELFDE BEHANDELING DE RELATIEVE GROEI NIET SIGNIFICANT AFNEEMT OVER DE HELE PERIODE. DE STANDAARDDEVIATIES BLIJVEN GROOT. DIT KAN VERKLAARD WORDEN DOORDAT HET METEN VAN DE LENGTE VAN TOMATENPLANTEN BEMOEILIJKT WORDT DOOR HET OPKRULLEN. OP BEIDE GRAFIEKEN WORDEN DE FOUTENVLAGGEN VOORGESTELD DOOR STANDAARDDEVIATIES.

4.3 Multispectraal beelden: PathoViewer

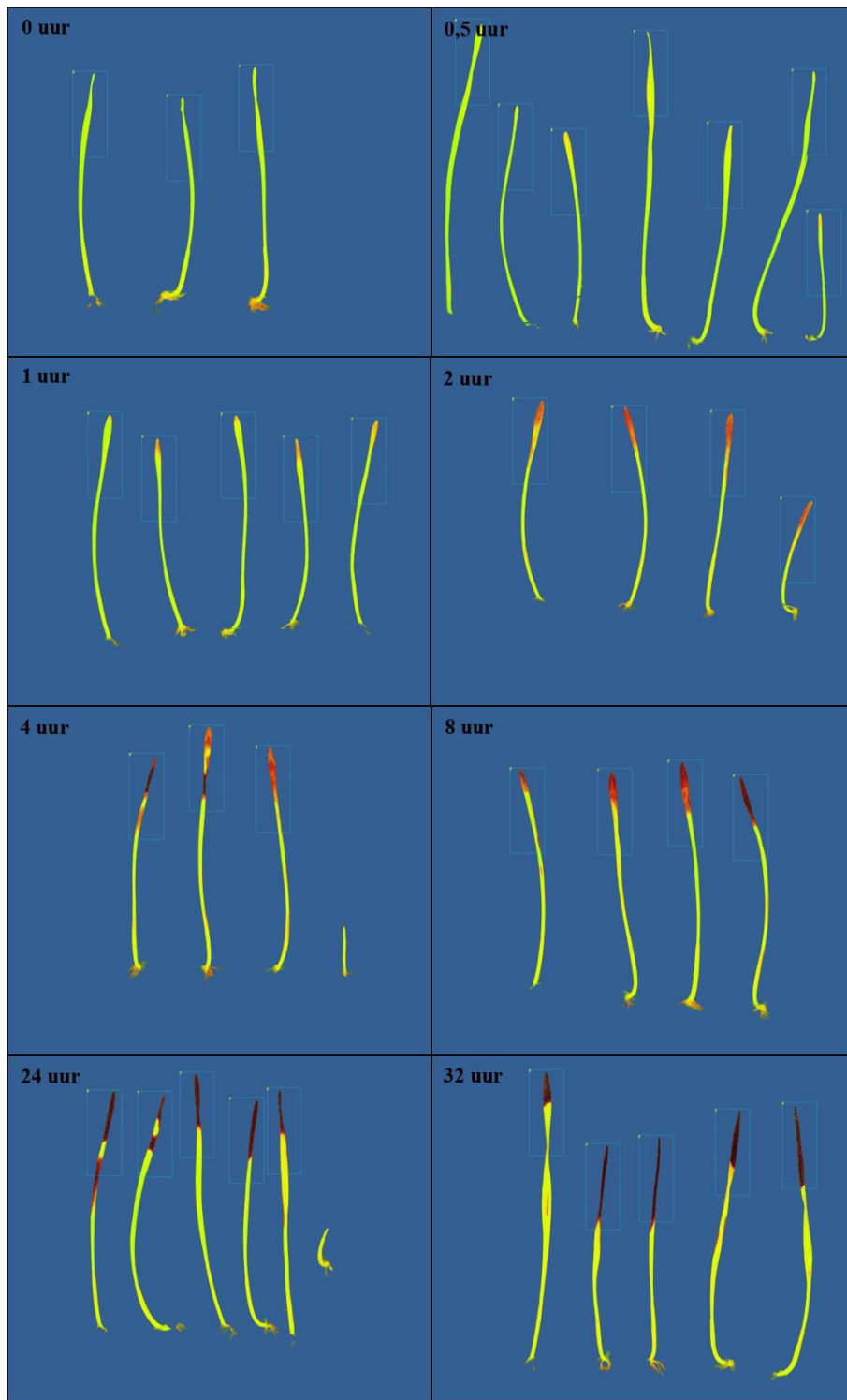
Door middel van PathoViewerbeelden kunnen F_V/F_M -waarden bekomen worden. Deze duiden aan wat de maximale efficiëntie van PSII is op het moment dat een multispectraal beeld genomen wordt. Tarwe en tomaat werden enkel geprimed met $50 \mu\text{M}$ Z-3-HAC, omdat uit vorige proeven bleek dat bij deze concentratie fenotypische schade optrad. De resultaten worden gevisualiseerd door middel van boxplots (Figuur 34), waarbij tarwe en tomaat ongeveer hetzelfde verloop vertonen (zie verder). Op tijdstip nul zijn beide waarden gelijk, dit blijkt ook uit de statistische analyse (Two-Sample t-test) ($p = 0,610$). Wanneer de andere tijdstippen van tarwe en tomaat met elkaar vergeleken worden, valt wel een significant verschil op te merken ($p = 0,000; 0,000; 0,000; 0,000; 0,011; 0,004$). De waarden op 32 uur komen volgens de statistische test opnieuw samen ($p = 0,058$). Voor het testen van het verschil tussen tarwe en tomaat bij 2 uur, 24 uur en 32 uur werd gebruik gemaakt van de Welch-correctie, omdat niet voldaan was aan de homoscedasticiteitsvoorwaarde. Voor 8 uur werd een Mann-Whitney U test uitgevoerd, want de normaliteitsvoorwaarde was niet voldaan. Net als bij de fytotoxiciteitstesten werd ook voor alle testen in verband met de F_V/F_M -waarden gebaseerd op een betrouwbaarheidsniveau van 95%.

Tijdens de volatiele behandeling is de daling in F_V/F_M bij zowel tarwe als tomaat het sterkst tussen 0 uur en 4 uur, waarna deze de volgende 28 uur zal stagneren. Deze stagnatie kan statistisch aangetoond worden door de F_V/F_M -waarden van de verschillende tijdstippen voor zowel tarwe als tomaat te vergelijken met elkaar via een One-Way ANOVA-analyse. In dit geval zal een Welch-test uitgevoerd worden, omdat in beide gevallen niet voldaan is aan de homoscedasticiteitsvoorwaarde. Zowel bij tarwe als tomaat is er een significant verschil tussen de F_V/F_M -waarden ($p = 0,000; 0,000$) Bij tarwe behoren de waarden van 4 uur tot en met 32 uur tot dezelfde categorie alsook de waarden van 0 tot en met 1 uur. Bij tomaat behoren de F_V/F_M -waarden van 4 tot en met 32 uur bij elkaar terwijl de eerste uren elk tot een aparte klasse behoren.

Wanneer de richtingscoëfficiënten van de lineaire delen van de grafieken vergeleken worden met elkaar (Two-Sample t-test), valt op dat deze niet significant verschillen van elkaar ($p = 0,592$). Dit bewijst dat de F_V/F_M -waarden van tarwe en tomaat met dezelfde snelheid afnemen. De richtingscoëfficiënten van tarwe werden berekend voor ieder tijdsinterval tussen 1 uur en 4 uur, terwijl deze van tomaat werden genomen tussen het tijdsinterval 0 uur en 4 uur. Het valt op dat er bij tarwe een lagfase voorkomt die een impact heeft op het langer hooghouden van de F_V/F_M -waarden. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de fotosynthese van tarwe minder snel beïnvloed wordt door $50 \mu\text{M}$ Z-3-HAC in vergelijking met tomaat. Op Figuur 36 is zichtbaar hoe de fotosynthetische activiteit van tomaat na 30 minuten reeds afgenomen is, terwijl deze afname bij tarwe pas duidelijk zichtbaar wordt na 1 à 2 uur (Figuur 35). Een andere verklaring kan worden gevonden bij een artefact van de gekozen ROI's. De stress bij tarweplanten begint vanaf de bladtoppen en verspreidt zich zo geleidelijk naar onder. Het verloop van deze verspreiding gebeurt relatief traag, maar de getroffen delen worden alsmaar meer beschadigd. Bij tomaat is de schade onmiddellijk merkbaar hij het gehele plantje. De kleur wordt steeds donkerder rood, wat wijst op een afname van de F_V/F_M -waarden. De ROI van tomaat covert de hele plant, omdat de schade onmiddellijk over de hele plant waar te nemen is (Figuur 36). Daar bij tarwe enkel de bladtoppen beschadigd zijn, wordt getracht om enkel op dit deel een ROI te plaatsen. De pixels van iedere ROI is gelijk, waardoor ook onopzettelijk een deel blad wordt meegenomen waarbij de F_V/F_M -waarde hoog is (groen op Figuur 35). Dit kan de trage respons en lagfase verklaren op de curve van tarwe.



FIGUUR 34: F_v/F_m (VARIABLE FLUORESCENTIE / MAXIMUM FLUORESCENTIE) -WAARDEN VAN TARWE EN TOMAAT IN FUNCTIE VAN DE VERSCHILLENDE GEANALYSEERDE TIJDSPUNTEN BIJ EEN CONCENTRATIE VAN $50 \mu\text{M}$ Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) (WEERGEGEVEN IN BOXPLOTEN). EERST EN VOORAL VALT OP DAT DE F_v/F_m -WAARDEN VAN TOMAAT SNELLER AFNEMEN DAN DEZE VAN TARWE, TERWIJL ZE IN HET ZELFDE BEGINPUNT STARTEN. DE STERKSTE DALING IS ZOWEL VOOR TARWE ALS TOMAAT WAARNEEMBAAR DE EERSTE 4 UUR VAN DE BLOOTSTELLING, WAARNA DE F_v/F_m -WAARDEN STAGNEREN. OP DE GRAFIEK WORDEN FOUTVLAGGEN BEREKEND OP BASIS VAN DE STANDAARDDEVIATIE.



FIGUUR 35: WEERGAVE VAN DE PATHOVIEWERBEELDEN VAN TARWE BIJ TOENEMENDE DUUR VAN BLOOTSTELLING AAN 50 μ M Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). ER IS EEN TOENEMEND STRESSPATTERN WAAR TE NEMEN BIJ EEN LANGERE BLOOTSTELLING AAN DE VOLATIELE COMPONENT. HET AFNEMEN VAN DE F_V/F_M -WAARDEN START VANAF DE TOP VAN DE PLANT EN BEREIKT UITEINDELIJK ONGEVEER ÉÉN DERDE VAN HET BLAD. DE SCHADE IS SNEL ZICHTBAAR, MAAR DE SNELHEID VAN VOORTZETTING IS LAAG WAARBIJ DE GETROFFEN DELEN ALS MAAR DONKERDER KLEUREN.

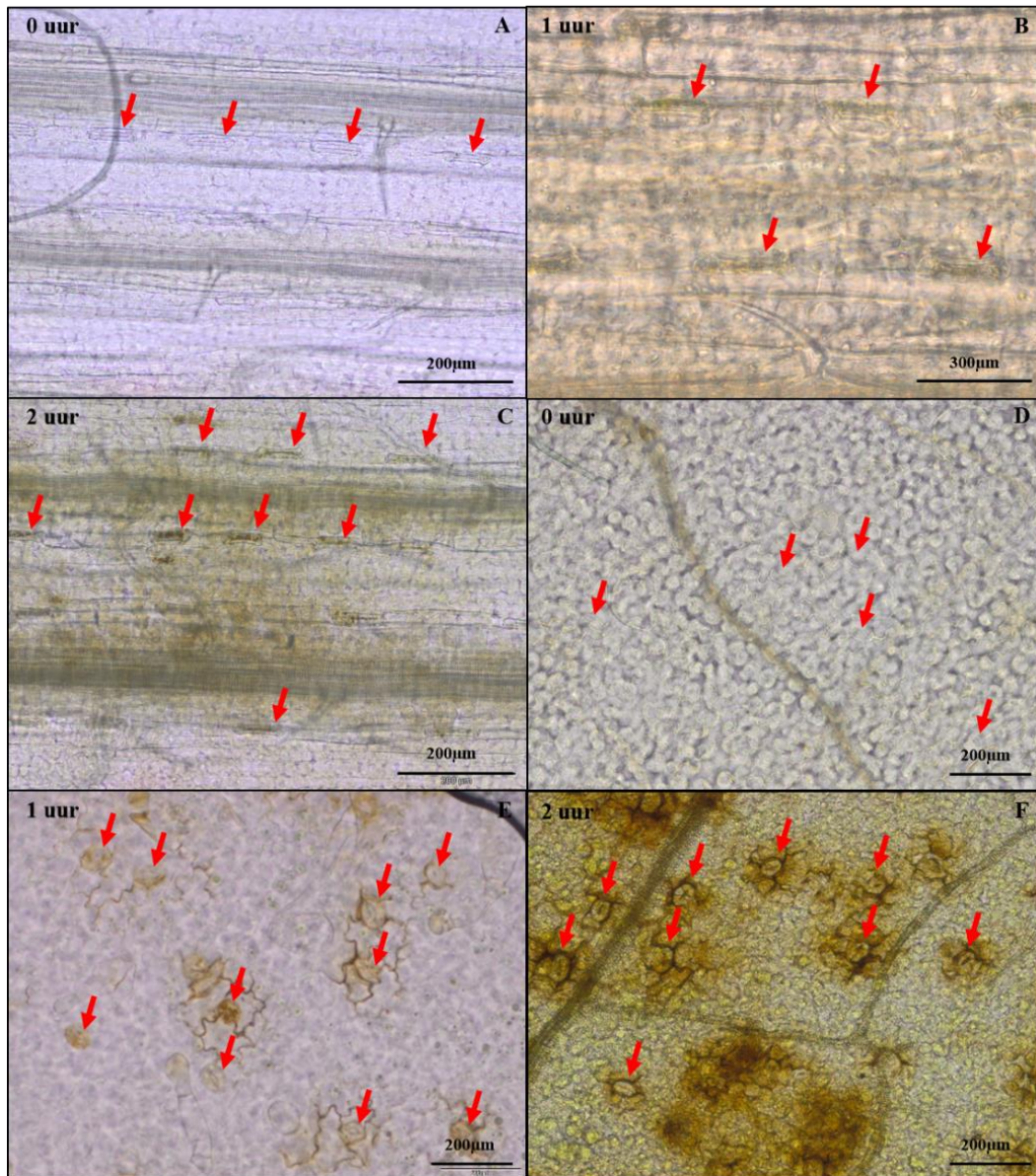


FIGUUR 36: WEERGAVE VAN DE PATHOVIEWERBEELDEN VAN TOMAAT BIJ TOENEMENDE DUUR VAN BLOOTSTELLING AAN 50 μM Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). OMDAT TOMAAT EEN KLEINERE EN WAARSCHIJNLIJK OOK EEN MEER GEVOELIGE PLANT IS DAN TARWE, IS DE FYSIOLOGISCHE STRESS REEDS NA 30 MINUTEN ONMIDDELLIJK BIJ DE VOLLEDIGE PLANT WAARNEEMBAAR. DE KLEUR WORDT ALS MAAR DONKERDER ROOD, WAT WIJST OP EEN AFNAME VAN DE F_v/F_m (VARIABELE FLUORESCENTIE / MAXIMUM FLUORESCENTIE)-WAARDEN.

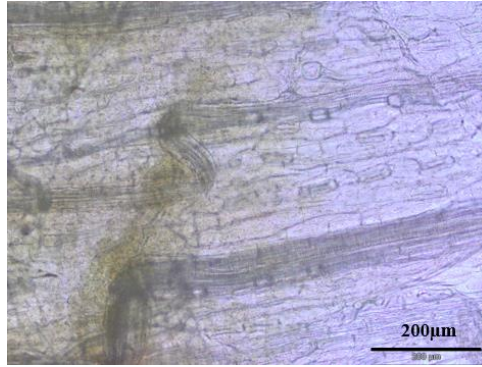
4.4 DAB-kleuring en lichtmicroscopie

De DAB-kleuring werd uitgevoerd op tarwe en tomaat nadat deze gedurende 0, 1 of 2 uur werden blootgesteld aan 50 μM Z-3-HAC. Op de microscopische beelden weergegeven in Figuur 37 wijzen de rode pijlen de stomata (huidmondjes) aan. Plaatsen die donkerder bruin gekleurd zijn dan de omgeving, duiden op het voorkomen van H_2O_2 . Het valt op dat de productie van H_2O_2 bij zowel tarwe als tomaat begint vanaf de stomata, waardoor besloten kan worden dat Z-3-HAC via deze weg wordt opgenomen door de plant. In deze cellen komt het induceerbare afweersysteem tijdelijk in actie, waarbij H_2O_2 (ROS) zal geproduceerd worden. De bruine neerslagvorming verspreid zich via de stomata verder doorheen het plantenweefsel. Dit doet vermoeden dat er een verdere ROS-productie plaatsvindt door signalisatie in het weefsel, of dat Z-3-HAC zich verder via de stomata verspreid en lokaal opnieuw ROS-productie induceert. Op Figuur 37 (C) is bovendien de granulatie van het chlorofyl duidelijk zichtbaar, wat wijst op celschade. Na een twee uur durende behandeling van tarwe met 50 μM Z-3-HAC is vanaf een bepaalde hoogte op het blad een duidelijke scheiding tussen het voorkomen van H_2O_2 waarneembaar. Links op de figuur duidt de bruinere kleur de aanwezigheid van H_2O_2 aan,

terwijl deze verkleuring op het rechterdeel niet waarneembaar is. Dit wijst erop dat rechts (nog) geen H_2O_2 -productie heeft plaatsgevonden.



FIGUUR 37: MICROSCOPISCHE BEELDEN NA DAB (DIAMINOBENZIDINE) -KLEURING VAN TARWE- EN TOMAATWEEFSEL BLOOTGESTELD AAN 50 μ M Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). H_2O_2 -PRODUCTIE START BIJ DE STOMATA EN ACCUMULEERT VANDAARUIT VERDER NAAR DE ANDERE PLANTENCELLEN. EEN VERKLARING HIERVOOR IS DAT DEZE VOLATIELE COMPONENT VIA DE STOMATA BINNENDRINGT, WAARDOOR DEZE DUS ALS EERSTE IN CONTACT KOMEN MET Z-3-HAC. ALS REACTIE HIEROP WORDT IN DEZE CELLEN HET INDUCEERBARE AFWEERSYSTEEM IN WERKING GESTELD MET PRODUCTIE VAN H_2O_2 TOT GEVOLG. RODE PIJL: STOMA; A, B EN C: DAB-KLEURING BIJ TARWE, RESPECTIEVELIJK 0 UUR, 1 UUR EN 2 UUR BLOOTSTELLING; D, E EN F: DAB-KLEURING BIJ TOMAAT, RESPECTIEVELIJK 0 UUR, 1 UUR EN 2 UUR BLOOTSTELLING.

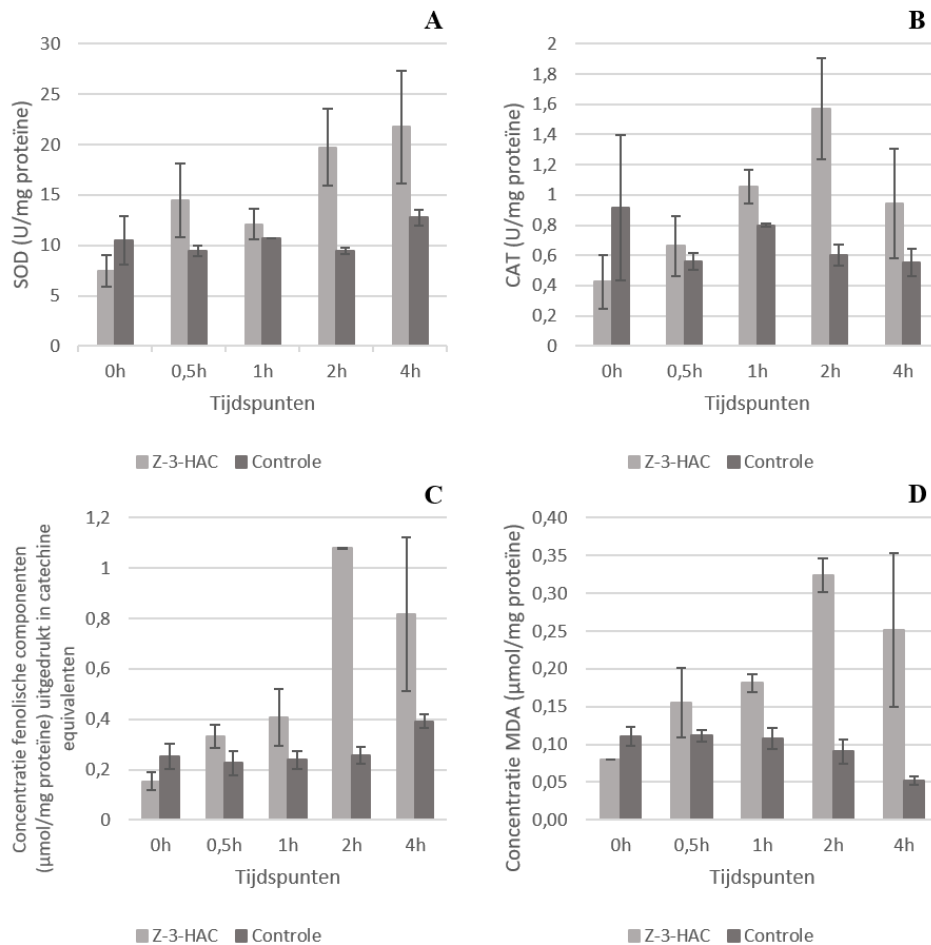


FIGUUR 38: SCHEIDING TUSSEN DELEN WAARBIJ AL DAN NIET H_2O_2 -PRODUCTIE PLAATSVINDT. NA EEN TWEE UUR DURENDE BEHANDELING VAN TARWE MET $50 \mu M$ Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) IS VANAF EEN BEPAALDE HOOGTE OP HET BLAD EEN DUDELIJKE SCHEIDING TUSSEN HET VOORKOMEN VAN H_2O_2 WAARNEEMBAAR. LINKS OP DE FIGUUR DUIDT DE BRUINERE KLEUR DE AANWEZIGHEID VAN H_2O_2 AAN, TERWIJL DEZE VERKLEURING OP HET RECHTER DEEL NIET WAARNEEMBAAR IS. DIT WIJST EROP DAT RECHTS (NOG) GEEN H_2O_2 -PRODUCTIE HEEFT PLAATSGEVONDEN.

4.5 Enzymtesten

Via de enzymtesten wordt gekeken of de gekozen enzymen meer actief zijn in het plantenweefsel door een behandeling met $50 \mu M$ Z-3-HAC. Figuur 39 geeft enzymatische activiteiten en concentraties van producten die gegenereerd werden door middel van enzymatische activiteit weer voor bepaalde inwerkingsperioden. Deze worden genormeerd ten opzichte van het totaal eiwitgehalte in het staal.

Door tarwe bloot te stellen aan $50 \mu M$ Z-3-HAC, zal de activiteit van het SOD- en het CAT-enzym stijgen. Omdat deze enzymen zorgen voor een verwijdering van ROS, wijst dit resultaat erop dat het induceerbare immuunsysteem geactiveerd wordt met de productie van ROS tot gevolg. Door de opregulatie van deze pathways, kan ROS wegreageren tot minder schadelijke intermediairen. Voor beide enzymen is bovendien een piek waarneembaar bij 2 uur en 4 uur. Daarnaast neemt ook de concentratie aan fenolische componenten toe, wat gelijk staat aan een verhoogde productie van antioxidanten. Logischerwijs wil dit zeggen dat er initieel meer oxidanten, zoals ROS, aanwezig waren ten gevolge van de Z-3-HAC-behandeling. Deze ROS-productie kan eveneens het gevolg zijn van de activatie van het induceerbare immuunsysteem. Overigens stijgt ook de concentratie aan MDA, wat erop wijst dat de activiteit van lipide peroxidase toegenomen is. Het gevolg hiervan is dat meer GLV's zullen gevormd worden. Dit alles kan evenzo voortvloeien uit het in werking treden van het induceerbare immuunsysteem bij planten. Tot slot kan uit de grafieken in Figuur 39 opgemerkt worden dat bij een tijdslot van 4 uur de spreiding groter wordt, dit wijst op een kantelpunt. Bij de concentratie van fenolische componenten en MDA is dit fenomeen meer uitgesproken dan bij de activiteit van de SOD- en CAT-enzymen.



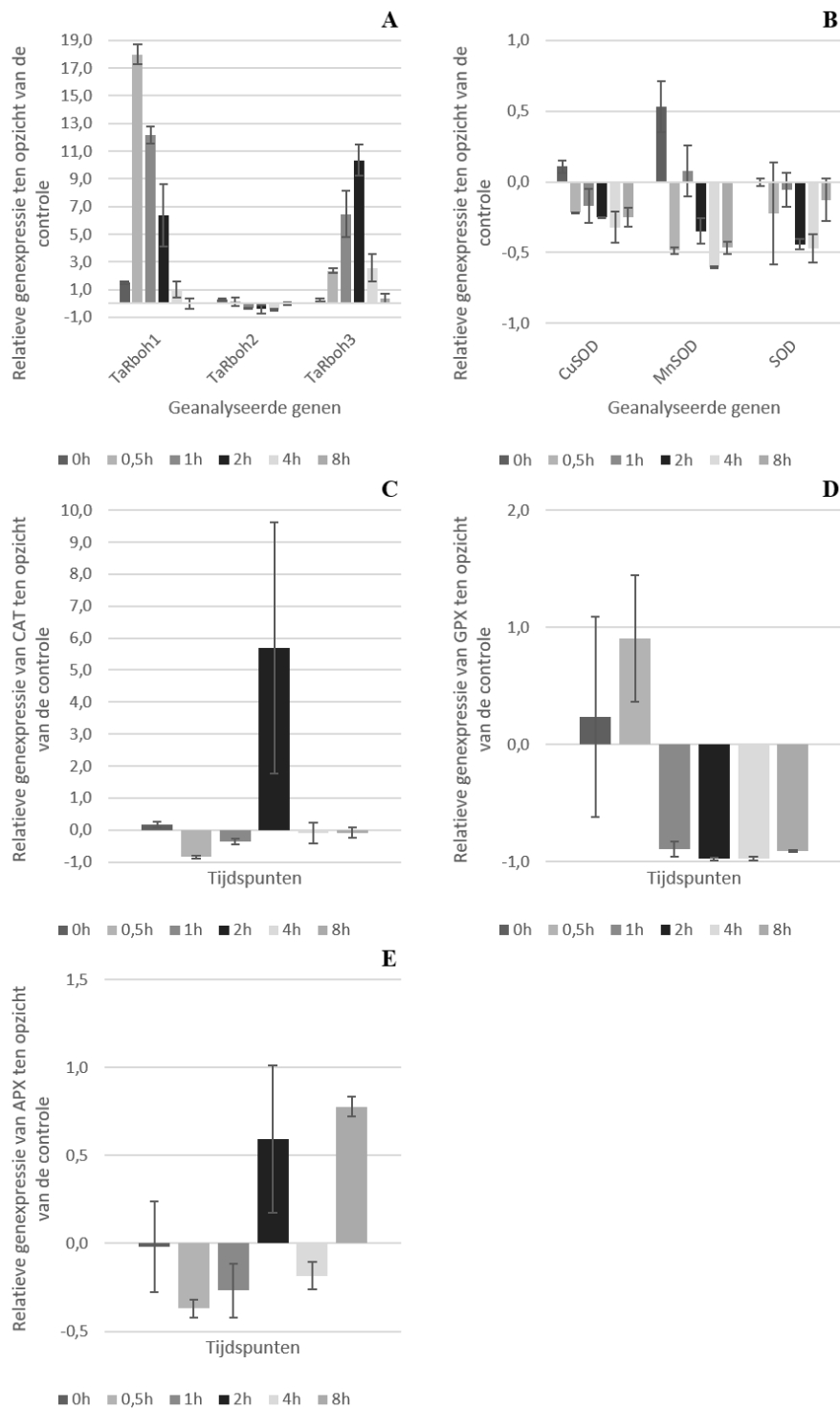
FIGUUR 39: RESULTATEN VAN DE VERSCHILLENDE ENZYMTTESTEN WANNEER TARWE WERD BEHANDELD MET EEN Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) -CONCENTRATIE VAN 50 µM. (A) DE SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) -ACTIVITEIT STIJGT NAARMATE DE TARWEPLANTEN LANGER WORDEN BLOOTGESTELD AAN DE VOLATIELE COMPONENT. (B) OOK DE CATALASE (CAT) -ACTIVITEIT STIJGT TOT AAN 2 UUR, DAARNA IS TERUG EEN NEERWAARTSE TREND WAARNEEMBAAR. (C) WANNEER DE CONCENTRATIE AAN FENOLISCHE COMPONENTEN IN KAART WORDT GEBRACHT, IS EEN PIEK BIJ 2 UUR BLOOTSTELLING ZICHTBAAR. (D) DEZE PIEK IS EVENEENS WAARNEEMBAAR WANNEER DE MALONDIALDEHYDE (MDA) -CONCENTRATIE GEMETEN WORDT BIJ VERSCHILLENDE TIJDSPUNTEN. OP DE GRAFIEKEN WORDEN FOUTVLAGGEN BEREKEND OP BASIS VAN DE STANDAARDDEVIATIE.

4.6 RT-qPCR

Via RT-qPCR worden de expressieniveaus van genen die mogelijks betrokken kunnen zijn bij het primen in kaart gebracht (Figuur 40). Opvallend is gebleken dat vooral twee onderzochte homologen van het Rboh-gen meer tot expressie komen bij het blootstellen van tarwe aan 50 µM Z-3-HAC. Deze genen zijn betrokken bij de generatie van reactief zuurstof, wat een eerste gevolg is bij de immuunreactie van planten. De CAT-genen ondervinden een piek bij 2 uur, waaruit blijkt dat de pathway om ROS terug te laten weg reageren ook actief wordt. Na 4 uur is de piek echter terug verdwenen. Bij de expressie van alle SOD-genen is er een licht dalende trend tot geen verschil merkbaar. Het GPX-gen codeert, net als de CAT- en SOD-genen, voor een eiwit dat zorgt voor het weg reageren van ROS. Na RT-qPCR blijkt dat de expressie van dit

gen bij blootstelling aan 50 μM Z-3-HAC neergereguleerd wordt. Over de expressie van het APX-gen kan geen eenduidig besluit getrokken worden, aangezien er te veel fluctuaties voorkomen bij de bekomen resultaten.

Er kan geconcludeerd worden dat genen die zorgen voor de vorming van ROS opgereguleerd zullen worden en genen die ervoor zorgen dat ROS verdwijnt, in expressie verminderd zullen worden ten opzichte van een controlebehandeling. Nochtans zal na 2 uur de genexpressie van de CAT-genen stijgen. Dit toont aan dat het antioxidantmechanisme aangesproken wordt.



FIGUUR 40: RELatieve GENEXPRESSIONE VAN VERSCHILLENDE GENEN TEN OPZICHT VAN EEN MEELOPENDE CONTROLEBEHANDLING. HET VALT OP DAT DE *TRITICUM AESTIVUM* RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (TaRBOH) -GENEN REEDS NA 30 MINUTEN HOGERE EXPRESSIONIVEAUS VERTONEN WANNEER ZE WORDEN BLOOTGESTELD AAN 50 μ M Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC). OP HET TIJDSPUNT VAN 2 UUR IS ER OOK EEN OPMERKELIJKE PIEK WAARNEEMBAAR BIJ DE EXPRESSIE VAN DE CATALASE (CAT)-GENEN. ZOWEL DE EXPRESSIONES VAN DE SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD)-GENEN ALS DE GLUTATHIONPEROXIDASE (GPX) -GENEN WORDEN HOOFDZAKELIJK NEERGEREGULEERD. UIT HET FLUCTUERENDE EXPRESSIONEPATROON VAN ASCORBAAT PEROXIDASE (APX) KAN GEEN EENDUIDIG BESLUIT GETROKKEN WORDEN. HET Ta54227-GEN FUNGEERT SAMEN MET HET ACTINE-GEN ALS REFERENTIEGEN. DE FOUTENVLAGGEN WORDEN BIJ IEDERE GRAFIEK UITGEDRUKT OP BASIS VAN STANDAARDDEVIATIES.

5 Algemene discussie

Uit de statistische analyse blijkt dat Z-3-HAC vanaf een concentratie van 100 en 250 μM een invloed heeft op de kieming van respectievelijk tarwe en tomaat. Ten eerste kan de verlaagde kiemcapaciteit het gevolg zijn van ethyleen dat zich manifesteert in de zaden na primen met Z-3-HAC. Ethyleen is, naast een hormoon betrokken bij het plantdefensiesysteem, ook een verouderingshormoon dat bij te hoge concentraties onder andere een verlaagde kieming kan veroorzaken (KeCpczynski & KeCpczynska, 1997). De ethyleenproductie kan het resultaat zijn van de geïnduceerde immuniteitsreactie die geactiveerd wordt. Hoe hoger de concentraties aan Z-3-HAC, hoe meer dit immuunsysteem geactiveerd wordt en dus zal resulteren in een hogere ethyleenproductie. Ten tweede wordt op de microscopische beelden na DAB-kleuring granulatie waargenomen, wat erop wijst dat er schade wordt aangericht in het bladweefsel door Z-3-HAC. Een mogelijke andere verklaring voor de dalende kiemkracht is bijgevolg dat een te hoge concentratie aan Z-3-HAC te veel schade aanricht bij het embryo, waardoor het niet meer kan ontluiken.

Tijdens de behandeling met hoge concentraties aan Z-3-HAC komt bij de kieming van zowel tarwe als tomaat soms enkel de kiemwortel tevoorschijn, terwijl de cotylen niet ontwikkelen. Dit kan erop wijzen dat de volatiele component een grotere invloed heeft op de cotylen dan op het wortelgedeelte. Daarnaast kan het ook voorkomen dat op het moment dat de kiemwortel in contact komt met de volatiele component een witte smeer wordt gevormd. Indien het zaadje met zijn dorsale zijde naar onder ligt, komt deze wortel direct in contact met de volatiele component. Het gevolg hiervan is dat zijn groei afgeremd wordt. Echter wanneer het zaadje met zijn dorsale zijde naar boven ligt, kan het worteltje onmiddellijk in het medium groeien. Hierdoor komt het niet meer rechtstreeks in contact met de vluchtige component en ontwikkeld de kiemwortel beter. Eerder werd echter aangehaald dat de kiemkracht zou verminderen indien er een te hoge concentratie aan Z-3-HAC aanwezig is. Dit zou willen zeggen dat de volatiele component reeds door het zaadje werd opgenomen vooraleer de kiemwortel tevoorschijn komt. Het lijkt hierdoor onwaarschijnlijk dat het worteltje initieel wel ontwikkeld en enkel bij direct contact met de volatiele component, de verdere groei en ontwikkeling onmiddellijk stillet. Natuurlijk is het wel mogelijk dat de concentraties die op worden genomen door het zaad, kleiner zijn dan de concentraties aanwezig in de Weckbokaal. Dit zou er ook op wijzen dat de cotylen sneller beïnvloed worden door deze lagere concentratie aan Z-3-HAC dan de kiemwortel. Tot slot is het ook mogelijk dat er een vertraagde opname van de component voorkomt en door het feit dat de kiemwortel eerder ontwikkelt dan de cotylen, kan de invloed van de volatiele component op de wortel initieel kleiner zijn dan op de bladvorming. Om echter een eenduidig besluit te kunnen trekken, is nader onderzoek nodig naar de opname en het voorkomen van Z-3-HAC in het zaad.

Alhoewel de kiemvorming van tomaat pas vanaf een concentratie van 250 μM Z-3-HAC verstoord wordt, komt bij de cotylvorming al tijdens de behandeling met 50 μM aan Z-3-HAC een fenotypische verandering voor. De bladeren krullen op en de gevormde stengel heeft de kracht niet meer om omhoog te groeien. Bij tarwe komt dit effect niet voor. Een verklaring hiervoor kan gevonden worden bij de PathoViewerbeelden. Hierop is zichtbaar dat de fotosynthetische schade die na 32 uur wordt aangericht door 50 μM Z-3-HAC enkel het bovenste deel van de tarweplant bereikt, waardoor een groot gedeelte nog vitaal genoeg is om de hele plant overeind te houden. Bij tomaat daarentegen wordt na 30 minuten al onmiddellijk over de volledige plant een negatief effect waargenomen. Hierdoor wordt de gehele tomatenplant zwakker en zakt deze in elkaar.

Voor het verklaren van de verandering in lengte en relatieve groei per DAG (zelfde leeftijd) bij verschillende dosissen aan Z-3-HAC kan eveneens teruggekoppeld worden naar de PathoViewerbeelden. Doordat tarwe bij 50 μM Z-3-HAC nog veel vitaal weefsel heeft, is het logisch dat de lengte en de relatieve groei op dezelfde DAG tussen verschillende concentraties aan volatiele component niet significant verschilt. Ook bij hogere concentraties tot 75 μM Z-3-HAC kan tarwe nog groeien, doordat slechts een deel van de plant verminderde fotosynthetische activiteit vertoont (data niet getoond). De tomatenplanten die behandeld werden met 25 μM Z-3-HAC zijn op DAG 0 en DAG 3 significant groter dan de 50 μM -behandeling en gelijk aan de controlebehandeling. Dit komt omdat het bladweefsel van tomaat bij een behandeling met 50 μM Z-3-HAC volledig wordt aangetast, waardoor iedere cel onder stress komt te staan en bijgevolg minder snel groeit. Vermoedelijk is het effect van 25 μM Z-3-HAC minder groot. Bovendien wordt het groeiverschil significant tussen 1 DAG en 2 DAG. Dit alles wekt het vermoeden dat de component een andere invloed heeft op de groei en ontwikkeling van tomaat dan op die van tarwe. Het groeiproces van tarwe (monocotyl) is mogelijks beter bestand tegen hogere concentraties aan Z-3-HAC in vergelijking met tomaat (dicotyl). Dit is waarschijnlijk het gevolg van de aanwezigheid van een coleoptiel bij monocotylen. Het epicotyl wordt initieel bedekt door het coleoptiel dat fungeert als een beschermende omhulling (Encyclopedia Britannica, 2019). Het is mogelijk dat hierdoor een kiemende monocotyl beter bestand is tegen deze hogere concentraties aan Z-3-HAC dan een dicotyl (data niet getoond). Om dit vermoeden te kunnen bevestigen, werd de interactie tussen de behandeling en de plantensoort bekeken. Deze spreekt de bovenstaande veronderstelling echter tegen. Er wordt geen significant verschillende dosis-respons curve bekomen voor tarwe en tomaat.

In de literatuurstudie werd een onderzoek van Cannoot *et al.* (2018) aangehaald waarbij besloten werd dat wanneer Z-3-HAC aan een te hoge concentratie worden blootgesteld aan de plant, dit een verminderde groei en fotosynthese zal veroorzaken. Dit is niet volledig in overeenstemming met wat in dit onderzoek werd waargenomen. Alhoewel de plantdelen eveneens fotosynthetisch minder actief worden, is bij tarwe geen significant verminderde groei

waar te nemen. Voor tomaat geldt deze stelling wel, want er wordt zowel een verminderde groei als een dalende fotosynthese waargenomen bij het behandelen met 50 μM Z-3-HAC.

Tot nu toe kan besloten worden dat pas bij het primen met 100 μM en 250 μM Z-3-HAC een negatief effect ontstaat op de kieming van respectievelijk tarwe en tomaat. Wanneer deze planten ook tijdens hun groei en ontwikkeling behandeld worden met Z-3-HAC, is bij tarwe tot een concentratie 75 μM geen significant effect op de lengte en de groei waarneembaar. Hierdoor maakt het bij tarwe niet uit of de behandeling wordt toegepast op het zaad of op de kiemplant. Wanneer de behandeling enkel wordt toegepast op het zaad, zal wel nog bijkomend onderzoek naar de primingscapaciteit moeten gebeuren. Wanneer enkel de kiemplant geprimed wordt met 50 μM Z-3-HAC mag dit maximaal 1 uur duren, omdat bij een langere behandeling schade optreedt aan het fotosyntheseweefsel. Bij tomaat is de lengte na behandelen met 50 μM Z-3-HAC op 0 DAG en 3 DAG significant kleiner dan bij de controle- en 25 μM -behandeling. Bovendien wordt tot een concentratie van 25 μM geen groeiachterstand waargenomen. Bij de testen met 50 μM Z-3-HAC, blijkt dat een behandeling langer dan 30 minuten een nadelig effect heeft op de fotosynthese. Vermoedelijk zal met een concentratie van 25 μM langer kunnen behandeld worden. Wanneer echter enkel geprimed wordt bij het zaad, kan tot 250 μM Z-3-HAC gegaan worden. Bij deze hoge concentraties zal nog verder onderzocht moeten worden of de groei van de kiemplant goed verloopt na het stoppen van de behandeling vlak na de kieming. Bovendien moet net als bij tarwe ook onderzocht worden of het primen van het zaad voldoende is om een verhoogde immuniteit te veroorzaken. Tot slot valt het op dat het beschadigde deel van tarwe ongeveer even groot is als het tomatenplantje zelf (data niet weergegeven), waardoor kan geopteerd worden om de tomatenplanten pas te primen wanneer ze groter zijn. Dit zal echter nog nader onderzoek vergen.

Door middel van de multispectraal beelden en de microscopische beelden van de DAB-kleuring kan het beginpunt van de fytoxische schade duidelijk in beeld gebracht worden. Hierbij bevestigen de DAB-kleuringen de Fv/Fm beelden van tarwe. De schade ontstaat bij het jongste en meest fragiele bladweefsel, namelijk de toppen van de bladeren en enkel daar is DAB-kleuring zichtbaar. Bij ouder (tarwe-)weefsel was geen schade aan het fotosynthetisch weefsel en ook geen DAB-kleuring te zien. De beelden van de DAB-kleuring geven duidelijk de productie van H_2O_2 weer bij de stomata. Dit toont aan dat het binnentreden van Z-3-HAC gebeurt via de stomata en zich van hieruit verder kan verspreiden doorheen het plantenweefsel. Daarnaast wijst deze H_2O_2 -productie (ROS) op het voorkomen van schade, waardoor het induceerbare afweersysteem kan worden aangeschakeld. Niet alleen ROS zijn schadelijke stoffen die massaal vrijkomen tijdens deze aanschakeling, maar ook kan de productie van plantenhormonen, PR-eiwitten en secundaire metaboliëten zorgen voor celschade. Normaal worden deze via vesicle trafficking getransporteerd doorheen de cel (Overmyer *et al.*, 2003; Torres, 2010), maar bij een te hoge productie is de kans reëel dat dit systeem gedeeltelijk faalt.

Bovendien wezen de enzymtesten uit dat er een verhoogde activiteit van lipide peroxidases kon waargenomen worden tijdens het behandelen van tarwe met 50 μM Z-3-HAC. Lipide peroxidase zorgt echter voor celbeschadiging (Matsui *et al.*, 2000). Bij een te hoge activiteit van dit enzym, maar ook bij een te hoge productie van schadelijke moleculen kan de schade echter zodanig groot zijn dat granulatie in de stomata optreedt, wat niet ten goede komt van de fotosynthese.

Bij tarwe werd na een behandeling met 50 μM Z-3-HAC de expressieniveaus van verschillende genen geanalyseerd. Hieruit bleek dat twee homologen van het Rboh-gen een duidelijk verhoogd expressieniveau kenden. Dit is reeds significant na 30 minuten, wat wijst op de vroege productie van ROS wanneer de plant wordt blootgesteld aan 50 μM Z-3-HAC. Dit is dan ook de eerste reactie bij het geïnduceerd beschermingsmechanisme. Dat zowel de activiteit van CAT als de expressie van het CAT-gen pas na respectievelijk 1 uur en 2 uur zichtbaar wordt, wijst erop dat antioxidantenzymen pas later meer actief worden. Het geheel van ROS vrijgeven en daarna terug trachten te verwijderen, is een duidelijke aanwijzing op de tijdelijke activatie van het induceerbare afweermechanisme. De expressie van de SOD-genen zal afnemen tijdens het behandelen van tarwe met 50 μM Z-3-HAC. Dit kan verklaard worden doordat ROS op die manier een maximale werking heeft. SOD is namelijk een antioxidantenzym dan zal trachten de ROS-concentratie terug te brengen naar zijn basaal niet-toxisch niveau (Mittler *et al.*, 2004). Dit dalend fenomeen is echter niet terug te vinden wanneer de enzymactiviteit van SOD voor dezelfde behandeling bepaald wordt. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat bij de initiatie van het induceerbare afweermechanisme geen verhoogde genexpressie nodig is, omdat alle SOD-eiwitten post-translationele modificaties ondergaan. Hierdoor zijn de enzymen reeds aanwezig, maar in een inactieve vorm. Er zijn intussen al verschillende post-translationele routes ontdekt. Yamakura en Kawasaki (2010) onderzochten dit fenomeen en kwamen tot de conclusie dat er vier soorten post-translationele mechanismen verantwoordelijk zijn voor de inactivatie van SOD, namelijk nitratie, fosforylatie, glutathionylatie en glycatie. Uit de literatuur blijkt dat ook de GPX-genen post-translationele modificaties ondergaan. Dit kan eveneens de verklaring zijn waarom geen hogere expressieniveaus bij dit antioxidantgen teruggevonden worden (Rhee *et al.*, 2005). Om erachter te komen of de activiteit van dit enzym eveneens stijgt bij een behandeling met 50 μM Z-3-HAC, zal een enzymtest moeten uitgevoerd worden.

Uit de enzymtesten toegepast op de fotosynthetisch minder actieve delen van tarwe na behandeling met 50 μM Z-3-HAC, kan aangetoond worden dat na 2 uur behandelen een hogere concentratie aan zowel fenolische componenten als MDA aanwezig zijn. De fenolische componenten zijn antioxidanten en wijzen op de aanwezigheid van een oxidant die geneutraliseerd moet worden. De oxidanten die hierbij eerst naar vorenkomen, zijn ROS. Dit bewijst nogmaals de activering van het geïnduceerde afweermechanisme. Door het

aanschakelen van dit mechanisme kan bovendien GLV vrijkomen. Het is vrij logisch dat ook een verhoogde concentratie aan MDA waargenomen wordt bij de enzymtesten, want beide stoffen worden vrijgesteld door de werking van lipide peroxidase.

Eerder in de literatuurstudie werd een andere primingscomponent, namelijk BABA, aangehaald. Deze component staat al jaren gekend voor zijn resistentie-inducerende eigenschappen bij planten tegen zowel biotische als abiotische stress. Uit onderzoek blijkt dat bij een primingsconcentratie van 500 μM deze component geen variatie veroorzaakt bij de Ca^{2+} -concentratie in het cytoplasma, geen effect heeft op de productie van NO en ROS of op de expressie van defensie gerelateerde genen bij wijnstok (*Vitis vinifera*). Het primingseffect verschilt dus tussen BABA en een lage concentratie van Z-3-HAC, wat suggereert dat bij het primen met deze componenten verschillende moleculaire mechanismen aangesproken worden. Naast de verschillende structuren van de moleculen, kan dit verschil ook te wijten zijn aan de plantensoort of de gebruikte concentratie. Bij een kleinere concentratie aan BABA werden in *Arabidopsis thaliana* toch een directe activering van de PR-genen geïnduceerd (van Hulst *et al.*, 2006). Deze gegevens tonen dus aan dat BABA werkt volgens verschillende mechanismen, afhankelijk van de plantensoort (Jakab *et al.*, 2001). Om te testen of dit ook voorkomt bij Z-3-HAC, kan beroep gedaan worden op enzymtesten en een RT-qPCR voor tomaat. Hierbij wordt geopteerd om dezelfde richtlijnen te volgen als bij de testen uitgevoerd op tarwe. De interactietest laat echter vermoeden dat dit niet het geval zal zijn.

Bij de TaRboh1-, TaRboh3- en CAT-genen wordt na 2 uur behandelen het hoogste expressieniveau bereikt. Bij de enzymtesten kan daarnaast ook een piek waargenomen worden bij alle onderzochte eiwitten (SOD, CAT, fenolische componenten en MDA) bij 2 uur. Na 1 uur is er schade aan het fotosyntheseweefsel waarneembaar en na 4 uur vindt bovendien de stagnatie van de F_v/F_m -waarden plaats. Dit alles is geen toeval. Het lijkt erop dat wanneer kiemplanten geprimed worden een contacttijd langer dan 4 uur niet meer zinvol is, omdat het geïnduceerd reactiemechanisme reeds werd aangeschakeld. Daarnaast moet bij het primen ook rekening gehouden worden met het toxisch effect van Z-3-HAC. Dit effect is waarschijnlijk het gevolg van het aanschakelen van ROS-pathways en is niet alleen afhankelijk van de concentratie, maar ook van de duur van de primingsbehandeling.

Algemeen kan besloten worden dat de fotosynthese bij getroffen delen achteruitgaat als gevolg van stress. Door het voorkomen van ROS en verschillende antioxidanteiwitten bij tarwe, kan aangetoond worden dat in deze cellen het geïnduceerd beschermingsmechanisme wordt geactiveerd. Hierdoor treedt geen groei meer op bij deze delen, want zoals aangehaald in de literatuurstudie zal een plant ofwel kunnen groeien ofwel zichzelf beschermen (Pieterse & Dicke, 2007). Daarnaast wordt ook granulatie waargenomen, wat wijst op celschade. Waarschijnlijk is er dus een combinatie van cellen waarin het geïnduceerd beschermingsmechanisme tijdelijk wordt aangeschakeld en zijn er cellen die afgestorven zijn

vanwege het fytotoxisch karakter van Z-3-HAC bij te hoge concentraties. Om te kunnen besluiten of er bij tomaat een ander mechanisme gebruikt wordt, zullen de enzym- en RT-qPCR-testen voor deze plant doorgetrokken moeten worden.

Aangezien wordt gewerkt met een volatiele component, is het mogelijk dat deze na verloop van tijd ontsnapt uit de Weckbokaal. Dit komt omdat deze bokaal niet hermetisch afgesloten is. Ook kan de concentratie aan Z-3-HAC dalen doordat deze reageert met moleculen in de bokaal of gemetaboliseerd wordt door de plant zelf (Sugimoto *et al.*, 2014). Op ieder moment zou dus de actuele concentratie aan Z-3-HAC moeten opgevolgd kunnen worden. Hierbij kunnen technieken gebruikt worden die ook toegepast worden om de oorzaak van het sickbuildingsyndroom bloot te leggen. Dit syndroom gaat gepaard met irritatie van de ogen, neus en luchtwegen. De oorzaak hiervan kan een schadelijke volatiele component zijn (Burge, 2004) die vervolgens kan opgespoord worden via GC (gaschromatografie) (Dewulf *et al.*, 2002), SIFT-MS (Selected-Ion Flow-Tube Mass Spectrometry) (Smith & Španěl, 2005) of PRT-MS (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry) (Hansel *et al.*, 1995).

6 Besluit

De titel “*Green Leaf Volatiles, what makes them toxic, what makes them effective*” geeft een perfecte weergave van het doel van deze masterproef. Er wordt gezocht naar het mechanisme dat de toxiciteit verklaart wanneer gebruik wordt gemaakt van de volatiele component Z-3-HAC. Tegelijkertijd worden ook de regulatie van de verschillende genen en enzymen die betrokken zijn bij ROS-vorming en -quenching in kaart gebracht. Praktisch werd dit gedaan via kiem- en fytoxiciteitstesten, PathoViewerbeelden, DAB-kleuringen, enzymtesten en een RT-qPCR-analyse.

De volatiele component treedt binnen via de stomata en verspreidt zich op die manier doorheen het bladweefsel. Vandaar dat tijdens de groei van zowel tarwe als tomaat een afname in fotosynthetische activiteit waarneembaar is afhankelijk van de duur van de behandeling. Er werd aangetoond dat na priming van tarwe met 50 μM Z-3-HAC, verschillende pathways aangeschakeld worden. Zo zal een expressieverhoging van de Rboh-pathway plaatsvinden, waardoor de ROS-concentratie significant verhoogt. Als reactie hierop wordt de CAT-pathway geactiveerd. Soms is een verhoogde expressie van deze antioxidantgenen minder uitgesproken, omdat hun translatie-eiwitten post-translationele modificaties ondergaan. Denk hierbij aan SOD en GPX. Alles wijst erop dat bij primen met 50 μM Z-3-HAC het geïnduceerde verdedigingsmechanisme van tarwe na 2 uur in werking treedt. Wanneer deze plant nadien in contact komt met een pathogeen, zal bijgevolg het verdedigingsmechanisme sneller aangesproken worden. Hetgeen de behandeling zo fytoxisch maakt, is het feit dat via dit mechanisme een grote hoeveelheid ROS en eventueel andere schadelijke moleculen (planthormonen, PR-eiwitten en secundaire metabolieten) worden vrijgesteld. Het fytoxisch effect van Z-3-HAC is afhankelijk van zowel de plantensoort, het groeistadium, de concentratie aan volatiele component als de duur van de primingsbehandeling. Bij te hoge concentraties veroorzaakt de volatiele component schade aan de plantencellen. Hieruit volgt dat niet langer moet geprimed worden dan nodig om een effectieve werking te hebben tegen een pathogeenaanval. Dit zal echter nog verder onderzocht moeten worden in toekomstige experimenten.

Het primen van tarwe met Z-3-HAC heeft vanaf een concentratie van 100 μM een significant effect op de kieming, terwijl de relatieve groei tot een concentratie van 75 μM niet verandert. Een primingsbehandeling langer dan 1 uur met 50 μM Z-3-HAC bezorgt schade aan het fotosynthetisch weefsel, maar pas na 2 uur is er significante opregulatie van het geïnduceerd beschermingsmechanisme waarneembaar. Of deze opregulatie ook gebeurt bij het primen van enkel tarwezaden, zal nog nader onderzocht moeten worden. Algemeen kan er voor tarwe besloten worden dat het niet uitmaakt in welk stadium de primingsbehandeling plaatsgrijpt, enkel zal de concentratie aan Z-3-HAC onder 100 μM gehouden moeten worden. Voor tomaat werd alleen onderzoek gedaan naar het fytoxisch effect van Z-3-HAC. Hieruit blijkt dat het

primen van zaden de kieming minder beïnvloedt (tot 250 μM) dan priming van kiemplanten (tot 50 μM). Nader onderzoek dient nog te gebeuren omtrent het enkel primen van de zaden met Z-3-HAC. Enkele onderzoeksvragen die hierbij kunnen gesteld worden zijn: “*Welke concentraties zullen nodig zijn om voldoende primingscapaciteit te bereiken?*” en “*In welke mate zal de verdere groei van de kiemplant beïnvloed worden na het primen?*”.

Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat meer onderzoek moet verricht worden in de richting van het behandelen van zaden in plaats van het primen van kiemplanten. Bovendien zal dit op grote schaal gemakkelijker realiseerbaar zijn. Er zal gezocht moeten worden naar een concentratie aan Z-3-HAC die geen fytoxiciteit induceert, maar wel verdedigingspathways kan aanschakelen. Zoals eerder aangehaald in de literatuurstudie is het niet de wetgeving, maar de toepasbaarheid en de effectiviteit van de component die de oorzaak is van de meeste problemen.

Naast de besluiten die getrokken worden uit de experimenten, kunnen nog enkele bedenkingen worden gemaakt bij de proefopzet. Eerst en vooral zouden de enzymtesten over een langere tijdsperiode moeten uitgevoerd worden. Bovendien kunnen in de toekomst de enzymtesten en de RT-qPCR doorgetrokken worden naar tomaat. Op die manier kan onderzocht worden of Z-3-HAC bij deze plant via een ander mechanisme werkt. Ook dient er op gelet te worden dat er genoeg herhalingen ingepland worden, zodat statistische analyse van de resultaten mogelijk wordt. Daarnaast zou meer onderzoek moeten verricht worden naar het primen van zaden. Tot slot zou de actuele concentratie aan Z-3-HAC moeten opgevolgd worden, zodat de reactie van de plant ten opzichte van de werkelijke concentratie aan volatiele component kan bekeken worden.

Bibliografie

- Abcam. (z.d.). DAB staining. Geraadpleegd op 23 februari 2019, van <https://www.abcam.com/kits/dab-staining>
- Ameye, M. (2017). *Uncovering the priming potential of the green leaf volatile Z-3-hexenyl acetate: towards a new disease control tool*. Ghent University. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent, Belgium.
- Andersen, M. M., Landes, X., Xiang, W., Anyshchenko, A., Falhof, J., Østerberg, J. T., ... Palmgren, M. G. (2015). Feasibility of new breeding techniques for organic farming. *Trends in Plant Science*, 20(7), 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.011>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., ... Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Bebber, D. P., Ramotowski, M. A. T., & Gurr, S. J. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, 3(11), 985–988. <https://doi.org/10.1038/nclimate1990>
- Birch, P. R. J., & Cooke, D. E. L. (2013). The early days of late blight. *eLife*, 2. <https://doi.org/10.7554/eLife.00954>
- Bown, A. W., Hall, D. E., & MacGregor, K. B. (2002). Insect Footsteps on Leaves Stimulate the Accumulation of 4-Aminobutyrate and Can Be Visualized through Increased Chlorophyll Fluorescence and Superoxide Production. *Plant Physiology*, 129(4), 1430–1434. <https://doi.org/10.1104/pp.006114>
- Burge, P. S. (2004). Sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(2), 185–190. <https://doi.org/10.1136/oem.2003.008813>
- Buxusworld. (z.d.). De Buxusrups of Buxusmot effectief bestrijden of beschermen met Xentari. Geraadpleegd op 5 februari 2019, van <https://www.buxusworld.com/buxusmot-buxusrups/>
- Cannoot, Q., Vanhaelemeersch, F., & Verwee, P. (2018). *De geur van versgemaaid gras in de strijd tegen plantenziektes: op zoek naar fytotoxische concentraties* (scriptie). Ghent University. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent, Belgium.
- Carl Roth. (z.d.). Roti®-Nanoquant. Geraadpleegd op 5 maart 2019, van https://www.carlroth.com/en/en/Life-Science/Biochemistry/Protein-Quantitation/Roti%C2%AE<sup>-Nanoquant/p/000000010000343500020023_en
- Carson, R. (1962). *Silent Spring*. Boston, New York: Lewis Publishers (CRC Press LLC).
- Centraal Bureau voor de Statistiek. (2018). Minder biologische bestrijding in glasgroenteteelt. Geraadpleegd op 5 december 2018, van <https://www.cbs.nl/nl-nl/nieuws/2018/16/minder-biologische-bestrijding-in-glasgroenteteelt>

- Chen, S. X., & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), 726–735. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00199.x>
- Cheng, C., Xu, X., Gao, M., Li, J., Guo, C., Song, J., & Wang, X. (2013). Genome-Wide Analysis of Respiratory Burst Oxidase Homologs in Grape (*Vitis vinifera* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24169–24186. <https://doi.org/10.3390/ijms141224169>
- Chernin, L., & Chet, I. (2002). Microbial Enzymes in the Biocontrol of Plant Pathogens and Pests. In R. G. Burns, & R. P. Dick (Eds.), *Enzymes in the Environment* (pp. 166–222). Geraadpleegd van <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9780203904039/chapters/10.1201%2F9780203904039-7>.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124(4), 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- Cipollini, D., & Heil, M. (2010). Costs and benefits of induced resistance to herbivores and pathogens in plants. *Plant Science Review*, 5, 1-25.
- Culotta, V. C., Yang, M., & O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 747–758. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.003>
- Derkx, M. P. M., van Doorn, J., & van der Wolf, J. M. (2012). *Toepassing van elicitors ter verhoging van de plantweerstand*. Praktijkonderzoek Plant & Omgeving BV.
- Dewulf, J., Van Langenhove, H., & Wittmann, G. (2002). Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(9–10), 637–646. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00804-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00804-X)
- Dudziak, K., Zapalska, M., Börner, A., Szczerba, H., Kowalczyk, K., & Nowak, M. (2019). Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39154-w>
- Encyclopedia Britannica. (2019). Plant anatomie: Coleoptile. Geraadpleegd op 13 mei 2019, van <https://www.britannica.com/science/coleoptile>
- Engelberth, J., Alborn, H. T., Schmelz, E. A., & Tumlinson, J. H. (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(6), 1781–1785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308037100>
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Dervinis, C., Davis, J. M., Carlson, J. E., & De Moraes, C. M. (2008). Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatiles cis-3-hexenyl acetate. *New Phytologist*, 180(3), 722–734. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02599.x>
- Fry, W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 385–402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>
- Gao, X., Cox Jr., K., & He, P. (2014). Functions of Calcium-Dependent Protein Kinases in Plant Innate Immunity. *Plants*, 3(1), 160–176. <https://doi.org/10.3390/plants3010160>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

- Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A., & Fontes, E. P. B. (2017). Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02139>
- Grant, J. J., & Loake, G. J. (2000). Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiology*, 124(1), 21–30. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.21>
- Gu, Y., Zavaliev, R., & Dong, X. (2017). Membrane Trafficking in Plant Immunity. *Molecular Plant*, 10(8), 1026–1034. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.001>
- Hamada, N., Fujimichi, Y., Iwasaki, T., Fujii, N., Furuhashi, M., Kubo, E., ... Sato, H. (2014). Emerging issues in radiogenic cataracts and cardiovascular disease. *Journal of Radiation Research*, 55(5), 831–846. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru036>
- Hansel, A., Jordan, A., Holzinger, R., Prazeller, P., Vogel, W., & Lindinger, W. (1995). Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 149–150, 609–619. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(95\)04294-U](https://doi.org/10.1016/0168-1176(95)04294-U)
- Heil, M. (2007). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178(1), 41–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x>
- Henry, G., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16(2), 257–268.
- Heuskin, S., Verheggen, F. J., Haubruge, E., Wathélet, J. P., & Lognay, G. (2011). The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *ProQuest*, 15(3), 459–470.
- Hohmann, U., Lau, K., & Hothorn, M. (2017). The Structural Basis of Ligand Perception and Signal Activation by Receptor Kinases. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040957>
- Hollander, A. (2012). Tegen beter weten in: De geschiedenis van de biologische landbouw en voeding in Nederland (1880-2001). Geraadpleegd op 23 november 2018, van <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/240439>.
- Ishii, H., & Hollomon, D. W. (2015). *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Tokyo, Japan: Springer.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J.-P., & Mauch-Mani, B. (2001). β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 29–37.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M. R. G., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J. T. M., Felix, G., ... Becker, D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca^{2+} -associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal*, 62(3), 367–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2010.04155.x>
- Jiang, L., & Yang, H. (2009). Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1687–1693. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.025>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

- Jørgensen, L. N., Van den Bosch, F., Oliver, R., Heick, T., & Paveley, N. (2017). Targeting Fungicide Inputs According to Need. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 181–203. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035357>
- Kamrin, M. A. (1997). *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. Boca Raton, Verenigde Staten: Lewis Publishers (CRC Press LLC).
- KeCpczynski, J., & KeCpczynska, E. (1997). Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum*, 101(4), 720–726. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01056.x>
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., ... Yoshioka, H. (2007). Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. *The Plant Cell*, 19(3), 1065–1080. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048884>
- Kombrink, E. (2012). Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta*, 236(5), 1351–1366. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1705-z>
- Kost, C., & Heil, M. (2006). Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *Journal of Ecology*, 94(3), 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01120.x>
- Kumar, R. R., Tasleem, M., Singh, K., Ahuja, S., Sakhare, A., Kumar, S., ... Praveen, S. (2019). NO protect the wheat embryo from oxidative damage by triggering the biochemical defence network and amyolytic activity. *Plant Physiology Reports*, 24(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-0439-3>
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 251–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>
- Lamichhane, J. R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., & Messéan, A. (2016). Toward a Reduced Reliance on Conventional Pesticides in European Agriculture. *Plant Disease*, 100(1), 10–24. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-15-0574-fe>
- Lenders S., D’hooghe J. & Tacquenier B. (2013) Gebruik van energie, gewasbescherming, water en kunstmest in de Vlaamse landbouw. Resultaten op basis van Landbouwmonitoringsnetwerk 2005-2011, Beleidsdomein Landbouw en Visserij, Afdeling Monitoring en Studie, Brussel.
- Loomans, A. J. M. (2000). Introductie van uitheemse soorten als bestrijders van plagen: ecologische risico-analyse. *Entomologische Berichten, Amsterdam*, 60, 118-130.
- Lugtenberg, B. (2014). The Oomycete *Phytophthora infestans*, the Irish Potato Famine Pathogen. In C. Schoina, & F. Govers (Eds.), *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 371–378). Cham, Zwitserland: Springer International Publishing.
- MacAllister, S. L., Choi, J., Dedina, L., & O’Brien, P. J. (2011). Metabolic mechanisms of methanol/formaldehyde in isolated rat hepatocytes: Carbonyl-metabolizing enzymes versus oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.01.017>
- Marques, A. C., Fuinhas, J. A., & Pais, D. F. (2018). Economic growth, sustainable development and food consumption: Evidence across different income groups of countries. *Journal of Cleaner Production*, 196, 245–258. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.011>
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M., Pozo, M. J., ... Conrath, U. (2016). Recognizing Plant Defense Priming. *Trends in Plant Science*, 21(10), 818–822. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.009>

- Matošević, D. (2013). Box Tree Moth (*Cydalima perspectalis*, Lepidoptera; Crambidae), New Invasive Insect Pest in Croatia. *South-east European forestry*, 4(2), 89–94. <https://doi.org/10.15177/seefor.13-09>
- Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.002>
- Matsui, K., Kurishita, S., Hisamitsu, A., & Kajiwara, T. (2000). A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation. *Biochemical Society Transactions*, 28(6), 857–860. <https://doi.org/10.1042/bst0280857>
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7(4), 212. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-212>
- Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. (2017). Wet- en regelgeving gewasbeschermingsmiddelen en biociden. Geraadpleegd op 5 februari 2019, van <https://www.ctgb.nl/onderwerpen/wet--en-regelgeving>
- Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., & Karley, A. J. (2016). Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01132>
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 431–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- NCBI. (z.d.). *Triticum aestivum* NADPH oxidase. Geraadpleegd op 2 mei 2019, van <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY561153>
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. (1999). Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase. *FEBS Letters*, 443(2), 201–204. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01706-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01706-2)
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198(1), 249–266. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x>
- Oerke, E. C. (2005). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43. <https://doi.org/10.1017/s0021859605005708>
- Overmyer, K., Brosché, M., & Kangasjärvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science*, 8(7), 335–342. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(03\)00135-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(03)00135-3)
- Paolacci, A. R., Tanzarella, O. A., Porceddu, E., & Ciaffi, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11>
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., ... Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731–734. <https://doi.org/10.1038/35021067>

- Phytofar. (2018). Manieren van gewasbescherming. Geraadpleegd op 11 oktober 2018, van http://www.phytofar.be/nl/manieren_van_gewasbescherming
- Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E., Harrison, K., & Jones, J. D. G. (1998). Rapid, Cf-9- and Avr9-Dependent Production of Active Oxygen Species in Tobacco Suspension Cultures. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *11*(12), 1155–1166. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1998.11.12.1155>
- Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science*, *12*(12), 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.09.004>
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology*, *130*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1104/pp.010787>
- Promega. (z.d.). GoScript™ Reverse Transcription System Protocol. Geraadpleegd op 27 maart 2019, van <https://nld.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol/>
- Rhee, S. G., Yang, K., Kang, S. W., Woo, H. A., & Chang, T. (2005). Controlled Elimination of Intracellular H₂O₂: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-translational Modification. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(5-6), 619–626. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.619>
- Royal Brinkman. (z.d.-a). Welke soorten chemische gewasbeschermingsmiddelen zijn er? Geraadpleegd op 11 oktober 2018, van <https://royalbrinkman.nl/kennisbank-gewasbescherming/chemische-gewasbeschermingsmiddelen>.
- Royal Brinkman. (z.d.-b). Wat is geïntegreerde gewasbescherming? Geraadpleegd op 11 oktober 2018, van <https://royalbrinkman.nl/kennisbank-gewasbescherming/geintegreerde-gewasbescherming>.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the Crossroads of Signaling. *The Plant Cell*, *14*(suppl 1), S401–S417. <https://doi.org/10.1105/tpc.002899>
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M., & Schuurink, R. (2013). Green Leaf Volatiles: A Plant's Multifunctional Weapon against Herbivores and Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(9), 17781–17811. <https://doi.org/10.3390/ijms140917781>
- Schulz, P., Herde, M., & Romeis, T. (2013). Calcium-Dependent Protein Kinases: Hubs in Plant Stress Signaling and Development. *Plant Physiology*, *163*(2), 523–530. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222539>
- Segal, A. W. (2008). The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(4), 604–618. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.003>
- Sigma-Aldrich. (z.d.). TRI Reagent® Protocol. Geraadpleegd op 13 maart 2019, van <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/tri-reagent.html>
- Smith, D., & Španěl, P. (2005). Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, *24*(5), 661–700. <https://doi.org/10.1002/mas.20033>
- Stenberg, J. A., Heil, M., Åhman, I., & Björkman, C. (2015). Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease. *Trends in Plant Science*, *20*(11), 698–712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.007>

- Sugimoto, K., Matsui, K., Iijima, Y., Akakabe, Y., Muramoto, S., Ozawa, R., ... Takabayashi, J. (2014). Intake and transformation to a glycoside of (Z)-3-hexenol from infested neighbors reveals a mode of plant odor reception and defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(19), 7144–7149. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320660111>
- Takahashi, S., Kimura, S., Kaya, H., Iizuka, A., Wong, H. L., Shimamoto, K., & Kuchitsu, K. (2012). Reactive oxygen species production and activation mechanism of the rice NADPH oxidase OsRbohB. *Journal of Biochemistry*, *152*(1), 37–43. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs044>
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, *11*(6), 1187–1194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11061187.x>
- Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, *138*(4), 414–429. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>
- Torres, M. A., & Dangl, J. L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, *8*(4), 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.014>
- ul Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(6), 727–739. <https://doi.org/10.1111/pbi.12368>
- van Hulst, M., Pelser, M., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., & Ton, J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(14), 5602–5607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510213103>
- Van Lenteren, J. C. (1997). Benefits and risks of introducing exotic macro-biological control agents into Europe. *EPPO Bulletin*, *27*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00611.x>
- VanLoon, G. W., & Duffy, S. J. (2017). *Environmental Chemistry A Global Perspective* (4e ed.). Oxford, Groot-Brittannië: Oxford University Press.
- Wadhwa, N., Mathew, B. B., Jatawa, S. K., & Tiwari, A. (2012). Lipid peroxidation: Mechanism, models and significance. *International Journal of Current Science*, *3*, 29–38.
- Walters, D., Newton, A., & Lyon, G. (2007). *Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection*. Oxford, UK: Blackwell.
- Wang, M., Zhao, X., Xiao, Z., Yin, X., Xing, T., & Xia, G. (2016). A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity. *Plant Molecular Biology*, *91*(1–2), 115–130. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0446-y>
- Yamakura, F., & Kawasaki, H. (2010). Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1804*(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.010>
- Yi, H., Heil, M., Adame-Alvarez, R. M., Ballhorn, D. J., & Ryu, C. (2009). Airborne Induction and Priming of Plant Defenses against a Bacterial Pathogen. *Plant Physiology*, *151*(4), 2152–2161. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144782>

Bijlagen

Bijlage 1: Onvolledige lijst met mogelijke primingscomponenten

TABEL 3: OPSOMMING VAN MOGELIJKE STOFFEN DIE EEN PRIMINGSREACTIE KUNNEN OPWEKKEN BIJ PLANTEN WANNEER ZE BLOOTGESTELD WORDEN AAN EEN PATHOGEEN (AMEYE, 2017).

Priming agent	Concentration (mM)	Application	Plant species	Challenge	Reference
Indole	5.12 x 10 ⁻⁶	Aerial	<i>Zea mays</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	(Erb <i>et al.</i> , 2015)
GLVs	1.2 x 10 ⁻⁶	Aerial	<i>Populus deltoides X nigra</i>	<i>Lymantria dispar</i>	(Frost <i>et al.</i> , 2008b)
	5 x 10 ⁻⁶	Aerial	<i>Zea mays</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	(Engelberth <i>et al.</i> , 2004; Engelberth <i>et al.</i> , 2007)
	84.73	Foliar spray	<i>Camelia sinensis</i>	<i>Ectropis obliqua</i>	(Xin <i>et al.</i> , 2015)
Pipecolic acid	1	Soil drench	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Navarova <i>et al.</i> , 2012)
BTH induced volatiles	ND		<i>Phaseolus lunatus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Yi <i>et al.</i> , 2009)
Hexanoic acid	1	Soil drench	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	(Kravchuk <i>et al.</i> , 2011)
	0.6	Soil drench	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>	(Vicedo <i>et al.</i> , 2009; Scalschi <i>et al.</i> , 2013)
	1	Soil drench	<i>Citrus clementina</i>	<i>Alternaria alternata</i>	(Llorens <i>et al.</i> , 2016)
Azelaic acid	1	Foliar spray	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2009)
β-aminobutyric acid	0.15-0.3	Soil drench	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Hyaloperonospora arabidopsis</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Plectophaeella cucumerina</i> , <i>Peronospora parasitica</i>	(Zimmerli <i>et al.</i> , 2000; Ton & Mauch-Mani, 2004; Van der Ent <i>et al.</i> , 2009)
	0.5 mM	Floating leaf disk assay	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	(Hamiduzzaman <i>et al.</i> , 2005)
	10	Foliar spray	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	(Floryszak-Wieczorek <i>et al.</i> , 2015)
HIPV	ND	Aerial	<i>Zea mays</i>	<i>S. littoralis</i>	(Ton <i>et al.</i> , 2007)
	ND	Aerial	<i>Phaseolus lunatus</i>	Wounding, <i>Tetranychus urticae</i>	(Choh & Takabayashi, 2006; Kost & Heil, 2006)
BTH	0.1	Foliar spray	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Kohler <i>et al.</i> , 2002)
Silicon	2	Hydroponic	<i>Oryza sativa</i>	<i>Cochliobolus miyabeanus</i> <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	(Ye <i>et al.</i> , 2013; Van Bockhaven <i>et al.</i> , 2015a)

Abbreviations: GLV: green leaf volatile, HIPV: herbivore induced plant volatiles; BTH: benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothiolic acid S-methyl ester; MeJA: methyl jasmonate; ND: not determined

Bijlage 2: Onvolledige lijst met antioxidantenzymen

TABEL 4: ONVOLLEDIGE LIJST MET ANTIOXIDANTENZYMEN AANWEZIG IN *ARABIDOPSIS* DIE INSTAAN VOOR ROS (REACTIVE OXIGEN SPECIES) -SCAVENGING. GSH: GLUTATHION; GSSG: GLUTATHION DISULFIDE; NAD(P)(H): NICOTINAMIDE-ADENINE-DINUCLEOTIDE-(FOSFAAT); ASC: ASCORBAAT; MDA: MALONDIALDEHYDE; DHA: DEHYDROASCORBAAT (MITTLER *ET AL.*, 2004).

Antioxidantenzym	Afkorting	Katalyserende reactie
Superoxide Dismutase	SOD	$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Catalase	CAT	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Glutathionine Peroxidase	GPX	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Glutathionine Reductase	GR	$\text{GSSG} + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NAD(P)}^-$
Ascorbate Peroxidase	APX	$2\text{Asc} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{MDA} + 2\text{H}_2\text{O}$
Monodehydroascorbate Reductase	MDAR	$\text{MDA} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Asc} + \text{NAD(P)}^-$
Dehydroascorbate Reductase	DHAR	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{Asc} + \text{GSSG}$
Alternative Oxidase	AOX	$2\text{e}^- + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

Bijlage 3: Hoeveelheid toe te voegen volatiele component voor priming

TABEL 5: HOEVEELHEID TOE TE VOEGEN VOLATIELE COMPONENT VOOR PRIMING IN EEN WECKBOKAAL VAN 1500 ML. HET VOLUME AAN Z-3-HEXENYL ACETAAT (HAC) IS AFHANKELIJK VAN DE GEWENSTE CONCENTRATIE.

Gewenste concentratie aan Z-3-HAC	Volume component
25 μ M	4,95 μ L
50 μ M	9,91 μ L
75 μ M	14,86 μ L
100 μ M	19,82 μ L
250 μ M	49,54 μ L
500 μ M	99,08 μ L

