

SPATIO-TEMPORELE ANALYSE VAN EEN HEMIBIOTROFE PATHOGEEN

KAN DE PATHOVIEWER HELPEN OM DE DYNAMISCHE
VERDEDIGINGSRESPONS VAN PLANTEN TE ONTRAFELEN?

Ilse Goyens

Stamnummer: 01500363

Promotor: Prof. Dr. ir. Kris Audenaert

Co-promotor: Dr. ir. Maarten Ameye

Tutor: Dr. ir. Maarten Ameye

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

Academiejaar: 2019 - 2020

SPATIO-TEMPORELE ANALYSE VAN EEN HEMIBIOTROFE PATHOGEEN

KAN DE PATHOVIEWER HELPEN OM DE DYNAMISCHE
VERDEDIGINGSRESPONS VAN PLANTEN TE ONTRAFELEN?

Ilse Goyens

Stamnummer: 01500363

Promotor: Prof. Dr. ir. Kris Audenaert

Co-promotor: Dr. ir. Maarten Ameye

Tutor: Dr. ir. Maarten Ameye

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

Academiejaar: 2019 - 2020

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 promoter 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.

Dankwoord

Deze thesis onderzoekt of planten hun stikstofmetabolisme inzetten in de strijd tegen hemibiotrofe fungale pathogenen. In eerste instantie wordt de levenscyclus van twee plant-pathogene schimmels (*Zymoseptoria tritici* en *Fusarium graminearum*) en de ziekten die zij veroorzaken beschreven. Omdat er geen ervaring was met *Z. tritici*, werd voor die schimmel getracht om de infectie te volgen met de PathoViewer. De focus van het praktische werk lag echter op de rol van het stikstofmetabolisme wanneer de planten een infectie met deze schimmels doormaken.

Ik ben zeer blij dat ik dit onderwerp heb gekregen. De keuze voor dit onderwerp was gebaseerd op mijn interesse voor planten en hun interactie met pathogenen, of het nu schimmels zijn of niet. Dankzij deze thesis ontdekte ik dat ook het praktische werk leuk was om te doen.

Naar mijn gevoel is in deze thesis niets gelopen zoals gepland. De schimmel *Zymoseptoria tritici* werd besteld in het buitenland en het duurde erg lang voordat de schimmel geleverd werd. Vol goede moed ging ik aan de slag met *Z. tritici*, maar alle testen met deze schimmel mislukten. Daar maakte ik me zorgen over en uiteindelijk was *Z. tritici* niet de spelbreker, maar het SARS-cov-2 virus. Net op het moment dat ik verschillende tarwecultivars wilde uitproberen met *Z. tritici* en een groot experiment startte met een tweede schimmel *Fusarium graminearum*, ontstond de Corona-Covid19-crisis. Dit had tot gevolg dat de labo's werden gesloten, ik de experimenten niet kon verder zetten en dus gebruik diende te maken van de reeds bekomen resultaten. Ondanks alle tegenslagen is alles goed gekomen.

Ik wil mijn promotor Prof. Dr. Ir. Kris Audenaert bedanken voor het nalezen van mijn teksten. Daarnaast wil ik ook Dr. Ir. Maarten Ameye van harte bedanken. Hij heeft niet alleen mijn teksten meermaals nagelezen maar me begeleid bij het praktische werk. Tijdens de Corona-Covid19-crisis bood hij ook praktische ondersteuning door data te willen verzamelen in mijn plaats, aangezien de maatregelen verboden me om in het labo te komen.

Preambule

Net op het moment dat de Corona-Covid19-crisis ontstond, zou getracht worden twee nieuwe tarwecultivars te infecteren met *Zymoseptoria tritici*. Het infecteren van de gebruikte tarwecultivar Tybald met *Z. tritici* mislukte steeds. Om uit te zoeken waarom, zouden twee andere cultivars (Sahara en Stereo) geïnfecteerd worden met *Z. tritici*. De bedoeling was om, net als in voorgaande proeven, *Z. tritici* op te kweken in vloeibaar PDB-medium, de sporen te oogsten en vervolgens de bekomen sporensuspensie op dezelfde concentratie te brengen. Tarweplantjes van drie weken oud zouden geïnoculeerd worden door de sporensuspensie op de bladeren te sprayen. Op het moment dat de vloeibare cultuur van *Z. tritici* gestart zou worden, begon de Corona-Covid19-crisis. Dit had tot gevolg dat de cultivars Sahara en Stereo niet getest konden worden. Bijgevolg kon een toevallige resistentie van Tybald tegen *Z. tritici* niet uitgesloten worden als reden voor het mislukken van de infecties.

Ook een experiment met *Fusarium graminearum* op de cultivar Tybald ondervond hinder. De opzet van dit experiment bestond uit twee delen, enerzijds het meten van vier spectrale parameters (F_V/F_M , Green, chlorofylindex en anthocyaanindex) en anderzijds het uitvoeren van RNA extracties, cDNA synthese en qPCR. Voordat de coronamaatregelen van kracht werden, kon het luik omtrent de spectrale parameters nog uitgevoerd worden. Op vijf tijdstippen tijdens de infectie (1, 6, 24, 48 en 72 uur na inoculatie) werden stalen genomen. Voor zowel de geïnoculeerde bladeren als de controlebladeren werden drie biologische replicaten gebruikt en elk replicaat bestond uit zes tarwebladeren. Voor alle replicaten werden de spectrale parameters gemeten op de vijf tijdstippen. Na het meten werd een deel van de replicaten in drie stukken verdeeld (het onderste, middelste en bovenste stuk van het blad) en bevroren in vloeibare stikstof. De stalen werden bewaard bij -80°C tot RNA-extractie kon plaatsvinden. Het tweede luik, nl. de RNA extractie, de cDNA synthese en de qPCR kon niet meer uitgevoerd worden. Bij de qPCR zouden GS1, GS2, GSe en GSr de targetgenen zijn en actine en Ta54227 de referentiegenen. De bedoeling was om de vooropgestelde hypothese na te gaan door zowel het verloop van de infectie als de veranderingen in chlorofylgehalte en genexpressie te volgen. Er zou ten eerste gekeken worden of *F. graminearum* een invloed heeft op de spectrale parameters of de genexpressie. Ten tweede zouden correlaties gezocht worden tussen de spectrale parameters en de genexpressie.

Omwille van het mislukken van de infecties met *Z. tritici* en de Corona-Covid19-crisis, waren er bijna geen resultaten beschikbaar. Dit werd ondervangen door de resultaten van een eerder uitgevoerde, kleinschalige test met *F. graminearum* als case-study te behandelen in de resultaten. Deze test bevatte data van slechts één tijdstip en een beperkter aantal stalen. Daarnaast werd ook besloten om de literatuurstudie uit te breiden. Initieel omvatte de literatuurstudie twee delen, nl. het deel omtrent de interacties tussen planten en hun pathogenen en het deel over *Z. tritici*. Omdat de beschikbare tijd vrij kort was om de testen met *Z. tritici* te doen slagen, werd reeds voor de Corona-Covid19-crisis overgeschakeld op *F. graminearum*. *F. graminearum* zou niet aan bod komen in de literatuurstudie en de reden voor het overschakelen zou beschreven worden in de resultaten. Omdat door de Corona-Covid19-crisis het experiment met *F. graminearum* niet volledig kon doorgaan, werd de literatuurstudie alsnog uitgebreid met een stuk over *F. graminearum*.

Deze preambule werd in overleg tussen de student en de promotor opgesteld en door beiden goedgekeurd.

Abstract

Zymoseptoria tritici en *Fusarium graminearum* veroorzaken resp. de bladvlekkenziekte en aarfusarium in tarwe (*Triticum aestivum* L.). De moleculaire basis van de interactie tussen tarwe en *F. graminearum* is reeds goed begrepen, maar voor de interactie met *Z. tritici* is dit niet het geval. Echter, voor beide schimmels werd nog niet onderzocht of de planten hun stikstofmetabolisme inzetten in de strijd tegen deze pathogenen. Deze masterthesis focust op het stikstofmetabolisme en zijn mogelijke rol in het afweermechanisme tegen hemibiotrofe schimmels. Het doel is om na te gaan of het stikstofmetabolisme wordt ingezet en of deze responsen tijds- of plaatsafhankelijk zijn. Hiervoor werden enerzijds vier spectrale parameters (F_V/F_M , Green, chlorofylindex en gemodificeerde anthocyaan reflectie index) opgevolgd gedurende de infectie. Anderzijds werd RT-qPCR uitgevoerd op vier glutaminesynthetase-genen met een centrale rol in het stikstofmetabolisme van tarwe. Stalen werden op verschillende tijdstippen genomen doorheen de infectie om het temporele aspect te onderzoeken en werden vervolgens in drie delen verdeeld om de plaatsafhankelijkheid te bestuderen. De spectrale data en genexpressie-data werden afzonderlijk geanalyseerd, maar er werd ook getracht om correlaties te vinden tussen de spectrale en genexpressie parameters. Voor *Z. tritici* kon geen conclusie getrokken worden omtrent de rol van het stikstofmetabolisme omdat de inoculaties van tarwe met *Z. tritici* mislukten. Wat *F. graminearum* betreft werden slechts weinig veranderingen waargenomen in zowel de genexpressie als in de spectrale parameters. Hoewel het niet mogelijk was om het bestaan van correlaties te bewijzen, suggereren de correlatieplots dat verbanden alsnog kunnen bestaan. Op basis van al deze waarnemingen kan een rol van het stikstofmetabolisme van de plant in de strijd tegen *F. graminearum* dus niet worden uitgesloten.

Kernwoorden: *Triticum aestivum* L., *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium graminearum*, hemibiotrofie, glutaminesynthetase, stikstofmetabolisme

Abstract

Zymoseptoria tritici and *Fusarium graminearum* are the causal agents of septoria tritici blotch and Fusarium head blight in wheat (*Triticum aestivum* L.) respectively. The molecular basis of the interaction between wheat and *F. graminearum* is well understood but this is not the case for *Z. tritici*. Many different aspects of the lifestyle of *Z. tritici* and the interaction with wheat still need to be elucidated. However, the utilization of the nitrogen metabolism by wheat to combat both fungi has not been studied yet. This master's thesis will focus on the nitrogen metabolism and its possible role in defense against hemibiotrophic fungi. The aim is to elucidate whether the nitrogen metabolism is used as a defense mechanism and whether these responses are time- or space-dependent. On the one hand, four spectral parameters (F_v/F_m , Green, chlorophyll index and modified anthocyanin reflectance index) are followed throughout the infection with *Z. tritici* or *F. graminearum*. On the other hand RT-qPCR is performed on four glutamine synthetase genes with a central role in the nitrogen metabolism of wheat. Samples were taken at different time points throughout the infection in order to investigate the temporal aspect and were subsequently divided into three pieces to examine the spatial aspect. Both spectral and gene expression data were analyzed separately, and it was also attempted to find correlations between spectral and gene expression parameters. Due to the failure of infecting wheat plants with *Z. tritici*, it was not possible to draw a conclusion regarding role of the nitrogen metabolism during an infection with *Z. tritici*. For *F. graminearum* there were few changes observed in gene expression and spectral parameters. Although it was not possible to prove the existence of correlations, correlation plots indicate these may yet exist. Together, these findings do not rule out the possibility of a role for the nitrogen metabolism in defense against *F. graminearum*.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium graminearum*, hemibiotrophy, glutaminesynthetase, nitrogen metabolism

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	VII
Algemene inleiding.....	1
1 Literatuurstudie.....	4
1.1 Interacties tussen planten en hun pathogenen.....	4
1.1.1 Plant-pathogeen interactiemodel	4
1.1.2 Hormonen betrokken bij immuniteitsresponsen.....	6
1.1.3 Stikstofmetabolisme in defensieresponsen.....	7
1.2 Spectrale parameters voor de monitoring van planten	10
1.3 Interactie tussen tarwe en <i>Zymoseptoria tritici</i>	12
1.3.1 <i>Triticum aestivum</i> L.	12
1.3.2 <i>Zymoseptoria tritici</i>	12
1.3.3 Infectiemechanisme.....	14
1.3.4 Moleculaire basis van de interactie tussen tarwe en <i>Z. tritici</i>	16
1.3.5 Is <i>Z. tritici</i> een hemibiotroof?	17
1.4 Interactie tussen tarwe en <i>Fusarium graminearum</i>	18
1.4.1 <i>Fusarium graminearum</i>	18
1.4.2 Interactie tussen <i>F. graminearum</i> en tarwe	19
2 Probleem- en doelstelling	22
3 Materiaal en methoden	23
3.1 Planten, pathogenen en omgevingscondities.....	23
3.2 Preparatie inoculum	23
3.3 Inoculatie	24
3.3.1 <i>In planta</i> test – <i>Z. tritici</i>	24
3.3.2 Detached leaf assay – <i>F. graminearum</i>	25
3.4 Multispectrale beeldvorming - PathoViewer.....	25
3.5 Proefopzet.....	26
3.5.1 <i>In planta</i> test – <i>Z. tritici</i>	26
3.5.2 Detached leaf assay – <i>F. graminearum</i>	26
3.6 RNA-extractie en reverse transcription quantitative PCR	27
3.7 Data analyse.....	28
4 Resultaten	29
4.1 <i>In planta</i> test – <i>Z. tritici</i>	29
4.2 Detached leaf assay – <i>F. graminearum</i>	31
5 Discussie	37
5.1 <i>In planta</i> test – <i>Z. tritici</i>	37

5.2 Detached leaf assay – <i>F. graminearum</i>	37
6 Besluit.....	40
7 Bibliografie	42
8 Bijlage A – optimalisatie qPCR protocol	48

Lijst met afkortingen

Afktoring	Engelse betekenis	Nederlandse betekenis
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosinetrifosfaat
Avr	Avirulence	Avirulentie
CDC	Cell division control protein	Celdelingscontroleproteïne
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	Complementair desoxyribonucleïnezuur
ChlIdx	Chlorophyll index	Chlorofyindex
DON	Deoxynivalenol	Deoxynivalenol
dpi	Days post inoculation	Dagen na inoculatie
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ET	Ethylene	Ethyleen
ETI	Effector triggered immunity	Effector getriggerde immuniteit
ETS	Effector triggered susceptibility	Effector getriggerde gevoeligheid
F ₀	Minimal fluorescence	Minimale fluorescentie
FHB	Fusarium head blight	Aarfusarium
F _M	Maximum fluorescence	Maximale fluorescentie
F _V	Variabele fluorescence	Variabele fluorescentie
GM	Glutamate metabolism	Glutamaatmetabolisme
GOGAT	Glutamine oxoglutarate aminotransferase	Glutamine-oxoglutarate aminotransferase
GS	Glutaminesynthetase	Glutaminesynthetase
hai	Hours after inoculation	Uren na inoculatie
HR	Hypersensitive respons	Hypersensitieve respons
JA	Jasmonic acid	Jasmijnzuur
mARI	Modified anthocyanin reflectance index	Gemodificeerde anthocyaan reflectie index
mRNA	Messenger RNA	Boodschapper RNA
NMR	Nuclear magnetic resonance	Nucleaire magnetische resonantie
PAMP	Pathogen associated molecular pattern	Pathogeen geassocieerd moleculair patroon
PCD	Programmed cell death	Geprogrammeerde celdood
PDA	Potato dextrose agar	Aardappel dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth	Aardappel dextrose bouillon
PR-proteïne	Pathogenesis related protein	Pathogenese-gerelateerde proteïne
PR-2	β-1,3-glucanase	β-1,3-glucanase
PR-3	chitinase	chitinase
PSII	Photosystem II	Fotosysteem II
PTI	Pathogen triggered immunity	Pathogeen getriggerde immuniteit
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Kwantitatieve polymerase kettingreactie
RGB	Red green blue	Rood groen blauw
ROI	Region of interest	Interessegebied
ROS	Reactive oxygen species	Reactieve zuurstofcomponenten
R-proteïne	Resistant protein	Resistentie proteïne
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	Kwantitatieve omgekeerde transcriptie polymerase kettingreactie
SA	Salicylic acid	Salicylzuur
STB	Septoria tritici blotch	Bladvlekkenziekte
UV	Ultra violet	Ultra violet

Algemene inleiding

Voor sessiele organismen als planten is het essentieel om pathogenen tijdig te herkennen en een gepaste biochemische verdediging te starten. Co-evolutie van beide leidde tot een verscheidenheid aan complexe interacties waarbij pathogenen de metabolische pathways van de gastheer beïnvloeden om nutriënten te verkrijgen (Kabbage, Yarden, & Dickman, 2015). Biotrofe pathogenen bijvoorbeeld doden hun gastheren niet, maar voorkomen herkenning of onderdrukken het immuunsysteem van de gastheer (Glazebrook, 2005; Selin, de Kievit, Belmonte, & Fernando, 2016). Necrotrofen daarentegen volgen de omgekeerde strategie. De cellen van de gastheer worden gedood en de nutriënten uit het dode weefsel geëxtraheerd (Glazebrook, 2005; Selin et al., 2016). Een combinatie van beide strategieën wordt toegepast door hemibiotrofe pathogenen. Door de gastheer in eerste instantie in leven te laten en nadien alsnog te doden, kan de pathogeen het immuunsysteem van de gastheer in de war brengen (Glazebrook, 2005; Selin et al., 2016).

Tegelijk met de evolutie van infectiestrategieën, breidden planten hun arsenaal aan verdedigingsmechanismen uit. Niet alleen fysieke barrières als een cuticula en doornen worden ingezet, maar ook hoogdynamische biochemische mechanismen (Bari & Jones, 2009; Duba, Goriewa-Duba, & Wachowska, 2018). Deze complexe systemen vereisen nauwkeurige signalering en strikte regulatie aangezien ze ook schadelijk kunnen zijn voor de plant (Glazebrook, 2005). Algemeen kan voor dicotylen gesteld worden dat planten zich verdedigen tegen biotrofe pathogenen via de salicylzuur pathway, en tegen necrotrofen via de jasmonaat- en ethyleenpathway (Bari & Jones, 2009; Glazebrook, 2005). Deze dichotomie is echter niet aanwezig bij monocotylen. In rijst bijvoorbeeld treedt bij pathogeeaanvallen geen verandering op in de hoeveelheid salicylzuur en de jasmonaatpathway blijkt dan weer actief te zijn tegen biotrofen, hemibiotrofen en necrotrofen (De Vleeschauwer, Gheysen, & Höfte, 2013). Tot slot kan de ethyleen-pathway zowel een positieve als een negatieve impact hebben op de resistentie van rijst tegen verschillende pathogenen (De Vleeschauwer et al., 2013).

Om verdere uitbreiding van de infectie te vermijden, zullen planten afhankelijk van de pathogeen (biotroof of necrotroof) de geïnfecteerde cellen doden of in leven proberen te houden (Seifi, Van Bockhaven, Angenon, & Höfte, 2013). Hiervoor zullen onder andere aminozuren ofwel van de cellen worden weggevoerd ofwel er juist naar toe (Seifi et al., 2013). Aminozuren worden voorafgaand aan het transport door glutaminesynthetasen (GS) omgezet naar glutamine. Glutamine heeft een hoge C/N-verhouding, zodat het stikstoftransport efficiënt verloopt. Na de omzetting wordt glutamine via het floëem vervoerd (Seifi et al., 2013). Tarwe beschikt over vier glutamine-synthetase-enzymen (GS1, GS2, GSe en GSr) die afhankelijk van het weefsel en van de ontwikkeling van de plant tot expressie komen (Bernard & Habash, 2009; Bernard et al., 2008). De expressie van hun coderende genen kan gevolgd worden via reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). Dit laat toe na te gaan of planten hun aminozuurmetabolisme inzetten in de strijd tegen pathogenen.

Het belang van de dynamische verdedigingsmechanismen komt duidelijk naar voor bij infecties met hemibiotrofe pathogenen, gezien de verandering in hun levenswijze. De fungi *Zymoseptoria tritici* en *Fusarium graminearum* zijn twee voorbeelden van hemibiotrofe pathogenen die respectievelijk de bladvlekkenziekte en aarfusarium in tarwe (*Triticum aestivum* L.) veroorzaken (Adhikari, Mamidi, Gurung, & Bonman, 2015; Ameye et al., 2015; Fones & Gurr, 2015; Kettles et al., 2018; Wilson, Dahl, & Nganje, 2018).

De bladvlekkenziekte (septoria tritici blotch, STB) kan enorme proporties aannemen, wat te zien is in de cijfers. Tijdens zware epidemieën kan tot 50% van de opbrengst verloren gaan (Adhikari et al., 2015; Fones & Gurr, 2015), wat in Europa alleen verliezen met zich mee brengt van zo'n 400 miljoen dollar

(Yemelin et al., 2017). Om STB onder controle te houden, worden voornamelijk twee fungicidegroepen (strobilurines en azolen) gebruikt (Adhikari et al., 2015; Yemelin et al., 2017). Van de jaarlijks gebruikte fungiciden in de EU, schat Fones & Gurr (2015) dat ongeveer 70% dienen om infecties met *Z. tritici* binnen de perken te houden. De kost van deze fungiciden tegen *Z. tritici* lopen volgens Kettles & Kanyuka (2016) op tot 1 miljard euro per jaar.

Ondanks het wereldwijde enorme economische belang van tarwe en de grote verliezen die *Z. tritici* veroorzaakt, is slechts weinig geweten omtrent de moleculaire basis van de interactie (Ben M'Barek et al., 2015; Fones, Eyles, Kay, Cowper, & Gurr, 2017; Kilaru, Schuster, Ma, & Steinberg, 2017). Twee bijkomende problemen zijn dat *Z. tritici* niet alleen aan een hoog tempo resistentie ontwikkelt tegen commercieel beschikbare fungiciden, maar ook de snelle aanpassing van de pathogeenpopulaties aan resistente plantencultivars (Adhikari, Anderson, & Goodwin, 2003; Adhikari et al., 2015; Brennan, Benbow, Mullins, & Doohan, 2019; Mehrabi, Zwiers, de Waard, & Kema, 2006; Mohammadi et al., 2017; Sanchez-Vallet et al., 2018).

Het verloop van de bladvlekkenziekte kan in twee grote fasen worden verdeeld (Brennan et al., 2019). De eerste fase verloopt zonder zichtbare symptomen, en wordt daarom de latente fase genoemd (Palma-Guerrero et al., 2016). Na 9 tot 14 dagen zonder symptomen ontstaan plots laesies, die onregelmatig zijn van vorm en steeds groter worden (Ben M'Barek et al., 2015; Steinberg, 2015). Het is tijdens deze necrotrofe fase dat de schimmel sporuleert (Ben M'Barek et al., 2015; Brennan et al., 2019).

In de moleculaire kennis omtrent de interactie tussen tarwe en *Z. tritici* bestaan nog hiaten. Zo is niet geweten welke moleculen de trigger zijn voor de switch naar necrotrofie. Ook is niet geweten hoe *Z. tritici* erin slaagt onopgemerkt te blijven tijdens de latente fase, hoe in diezelfde fase nutriënten worden vergaard en hoe de laesies ontstaan (Brennan et al., 2019). De celbiologie van de interactie is daarentegen beter beschreven, maar ook hier bestaan nog steeds onduidelijkheden. Het is bijvoorbeeld nog niet helemaal duidelijk hoe *Z. tritici* het plantenweefsel binnen dringt, maar het is wel zeker dat *Z. tritici* geen voedingsstructuren maakt zoals biotrofe fungi dat doen (Brennan et al., 2019). Daarnaast blijken ook de timing van het binnentreden, de overgang naar necrotrofie en de start van de sporulatie enigszins te verschillen van studie tot studie (Brennan et al., 2019).

Het pathogeensysteem tarwe - *F. graminearum* is, in tegenstelling tot *Z. tritici*, goed begrepen. Zo staat het bijvoorbeeld vast dat *F. graminearum* een hemibiotroof is, terwijl dit voor *Z. tritici* nog steeds onduidelijk is. De schaal van de economische gevolgen van aarfusarium (FHB) veroorzaakt door *F. graminearum* is van dezelfde grootteorde als voor *Z. tritici*. De economische gevolgen omvatten niet alleen opbrengstverliezen, maar ook het resterende graan is gecontamineerd met mycotoxines (zoals deoxynivalenol, DON) die gevaarlijk zijn voor mens, plant en dier (Audenaert, Vanheule, Höfte, & Haesaert, 2013). Ding et al. (2011) schatten dat er vaak 10 tot 15% opbrengst aan tarwe verloren gaat door *F. graminearum*, en dat dit kan oplopen tot meer dan 50%. In geldelijke waarde zou het volgens Figueroa, Hammond-Kosack, & Solomon (2018) gaan om 3 miljard US\$ verlies tussen de vroege 1990 en 2008. Meer recente cijfers geven aan dat in de USA in 2014-2015 voor 1,176 miljard dollar aan tarwe verloren ging door *F. graminearum* (Wilson, McKee, Nganje, Dahl, & Bangsund, 2017).

Los van het verlies aan opbrengst, moet het graan vaak aan een lagere prijs verkocht worden omwille de mycotoxines die *F. graminearum* produceert. In de EU ligt de toegelaten limiet aan DON op 1250 ppb voor onverwerkte producten en op 200-750 ppb voor afgewerkte producten (Figueroa et al., 2018). Graan dat teveel DON bevat, wordt bijgevolg tegen een lagere prijs verkocht (Wilson et al., 2018). Hoe meer DON aanwezig is op het graan, hoe lager de prijs waaraan het graan verkocht kan worden.

Het gebruik van fungiciden tegen *F. graminearum* is vanaf de vroege jaren 2000 tot 2018 sterk gestegen. Terwijl in begin 2000 bijna geen fungiciden werden gebruikt, was tegen 2018 het gebruik reeds gestegen naar 40 tot 60 % van de totale oppervlakte van wintertarwe (Wilson et al., 2018). Volgens Wilson et al. (2018) werd in 2015-2016 voor 197 miljoen dollar aan fungiciden toegepast tegen *F. graminearum* in de USA. De azolen zijn de meest gebruikte fungicidegroep die tegen *F. graminearum* wordt ingezet, hoewel *F. graminearum* daartegen resistent is (Audenaert et al., 2013; Figueroa et al., 2018). Door de resistentie kan aarfusarium slechts voor 30 tot 60% onder controle gehouden worden met triazolen (Figueroa et al., 2018).

Zowel *Z. tritici* als *F. graminearum* vormen een bedreiging voor de tarweoogsten. Het begrijpen en onder controle kunnen houden van de ziekten die ze veroorzaken is belangrijk omdat tarwe wereldwijd een belangrijk voedselgewas is en jaarlijks in grote tonnages wordt geteeld. Voor geen van beide schimmels werd al onderzocht of het stikstofmetabolisme van tarwe een rol speelt in de resistentie. Het zou interessant zijn om enerzijds te weten of tarweplanten hun stikstofmetabolisme inzetten en anderzijds of de planten hun responsen aanpassen aan de biotrofe en necrotrofe fasen van de ziekten.

Het doel van deze thesis is enerzijds om het verloop van STB en aarfusarium in beeld te brengen met behulp van de een multispectraal camera waarmee o.a. modified anthocyanin reflection index, het chlorofyl-gehalte en chlorofyl-fluorescentie kan worden bekeken in planten. De beelden laten toe om na te gaan in welke mate plantenweefsels stress ondervinden. Uit eerder onderzoek is geweten dat er een directe link bestaat tussen het stikstofgehalte in planten enerzijds en de chlorofyl-index anderzijds. In deze thesis wordt deze kennis gebruikt om de hypothese van stikstofremobilisatie tijdens een infectie op te volgen. Met behulp van RT-qPCR wordt de expressie van glutaminesynthetase-genen (*GS1*, *GS2*, *GSr* en *GSe*) gevolgd met als doel de spectrale data verder te onderbouwen met functionele expressie van genen betrokken bij de initiatie van stikstofremobilisatie.

1 Literatuurstudie

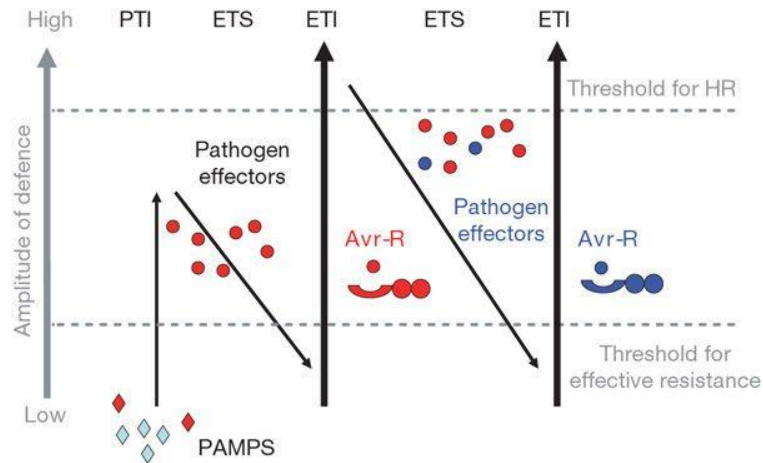
1.1 Interacties tussen planten en hun pathogenen

Omdat planten in evolutionaire termen al veel langer bestaan dan dieren, konden ook meer verschillende interacties ontstaan tussen planten en hun pathogenen. De indeling van pathogenen volgens levensstijl maakt gebruik van de klassen biotroof, hemibiotroof en necrotroof. Necrotrofe pathogenen zoals *Alternaria spp.* maken toxines of enzymen aan en scheiden deze uit. Deze producten doden de gastcellen waaruit dan nutriënten vrijkomen voor de pathogeen (Horbach, Navarro-Quesada, Knogge, & Deising, 2011; Sharma, De Vleeschauwer, Sharma, & Ronald, 2013). Biotrofe pathogenen zoals tarwe-roesten daarentegen, verkrijgen hun nutriënten uit levende cellen (Garnica, Upadhyaya, Dodds, & Rathjen, 2013; Horbach et al., 2011). Ze produceren geen toxines en laten de gastcellen leven zodat ze gedurende lange tijd voedingsstoffen uit de gastheer kunnen opnemen (Horbach et al., 2011; Seifi et al., 2013; Selin et al., 2016; Sharma et al., 2013). Hemibiotrofen combineren beide levensstijlen en nutriëntenstrategieën en vertonen eerst een biotrofe fase, waarna wordt overgeschakeld op necrotrofie (Horbach et al., 2011; Selin et al., 2016).

Bij tijdige herkenning van de pathogeen, zet een resistente plant een geschikte verdedigingsstrategie in en slaagt er zo in om de pathogeen te stoppen (Seifi et al., 2013). Deze strategieën gaan van fysieke barrières zoals versterkingen van de celwand, tot *de novo* synthese van anti-microbiële componenten zoals pathogenese-gerelateerde (PR) proteïnen (Seifi et al., 2013). De fysieke verdediging limiteert zich niet tot de celwand, maar ook de cuticula, trichomen en de apoplast vormen barrières (Bari & Jones, 2009; Duba et al., 2018). Terwijl fysieke barrières meer gericht zijn op voorkomen dat een pathogeen de plant binnentreedt, verhinderen chemische barrières eerder het tot stand komen van infecties of de verdere verspreiding van de pathogeen. Planten kunnen verschillende defensiemechanismen activeren als respons op pathogeen-herkenning (Bari & Jones, 2009; Glazebrook, 2005). Dit betreft o.a. moleculaire, biochemische en morfologische veranderingen. Voorbeelden hiervan zijn de expressie van defensie-gerelateerde genen, productie van reactieve zuurstofcomponenten of antimicrobiële stoffen en geprogrammeerde celdood (Bari & Jones, 2009).

1.1.1 Plant-pathogeen interactiemodel

Het zigzag model van Jones & Dangl (2006) beschrijft de evolutionaire ontwikkeling van het plantaardige immuunsysteem (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon-Reyes, & Van Wees, 2012). Pathogenen produceren virulentiefactoren die meestal sterk geconserveerd zijn en bijgevolg herkend kunnen worden door planten (Fagard et al., 2014). De virulentiefactoren worden pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMP's) genoemd omdat het typische moleculen zijn voor de pathogeen (Figuur 1, Jones & Dangl, 2006; Shetty et al., 2009). Voorbeelden van fungale PAMP's zijn o.a. β -1,3-glucaan, chitine en ergosterol (Shetty et al., 2009). Wanneer planten een of meerdere van deze PAMP's waarnemen, activeert de plant defensie-mechanismen (Figuur 1; De Vleeschauwer et al., 2013). Vaak is deze basale PAMP-getriggerde immuniteit (PTI) voldoende om de pathogeen te stoppen en ziekteontwikkeling te vermijden (De Vleeschauwer et al., 2013; Duba et al., 2018; Jones & Dangl, 2006). De PAMP's worden gedetecteerd m.b.v. membraangebonden receptor proteïnen, de zogenaamde patroonherkennings-proteïnen (De Vleeschauwer et al., 2013; Jones & Dangl, 2006; Shetty et al., 2009).



Figuur 1: Het zigzag model van Jones & Dangl (2006) stelt de co-evolutie van het plantaardige immuunsysteem en pathogeeninfecties voor. De rode ruiten stellen PAMP's voor, geproduceerd door de pathogenen. De blauwe ruiten worden eveneens geproduceerd door de pathogenen, maar zijn geen PAMP's. PAMP's zijn moleculen die typisch en geconserveerd zijn voor de pathogeen in kwestie. Planten kunnen deze herkennen m.b.v. patroonherkennings-proteïnen. Vervolgens activeren planten een basale defensierespons (PAMP-getriggerde immuniteit - PTI), die vaak volstaat om de pathogeen tegen te houden. Succesvolle pathogenen scheiden effectoren uit (rode cirkels) die interfereren met PTI. Vanuit het perspectief van de plant wordt gesproken van effector getriggerde gevoeligheid (ETS). Wanneer planten zich aanpassen en resistente (R)-proteïnen aanmaken, leidt dit tot effector getriggerde immuniteit (ETI). Tijdens ETI herkennen R-proteïnen de effectormoleculen. ETI is vaak een versterkte versie van PTI en overschrijdt meestal de grenswaarde voor de hypersensitieve respons (HR). Pathogenen passen zich aan en produceren aangepaste of nieuwe effectoren (blauwe cirkels) die de ETI onderdrukken. Dit leidt opnieuw tot ETS, waarna selectie leidt tot herkenning van de nieuwe effectoren, opnieuw resulterend in ETI. Figuur uit Jones & Dangl, 2006.

Succesvolle pathogenen daarentegen secreteren effector-moleculen in de gastheer en slagen er zo in om PTI-resistentie te omzeilen of te onderdrukken (De Vleeschauwer et al., 2013; Jones & Dangl, 2006). Dit leidt tot een situatie, effector getriggerde gevoeligheid (ETS) genoemd, waarin planten gevoelig zijn voor de pathogeen (Figuur 1; De Vleeschauwer et al., 2013; Jones & Dangl, 2006). De effectoren worden gecodeerd door avirulentie (Avr)-genen in het genoom van de pathogeen (Duba et al., 2018). Wanneer planten zich aanpassen en in staat zijn deze effectoren te herkennen m.b.v. R-genen die coderen voor resistente proteïnen (R-proteïnen), zijn ze opnieuw resistent tegen de pathogeen en bevinden ze zich in een fase van effector getriggerde immuniteit (ETI, Figuur 1; De Vleeschauwer et al., 2013; Fagard et al., 2014; Jones & Dangl, 2006; Pieterse et al., 2012). R-proteïnen merken de aanwezigheid van effectoren op of herkennen de activiteit van de effectoren (Fagard et al., 2014). ETI gaat typisch gepaard met een hypersensitieve respons (HR) waarbij de plant lokaal, ter hoogte van de infectie, preventief cellen afdoofd. Via deze geprogrammeerde celdood (PCD) trachten planten een verdere verspreiding van de pathogeen tegen te gaan (Figuur 1; Jones & Dangl, 2006).

De co-evolutie van plant en pathogeen stopt niet na ETI. Pathogenen kunnen zich op verschillende manieren adapteren aan de ETI-resistentie van de gastheer. Het gen van de herkende effector kan bijvoorbeeld enigszins wijzigen, waardoor de plant niet langer in staat is de effector te detecteren. Daarnaast is het ook mogelijk dat de effector vervangen wordt door een andere effector, of kan een tweede effector worden geïntroduceerd (Figuur 1; Jones & Dangl, 2006). Hierdoor wordt de plant opnieuw gevoelig voor de pathogeen en bevindt zich dus opnieuw in het stadium van ETS.

Bij zowel PTI als ETI omvatten de plantaardige responsen biochemische veranderingen. Dit zijn bijvoorbeeld de versteviging van celwanden met lignine of callose, de productie van reactieve zuurstofcomponenten zoals H_2O_2 en O_2^- (ROS) en de aanmaak van pathogenese-gerelateerde proteïnen (PR-proteïnen) of toxische secundaire metabolieten (De Vleeschauwer et al., 2013; Duba et al., 2018; Ma, Keller, McDonald, Palma-Guerrero, & Wicker, 2017; Shetty et al., 2009). De precursoren van lignine zijn toxisch voor pathogenen en in hun gepolymeriseerde staat maken ze

plantencelwanden moeilijker afbreekbaar (Shetty et al., 2009). Hierdoor worden de celwanden niet alleen moeilijker doordringbaar voor de pathogeen, maar ook pathogene toxines kunnen moeilijker diffunderen doorheen de versterkte celwand (Bellincampi, Cervone, & Lionetti, 2014).

De accumulatie van ROS heeft weliswaar een effect op de celwanden, maar speelt voornamelijk een rol in de activatie van defensiegenen en heeft een direct antimicrobiële effect (Ding et al., 2011; Shetty et al., 2009). Daarnaast gaat de productie van ROS vaak gepaard met een geprogrammeerde celdood en een hypersensitieve respons (Audenaert et al., 2013). De rol van ROS is een complexe aangelegenheid en lijkt, althans wat dicotylen betreft, afhankelijk te zijn van het type van interactie (Keon et al., 2007). Terwijl planten biotrofe fungi onder controle kunnen houden via ROS-productie en lokale celdood, lijken necrotrofen goed in staat om met ROS om te gaan. Soms lijken necrotrofen zelfs te profiteren van de ROS (Glazebrook, 2005; Keon et al., 2007).

PR-proteïnen, geproduceerd door de planten, kunnen eveneens betrokken zijn bij ziekteresistentie in verschillende plant-pathogeen interacties (Duba et al., 2018; Shetty et al., 2009). De rol van sommige PR-proteïnen is onbekend, maar van anderen is geweten dat ze een *in vivo* effect hebben tegen schimmels (Shetty et al., 2009). Twee hydrolases bijvoorbeeld, PR-2 (β -1,3-glucanase) en PR-3 (chitinase), breken fungale celwanden af. De oligomeren chitine en β -1,3-glucaan die hierbij vrijkomen, kunnen dienen als PAMP en zo de groei van de pathogeen direct voorkomen (Shetty et al., 2009).

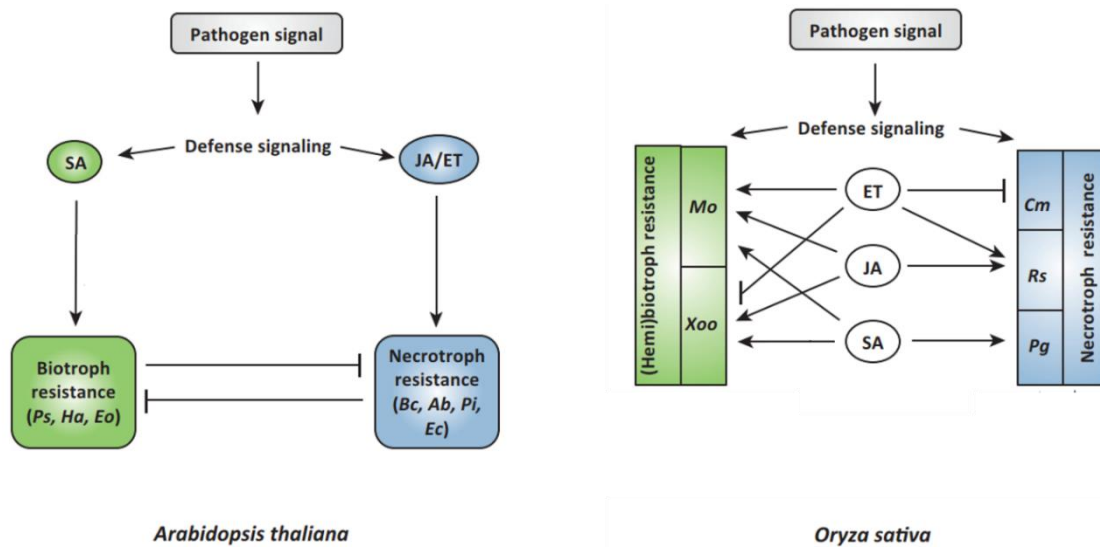
1.1.2 Hormonen betrokken bij immuniteitsresponsen

Planten gebruiken hormonen niet alleen in de regulatie van bijvoorbeeld groei en reproductie, maar ook voor de signalering van het immuunsysteem en om verschillende defensie-pathway's aan te sturen (Pieterse et al., 2012). De mix van geproduceerde hormonen is complex, maar salicylzuur (SA), ethyleen (ET) en jasmijnzuur (en zijn derivaten, samen gekend als jasmonaten, JA) zijn hormonen met sleutelrollen in de verdediging (De Vleeschauwer et al., 2013; De Vleeschauwer, Xu, & Höfte, 2014; Glazebrook, 2005). In dicotylen zoals *A. thaliana* is de functie van deze hormonen goed gekend. Algemeen gesteld verleent SA resistentie tegen biotrofe pathogenen, terwijl necrotrofen afgeweerd zullen worden met JA en ET (De Vleeschauwer et al., 2013; Glazebrook, 2005). In hemibiotrofe interacties worden de SA- en JA-pathways gecombineerd en gecoördineerd om de pathogeen tegen te houden, hoewel dat voor de pathogeen tegelijk ook meer kansen biedt om te interfereren (Audenaert et al., 2013). Voor monocotylen wijzen recente studies in het modelorganisme *Oryza sativa* L. (rijst) echter op een andere regulatie dan bij dicotylen (De Vleeschauwer et al., 2013).

In dicotylen neemt de concentratie aan SA sterk toe tijdens PTI en ETI (De Vleeschauwer et al., 2014). Opmerkelijk is dat de basale hoeveelheden SA in rijst hoger zijn dan in *A. thaliana*, maar dat de concentraties aan SA niet toenemen bij pathogeenaanvallen (De Vleeschauwer et al., 2013). Vermoedelijk fungeert SA eerder als een antioxidant en beschermt het zo de plant bij veroudering, abiotische stress of pathogeen-aanvallen (De Vleeschauwer et al., 2013). Desondanks kan SA wel degelijk resistentie induceren. SA kan namelijk op twee manieren bijdragen tot de verdedigingsmechanismen. Het heeft een signaleringsfunctie, maar ook de *de novo* synthese van SA speelt een rol bij de verdediging. Terwijl bij dicotylen de *de novo* synthese van SA het belangrijker is dan de signaleringsfunctie, is dit bij monocotylen omgekeerd en is de signaleringsfunctie wellicht belangrijker dan de *de novo* synthese (De Vleeschauwer et al., 2014).

Op basis van onderzoek in *A. thaliana* staan JA's gekend om hun effectieve resistentie tegen necrotrofen (De Vleeschauwer et al., 2013). Er zijn echter studies die erop wijzen dat immuniteit tegen biotrofen, hemibiotrofen en necrotrofen in rijst allen JA-gemedieerd is (De Vleeschauwer et al., 2013). De Vleeschauwer et al. (2013) speculeert dat JA fungeert als een priming-agent die pathogeengeïnduceerde defensieresponsen versterkt, onafhankelijk van de levensstijl van de

pathogenen (Figuur 2). Algemeen wordt voor dicotylen aangenomen dat ET de werking van JA ondersteunt. Echter, in rijst lijkt het effect van ET af te hangen van zowel de levensstijl van de pathogeen als van specifieke kenmerken van elke interactie (De Vleeschauwer et al., 2013).



Figuur 2: Modellen van het hormonale verdedigingsnetwerk in *Arabidopsis thaliana* en rijst (*O. sativa*). Pijlen stellen resistentieverhogende acties voor, doodlopende lijnen stellen negatieve acties voor die de planten net gevoeliger maken voor de desbetreffende pathogeen. Hormonen: salicylzuur - SA, jasmijnzuur - JA, ethyleen - ET. Pathogeenafkorting: Ab - *Alternaria brassicicola*, Bc - *Botrytis cinerea*, Cm - *Cochliobolus miyabeanus*, Ec - *Erwinia carotovora*, Eo - *Erysiphe orontii*, Ha - *Hyaloperonospora arabidopsidis*, Mo - *Magnaporthe oryzae*, Pg - *Pythium graminicola*, Pi - *Pythium irregulare*, Ps - *Pseudomonas syringae*, Rs - *Rhizoctonia solani*, Xoo - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Figuur aangepast uit De Vleeschauwer et al., 2013.

In sommige gevallen zullen planten individuele defensie-pathways combineren en coördineren. Interactie tussen de pathway's stelt planten in staat om hun induceerbare responsen af te stemmen op het type pathogeen (De Vleeschauwer et al., 2014; Pieterse et al., 2012). Bovendien laat zulke wisselwerking toe om nutriënten kosten-efficiënt te gebruiken, de activatie van het immuunsysteem gaat namelijk vaak ten koste van groei en ontwikkeling (Fagard et al., 2014; Pieterse et al., 2012). Er werden reeds in verscheidene plantensoorten zowel synergistische als antagonistische interacties tussen SA en JA beschreven, maar meestal betreft het een antagonistische wisselwerking (De Vleeschauwer et al., 2013). Dit antagonisme is wederkerig zodat de SA- en de JA pathway elkaar kunnen onderdrukken (De Vleeschauwer et al., 2014).

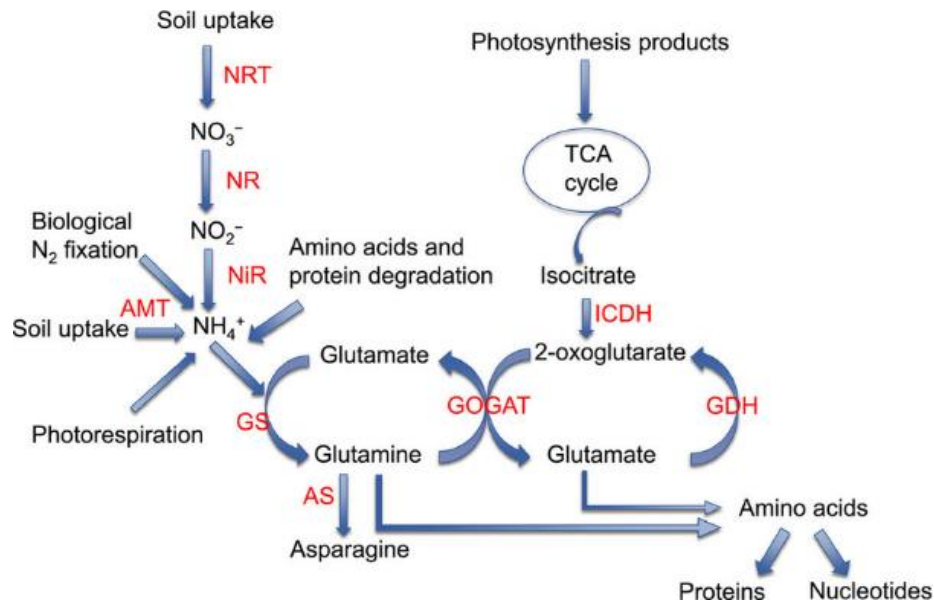
1.1.3 Stikstofmetabolisme in defensieresponsen

1.1.3.1 Isovormen van glutaminesynthetase

Planten brengen stikstof in hun metabolisme door ammonium vast te leggen in de vorm van aminozuren. Dit kan bijvoorbeeld gebeuren via het assimileren van ammonium op een glutaminezuurmolecule (Figuur 3) door het ATP-verbruikende enzym glutamine-synthetase (GS, E.C. 6.3.1.2; Bernard & Habash, 2009; Seifi et al., 2013). Nadien zet het enzym glutamine-oxoglutaraat aminotransferase, ook gekend als glutamaatsynthase (GOGAT, E.C.1.4.7.1), een deel van de gevormde glutamine om naar twee moleculen glutamaat (Figuur 3; Bernard & Habash, 2009; Seifi et al., 2013). Deze twee enzymen vormen samen een cyclus in het aminozuurmetabolisme, nl. de GS/GOGAT-cyclus. De cyclus speelt niet alleen een rol in assimilatie van ammonium, maar ook in de dissimilatie ervan en in het aminozuurmetabolisme (Seifi et al., 2013).

Er zijn verschillende bronnen waaruit planten stikstof halen (Figuur 3). Ten eerste kan de stikstof afkomstig zijn uit de reductie van N_2 uit de lucht en uit de reductie van bodem-nitraat (Bernard &

Habash, 2009). Een tweede bron van stikstof is de rechtstreekse opname van ammonium uit de bodem (Habash, Massiah, Rong, Wallsgrave, & Leigh, 2001). Deze primaire bronnen laten toe om 'verse' stikstof in het metabolisme te brengen. Echter kan stikstof ook via interne recyclage-mechanismen hergebruikt worden, bijvoorbeeld fotorespiratie en het aminozuurkatabolisme dat volgt op de degradatie van eiwitten (Bernard & Habash, 2009).



Figuur 3: Schema van stikstofassimilatie tot aminozuren in planten. Glutaminesynthetase (GS) zet glutaminezuur (glutamate) en ammonium om tot glutamine. Het ammonium hiervoor kan rechtstreeks uit de bodem opgenomen worden, maar kan ook afkomstig zijn uit bijvoorbeeld fotorespiratie en eiwitafbraak. In de omgekeerde reactie zet glutamine-oxoglutarate aminotransferase (glutamaatzuursynthase, GOGAT) 2-oxoglutarate en glutamine om tot twee glutamaatmoleculen. 2-oxoglutarate wordt aangeleverd door de krebscyclus (TCA-cycle). GS en GOGAT vormen samen een cyclus waaruit andere aminozuren kunnen ontstaan. Afkortingen: nitraat transporters (NRT), nitraat reductase (NR), nitriet reductase (NiR), ammonium transporters (AMT), glutaminesynthetase (GS), glutamaatzuursynthase (GOGAT), asparagine synthetase (AS), glutamaat dehydrogenase (GDH), en isocitraat dehydrogenase (ICDH). Figuur uit Lu et al., 2016.

De stikstofassimilatie in planten vindt plaats in zowel het cytosol als in de chloroplasten (Bernard & Habash, 2009). Tarwe beschikt over vier isovormen van glutaminesynthetase, nl. GS1, GS2, GSe en GSr (Bernard & Habash, 2009; Bernard et al., 2008). Drie isovormen, nl. GS1, GSe en GSr, komen voornamelijk in het cytosol voor, terwijl GS2 eerder in de chloroplasten aanwezig is (Bernard & Habash, 2009; Bernard et al., 2008; Oliveira & Coruzzi, 1999). De relatieve hoeveelheden van de isovormen varieert tussen weefsels en tussen plantensoorten (Bernard & Habash, 2009). Niet alleen de hoeveelheden, maar ook de regulatie van de verschillende isovormen varieert en wordt beïnvloed door celtype, orgaan, ontwikkelingssignalen, metabolisme en de omgeving (Bernard & Habash, 2009; Bernard et al., 2008).

Bernard et al. (2008) onderzochten bij tarwe in welke weefsels het mRNA van de verschillende isovormen zich bevindt. Het mRNA van GS1 en GS2 werd in alle weefsels gedetecteerd. Het merendeel van GS2-mRNA was aanwezig in volwassen bladeren en steeltjes terwijl het mRNA van GS1 vooral in de glumes en in het jongste blad werd aangetroffen. Meer specifiek wees immunolocalisatie uit dat GS1 binnen bladeren zich voornamelijk bij de vaatbundels bevindt, meer specifiek in parenchymcellen en schedecellen die de vaatbundels omringen (Bernard et al., 2008; Habash et al., 2001). De GSr-isovorm werd voornamelijk teruggevonden in de glumes, maar ook in de wortels (Bernard et al., 2008) (Bernard et al., 2008). Het mRNA van GSe kwam bijna niet voor in vergelijking met de andere isovormen en er was geen verschil qua hoeveelheid mRNA tussen de onderzochte weefsels (Bernard et al., 2008).

De cytosolische en chloroplast-vormen van GS hebben verschillende metabolische rollen (Bernard et al., 2008). Tijdens de vegetatieve periode is GS2 (chloroplast) het meest voorkomende enzym in het bladmesofyl, waar het ammonium assimileert afkomstig uit fotorespiratie en nitraatreductie (Bernard et al., 2008). Echter, tijdens bladsenescentie waren GS1 en GSr de meest voorkomende varianten, wat samen met de immunolokalisatie en de ontwikkelings-afhankelijke regulatie wijst op een rol voor deze enzymen in het assimileren van ammonium voor transport en distributie doorheen de plant (Bernard & Habash, 2009; Bernard et al., 2008).

1.1.3.2 Stikstofremobilisatie als verdedigingsstrategie

Interessant is dat tijdens interacties met pathogenen niet alleen veranderingen in hormonen optreden. Er worden ook opvallende veranderingen in het glutamaatmetabolisme (GM) vastgesteld (Seifi et al., 2013). De veranderingen in het GM hebben verschillende effecten die allen kunnen leiden tot ofwel een status waarin de plant geïnfecteerde cellen in leven probeert te houden, ofwel een status waarin de plant zijn cellen zal doden (Seifi et al., 2013). Een van de effecten is stikstoftransport m.b.v. de GS/GOGAT cyclus (Seifi et al., 2013). Om stikstof te hergebruiken worden eiwitten tijdens zowel natuurlijke als stress-geïnduceerde senescentie enzymatisch gehydrolyseerd tot aminozuren (Caputo, Criado, Roberts, Gelso, & Barneix, 2009; Feller & Fischer, 1994). Omwille van hun hoge N/C-verhouding spelen glutamine en asparagine een uitgesproken rol in stikstof-remobilisatie (Bernard & Habash, 2009; Seifi et al., 2013). De verschillende aminozuren die tijdens senescentie vrijkomen, worden omgezet naar glutamine of asparagine (Feller & Fischer, 1994). Vervolgens wordt de stikstof naar andere delen van de plant getransporteerd via het floëem (Caputo et al., 2009; Feller & Fischer, 1994).

Er zijn aanwijzingen dat de inductie van stikstof-remobilisatiegenen gelijk loopt met de inductie van defensiegenen (Fagard et al., 2014). Zo verloopt bijvoorbeeld bij infecties met de fungus *Colletotrichum lindemuthianum* de expressie van *GS1* in gewone boon (*Phaseolus vulgaris* L.) parallel aan de expressie van twee defensiegenen *PAL3* en *CHS* (Fagard et al., 2014). Verder werd *GS1* ook in resistente tabaksplanten (*Nicotiana tabacum* L.) geïnduceerd in respons op drie verschillende *Pseudomonas syringae* stammen (Fagard et al., 2014).

Aangezien fungale pathogenen al hun stikstof uit de gastheer moet halen en (hemi)biotrofen teren op levende cellen, is een invasie-getriggerde senescentie gevolgd door celdood een effectieve verdediging tegen (hemi)biotrofen (Seifi et al., 2013). Het tijdig en efficiënt afvoeren van ammonium uit een geïnfecteerde regio in de vorm van asparagine of glutamine heeft twee gevolgen. Ten eerste zal het bijdragen tot lokale celdood, zodat de biotroof niet langer over levende cellen beschikt. De fungus heeft geen toegang meer tot stikstof en wordt dus gestopt (Audenaert et al., 2013; Seifi et al., 2013). Ten tweede beschermt de plant op deze manier zijn stikstofreserves (Seifi et al., 2013). Pathogenen kunnen echter dit stikstof-transport tegenhouden. Een voorbeeld hiervan is de bacteriële hemibiotroof *P. syringae* pv. *tabaci* die de afvoer van stikstof in tabak verhindert m.b.v. een toxine. Het tab-toxine inhibeert GS irreversibel, waardoor vrij ammonium zich opstapelt in de weefsels van de gastheer en de pathogeen dus toegang heeft tot stikstof (Seifi et al., 2013).

Het gericht doden van cellen om zo te voorkomen dat pathogenen aan nutriënten geraken, werkt tegen biotrofen en hemibiotrofen in de biotrofe fase, maar zou necrotrofen net in de kaart spelen. De omgekeerde strategie, nl. het transporteren van nutriënten naar de geïnfecteerde zone, zal cellen lokaal langer in leven houden (Seifi et al., 2013). Necrotrofen induceren senescentie zodat ze nutriënten kunnen halen uit de dode plantenresten (Seifi et al., 2013; Sharma et al., 2013). Door stikstof te vervoeren naar de aangevallen regio's vanuit gezonde weefsels zal de plant proberen de geïnfecteerde cellen langer in leven te houden. Hierdoor wordt de pathogeen-geïnduceerde senescentie uitgesteld en zullen necrotrofen het dus moeilijker hebben om hun infectie tot stand te brengen (Audenaert et al., 2013; Seifi et al., 2013). Bij zonnebloemen (*Helianthus annuus*) bijvoorbeeld

werd de voorraad glutaminezuur in niet-geïnficeerde regio's van het blad sterk uitgeput als respons op de fungale necrotroof *Botrytis cinerea*. Op basis daarvan werd verondersteld dat stikstof van gezonde weefsel naar het geïnficeerde weefsel werd getransporteerd (Dulermo, Bligny, Gout, & Cotton, 2009; Seifi et al., 2013). Sommige pathogenen kunnen echter de stikstofremobilisatie tegengaan. De fungale necrotroof *Cochliobolus victoriae* bijvoorbeeld produceert een toxine dat de GS/GOGAT-gemedieerde N-remobilisatie in haver (*Avena sativa*) verstoort en induceert zo toch senescentie (Seifi et al., 2013).

Het stikstoftransport heeft een dubbel effect. Door via GS glutamine te vormen kan stikstof van de geïnficeerde regio weggevoerd worden, waardoor biotrofe pathogenen gestopt worden omdat de gastheer zijn cellen preventief doodt. Tegelijk maakt deze reactie de gastheer meer gevoelig voor necrotrofe pathogenen, die net profiteren bij deze geprogrammeerde celdood (Seifi et al., 2013). De omgekeerde respons waarbij stikstof richting de geïnficeerde zone wordt gevoerd, leidt tot een verhoogde resistentie tegen necrotrofen, maar maakt de plant tegelijk vatbaarder voor biotrofe pathogenen die levende cellen nodig hebben. Dit zou de tegenstrijdige effecten van N-toediening bij tomaten tegen verschillende pathogenen kunnen verklaren (Seifi et al., 2013). Een verhoogde hoeveelheid stikstof bij hydroponic-tomaten verminderde de gevoeligheid voor *B. cinerea* maar verhoogde de gevoeligheid voor de biotroof *Oidium lycopersicum* (Seifi et al., 2013). De extra stikstof zou de GS/GOGAT-cyclus kunnen voeden, waardoor de plant erin slaagt om de geïnficeerde zone langer in leven te houden tegen *B. cinerea*. Anderzijds krijgt *O. lycopersicum* zo meer nutriënten aangereikt en verhoogt de gevoeligheid voor deze pathogeen (Seifi et al., 2013).

Sommige pathogenen, meestal hemibiotrofen, zijn echter in staat om GM-gemedieerde responsen te neutraliseren door hun levensstijl aan te passen aan de metabolische veranderingen in de gastheer (Seifi et al., 2013). In de interactie tussen hemibiotroof *C. lindemuthianum* en gewone boon (*P. vulgaris*), reageert de plant traag. Pas laat in de biotrofe fase start de plant met het weghalen van nutriënten uit de geïnficeerde regio via GS1. Tegelijk met deze respons switcht *C. lindemuthianum* naar een necrotrofe levensstijl. De werking van GS1 verhoogt de concentratie van glutamine in het floëem rondom de geïnficeerde zone, waardoor *C. lindemuthianum* over een grote hoeveelheid nutriënten beschikt in zijn necrotrofe fase (Seifi et al., 2013). Door de laatijdige initiële respons is de gastheer dus niet in staat om zijn stikstof-reserves tijdig weg te halen en *C. lindemuthianum* reeds in de biotrofe fase te stoppen (Seifi et al., 2013). Echter, het is wel degelijk mogelijk om hemibiotrofen te stoppen nog voor de overgang naar de necrotrofe fase. Voorbeelden hiervan zijn de interacties tussen *C. higginsianum* en *A. thaliana* enerzijds, en *Phytophthora infestans* en *Nicotiana benthamiana* anderzijds (Seifi et al., 2013).

1.2 Spectrale parameters voor de monitoring van planten

Visuele symptomen en kleuringstechnieken zijn eenvoudige manieren om het verloop van een pathogeeninfectie in planten op te volgen. Andere, meer complexe methoden zijn bijvoorbeeld de detectie van proteïnen, RNA of DNA met behulp van (resp.) ELISA, RT-PCR en PCR. Daarnaast werden ook verscheidene spectrale parameters ontwikkeld die informatie geven omtrent het stress-gehalte (F_v/F_m ratio, gemodificeerde anthocyaan reflectie-index) en stikstofstatus (chlorofylindex) van de planten (Baker, 2008; Gitelson, Chivkunova, & Merzlyak, 2009; Muñoz-Huerta et al., 2013).

In de chloroplasten wordt lichtenergie opgevangen door chlorofylmoleculen in fotosysteem II (PSII). Deze energie kan in de vorm van elektronen doorgegeven worden langs de elektronentransportketen, wat deel uitmaakt van het fotosynthese-proces. Echter, de energie van de fotonen kan ook verloren gaan, namelijk door warmteverlies en via chlorofyl-fluorescentie. Er is als het ware competitie voor energie tussen de processen van fotosynthese aan de ene kant en chlorofyl-fluorescentie en warmteverlies aan de andere kant. Wanneer planten stress ondervinden, door bijvoorbeeld

pathogeeninfecties, vermindert de fotosynthese. De stroom aan fotonen stopt echter niet, de overmaat aan energie wordt afgevoerd via warmteverlies en via chlorofyl-fluorescentie (Baker, 2008).

Stress zorgt dus niet alleen voor een vermindering in fotosynthese maar ook voor een toename in chlorofyl-fluorescentie. Dit fenomeen kan gebruikt worden om de stress die planten ondervinden te meten met behulp van licht. Er is steeds een basale fluorescentie. Deze minimale fluorescentie (F_0) wordt gemeten wanneer PSII volledig geoxideerd is door een zwakke lichtflits in te sturen op de bladeren van de plant. Doordat de intensiteit van de flits laag is, wordt de elektrontransportketen van de fotosynthese niet aangedreven. De maximale fluorescentie (F_M) wordt vervolgens gemeten door een felle maar korte lichtflits in te sturen. Door de intensiteit van de flits wordt PSII volledig gereduceerd, maar doordat de flits slechts kort duurde, is er niet genoeg energie om de elektrontransportketens van de fotosynthese aan te drijven. Alle energie die door de flits gegenereerd kon worden, moet dan afgevoerd worden via warmte of chlorofyl-fluorescentie. Het verschil tussen F_M en F_0 is de variabele fluorescentie $F_V (= F_M - F_0)$. De ratio F_V/F_M is een maat voor de efficiëntie van PSII en is bijgevolg ook een indicator voor de stress die een plant ondervindt. De vermindering in fotosynthese ten gevolge van stress, is namelijk zichtbaar als een daling in de efficiëntie van PSII. Als gevolg van stress zal F_M dalen en F_0 stijgen, waardoor F_V/F_M daalt. Met andere woorden, hoe hoger de ratio F_V/F_M is, hoe minder stress een blad ondervindt, of hoe gezonder het blad is (Baker, 2008).

Om het stikstofgehalte te bepalen, kan de Dumas combustion-methode gebruikt worden. Deze is betrouwbaar maar ook destructief en tijdrovend (Muñoz-Huerta et al., 2013). De stikstofstatus van planten kan echter ook bepaald worden aan de hand van het chlorofylgehalte. De chlorofylindex is een maat voor de hoeveelheid chlorofyl en wordt berekend a.d.h.v. reflectiemetingen bij verschillende golflengten (Gitelson, Gritz †, & Merzlyak, 2003). De index wordt groter naarmate er meer chlorofyl aanwezig is. De chlorofylindex is ook een maat voor het stikstofgehalte omdat stikstof in planten niet alleen in aminozuren, eiwitten en nucleïnezuren zit, maar ook in het chlorofyl (Muñoz-Huerta et al., 2013). Omdat de stikstof in bladeren vooral in het chlorofyl zit, is de chlorofylindex sterk gecorreleerd aan het stikstofgehalte (Gitelson et al., 2003; Muñoz-Huerta et al., 2013).

Chlorofyl is niet het enige pigment in planten, ook anthocyanen komen algemeen voor in hogere planten en zijn verantwoordelijk voor een rode kleur (Gitelson et al., 2009). Anthocyanen worden vooral aangemaakt wanneer de plant stress ondervindt door bijvoorbeeld tekorten aan stikstof en fosfor, verwondingen, pathogeeninfectie, lage temperatuur en UV-straling en spelen een rol als antioxidant (Gitelson et al., 2009; Liu et al., 2018). De gemodificeerde anthocyaan reflectie index (mARI) is een maat voor het gehalte aan anthocyanen en stijgt naarmate er meer anthocyanen aanwezig zijn. Ook deze index wordt berekend met behulp van reflectiemetingen bij verschillende golflengten (Gitelson et al., 2009).

1.3 Interactie tussen tarwe en *Zymoseptoria tritici*

1.3.1 *Triticum aestivum* L.

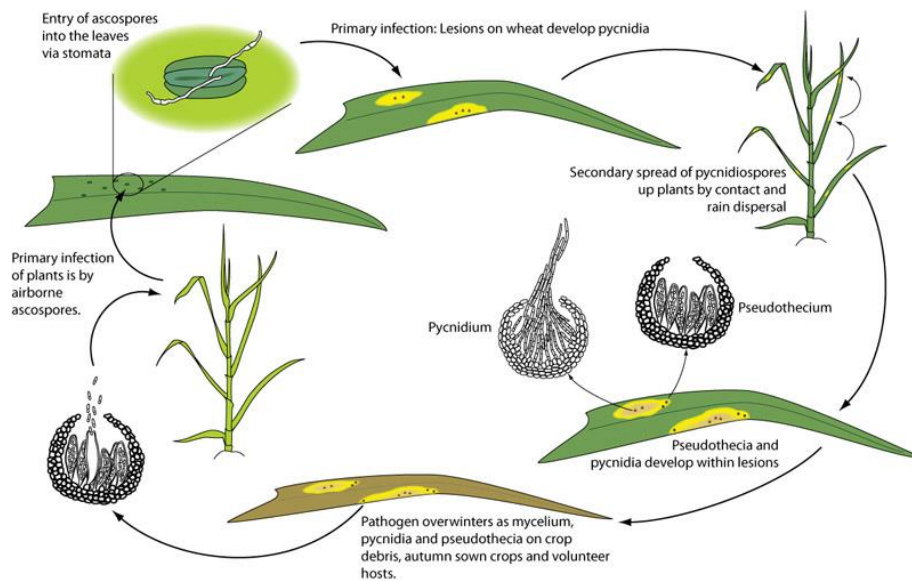
Binnen de grassenfamilie (*Poaceae*) is tarwe (*Triticum aestivum* L.) één van de belangrijkste akkerbouwgewassen (Adhikari et al., 2003; Fones & Gurr, 2015). Tarwe wordt gebruikt in verschillende toepassingen, waaronder voeding, diervoeder, bierproductie en biobrandstoffen (Fones & Gurr, 2015). In 2013/2014 produceerde de EU een zevende van de totale wereldproductie aan tarwe, waarvan zo'n 15% geëxporteerd werd (Fones & Gurr, 2015). In 2017 was de wereldwijde tarweproductie zo'n 772 miljoen ton. Het Europese aandeel daarin bedroeg 35%, wat overeenkomt met 270 miljoen ton. Van de 270 miljoen ton was 150 miljoen ton afkomstig uit de EU, dat is ongeveer een vijfde van de wereldproductie (United Nations, Food and Agricultural organisation, 2019). De EU exporteerde daarvan ongeveer 21 miljoen ton (European Commission, 2019). Deze cijfers wijzen niet alleen op het enorme belang van tarwe voor de EU, maar ook op een potentieel voedselvoorzienings- en economisch probleem indien oogsten falen omwille van bijvoorbeeld weersomstandigheden, schimmelinfecties of insecten.

1.3.2 *Zymoseptoria tritici*

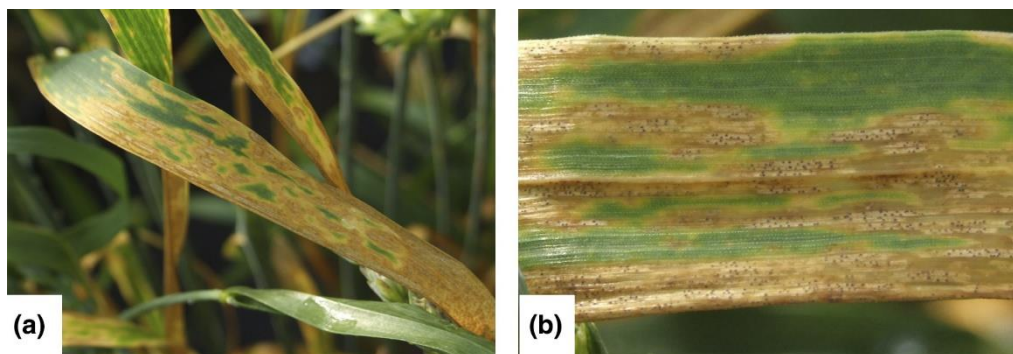
De ascomycet *Zymoseptoria tritici* (teleomorf: *Mycosphaerella graminicola*, Fückel J. Schröt) veroorzaakt de bladvlekkenziekte (septoria tritici blotch, STB, Figuur 4) in tarwe (Brennan et al., 2019; Kettles & Kanyuka, 2016; Palma-Guerrero et al., 2016; Yemelin et al., 2017). *Z. tritici* wordt omschreven als een hemibiotroof omwille van een initiële symptoomloze fase gevolgd door een necrotische fase (Sánchez-Vallet, McDonald, Solomon, & McDonald, 2015; Shetty et al., 2009). Echter bezit *Z. tritici* een aantal kenmerken die atypisch zijn voor biotrofen, waardoor de vraag rijst of de eerste fase wel degelijk een biotrofe fase is (Brennan et al., 2019; Duba et al., 2018; Kettles & Kanyuka, 2016; Sánchez-Vallet et al., 2015; Sanchez-Vallet et al., 2018).

Vanuit een spore op het blad dringen de hyfen van *Z. tritici* via de stomata het plantenweefsel binnen (Figuur 4; Brennan et al., 2019; Palma-Guerrero et al., 2016). Na een symptoomloze fase van 9 tot 14 dagen start de tweede fase waarbij wel symptomen ontstaan, nl. laesies (Figuur 5). Tijdens deze fase begint het bladweefsel te sterven en vormt *Z. tritici* sporen (Figuur 4; Steinberg, 2015). De aseksuele pycnidiosporen worden via gespetter van regen verspreid naar naburige planten (Mehrabi, van der Lee, Waalwijk, & Kema, 2006; Sanchez-Vallet et al., 2018). De seksuele ascosporen daarentegen worden via de wind verspreid en staan wellicht in voor overleving tussen twee seizoenen (Mehrabi, van der Lee, et al., 2006; Palma-Guerrero et al., 2016; Sanchez-Vallet et al., 2018). Nieuwe infecties in het volgende seizoen ontstaan uit ascosporen die achterbleven op het veld (Francisco, Ma, Zwyszig, McDonald, & Palma-Guerrero, 2019). *Z. tritici* is een polycyclische schimmel, wat betekent dat per groeiseizoen de ziektecyclus meerdere keren doorlopen kan worden op eenzelfde plant (Figuur 4; Fones & Gurr, 2015). De anamorfe cyclus kan per seizoen 4 tot 6 keer doorlopen worden, de teleomorfe cyclus echter slechts één tot twee keer (Sanchez-Vallet et al., 2018).

Z. tritici vertoont twee morfologieën, enerzijds een filamenteuze vorm en anderzijds een gistachtige vorm, blastosporen genaamd (Sanchez-Vallet et al., 2018). Door de omgevingscondities te wijzigen, verandert *Z. tritici* van morfologie. In nutriënt-rijke omstandigheden en temperaturen bij 15-18°C komt *Z. tritici* voor in de blastospore vorm en replicateert zich via budding (Sanchez-Vallet et al., 2018). Deze morfologie ziet eruit als roze massa (Kema & Annone, 1991; King et al., 2017). Bij hogere temperatuur (>22°C) of in voedselarmere omstandigheden bevindt *Z. tritici* zich in de filamenteuze vorm (Francisco et al., 2019; Sanchez-Vallet et al., 2018; Yemelin et al., 2017). De rol van de blastosporen is niet volledig duidelijk, maar Francisco et al. (2019) hypothetiseren dat ze een rol spelen in de explosieve toename van STB die optreedt na een regenachtige periode.



Figuur 4: Schematische voorstelling van de cyclus van de bladplekkenziekte in tarwe, veroorzaakt door de hemibiotrofe fungus *Zymoseptoria tritici*. Na het kiemen van ascosporen of pycnidiosporen op het blad, dringen hyfen via de stomata de apoplast van het mesofyl weefsel binnen. Er volgt een symptoomloze periode die 9 tot 14 dagen duurt, waarna de necrotrofe fase start. De symptomen zijn chlorotische laesies waarbinnen de sporestructuren gevormd worden. De ascosporen worden via de wind verspreid over langere afstanden, terwijl de pycnidiosporen zorgen voor besmetting van naburige planten via gespetter van regen. Per groeiseizoen kunnen meerdere infectiecycli plaatsvinden. De winter wordt doorgebracht op tarweresten die achterbleven op het veld. Nieuwe infecties in het volgende groeiseizoen komen voort uit deze sporen. Figuur uit Ponomarenko, Kema, & Goodwin, 2011.



Figuur 5: (a) Tweede, necrotrofe fase in het verloop van de bladplekkenziekte (*Septoria tritici* blotch, STB), maar nog voor de spore-ontwikkeling. Deze symptomen ontstaan 9 tot 14 dagen na de infectie. (b) Ongeveer 21 dagen na de infectie worden zwarte puntjes zichtbaar binnen de geel-bruine laesies. Deze structuren zijn de pycnidia die de asexuele pycnidiosporen bevatten. Foto's uit Brennan et al., 2019.

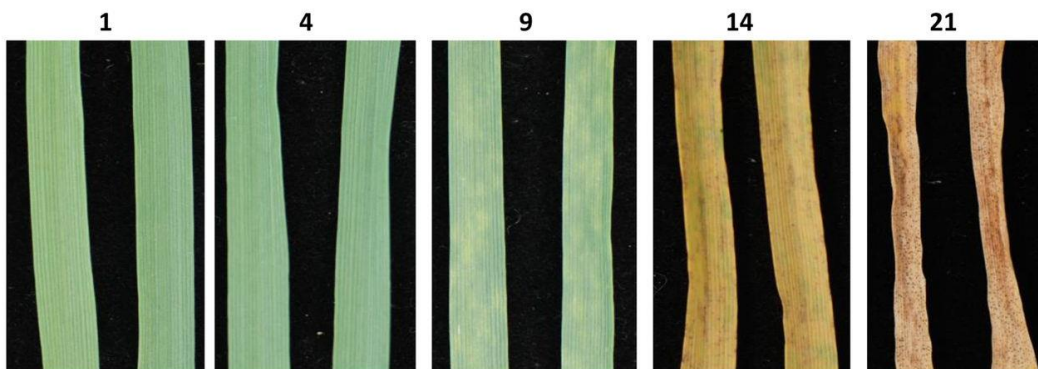
Recent werden voor het eerst pseudohyfen en chlamydosporen, zowel *in vitro* als *in planta*, gerapporteerd bij *Z. tritici* (Francisco et al., 2019). Pseudohyfen verschillen van werkelijke hyfen door vernauwingen ter hoogte van de septa. De rol van pseudohyfen is, net als die van blastosporen, niet geheel duidelijk (Francisco et al., 2019). Francisco et al. (2019) vermoedt dat de chlamydosporen een rol spelen bij het overleven van de winter, het vormen van langlevende reserves aan sporen of het verspreiden over lange afstanden. Deze vermoedens worden geuit omdat chlamydosporen cellen zijn die verschillende extreme omgevingsfactoren kunnen weerstaan en vaak een rol hebben in de overleving op lange termijn (Francisco et al., 2019).

1.3.3 Infectiemechanisme

De ziekte start met het landen van een ascospore of pycnidiospore op een blad van tarwe. De manier waarop *Z. tritici* toegang verkrijgt tot het mesofylweefsel is nog steeds onduidelijk. Zeker is dat *Z. tritici* geen cellen aanboort, en dus op een andere manier het blad moet betreden (Brennan et al., 2019; Palma-Guerrero et al., 2016). Duba et al. (2018) en Kettles & Kanyuka (2016) vermelden dat *Z. tritici* uitsluitend via de stomata het plantaardige weefsel binnentreedt, maar Fones et al. (2017) stelt *Z. tritici* eveneens gebruik maakt van verwondingen. Daarnaast zouden wonden op het blad de vorming van pycnidia promoten en de infectiecyclus verkorten (Fones et al., 2017).

De hyfen die na het kiemen gevormd worden, dringen zowel in compatibele interacties als bij incompatibele interacties wellicht via de stomata het blad binnen tot in de substomatale holte (Figuur 7; Brennan et al., 2019; Sanchez-Vallet et al., 2018; Steinberg, 2015). Echter, de snelheid waarmee dit gebeurt varieert tussen studies. Gemiddeld duurt dit proces 1 tot 3 dagen (Brennan et al., 2019), hoewel ook meer dan 10 dagen en slechts 12 uur gerapporteerd zijn (Fones et al., 2017; Kema, Yu, Rijkenberg, Shaw, & Baayen, 1996).

Op de vraag waarom de plantencellen niet worden aangeboord, formuleren zowel Brennan et al. (2019) als Francisco et al. (2019) een mogelijk antwoord. Biotrofen vormen appressoria om plantencellen binnen te dringen, maar in het genoom van *Z. tritici* ontbreken een aantal essentiële genen voor de vorming van zulke appressoria (Brennan et al., 2019; Pandey, Rajendran, Gaur, Sajeesh, & Kumar, 2016; Steinberg, 2015). Anderzijds beschikt *Z. tritici* in vergelijking met andere fungale pathogenen over weinig enzymen die plantencelwanden kunnen afbreken (Brennan et al., 2019; Francisco et al., 2019). *Z. tritici* bezit met andere woorden niet de nodige genen om rechtstreeks plantencellen aan te boren. Dit zou volgens Brennan et al. (2019) helpen vermijden dat het plantaardige immuunsysteem geactiveerd wordt door het penetreren van plantencellen.

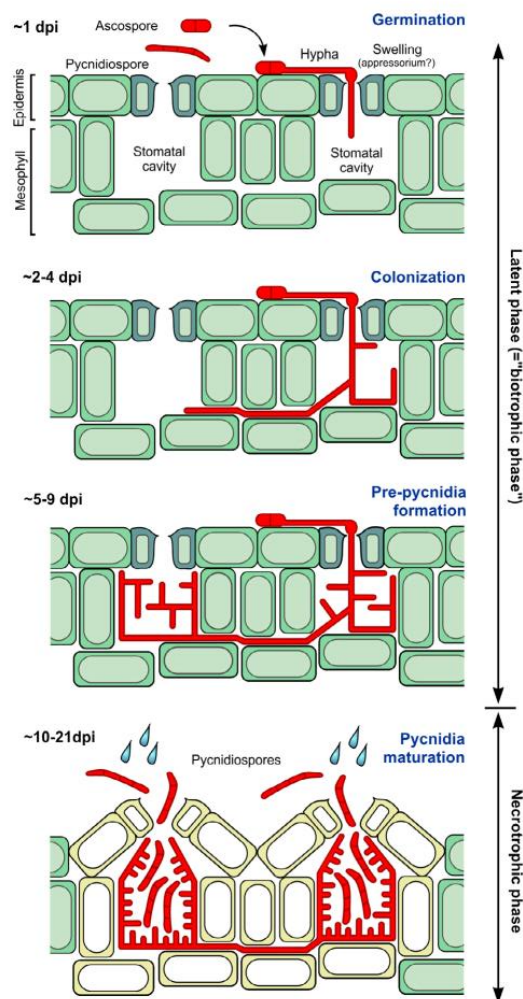


Figuur 6: Verloop STB in beeld gebracht. Foto's werden genomen op 1, 4, 9, 14 en 21 dagen na infectie (dpi). Op 9 dpi worden de eerste symptomen zichtbaar, nl. de chlorotische laesies. Na 21 dagen is de ziektecyclus vervolledigd en zijn de pycnidia die de pycnidiosporen bevatten zichtbaar. Figuur aangepast uit Rudd et al., 2015.

Na het binnentreden in de plant, volgt een periode zonder symptomen (Duba et al., 2018; Fones et al., 2017; Kettles et al., 2018; Kettles & Kanyuka, 2016). Gedurende deze fase verblijft *Z. tritici* uitsluitend in de apoplast van het mesofylweefsel (Figuur 7; Ben M'Barek et al., 2015; Duba et al., 2018; Kema et al., 1996; Kettles et al., 2018). Niet alleen de stomata, maar ook de substomatale holten en de apoplastische ruimten worden gekoloniseerd (Brennan et al., 2019; Kettles et al., 2018; Kettles & Kanyuka, 2016; Sanchez-Vallet et al., 2018). De hyfen groeien erg traag in dit stadium, waardoor dit een kleinschalige kolonisatie is en de biomassa nauwelijks toeneemt (Figuur 7; Fones et al., 2017; Kettles & Kanyuka, 2016; Steinberg, 2015). Één studie rapporteerde een visueel zichtbare toename in mycelium, hoewel het aantal invasieve hyfen beperkt was en dicht bij de stomata bleven waarlangs de hyfen binnendrongen (Fones et al., 2017). Er zijn twee bijkomende aanwijzingen dat de toename in

fungale biomassa beperkt is (Fones et al., 2017). Ten eerste kon Kema et al. (1996) tot 7 dagen na infectie (dpi) geen significante toename aan fungale antigenen detecteren m.b.v. ELISA-assays en dit zowel in een resistente als in een gevoelige tarwecultivar. Ten tweede, Shetty et al. (2007) nam tot 9 dpi eveneens geen toename waar in de hoeveelheid fungale biomassa gemeten met qPCR, zowel voor gevoelige als resistente tarwecultivars.

De kolonisatie van de intercellulaire ruimten is de laatste deelfase van de latente fase (Figuur 7; Brennan et al., 2019). De latente fase duurt 9 tot 14 dagen, afhankelijk van verschillende factoren zoals tarwecultivar, *Z. tritici* isolaat en weersomstandigheden (Duba et al., 2018; Fones et al., 2017; Hehir et al., 2018; Kettles & Kanyuka, 2016; Sanchez-Vallet et al., 2018; Steinberg, 2015). In het veld is er echter meer variatie in de duur van deze fase, nl. tussen de 6 en 36 dagen (Duba et al., 2018).



Figuur 7: Schematische voorstelling van het verloop van septoria tritici blotch. Een ascospore of pycnidiospore landt op een tarwe-blad, waarna deze kiemt. Via de stomata dringt *Zymoseptoria tritici* het blad binnen. Gedurende de latente fase die hierop volgt, koloniseert *Z. tritici* de apoplast van het mesofylweefsel, maar dringt geen tarwecellen binnen. De duur van deze fase varieert tussen 9 dagen post inoculatie (dpi) en 14 dpi. Door middel van een ongekend mechanisme schakelt *Z. tritici* over op een necrotrofe fase. Tijdens deze fase ontstaan de symptomen, nl. chlorotische laesies. Pycnidia ontwikkelen in de gekoloniseerde stomata die zich binnen de laesies bevinden. Deze pycnidia bevatten pycnidiosporen die, wanneer ze volledig ontwikkeld zijn (ongeveer 21 dpi), via regen verspreid worden naar naburige planten. Figuur uit Steinberg, 2015.

Om tot nog toe ongekende redenen en via een ongekend mechanisme, gaat *Z. tritici* na 9 tot 14 dagen over tot de necrotrofe fase (Palma-Guerrero et al., 2016; Sánchez-Vallet et al., 2015; Sanchez-Vallet et al., 2018). Als symptoom van STB ontstaan chlorotische laesies na 9 tot 14 dagen (Figuur 5 en Figuur 6; Brennan et al., 2019; Kettles & Kanyuka, 2016; Steinberg, 2015). Vlak voor het verschijnen van deze

laesies werden, op de plaatsen waar later de laesies zouden ontstaan, kleine waterverzadigde plekjes opgemerkt (Keon et al., 2007). De chlorotische regio's ondergaan een vorm van hypersensitieve respons waardoor het geïnfecteerde mesofylweefsel sterft (Brennan et al., 2019; Sanchez-Vallet et al., 2018). De HR lijkt op geprogrammeerde celdood en wordt in het algemeen door planten gebruikt om de groei van een biotrofe pathogeen in te perken (Keon et al., 2007).

Tegelijk met de start van de necrotrofe fase versnelt de groei van *Z. tritici* drastisch. Bijgevolg neemt de fungale biomassa sterk toe (Brennan et al., 2019; Duba et al., 2018; Palma-Guerrero et al., 2016). Deze toename in biomassa werd eveneens gerapporteerd door Shetty et al. (2007), die m.b.v. qPCR de hoeveelheid biomassa zag toenemen vanaf 12 dpi. De nutriënten voor deze verdere groei en biomassa-toename zijn wellicht afkomstig van de stervende mesofylcellen in de laesies (Brennan et al., 2019; Kettles & Kanyuka, 2016). De inhoud van deze dode plantencellen lekt in de apoplast en kan vervolgens door *Z. tritici* worden opgenomen (Ben M'Barek et al., 2015; Duba et al., 2018; Kettles & Kanyuka, 2016; Palma-Guerrero et al., 2016). De synchroniciteit tussen de plotse versnelling in groei en het optreden van HR, suggereert dat *Z. tritici* een rol speelt in het triggeren van de geprogrammeerde celdood (Keon et al., 2007). Het zou kunnen dat *Z. tritici* hiervoor gebruik maakt van een toxine, maar zeker is dit niet (Keon et al., 2007).

Binnenin de laesies ontwikkelen na verloop van tijd kleine zwarte puntjes, dit zijn pycnidia die gevormd worden in de substomatale holten (Figuur 5, Figuur 6 en Figuur 7; Brennan et al., 2019; Keon et al., 2007; Kettles & Kanyuka, 2016). Pycnidia zijn structuren die de asexuele sporen (pycnidiosporen) bevatten en komen langs de stomata naar buiten (Kettles & Kanyuka, 2016). Via opspattende regendruppels verspreiden de pycnidiosporen zich van het ene blad naar het andere op dezelfde plant maar ook van de ene plant naar de andere (Brennan et al., 2019; Fones et al., 2017; Sanchez-Vallet et al., 2018). Om deze manier van verspreiding te faciliteren komt *Z. tritici* gemakkelijk los van bladeren m.b.v. water (Fones et al., 2017). Ongeveer 21 dagen nadat de spore is geland, zijn de pycnidiosporen volledig ontwikkeld. De seksuele vruchtlichamen (pseudothecia) en de ascosporen worden iets later gevormd, ongeveer 25 tot 30 dagen na de start van de infectie en worden via de wind verspreid (Brennan et al., 2019; Sanchez-Vallet et al., 2018).

1.3.4 Moleculaire basis van de interactie tussen tarwe en *Z. tritici*

De celbiologie achter de bladvlekkenziekte is redelijk goed beschreven. Er bestaan nog een aantal vragen zoals de manier waarop *Z. tritici* naar binnen gaat in de plant. Het waarom roept meer vragen op. De redenen achter de trage groei tijdens de latente fase en lange duur van diezelfde fase, zijn bijvoorbeeld niet gekend. Echter, er bestaan nog veel meer onduidelijkheden omtrent de moleculaire basis van de interactie. Zo is bijvoorbeeld niet geweten hoe de resistentie tegen *Z. tritici* werkt. Zo zijn er aanwijzingen dat tarwe PR-proteïnen en ROS inzet tegen *Z. tritici*. (Shetty et al., 2009) merkte op dat resistentie tegen *Z. tritici* geassocieerd is met een vroege toename van PR-2, gevolgd door een daling. De β -1,3-glucaan die vrijkomt door het afbreken van de celwanden van *Z. tritici* met PR-2, kan optreden als PAMP's en zo verdere defensieresponsen opwekken. In een gevoelige tarwecultivar daarentegen nam de expressie van PR-2 pas toe 9 dagen na infectie, maar nog voor het verschijnen van de symptomen, wat wellicht overeenkomt met de start van de necrotrofe fase (Shetty et al., 2009).

(Keon et al., 2007) merkte op dat de hoeveelheden ROS sterk stijgen bij de start van de symptomen (9 tot 14 dpi) en dat ook de pycnidia sterk kleuren voor zowel waterstofperoxide als superoxide. *Z. tritici* blijkt over een divers arsenaal aan enzymen te beschikken die oxidatieve stress tegengaan, waaronder catalase A (Keon et al., 2007). In vergelijking met de symptoomloze fase was de expressie van deze antioxidant enzymen hoog op 14 dpi en nog hoger op 21 dpi (Keon et al., 2007). De stijging in expressie vond dus simultaan plaats met de stijging in waterstofperoxide en superoxide. Het blijft voorlopig echter onduidelijk of deze ROS al dan niet afkomstig zijn van *Z. tritici*. Dat tarwe ROS produceert als

respons tegen *Z. tritici* is een mogelijkheid, maar het zou ook kunnen dat *Z. tritici* zelf ROS produceert voor zijn ontwikkeling of de ontwikkeling van zijn sporen (Keon et al., 2007). Wanneer de bladeren volledig afgestorven zijn, blijven de pycnidia namelijk geassocieerd met hoge gehalten aan ROS (Keon et al., 2007). Aangezien de cellen in afgestorven bladeren niet langer ROS kunnen produceren, moet de ROS op zulke late tijdstippen afkomstig zijn van *Z. tritici*.

Sommige tarwecultivars zijn resistenter tegen *Z. tritici* dan andere, maar geen enkele cultivar is volledig resistent. Wellicht wordt de interactie tussen tarwe en *Z. tritici* gemedieerd door effectoren en R-proteïnen. Tarwe beschikt in totaal over een 20-tal loci (*STB*-genen genoemd) die resistentie zouden kunnen bieden. Een van deze loci, *STB6*, verleent gedeeltelijke resistentie en een ander gen, *STB16q*, verleende resistentie tegen alle geteste isolaten (Brennan et al., 2019; Brown, Chartrain, Lasserre-Zuber, & Saintenac, 2015; Duba et al., 2018; Saintenac et al., 2018). *STB6* is werkzaam tegen een klein cysteine rijk effector eiwit, AVRSTB6 genaamd, hoewel een directe interactie tussen AVRSTB6 en *STB6* nog niet is aangetoond (Brennan et al., 2019; Saintenac et al., 2018). Daarnaast is de functie van AVRSTB6 onduidelijk wanneer *STB6* ontbreekt in het genoom van tarwe (Brennan et al., 2019). In tegenstelling tot conventionele ETI, wordt de interactie tussen *STB6* en AVRSTB6 niet gevolgd door een HR (Brennan et al., 2019). Hierdoor lijkt het dat *Z. tritici* een HR nodig heeft om de apoplast te koloniseren (Brennan et al., 2019).

1.3.5 Is *Z. tritici* een hemibiotroof?

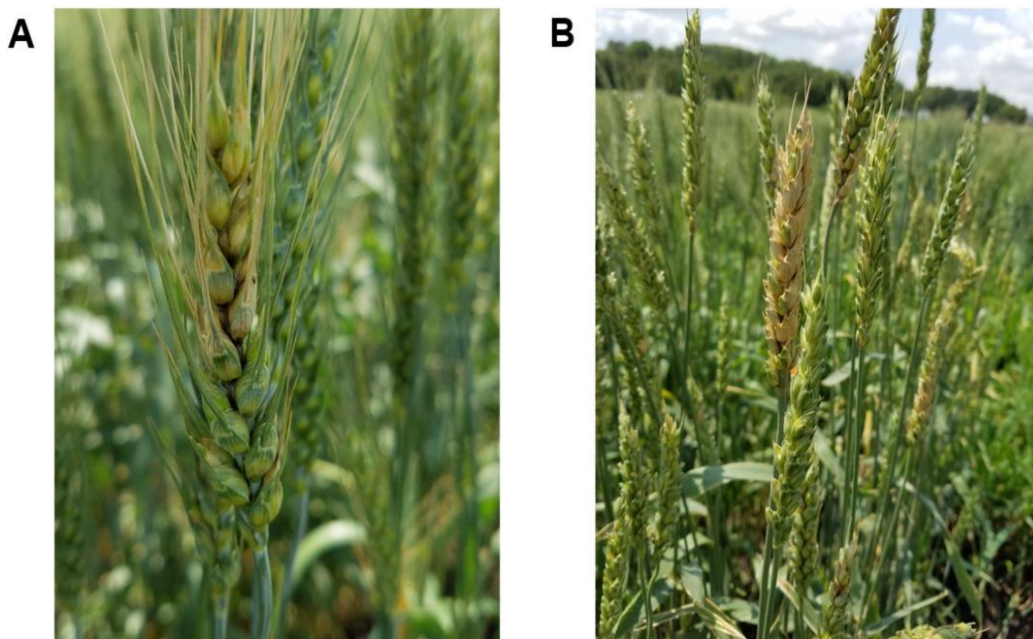
Gezien de initiële symptoomloze fase gevolgd door een necrotische fase waarin *Z. tritici* nutriënten haalt uit het dode plantenweefsel, wordt *Z. tritici* bestempeld als een hemibiotroof (Duba et al., 2018). De eerste fase wordt de biotrofe fase genoemd (Duba et al., 2018; Kettles & Kanyuka, 2016; Shetty et al., 2009; Steinberg, 2015), maar aangezien een aantal kenmerken van biotrofe pathogenen ontbreken bij *Z. tritici*, is deze benaming controversieel geworden. Een eerste kenmerk is dat *Z. tritici* geen voedingsstructuren zoals haustoria vormt, hoewel deze typerend zijn voor biotrofe fungi (Brennan et al., 2019; Duba et al., 2018; Kettles & Kanyuka, 2016; Sanchez-Vallet et al., 2018). Dit wijst op een eerder endofytische levensstijl dan een biotrofe stijl (Brennan et al., 2019). Een tweede voor biotrofen atypisch kenmerk is dat de biomassa van *Z. tritici* tijdens de eerste fase nauwelijks toeneemt (Brennan et al., 2019). Ten derde, in tegenstelling tot biotrofe pathogenen dringt *Z. tritici* tijdens de asymptomatische fase geen tarwecellen binnen (Brennan et al., 2019; Kettles & Kanyuka, 2016; Sanchez-Vallet et al., 2018). Tot slot kunnen strikt biotrofe pathogenen niet *in vitro* groeien, iets wat met *Z. tritici* wel mogelijk is (Brennan et al., 2019).

Omdat het dus niet zeker is dat *Z. tritici* een hemibiotroof is, werd in het verleden al voorgesteld om te spreken van een latente fase in plaats van een biotrofe fase (Sánchez-Vallet et al., 2015). Er werd ook voorgesteld om de benaming 'hemibiotroof' te vervangen door 'latente necrotroof' omdat de huidige kennis van *Z. tritici* beter beschreven wordt door het begrip 'latente necrotroof' (Sánchez-Vallet et al., 2015). Tot welke trofische klasse *Z. tritici* behoort zal wellicht nog voor enige tijd onduidelijk blijven, ook omdat een groot deel van alle proteïnen die *Z. tritici* uitscheidt nog onbekend zijn (Brennan et al., 2019).

1.4 Interactie tussen tarwe en *Fusarium graminearum*

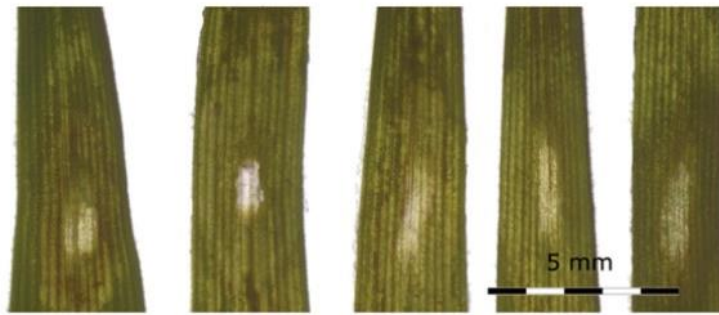
1.4.1 *Fusarium graminearum*

F. graminearum (ascomycota) is een hemibiotrofe fungus die aarfusarium (FHB) veroorzaakt in tarwe (Taheri, 2018; Walter, Nicholson, & Doohan, 2010). Vooral de aar wordt geïnfecteerd, met als symptoom het vroegtijdig verbleken van de aar, maar *F. graminearum* kan ook de bladeren infecteren (Figuur 8 en Figuur 9; Ameje et al., 2015; Walter et al., 2010). Granen van tarweplanten geïnfecteerd met *F. graminearum* hebben een laag gewicht, zijn gerimpeld en kiemen slecht (Taheri, 2018). Ze kunnen bedekt zijn met mycelium en een witte tot roze kleur hebben (Figuroa et al., 2018; Taheri, 2018). Niet alleen de kleur en het gewicht wijken af, ze zijn ook gecontamineerd met mycotoxinen, geproduceerd door *F. graminearum* (Taheri, 2018). Aarfusarium komt vooral voor in regio's die tijdens de bloei van de tarwe een hoge luchtvochtigheid kennen (Ding et al., 2011). Indien het regent net voor of tijdens anthesis, de periode waarin de bloem volledig open is, zijn de tarweplanten extra gevoelig voor aarfusarium (Figuroa et al., 2018).



Figuur 8: Foto's van aarfusarium in het veld. (A) Vroege symptomen: het verbleken van de aar. (B) Verder gevorderde symptomen: de aar is bijna volledig verbleekt. Foto's van Figuroa et al., 2018.

De levenscyclus bestaat uit een saprofytische en een pathogene fase (Walter et al., 2010). Gedurende de saprofytische fase overleeft *F. graminearum*, in afwezigheid van een levende gastheer, op dood organisch materiaal (Audenaert et al., 2013). *F. graminearum* produceert zowel macroconidia voor asexuele reproductie die via regen verspreid worden als wind-verspreide ascosporen voor seksuele reproductie (Audenaert et al., 2013; Walter et al., 2010). *F. graminearum* overwintert op gewasresten of in de bodem, dit kan zowel in de vorm van macroconidia als mycelium (Kazan et al., 2012; Leplat, Friberg, Abid, & Steinberg, 2013). Het mycelium zal na de winter macroconidia en ascosporen produceren die het primaire inoculum vormen (Leplat et al., 2013). Nadat macroconidia of ascosporen landen en kiemen op een tarweplant, start de pathogene fase. Deze fase kan verder ingedeeld worden in een biotrofe en een necrotrofe fase. Ongeveer zes uur na inoculatie start de biotrofe fase, die na 24 tot 72 uur overgaat in de necrotrofe fase (Taheri, 2018). Het volledig koloniseren en verbleken van de aren duurt 10 tot 14 dagen (Figuroa et al., 2018).



Figuur 9: Tarwebladeren geïnfecteerd met *F. graminearum*. Foto uit Ameye et al., 2015.

Gedurende de symptomloze biotrofe fase groeit *F. graminearum* voornamelijk intercellulair, maar in necrotrofe fase gaat de fungus over op een invasieve intracellulaire levensstijl (Audenaert et al., 2013; Figueroa et al., 2018). De productie van mycotoxinen start in de necrotrofe fase (Audenaert et al., 2013). Deoxynivalenol (DON) is het meest voorkomende mycotoxine, maar niet het meest toxische (Audenaert et al., 2013; Taheri, 2018). Wanneer mens of dier granen gecontamineerd met DON consumeren, treden symptomen op gaande van diarree, braken en gastro-intestinale ontstekingen tot necrose van het darmkanaal, beenmerg en lymfeweefsels (Audenaert et al., 2013). DON heeft echter toxische effecten op alle eukaryotische cellen, dus ook plantencellen. DON inhibeert namelijk belangrijke processen zoals de synthese van eiwitten, DNA en RNA, evenals het functioneren van de mitochondriën (Audenaert et al., 2013; Kazan et al., 2012; Taheri, 2018). Daarnaast induceert DON apoptose en beïnvloedt het de celdeling en de membraanintegriteit (Audenaert et al., 2013).

1.4.2 Interactie tussen *F. graminearum* en tarwe

F. graminearum kan zowel langs natuurlijke openingen zoals stomata als direct doorheen de cuticula en de celwand binnendringen in de plant (Ding et al., 2011; Walter et al., 2010). De directe route wordt waarschijnlijk gefaciliteerd door het grote arsenaal aan hydrolyserende enzymen die *F. graminearum* uitscheidt, al dan niet aangevuld met lipasen die de lange keten vetzuren in de cuticula degraderen (Taheri, 2018; Walter et al., 2010). Nadat *F. graminearum* doorheen de cuticula gedrongen is, groeien de hyfen intercellulair (Walter et al., 2010). Om de verdere verspreiding van o.a. *F. graminearum* te voorkomen gedurende de biotrofe fase, investeert tarwe in drie hindernissen. De pectinerijke middenlamella en de celwand vormen de grootste barrières voor de schimmel. Een tweede 'barrière' bestaat uit de chitinases en glucanases (Ding et al., 2011; Walter et al., 2010). Om de aanwezigheid van schimmels te detecteren produceren planten chitinases en glucanases die inwerken op fungale celwanden en PAMP's, zoals chitine en glukaan, genereren (Walter et al., 2010). Met andere woorden, de fungus kan opgemerkt worden zodra de spore landt en kiemt. Een interessante waarneming in deze context is dat de expressie van de chitinase en glucanase enzymen toeneemt in de granen en aren eenmaal *F. graminearum* gedetecteerd wordt via de PAMP's (Walter et al., 2010). Echter, in respons op de afbraak van zijn celwand door de chitinases en glucanases, maakt *F. graminearum* chitine synthases aan om de celwand te herstellen (Walter et al., 2010). Ten derde worden ook signaal-moleculen ingezet. Bij de afbraak van de cuticula door de fungus bijvoorbeeld, komen onder andere JA vrij, waardoor de defensieresponsen geactiveerd worden (Walter et al., 2010).

Zodra de aanwezigheid van *F. graminearum* wordt opgemerkt, volgen er drie reacties. Ten eerste zal tarwe enzyminhibitoren aanmaken. Deze inhiberen onder andere de pectine-afbrekende polygalacturonases en de hemicellulose-afbrekende xylanase enzymen van de fungus (Ding et al., 2011; Leplat et al., 2013; Walter et al., 2010). Ten tweede start de ROS productie en als laatste zullen ook de celwanden verstevigd worden, via bijvoorbeeld lignificatie (Ding et al., 2011; Taheri, 2018; Walter et al., 2010). In cultivars gevoelig voor *F. graminearum* treedt bijvoorbeeld minder lignificatie op dan in

gedeeltelijk resistente cultivars (Taheri, 2018). Lignificaties is een effectieve respons omdat dikkere celwanden zowel de influx van toxines van *F. graminearum* als de uitstroom van nutriënten verminderen (Walter et al., 2010).

De necrotrofe fase start wanneer *F. graminearum* de plantencellen begint binnen te dringen op 24 tot 72 uren na de inoculatie (Taheri, 2018). Daarvoor zal *F. graminearum* enerzijds met pectinases, hemi-cellulases en cellulases de plantencelwanden afbreken en anderzijds het celmembraan desintegreeren m.b.v. lipases, waarbij eveneens JA vrijkomt (Taheri, 2018; Walter et al., 2010). Tegelijk verhoogt ook de productie van mycotoxines.

Er werd aangenomen dat DON geen rol speelde tijdens de biotrofe fase waarbij *F. graminearum* zich voornamelijk intercellulair doorheen de apoplast verspreidt. In 2013 werd echter aangetoond dat zeer lage DON-concentraties de geprogrammeerde celdood inhibeert, waardoor de gastplant zijn verdediging tegen biotrofe pathogenen verliest (Audenaert et al., 2013). In de verdediging tegen (hemi)biotrofe fungi, zal tarwe ROS produceren met als doel de fungale kolonisatie te stoppen (Ameye et al., 2015). Accumulatie van ROS heeft namelijk een geprogrammeerde celdood tot gevolg, wat een effectieve verdediging is tegen biotrofe pathogenen (Ameye et al., 2015; Glazebrook, 2005). Echter, in geval van *F. graminearum* heeft de accumulatie van ROS in de biotrofe fase geen PCD tot gevolg omdat DON interfereert met deze PCD. De gastplant kan zijn cellen dus niet preventief afdoden en verliest daardoor de mogelijkheid om *F. graminearum* reeds in de biotrofe fase tegen te houden (Audenaert et al., 2013).

Daarnaast is de accumulatie van ROS, en meer specifiek van H₂O₂, door de gastplant een signaal voor *F. graminearum* om de necrotrofe fase aan te vangen en meer DON te beginnen produceren (Ameye et al., 2015). In deze context is het interessant om te weten dat DON omgekeerd ook een trigger is voor H₂O₂ productie (Audenaert et al., 2013; Taheri, 2018). Dit doet een positieve feedback loop starten waarbij de DON en H₂O₂ concentraties steeds stijgen (Ameye et al., 2015). De initiële H₂O₂-productie van de gastplant doet de DON productie door *F. graminearum* stijgen, waarop de plant reageert door H₂O₂ nog meer te laten toenemen etc. De accumulatie van H₂O₂ en DON zorgen er elk voor dat de plantencellen in de necrotrofe fase wel afsterven. Dit laat *F. graminearum* toe om via proteases, lipases en enzymen die koolhydraten te hydrolyseren en zo aan nutriënten te komen (Walter et al., 2010). Wanneer de H₂O₂-gemedieerde responsen van de gastplant uiteindelijk toch op gang komen, is het te laat om *F. graminearum* te stoppen (Audenaert et al., 2013).

Als verdediging tegen necrotrofen proberen planten de oxidatieve stress te reduceren. Waterstofperoxide kan bijvoorbeeld enzymatisch worden omgezet via catalase of ascorbaat-peroxidase en superoxide (O₂⁻) kan via superoxide dismutases verwijderd worden (Taheri, 2018; Walter et al., 2010). Walter et al. (2010) vermelden dat er reeds een correlatie werd waargenomen tussen FHB-resistentie en accumulatie van catalase of ascorbaat-peroxidase.

De rol van DON als virulentiefactor tijdens de pathogene fase wordt nog meer duidelijk als gekeken wordt naar zijn effecten op het stikstofmetabolisme van tarwe. Bij een infectie met *F. graminearum* lijkt het erop dat de GS/GOGAT-cyclus afgebogen wordt in de richting van arginine en van daaruit naar ornitine. Dit resulteert in de vorming van polyamines die, via polyamine-oxidases en stikstofmonoxide (NO), leiden tot de productie van ROS (Audenaert et al., 2013). Die ROS stimuleren op hun beurt de necrotrofe fase van *F. graminearum*.

Er bestaan tarwecultivars met resistentie tegen aarfusarium, hoewel tot nog toe geen volledige resistentie werd waargenomen (Jansen et al., 2005; Taheri, 2018). Resistentie tegen aarfusarium kan op verschillende wijzen bekomen worden. Sommige tarwe-cultivars zijn bijvoorbeeld in staat DON om te zetten in het minder toxische DON-3-glucoside (Walter et al., 2010). In *A. thaliana* is waarschijnlijk

het UDP-glucosyltransferase-enzym hiervoor verantwoordelijk en in 2008 werden twee homologen van dit enzym geïdentificeerd in tarwe. Bovendien bleek dat een van deze twee homologen geïnduceerd werd bij *F. graminearum*-infecties (Kazan et al., 2012; Walter et al., 2010). Naast DON-afbraak kan bijvoorbeeld ook de verspreiding van de infectie doorheen de aar te voorkomen worden en hebben verschillende plant-kenmerken een invloed op de resistentie (Taheri, 2018; Walter et al., 2010). De planthoogte, de timing en duur van bloeien, de dichtheid van de graankorrels en het wasachtige oppervlak van de aar hebben allen een invloed (Walter et al., 2010).

JA lijkt een rol te spelen in de *F. graminearum*-tarwe interactie maar de exacte rol van SA, JA en ET en hun gecoördineerde regulatie is echter nog niet opgehelderd (Ding et al., 2011). Ding et al. (2011) mat in een gevoelige en een partieel resistente tarwecultivar de concentraties aan SA en JA. In de resistente cultivar volgde na een vroege piek in SA-concentraties een piek in JA. In de FHB-gevoelige cultivar kwam de SA-piek daarentegen veel later en kwamen genen geassocieerd met JA-signalering zwakker tot expressie. Op basis van deze resultaten postuleerden Ding et al. (2011) dat een vroege activatie van de SA-pathway cruciaal is voor de resistentie tegen *F. graminearum*. In de studie van Ameye et al. (2015) werden gelijkaardige resultaten gerapporteerd. Wat ET-signalering betreft merkt Kazan et al. (2012) in een review op dat *F. graminearum* deze signalering lijkt uit te buiten. Transgene tarweplanten waarin de ET-pathway niet langer kon doorgaan, waren namelijk meer resistent tegen *F. graminearum*.

2 Probleem- en doelstelling

De afgelopen jaren vond veel onderzoek naar *Z. tritici* plaats. Desondanks is de interactie met tarwe nog steeds slecht begrepen en er zijn nog veel hiaten in de kennis. Hoewel het pathosysteem tarwe-*F. graminearum* beter is begrepen, is voor beide pathogenen niet geweten of de tarweplanten hun stikstofmetabolisme inzetten in hun defensieresponsen. In deze thesis wordt nagegaan of de planten al dan niet hun stikstofmetabolisme aanwenden en of ze dit metabolisme op een andere manier inzetten naargelang de trofische fase van de ziekten. Voor *Z. tritici* wordt daarnaast ook gecontroleerd of het verloop van de infectie gevolgd kan worden a.d.h.v. enkele spectrale parameters.

Hiervoor zal enerzijds gedurende de infectie het effect van biotische stress in beeld gebracht worden op de chlorofyl-fluorescentie, anthocyaan reflectie en het chlorofylgehalte van de tarweplanten m.b.v. een multispectraal camera. Dit laat toe om de aanwezige hoeveelheid in stikstof in de planten te bepalen, zodat de hypothese omtrent stikstofremobilisatie getest kan worden. Anderzijds zal de expressie van de genen *GS1*, *GS2*, *GSr* en *GSe*, betrokken bij stikstofremobilisatie, zowel temporeel als spatiaal opgevolgd worden. Door de spectrale en de expressie-data te combineren, zal worden nagegaan of er een correlatie bestaat tussen de genexpressie van de glutaminesynthetase-genen en de chlorofylindex. De correlatie zou een aanwijzing vormen dat stikstofremobilisatie optreedt in tarwe gedurende infecties met *Z. tritici* of *F. graminearum*.

Onderzoeksvragen

1. Worden de verschillende GS-isovormen op- of neer gereguleerd tijdens infectie met *Z. tritici* en *F. graminearum*?
2. Indien er verandering is in de genexpressie, zijn deze veranderingen dan temporeel of spatiaal?
3. Bestaat er een correlatie tussen de expressie van de GS-isovormen en de chlorofylindex?
4. Is deze correlatie verschillend voor de latente/biotrofe en necrotrofe fase?

Hypothese

Tarweplanten zullen in de biotrofe fase van een hemibiotrofe infectie met *Z. tritici* of *F. graminearum* glutaminesynthetase-genen *GS1*, *GSe* en *GSr* opreguleren in de buurt van de geïnfecteerde regio. In deze cellen worden aminozuren m.b.v. deze enzymen omgezet naar glutamine. De glutamine wordt afgevoerd via het floëem, om het hoofd te bieden aan een ogenschijnlijk biotrofe pathogeen. Wanneer nadien de necrotrofe fase start, wordt verwacht dat de expressie van deze genen afneemt in de geïnfecteerde regio. In niet-geïnfecteerde delen van de plant daarentegen zullen de GS-genen opgereguleerd worden, daardoor zal er stikstof naar de geïnfecteerde regio worden gevoerd om zo het weefsel in leven te houden. Door het afvoeren van glutamine in de biotrofe fase zal in die fase de totale hoeveelheid stikstof in de regio dalen, waardoor ook de chlorofylindex zal dalen. Nadien zal, in de necrotrofe fase, de hoeveelheid stikstof en dus ook de chlorofylindex stabiliseren of opnieuw stijgen.

3 Materiaal en methoden

Om het stikstofgehalte in verband te kunnen brengen met veranderingen in genexpressie van *GS1*, *GS2*, *GSr* en *GSe*, werd enerzijds RT-qPCR toegepast en anderzijds foto's gemaakt van de geïnfecteerde planten met een multispectraal camera. Deze foto's werden dagelijks genomen, waarna het gefotografeerde plantmateriaal werd verzameld voor RT-qPCR. Nadat het mRNA werd geïsoleerd uit het plantenmateriaal, werd het omgezet in cDNA. Vervolgens m.b.v. qPCR werden veranderingen in expressie van de targetgenen (*GS1*, *GS2*, *GSr* en *GSe*) in kaart gebracht. Om correlaties op te stellen werd tot slot de spectrale data gerelateerd aan de qPCR data.

3.1 Planten, pathogenen en omgevingscondities

Voor de tarwe werd de zomertarwe cultivar Tybald gezaaid in potgrond (Structural type I, Snebbout, Kaprijke, België). Er werden 10 zaden in een pot gezaaid en de planten kiemden en groeiden bij 21°C en een licht/donker cyclus van 8u donker en 16u licht.

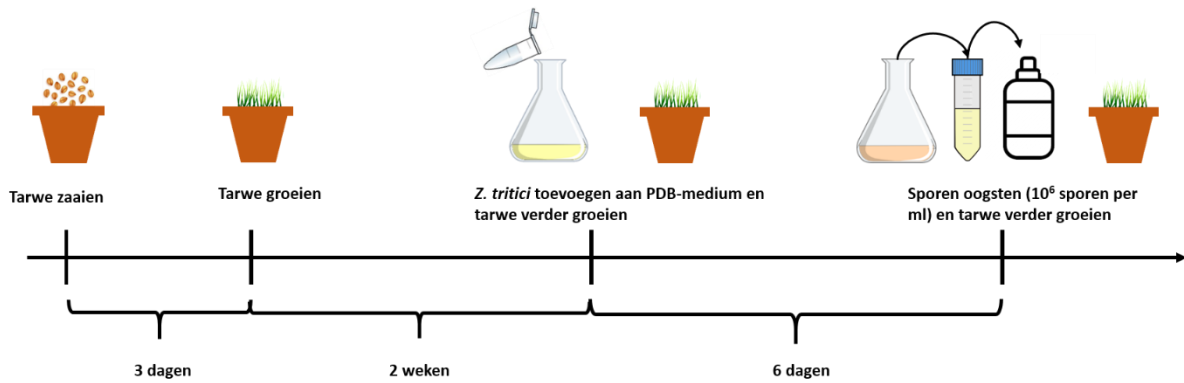
De gebruikte *Z. tritici*-stam, CBS 115943, is afkomstig van Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Nederland). Dit is dezelfde stam als de stam IPO323 waarvan het volledige genoom werd gesequeneerd en die in verscheidene studies werd gebruikt (Ben M'Barek et al., 2015; Fones et al., 2017; King et al., 2017). *Z. tritici* werd bewaard bij -80°C in een oplossing van 20%v/v glycerol en opgekweekt op potato dextrose agar (PDA) bij 18°C.

F. graminearum werd eveneens bewaard bij -80°C. Het betrof het isolaat 8/1 die in Jansen et al. (2005) gebruikt werd. Het opkweken gebeurde op PDA bij 18°C onder een regime van 12 uur donker en 12 uur UV-licht.

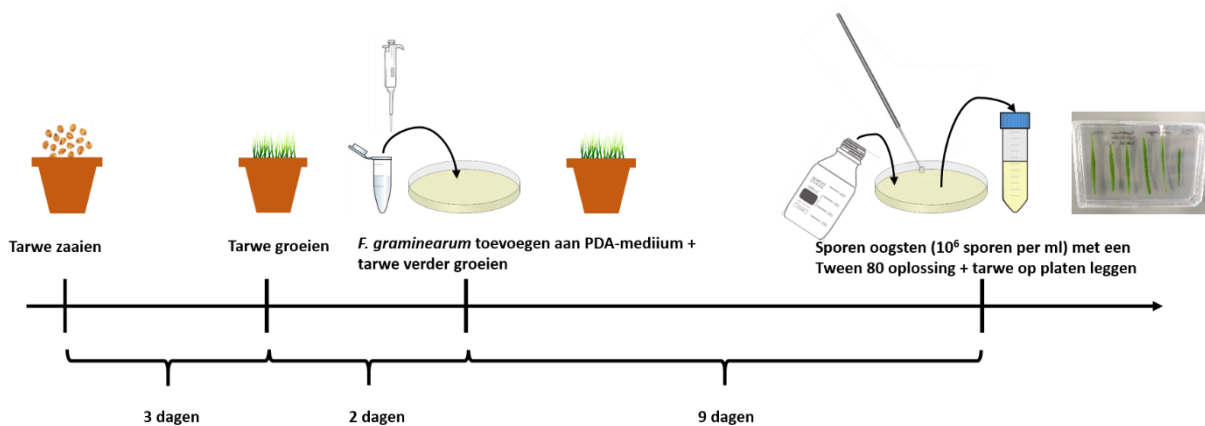
3.2 Preparatie inoculum

500 µl sporensuspensie van *Z. tritici* uit -80°C werd opgekweekt in 100ml steriele potato dextrose broth (PDB; 0,039 g ml⁻¹) met 1 µl ml⁻¹ ampicilline en 1 µl ml⁻¹ chlooramfenicol ter preventie van bacteriële contaminatie (Figuur 10). De vloeibare culturen werden op een shaker geplaatst bij 18°C en 120 rpm. Na zes dagen werd de inhoud van de erlenmeyers overgebracht in falconbuizen. Door middel van centrifugatie werd de fungale biomassa onderaan verzameld en kon het PDB-medium zonder verlies van biomassa worden weggegoten. Vervolgens werden de sporen losgemaakt door steriele 0,08% v/v Tween 80 toe te voegen en het mycelium te pletten en vortexen. Nadien werd de sporensuspensie over twee lagen steriele miracloth gegoten om grotere fungale structuren zoals hyfen te verwijderen. Tot slot werd de sporenconcentratie op 10⁶ sporen ml⁻¹ gebracht met behulp van een telkamer.

F. graminearum werd gekweekt op PDA in petriplaten. Er werd drie keer 20 µl sporensuspensie van *F. graminearum* uit -80°C gebracht op de petriplaten. Na negen dagen werden sporen van *F. graminearum* geoogst door ze los te schrapen nadat 0,08% v/v Tween 80 op de plaat was gebracht. Deze sporensuspensie werd overgebracht in een falcon en vervolgens op eveneens 10⁶ sporen ml⁻¹ gebracht.



Figuur 10: Groeien van tarweplanten en preparatie van vloeibaar inoculum van *Zyloseptoria tritici*. Terwijl de tarweplanten (cultivar Tybald) groeiden, werd een vloeibare cultuur van *Z. tritici* gestart in potato dextrose broth (PDB), met $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ ampicilline en $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ chlooramfenicol. $500 \mu\text{l}$ sporensuspensie van *Z. tritici* uit -80°C werd toegevoegd aan 100 ml PDB. De erlenmeyers werden vervolgens op een shaker gezet bij 18°C en 120 rpm . Na zes dagen incuberen werd de cultuur overgegoten in een falconbuis. Door middel van centrifugatie werd de fungale biomassa onderin verzameld. Het vloeibare medium werd weggegoten, waarna de fungale sporen werden losgemaakt d.m.v. steriele $0,08\% \text{ v/v}$ Tween 80 en de biomassa te pletten en vortexen. Grotere fungale structuren werden verwijderd door de oplossing over twee lagen steriele Mira cloth te gieten, waarna de sporencentratie op $10^6 \text{ sporen ml}^{-1}$ werd gebracht. Tot slot werd de sporensuspensie in een steriel spuitbusje overgebracht voor inoculatie van de tarweplanten.



Figuur 11: Groeien van tarweplanten en aanmaak van de sporenoposning van *F. graminearum*. Terwijl de tarweplanten (cultivar Tybald) groeiden, werd *F. graminearum* op PDA opgekweekt bij 18°C onder een regime van 12 uur UV-licht en 12 uur donker. Er werd drie keer $20 \mu\text{l}$ sporensuspensie van *F. graminearum* uit -80°C gebracht op een petriplaat. Na negen dagen werd steriel water met Tween 80 toegevoegd en de sporen losgeschrapt met een entnaald. De sporensuspensie werd verzameld in een falconbuis van 50 ml , waarna de sporencentratie werd aangepast tot $10^6 \text{ sporen ml}^{-1}$ voor inoculatie.

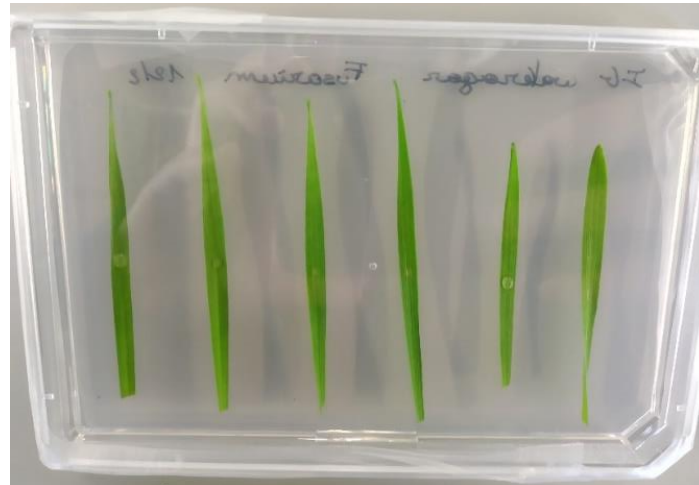
3.3 Inoculatie

3.3.1 *In planta* test – *Z. tritici*

Twintig volwassen planten die nog niet in bloei stonden werden gebruikt voor inoculatie met *Z. tritici*, waarvan het oudste blad werd geïnoculeerd. De sporensuspensie werd op de bladeren gesprayd, waarna de potten in doorzichtige plasticen zakken werden geplaatst. Controleplanten werden behandeld met steriel water. Door steriel water in de zak te sprayen werd de luchtvochtigheid verhoogd. Gedurende deze periode bleef de temperatuur hetzelfde als bij het opkweken van de planten, evenals de licht/donker cyclus. Na vier dagen werden de zakken verwijderd. De temperatuur en licht/donker cyclus bleef opnieuw hetzelfde.

3.3.2 Detached leaf assay – *F. graminearum*

Voor de experimenten met *F. graminearum* werd een detached leaf assay uitgevoerd in plaats van volledige planten te gebruiken. Hiervoor werd het oudste blad van verschillende planten afgeknipt en op petriplaten met wateragar gelegd. Op elke plaat werden 6 bladeren gelegd. De wateragar bestond uit water, agar (15 g l^{-1}) en benzimidazol (40 mg l^{-1}). Benzimidazol heeft een senescentie-vertragend en antifungaal effect waardoor *F. graminearum* en andere schimmels niet op de agar zelf kunnen groeien (Mishra & Pradhan, 1973). Vervolgens werden de bladeren in het midden met een scalpel beschadigd door een aantal cellen weg te schrapen. Ten slotte werd $5 \mu\text{l}$ van de *F. graminearum*-sporensuspensie op de verwonding gebracht (Figuur 12). De controlebehandeling bestond uit $5 \mu\text{l}$ steriel water in plaats van sporensuspensie.



Figuur 12: Opstelling detached leaf essay met *F. graminearum*. Er werden 6 bladeren op eenzelfde petriplaat met wateragar gelegd. De bladeren werden in het midden van het blad verwond door met een scalpel cellen weg te schrapen. Tot slot werd op de verwonding $5 \mu\text{l}$ van de sporensuspensie van *F. graminearum* aangebracht. Als controle werd steriel water gebruikt.

3.4 Multispectrale beeldvorming - PathoViewer

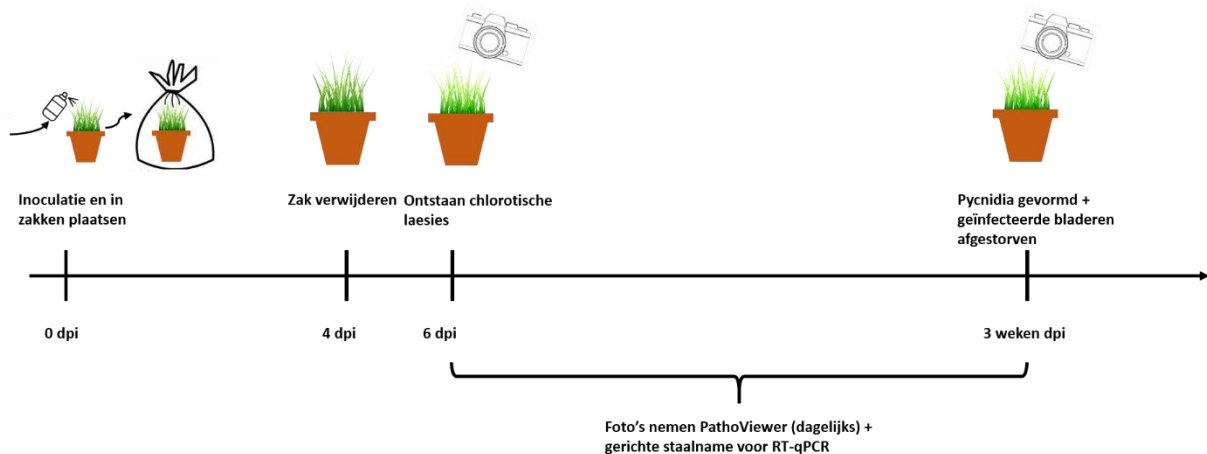
Gedurende de infecties met *Z. tritici* en *F. graminearum* werden verscheidene spectrale metingen uitgevoerd om zo enerzijds het verloop van de infecties te kunnen volgen en anderzijds om een indicatie te krijgen van het aanwezige stikstof in de bladeren. Dit werd gedaan m.b.v. multispectraal camera (PathoViewer), gemonteerd op een cartesische robot en geplaatst in geacclimatiseerde kamer. Met de PathoViewer werden verscheidene fysiologische kenmerken in real time gevolgd. Er werden twee stress-parameters gevolgd, anthocyaangehalte (mARI) en chlorofyl-fluorescentie (F_v/F_m), evenals de chlorofylindex als maat voor de hoeveelheid stikstof. Naast foto's van deze kenmerken werd tot slot ook nog het groene kanaal gefotografeerd van RGB-kleurenfoto's.

Door de beelden van de PathoViewer te analyseren m.b.v. de CropReporter software, kon de schade veroorzaakt door *Z. tritici* of *F. graminearum* bepaald worden. Hiervoor werd gebruik gemaakt van Regions Of Interest (ROI). Voor de detached leaf assays met *F. graminearum* lieten deze ROI's toe een onderscheid te maken tussen het bovenste, middelste en onderste stuk van de tarweblaadjes. Voor *Z. tritici*, waarvoor geen onderscheid werd gemaakt tussen een onderste, middelste en bovenste stuk, werd met de ROI's elk blad afzonderlijk onderzocht.

3.5 Proefopzet

3.5.1 *In planta* test – *Z. tritici*

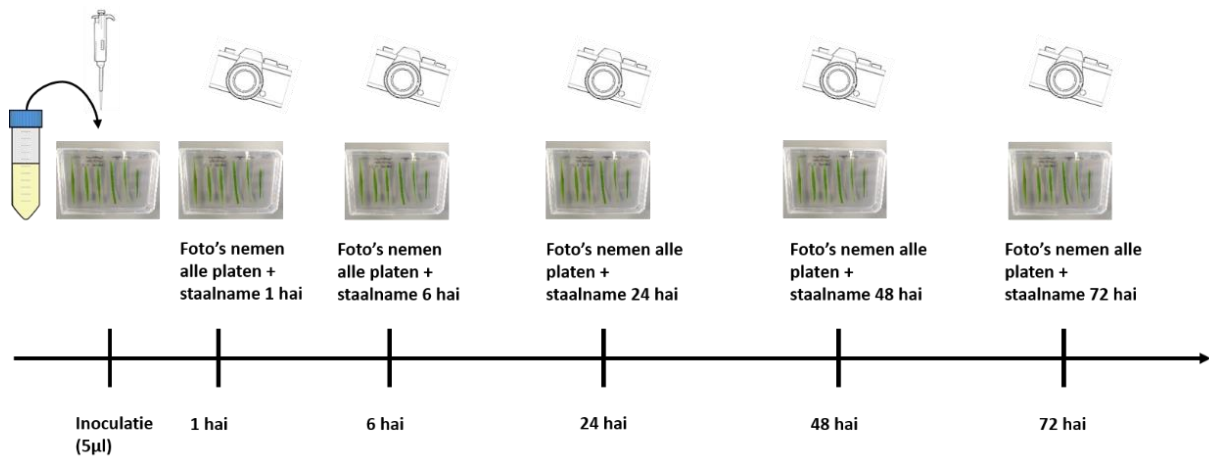
Nadat de planten uit de zakken werden gehaald, werden de planten dagelijks bekeken voor de eerste symptomen, nl. chlorotische laesies. Vervolgens werden de bladeren die symptomen vertoonden gefotografeerd met de PathoViewer om enerzijds de ontwikkeling van de laesies en de latere pycnidia-vorming op te volgen (Figuur 13). Anderzijds dienden de foto's ook om de chlorofylindex te meten en om interessante tijdstippen te bepalen in het verloop van STB, zodat op deze tijdstippen stalen genomen konden worden. Voorbeelden zijn net voor, tijdens en net na de switch naar necrotrofie. Vervolgens werd m.b.v. RT-qPCR de genexpressie van de glutaminesynthetase-genen in deze stalen nagegaan.



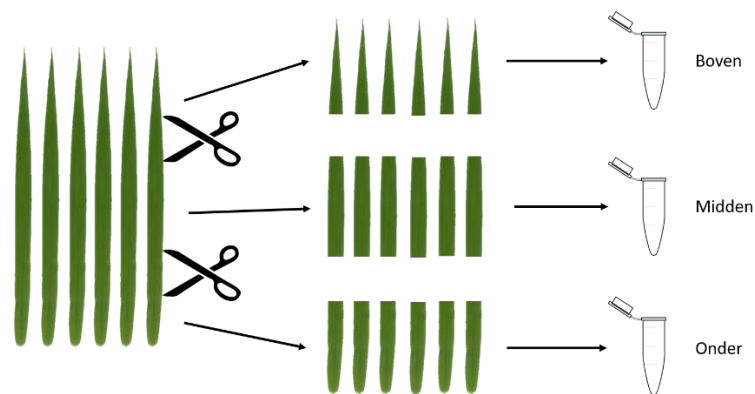
Figuur 13: Verloop experimenten met *Z. tritici*. Een sporensuspensie met 10^6 sporen ml^{-1} werd gesprayd op de oudste bladeren van de planten, waarna de planten in een doorzichtige plastic zak werden geplaatst gedurende 4 dagen. De luchtvochtigheid in de zakken werd verhoogd door steriel water in de zak te sprayen. Controleplanten werden behandeld met steriel water. Vijf dagen na inoculatie (dpi) werden chlorotische laesies waargenomen. Vanaf dan werden de bladeren met laesies gefotografeerd m.b.v. de PathoViewer.

3.5.2 Detached leaf assay – *F. graminearum*

Voor de detached leaf assay-experimenten met *F. graminearum* werd op basis van Ameye et al. (2015) en Ding et al. (2011) gekozen om foto's en stalen te nemen op 1 hai (uren na inoculatie), 6 hai, 24 hai, 48 hai en 72 hai (Figuur 14). Er werd voor dit experiment in drievoud gewerkt. Bij de staalname werden de 6 bladeren op een plaat samengenomen en in drie stukken geknipt (het bovenste, middelste en onderste stuk). Vervolgens werden de stukken in 3 afzonderlijke epjes gebracht en bevroren in vloeibare stikstof (Figuur 15). De samples werden bij $-80^{\circ}C$ bewaard tot de RNA extractie plaatsvond.



Figuur 14: Inoculatie en verloop experiment met *F. graminearum*. 1 uur na inoculatie (hai) werden eerst van alle platen foto's genomen met de PathoViewer en nadien werden stalen genomen. Op 6 hai werden van de resterende platen opnieuw foto's en stalen genomen. De procedure was analoog voor 24, 48 en 72 hai.



Figuur 15: Manier van staalname. De zes tarwebladeren per plaat werden samengenomen waarna het bovenste stuk werd afgeknijpt en in een epje werd gebracht. Hetzelfde werd gedaan voor het middelste en onderste stuk.

3.6 RNA-extractie en reverse transcription quantitative PCR

RNA werd geëxtraheerd uit het plantenmateriaal volgens het TRIzol-protocol van Thermo Fisher Scientific. Dit RNA werd vervolgens omgezet tot cDNA, gebruik makend van iScript cDNA synthesis kit van Biorad (Shetty et al., 2009). RNA dat niet gebruikt werd voor cDNA synthese werd bewaard bij -80°C . Tot slot werd qPCR uitgevoerd m.b.v. GoTaq[®] qPCR Master Mix van Promega met Bryt Green als fluorescente kleurstof. Hierbij werden actine en Ta54227 gebruikt als referentiegenen en *GS1* (chloroplastisch), *GS2* (cytosol), *GSr* en *GSe* als targetgenen (Tabel 1). Actine is een van de subunits van microfilamenten in het cytoskelet. Het Ta54227 gen is betrokken bij de celdeling en staat in voor de productie van cell division control protein (CDC; Giménez, Pistón, & Atienza, 2011).

Het thermische profiel bestond uit een initiële denaturatie bij 95°C gedurende twee minuten, gevolgd door 40 cyclussen van 95°C gedurende 15 seconden voor denaturatie en 60°C gedurende 1 minuut voor annealing en elongatie. Voor het bepalen van de smeltcurve werd gekoeld tot 60°C . Deze temperatuur werd aangehouden voor 5 seconden, waarna de temperatuur stapsgewijs ($0,5^{\circ}\text{C} / 10 \text{ sec}$) verhoogd werd tot 95°C .

Tabel 1: Gebruikte primers bij qPCR reacties: GS1: Glutaminesynthetase 1; GS2: Glutaminesynthetase 2; GSe: Glutaminesynthetase e; GSr: Glutaminesynthetase r; Actine: actine; Ta54227: Triticum aestivum CDC (cell division control protein). Actine en Ta54227 werden gebruikt als referentiegenen.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Referentie
GS1	AAGGACGGCGGGTTCAA	GCGATGTGCTCCTTGTGCTT	(Bernard et al., 2008)
GS2	GCCCTCGCTGCCAAGAA	TCGGCCTTTTCAGGTCCTT	(Bernard et al., 2008)
GSr	GAGGACAGCGAAGTCATCCTCTA	AGGTTGTCACCCCTCTGAA	(Bernard et al., 2008)
GSe	CTGTGACTGCTATGCGCCTAAC	CCGCGTTGTACCGCTTGT	(Bernard et al., 2008)
Actine	CGAAACCTTCAGTTGCCAGCAAT	ACCATCACCAGAGTCGAGCACAAT	(Meuninck, 2019)
Ta54227	CAAATACGCCATCAGGGAGAATC	CGCTGCCGAAACCACGAGAC	(Meuninck, 2019)

3.7 Data analyse

De data van de RT-qPCR werd geanalyseerd met qbase+ software (Biogazelle) en Biorad CFX Maestro software. De foto's van de PathoViewer werden geanalyseerd met behulp van de CropReporter software (Data Analysis V5.4.6, Phenovation, Wageningen, Netherlands). Alle statistische testen op de data werden uitgevoerd met behulp van SPSS 26 (IBM), alle grafieken werden gemaakt met behulp van Excel 2013 (Microsoft).

4 Resultaten

4.1 *In planta* test – *Z. tritici*

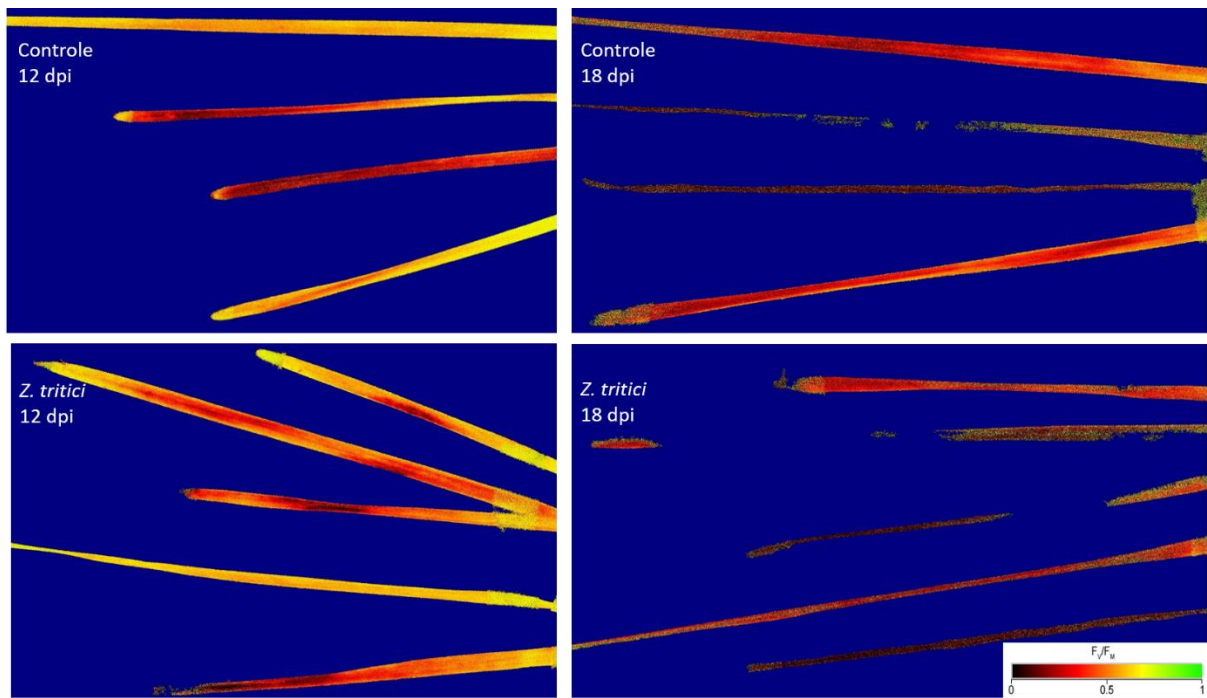
Bij de eerste twee infectie-testen met *Z. tritici* toonden de geïnoculeerde bladeren chlorotische laesies binnen de periode die in de literatuur beschreven staat. Nadien vergeelden de geïnoculeerde bladeren en stierven ze af zoals verwacht, maar er ontstonden bij geen van de twee testen pycnidia. Omdat bij deze testen er geen controlebehandeling was om mee te vergelijken, werd getracht *Z. tritici* terug te isoleren vanaf de bladeren met laesies. Dit leverde enkel bacteriële kolonies op. Zonder pycnidia was het dus niet mogelijk om vast te stellen of de vergeling veroorzaakt werd door *Z. tritici*. Bijgevolg konden geen interessante tijdstippen bepaald worden voor staalname.

In de derde en laatste test werden reeds vroeg (6 dpi) na de inoculatie chlorotische laesies opgemerkt, zowel bij de controlebladeren als de geïnoculeerde bladeren. Dit is vroeger dan de 9 tot 14 dpi die meestal beschreven worden, maar Marshall et al. (2011), Figueroa et al. (2018) en Rudd (2015) vermelden respectievelijk de periodes 7, 7 tot 11 en 7 tot 14 dpi. De omgevingscondities kunnen een invloed hebben gehad op de snelheid waarmee de laesies gevormd werden. Zowel bij de controlebladeren als de geïnoculeerde bladeren groeiden de laesies uit tot een vergeling van het hele blad en uiteindelijk stierven de bladeren af. Gedurende deze periode zou *Z. tritici* pycnidia moeten vormen die zichtbaar zijn als zwarte puntjes binnenin de laesies, maar dit gebeurde niet.

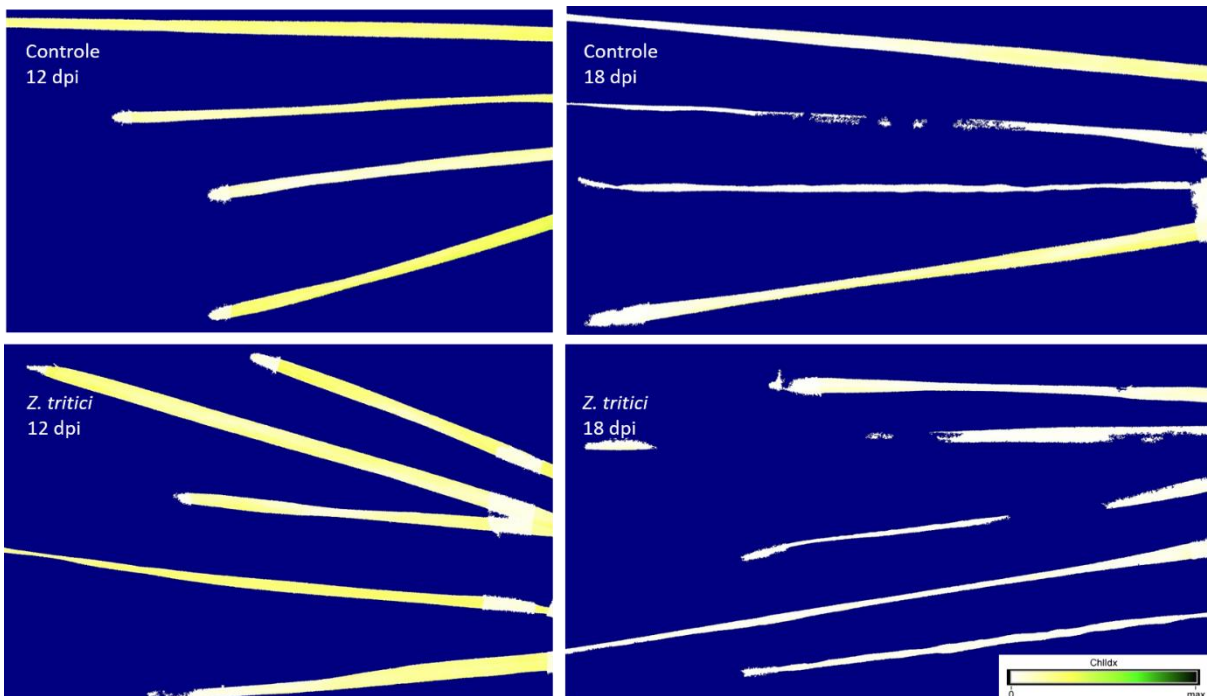
Er werd vermoed dat de infectie mislukt was omdat er visueel niet veel verschil was tussen de controle en de geïnfecteerde planten (Figuur 16 en Figuur 17). Door de gemiddelden van de gevolgde parameters uit te zetten in functie van de tijd (Figuur 18), konden eventuele verschillen visueel worden voorgesteld. In Figuur 18 is te zien dat de verschillen klein zijn. Bovendien stijgen en dalen de gevolgde parameters (F_V/F_M , Green, chlorofylindex en mARI) voor de controle en de geïnfecteerde planten volgens hetzelfde patroon, wat eveneens wijst naar geen wezenlijk verschil tussen de met *Z. tritici* geïnoculeerde planten en de controle. De kleine verschillen die te zien zijn, kunnen verklaard worden door bijvoorbeeld verschillen tussen planten, het gaat namelijk over verschillende individuele planten.

Om het vermoeden verder te verifiëren met beeldanalyse werden tussen 12 en 18 dpi foto's genomen met de PathoViewer (F_V/F_M , Green, chlorofylindex en mARI). Op basis van een two sample T-test (significantieniveau 0,05) kon worden besloten dat de geïnoculeerde planten en de controleplanten geen significant verschil vertoonden, voor geen enkele parameter of tijdstip. Er was echter een uitzondering, nl. op 18 dpi verschillen de geïnfecteerde en controle wel voor de parameter Green (Figuur 18B). Dit gebrek aan verschillen tussen behandeling en controle, bevestigt het vermoeden dat de inoculatie niet geslaagd was.

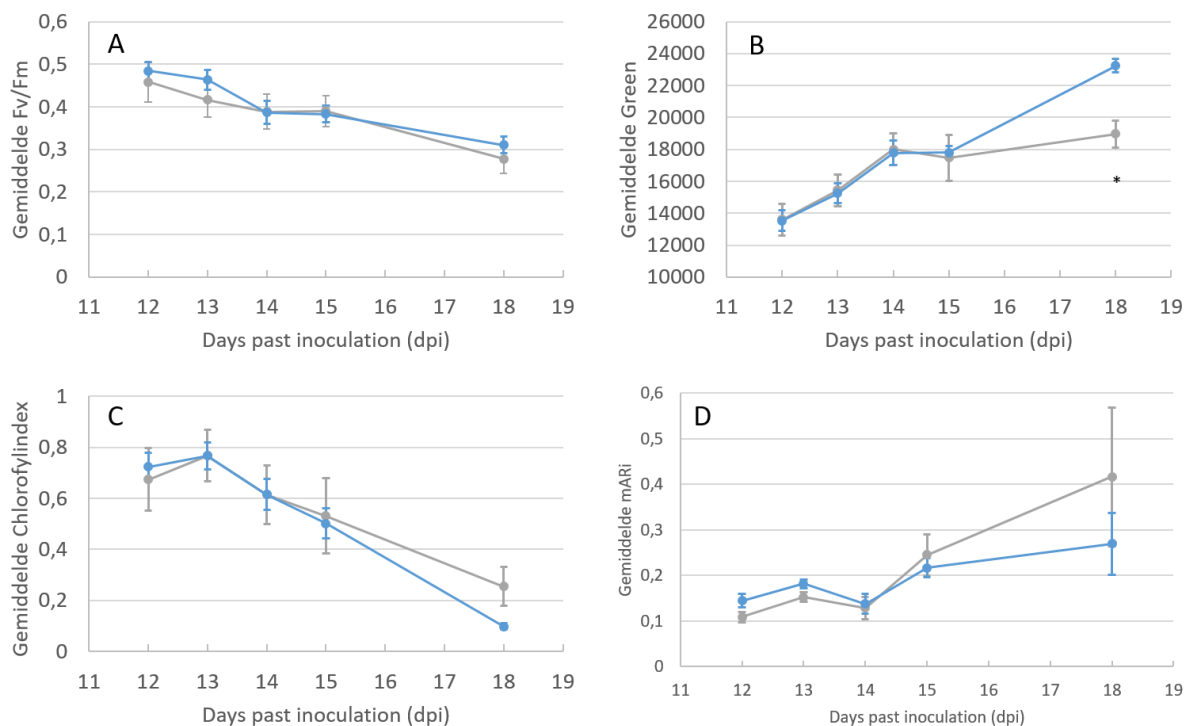
Zowel de mARI als de F_V/F_M vormen een indicatie voor de hoeveelheid stress die de gemeten plantenweefsels ondervinden. Een hogere mate van stress is zichtbaar als een lagere F_V/F_M en als een hogere mARI. Voor zowel de geïnfecteerde planten als de controle daalde de F_V/F_M en steeg de mARI, wat erop wees dat de planten in beide gevallen steeds meer stress ondervonden. De chlorofylindex daalde eveneens, wat erop wees dat er steeds minder chlorofyl aanwezig was. De groene kleur van planten is afkomstig van het chlorofyl. Omdat het chlorofylgehalte daalt, zullen de bladeren steeds minder groen zijn. Dit was effectief zichtbaar als het vergelen van de bladeren. Omdat de bladeren steeds minder groen werden, werd verwacht dat Green eveneens zou dalen, maar dit was niet het geval. Het stijgende patroon van Green zou eventueel verklaard kunnen worden doordat gele kleuren in het RGB kleurensysteem ook hoge waarden hebben voor Green. Er is echter geen informatie beschikbaar omtrent de spectrumbreedte van de groene filters in de PathoViewer, waardoor deze verklaring niet bevestigd kon worden.



Figuur 16: F_v/F_m bij planten geïnfecteerd met *Z. tritici* en de controle op 12 en 18 dpi. Een lichtere kleur wijst op een hogere F_v/F_m en dus op gezonder weefsel. Zowel de geïnfecteerde bladeren als de controleplanten vertonen op 12 dpi donkere vlekken. Bladeren bij beide behandelingen zijn bijna volledig rood gekleurd op 18 dpi.



Figuur 17: Chlorofylindex (ChlIdx) bij planten geïnfecteerd met *Z. tritici* en de controle op 12 en 18 dpi. Een lichtere kleur wijst op een lagere chlorofylindex en dus op minder chlorofyl aanwezig. Zowel de geïnfecteerde bladeren als de controleplanten vertonen op 12 dpi vlekken. Bladeren bij beide behandelingen zijn bijna volledig wit gekleurd op 18 dpi.



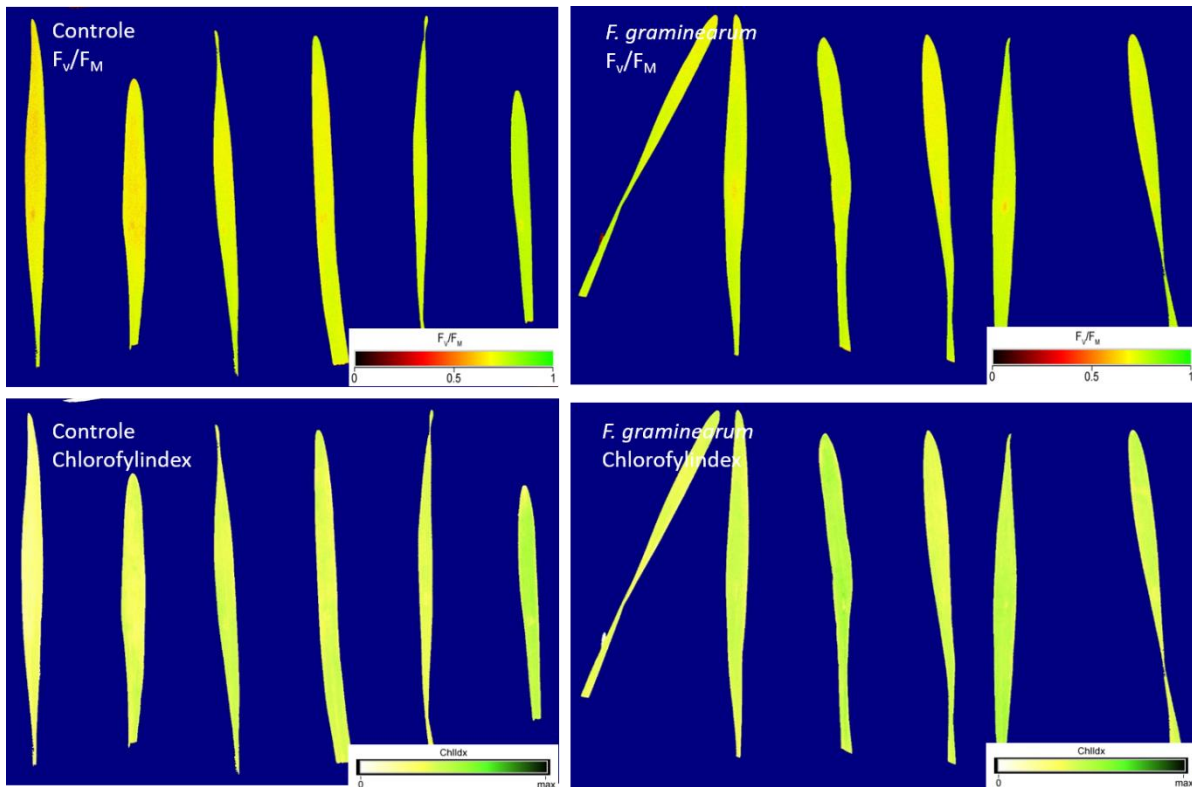
Figuur 18: Evolutie van de gemiddelden van F_v/F_m (A), Green (B), chlorofylindex (C) en mARI (D) doorheen de tijd. Blauw: geïnoculeerd met *Z. tritici*, grijs: controle. De foutenbalken geven de standaardfout aan. Significante verschillen tussen de controle en de behandelde bladeren worden aangegeven met een asterisk. Significantie werd bepaald met een two sample T-test op een significantieniveau van 0,05. Op 14, 15 en 18 dpi werd voor de mARI een Mann-Whitney U test uitgevoerd omdat de normaliteitsvoorwaarde niet voldaan was. Voor F_v/F_m op 12 dpi en ook voor de chlorofylindex op 12, 15 en 18 dpi werd de Welsh test uitgevoerd, omdat de homoscedasticiteitsvoorwaarde niet voldaan was.

4.2 Detached leaf assay – *F. graminearum*

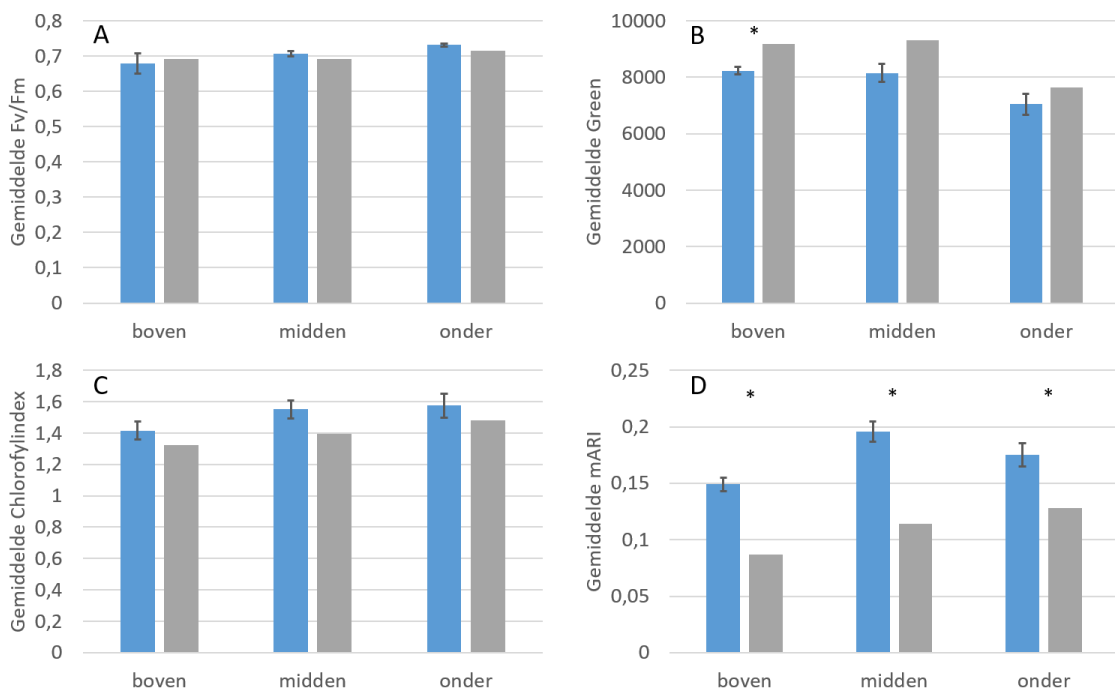
De resultaten die besproken zullen worden zijn afkomstig van een kleinschalig testexperiment. Deze test diende om te controleren of een groter experiment met de benodigde stalen en controles haalbaar zou zijn. Echter, de uitvoering van dit grotere experiment was niet mogelijk omwille van de Corona-Covid19-crisis. Om deze reden worden de resultaten van het test-experiment behandeld als een case-study.

Voor de test werd gebruik gemaakt van vier petriplaten met elk zes tarweblaadjes. Drie platen werden behandeld met *F. graminearum* en de vierde plaat diende als controle. De inoculatie en de manier waarop de stalen werden genomen was zoals beschreven. Stalen werden genomen volgens Figuur 15. Er werden enkel op 48 hai foto's en stalen genomen (Figuur 19). Hierdoor was het niet mogelijk om veranderingen in genexpressie doorheen de tijd op te volgen en verviel dus het temporele aspect. Op de stalen werd RT-qPCR uitgevoerd zoals beschreven.

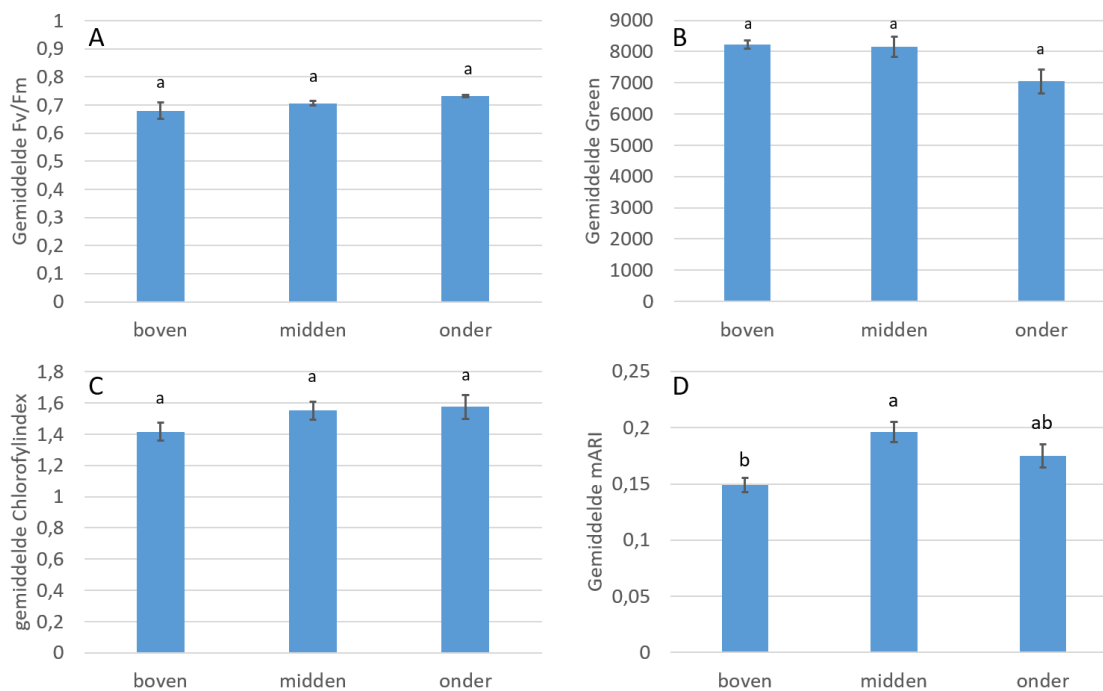
Met een one sample T-test werd nagegaan of de stukken (boven, midden en onder) verschillen van de controlebehandeling voor de gevolgde parameters. De geïnoculeerde bladeren verschilden voor geen enkele spectrale parameter van de controle, met uitzondering van mARI en Green-boven (Figuur 20). Wat de mARI betreft is het opvallend dat deze niet in overeenstemming is met F_v/F_m , ook een stressparameter. Omdat er bij F_v/F_m bijna geen verschillen zijn met de controle, lijkt het erop dat de bladeren niet veel stress ondervinden. De mARI daarentegen verschilt wel van de controle, wat laat vermoeden dat er toch iets aan de hand is.



Figuur 19: F_v/F_M en chlorofylindex (Chlldx) voor zowel de met *F. graminearum* geïnfecteerde planten als de controle. Voor de foto's van *F. graminearum* is slechts 1 van de drie biologische replicaten weergegeven.



Figuur 20: Verschil tussen de controlebladeren en de geïnoculeerde bladeren. Blauw: geïnoculeerd met *F. graminearum*, grijs: controle. Blauwe balken stellen drie biologische replicaten voor die elk bestaan uit zes bladeren, grijze balken stellen één biologisch replicaat voor bestaande uit zes bladeren. Met een one sample T-test (significantieniveau 0,05) werd nagegaan of de gemiddelde F_v/F_M (A), Green (B), chlorofylindex (C) en mARI (D) verschilden van de controlebladeren. Significante verschillen tussen de controle en de geïnoculeerde bladeren worden aangegeven met een asterisk. Voor F_v/F_M -boven en Chlorofylindex-midden was de normaliteitsvoorwaarde niet voldaan en werd een Wilcoxon signed rank test uitgevoerd. De foutenbalken geven de standaardfout aan. Voor de controlebehandeling kon geen standaardfout bepaald worden omdat er slechts één biologisch replicaat was.




Figuur 21: Verschillen tussen het bovenste, middelste en onderste stuk. Balken stellen drie biologische replicaten voor die elk bestaan uit zes bladeren. De foutenbalken geven de standaardfout aan. Met behulp van een one way ANOVA (significantië-niveau 0,05) werd nagegaan of de gemiddelde F_v/F_m (A), Green (B), chlorofylindex (C) en mARI (D) onderling verschillen tussen boven, midden en onder. Balken aangeduid met verschillende letters stellen significante verschillen voor. Voor zowel F_v/F_m als chlorofylindex was de normaliteitsvoorwaarde niet voldaan, waarvoor een Kruskal-Wallis test werd gebruikt als alternatief.

Naast de verschillen met de controle, werd met one way ANOVA ook gekeken of er significante verschillen zijn tussen de verschillende stukken onderling (Figuur 21). Er werden geen significante verschillen voor F_v/F_m , Green of chlorofylindex gevonden. mARI vormt opnieuw de enige uitzondering waarbij het bovenste en middelste stuk van het blad significant verschillen van elkaar.

De significantie van de verandering in genexpressie voor *GS1*, *GS2*, *GSe* en *GSr* ten opzichte van de controlebehandeling, werd nagegaan met een one sample T-test (significantië-niveau 0,05). Voor *GS1* (cytosol) werd een neerregulatie waargenomen in alle drie de stukken ten opzichte van de controlebehandeling (Tabel 2). De neerregulatie was minder groot in het onderste stuk dan in het bovenste en middelste stuk en is bovendien niet significant. *GS2* (chloroplasten) werd daarentegen als enige opgereguleerd in alle drie de stukken, maar geen enkele van deze veranderingen was significant.

GSr kende een neerregulatie in alle drie de stukken die min of meer gelijk loopt met die van *GS1*, hoewel enkel in het bovenste stuk de verandering in genexpressie significant was (Tabel 2). De gelijkenis kan eventueel verklaard worden doordat *GS1* en *GSr* beide verondersteld worden een rol te spelen in het transport en distributie van ammonium doorheen de plant. De meest drastische veranderingen traden op in *GSe*. De opregulatie ervan is groot in het onderste stuk, maar niet significant. Een fout bij de qPCR kan liggen aan de basis van de grote veranderingen in *GSe* in het onderste stuk.

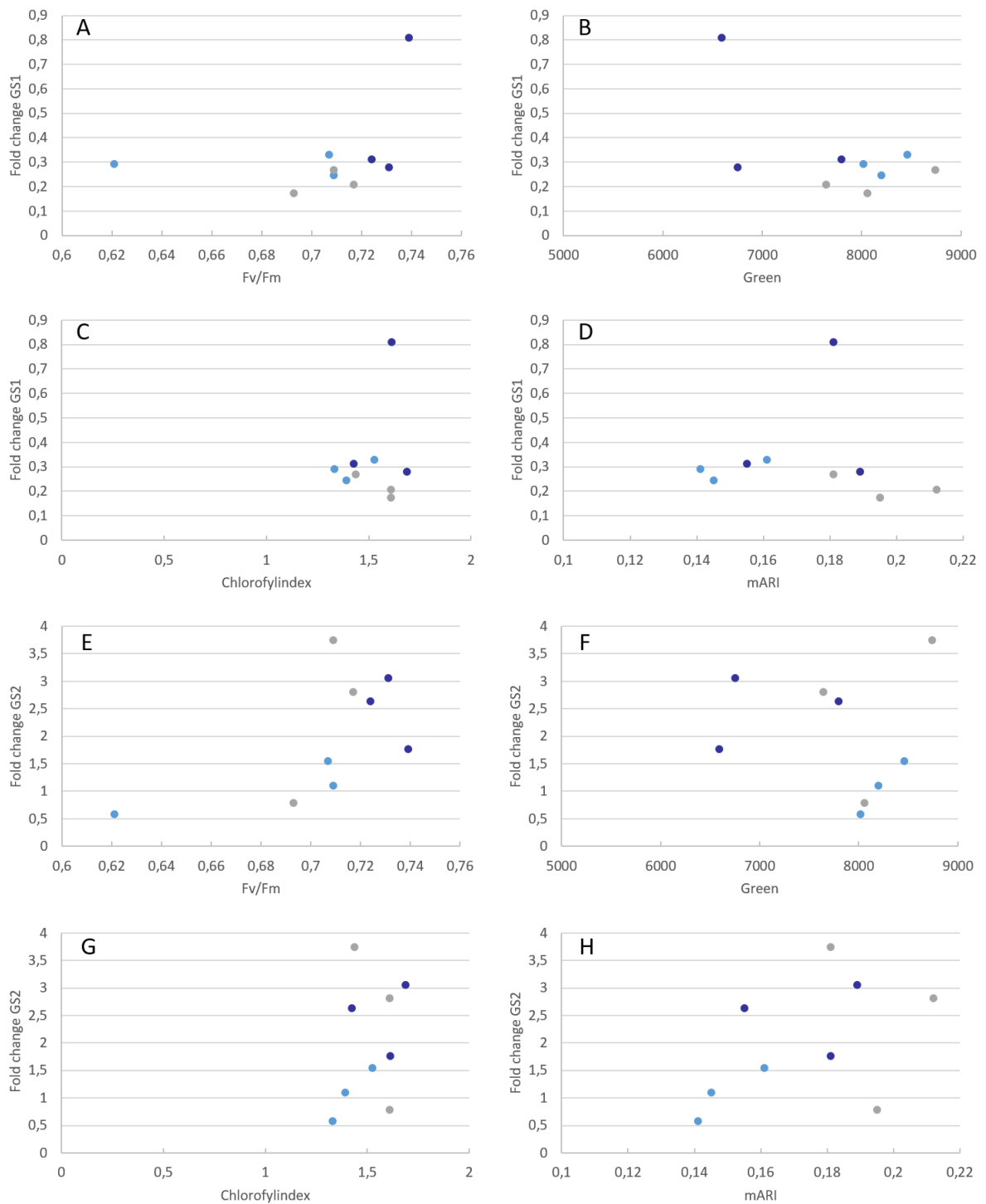
Tabel 2: De relatieve verandering in genexpressie t.o.v. de controle (foldchange) van GS1, GS2, GSe en GSr weergegeven per stuk van het blad ten opzichte van de controlebehandeling. De standaarddeviatie staat tussen haakjes. Significante verandering in expressie ten opzichte van de controle wordt aangegeven met een asterisk. Significante verschillen ten opzicht van 1 werden bepaald met een one sample T-test op een significantieniveau van 0,05. Voor GSe-midden, GSr-midden en GSr-onder werd een Wilcoxon signed rank test uitgevoerd omdat niet voldaan was aan de normaliteitsvoorwaarde. Een waarde kleiner dan 1 komt overeen met een neerregulatie van het gen in kwestie en een waarde groter dan 1 stelt een opregulatie voor.

	Locatie	GS1	GS2	GSe	GSr
	Boven	0,289 (0,042)*	1,078 (0,481)	0,224 (0,043)*	0,280 (0,125)*
	Midden	0,216 (0,049)*	2,444 (1,513)	0,143 (0,087)	0,138 (0,042)
	Onder	0,467 (0,297)	2,486 (0,660)	3,265 (4,622)	0,649 (0,689)

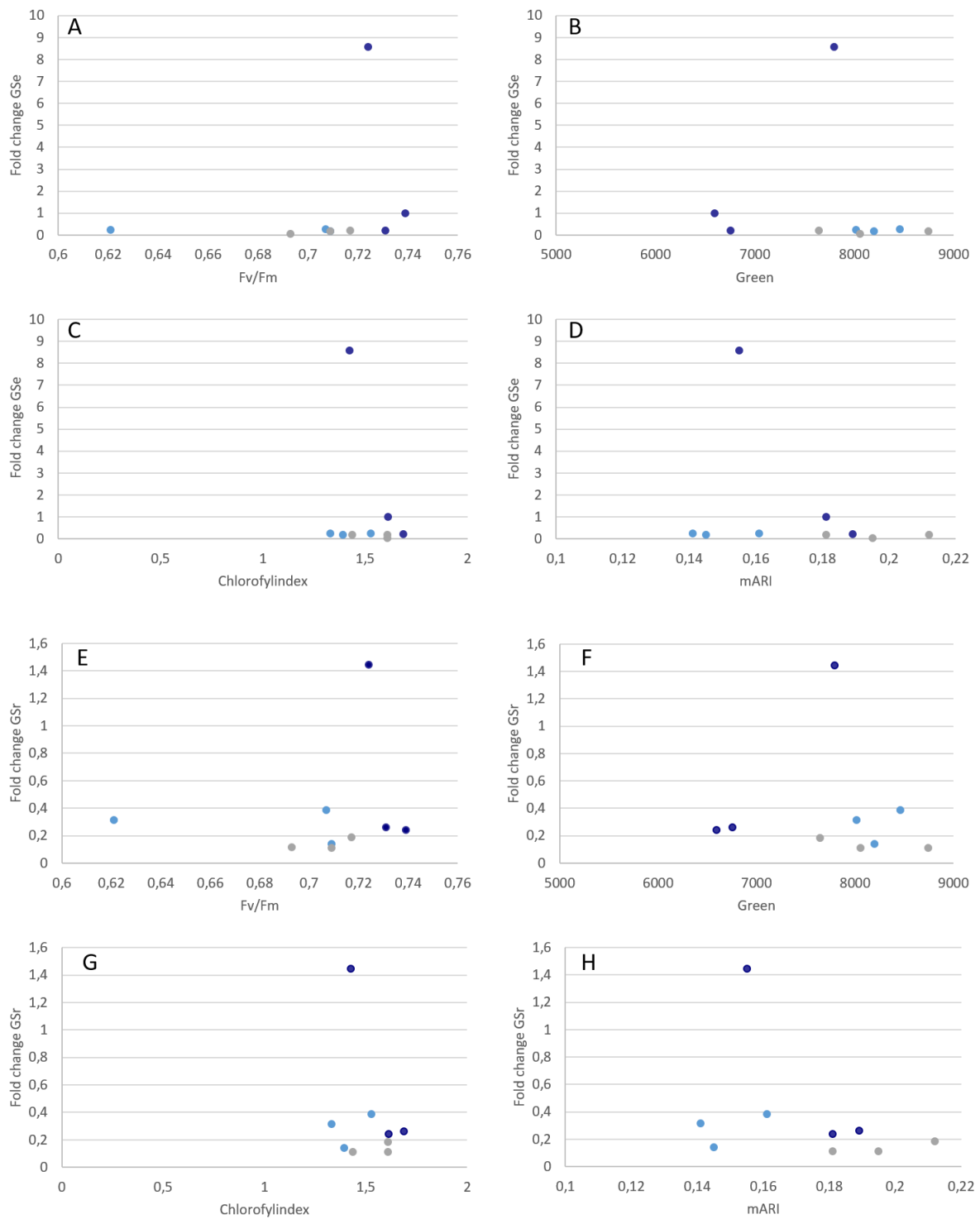
Om te onderzoeken of er een verband bestaat tussen de veranderingen in genexpressie en de PathoViewer data werden eventuele correlaties onderzocht tussen de spectrale parameters (F_v/F_m , Green, chlorofylindex en mARI) en de foldchanges van GS1, GS2, GSe en GSr. Hiervoor werd de data niet gesplitst naar boven, midden en onder omdat er in dat geval slechts drie datapunten waren per variabele. De normaliteitsvoorwaarde was niet voldaan om Pearson correlaties te gebruiken. Als alternatief werd een Spearman correlatie uitgevoerd op significantieniveau 0,05, waaruit bleek dat er geen significante correlaties waren tussen de spectrale variabelen en de genexpressies (Tabel 3). Wanneer de correlaties gevisualiseerd worden in correlatieplots, is te zien dat er misschien een verband bestaat tussen de foldchanges in GS aan de ene kant en de spectrale parameters aan de andere kant (Figuur 22 en Figuur 23).

Tabel 3: Spearman correlatiecoëfficiënten tussen fold changes (van GS1, GS2, GSe en GSr) enerzijds en de spectrale parameters (F_v/F_m , Green, chlorofylindex en mARI) anderzijds. Significante correlaties (significantieniveau 0,05) worden aangegeven met een asterisk. Grijs cijfers zijn de correlatiecoëfficiënten tussen de fold changes onderling en de spectrale parameters onderling.

	GS1	GS2	GSe	GSr	F_v/F_m	Green	Chlorofylindex	mARI
GS1	/	-	-	-	-	-	-	-
GS2	0,17	/	-	-	-	-	-	-
GSe	0,900*	0,100	/	-	-	-	-	-
GSr	0,700*	-0,150	0,850*	/	-	-	-	-
F_v/F_m	0,343	0,653	0,427	0,134	/	-	-	-
Green	-0,250	-0,133	-0,433	-0,317	-0,686*	/	-	-
Chlorofylindex	0,008	0,444	0,008	-0,134	0,588	-0,561	/	-
mARI	-0,460	0,469	-0,343	-0,435	0,307	-0,301	0,815*	/



Figuur 22: Correlatieplots van de fold changes van GS1 met F_v/F_M (A), Green (B), Chlorofylindex (C) en mARI (D) en van GS2 met F_v/F_M (E), Green (F), chlorofylindex (G) en mARI (H). Lichtblauw: boven, grijs: midden, donkerblauw: onder.



Figuur 23: Correlatieplots van de fold changes van GSe met FV/FM (A), Green (B), Chlorofylindex (C) en mARI (D) en van GSR met FV/FM (E), Green (F), chlorofylindex (G) en mARI (H). Lichtblauw: boven, grijs: midden, donkerblauw: onder.

5 Discussie

5.1 *In planta test – Z. tritici*

Gebaseerd op de inoculatie-experimenten met *Z. tritici* was geen verschil zichtbaar tussen de geïnoculeerde tarweplanten en de controle planten. Dit kan erop wijzen dat de inoculatie niet werkte, of dat de infectie door *Z. tritici* niet slaagde. Het vermoeden dat de inoculatie met *Z. tritici* niet gelukt was werd bevestigd door beeldanalyse van de PathoViewer-beelden en doordat het terug uitplaten van geïnoculeerde bladeren op PDA niet resulteerde in de groei van *Z. tritici*. Het leek er meer op dat de tarweplanten in beide behandelingen (geïnfecteerd met *Z. tritici* of controle) steeds meer stress ondervonden en dat ze in het algemeen achteruit te gingen. De aanwijzingen hiervoor zijn de stijgende mARI en de dalende F_V/F_M en chlorofylindex (Baker, 2008; Gitelson et al., 2009).

Er zijn een vijftal mogelijke verklaringen waarom de infecties niet slaagden. Er zijn aanwijzingen dat de gebruikte batch potgrond ongeschikt was omdat tomatenplanten in dezelfde potgrond eveneens slecht groeiden. Dat kan erop wijzen dat de groeiomstandigheden niet ideaal waren voor de tarweplanten en daardoor bijvoorbeeld nutriëntdeficiënties vertoonden. Ook is het mogelijk dat de inoculatieomstandigheden zoals de luchtvochtigheid en de temperatuur niet geschikt waren voor *Z. tritici* om een infectie tot stand te brengen. Ten derde zou het ook kunnen dat de planten gebruikt voor de infectie reeds te oud waren en dat de geïnoculeerde bladeren afstierven voordat *Z. tritici* zijn necrotrofe fase kon aanvangen. De oudste bladeren werden namelijk geïnoculeerd en dat zijn de bladeren die als eerste afsterven wanneer de tarweplanten in bloei komen.

Twee laatste mogelijkheden zijn dat de gebruikte stam zijn virulentie verloren is of dat de tarwecultivar Tybald toevallig resistent is. Indien Tybald resistent is, zijn er reeds een twintigtal genen beschreven die in meer of mindere mate resistentie verlenen (Brown et al., 2015). Brown et al. (2015) beschrijft bovendien dat verschillende isolaten van *Z. tritici* bepaalde cultivars gemakkelijker infecteren dan andere. Het meest belovende gen dat resistentie lijkt te geven is *STB6*. *STB6* werd geïdentificeerd met het isolaat IPO323, dewelke ook in deze masterproef werd gebruikt (Brown et al., 2015). Het is dus mogelijk dat, indien Tybald resistent is, dit te wijten is aan *STB6*.

5.2 *Detached leaf assay – F. graminearum*

Doordat de infecties van *Z. tritici* niet lukten, werd voor het verdere verloop van deze thesis gefocust op *F. graminearum*, een andere hemibiotrofe tarwepathogeen. Tijdens het fotograferen en het nemen van stalen voor de case-study, werden weinig necrotische symptomen waargenomen. Het zou kunnen dat *F. graminearum* zich op dat moment nog in de biotrofe fase bevond. De symptomen die op dat moment wel zichtbaar waren zijn mogelijk het gevolg van de ROS die tarweplanten inzetten tegen de ogenschijnlijk biotrofe pathogenen. Wellicht ondervonden de planten verder niet veel stress. Dit zou ten eerste kunnen verklaren waarom F_V/F_M , Green en chlorofylindex niet verschilden van de controle. Ten tweede zou dit ook verklaren waarom het bovenste, middelste en onderste stuk onderling geen verschillen vertoonden voor F_V/F_M , Green en chlorofylindex.

Echter, de mARI vormt een uitzondering. Het was de enige parameter die verschillen toonde met de controle. Dit lijkt in strijd te zijn met de waarnemingen bij de andere stressparameter, F_V/F_M , waarbij die verschillen niet werden waargenomen. Anthocyanen hebben een rol als antioxidant en worden geproduceerd als reactie op oxidatieve stress, in dit geval de ROS geproduceerd tegen *F. graminearum* (Liu et al., 2018). Het kan zijn dat de anthocyaan-moleculen de ROS wegnemen, daardoor de stress verminderen en dat deze stress daardoor niet te zien is in F_V/F_M .

De mARI was ook de enige parameter waarbij het bovenste, middelste en onderste stuk onderling verschilden. Het bovenste en middelste stuk verschilden significant, waarschijnlijk door de aanwezigheid van *F. graminearum* in het midden. Het onderste stuk had een mARI die niet significant noch van het bovenste, noch het onderste stuk verschilde. Dit kan verklaard worden door dat het onderste stuk ook stress ondervindt van het afknippen van het blad.

Niettegenstaande we geen verschillen zien in F_V/F_M , Green en chlorofylindex, zijn wel duidelijke verschillen te zien in de genexpressie. Aangezien veranderingen in genexpressie vooraf gaan aan veranderingen in de spectrale data, zouden deze verschillen op een later tijdstip kunnen leiden tot veranderingen in de spectrale data. De grootste veranderingen in genexpressie werden verwacht in het middelste stuk, maar dat was niet het geval. Omdat er in het middelste stuk bijna geen significante veranderingen optraden, zou het kunnen dat dat *F. graminearum* niet veel impact had op de genexpressie van de glutaminesynthetase-genen. Ook hier zou de verklaring kunnen zijn dat *F. graminearum* nog in de biotrofe fase zat en dat de tarweblaadjes daardoor nog niet veel stress ondervonden.

Als hypothese werd gesteld dat de tarweplanten in de biotrofe fase stikstof weg zouden mobiliseren om het weefsel te laten sterven en zo de fungus tegen te houden. In de necrotrofe fase zou net stikstof naar geïnfecteerde regio gestuurd worden om het weefsel in leven te houden en de fungus op die manier te stoppen. *GS1*, *GSe* en *GSr* (cytosol) werden neergereguleerd terwijl *F. graminearum* waarschijnlijk nog in de biotrofe fase zat. Wellicht werd er dus geen stikstof weggeremobiliseerd tijdens de biotrofe fase (Seifi et al., 2013). Dat zou erop kunnen wijzen dat het eerste deel van de hypothese niet klopt, maar het zou ook kunnen dat *F. graminearum* toch verder gevorderd was in de necrotrofe fase dan gedacht. Indien er stalen waren genomen op meerdere tijdstippen, had er misschien wel een opregulatie kunnen worden waargenomen in stalen van een eerder tijdstip, wanneer *F. graminearum* zeker nog in de biotrofe fase zat.

Opvallend is dat *GS2* (chloroplast) als enige opgereguleerd werd, hoewel de opregulatie niet significant was. Een mogelijke reden hiervoor kan zijn dat *GS2* ammonium assimileert afkomstig uit de fotorespiratie (Bernard et al., 2008). Fotorespiratie treedt op wanneer de CO_2 -concentraties laag en O_2 -concentraties hoog zijn (Lopez & Barclay, 2017). Misschien traden deze condities op in de petriplaten tussen de inoculatie en het moment van staalname. Het is echter moeilijk om hieromtrent met zekerheid conclusies te trekken omdat deze resultaten afkomstig zijn van een test met een beperkt aantal herhalingen, de hoeveelheid data is dus beperkt.

Voor de infecties met *F. graminearum* konden geen correlaties worden aangetoond tussen de foldchanges van de glutaminesynthetase-genen enerzijds en de spectrale parameters anderzijds. Dit kan erop wijzen dat er geen correlaties bestaan, maar de hoeveelheid data is te klein om betrouwbare correlaties op te stellen. Een tekort aan data heeft immers een invloed op eventuele correlaties. Er zijn meer datapunten nodig, zowel wanneer de data worden uitgesplitst naar de verschillende stukken als wanneer de data worden samengenomen. In deze test waren er slechts drie datapunten per variabele beschikbaar wanneer de data werden uitgesplitst om op een kleinere spatiale schaal te kijken. Het experiment met *F. graminearum* dat omwille van de Corona-Covid19-crisis niet verder gezet kon worden, omvatte meer herhalingen en tijdstippen en had misschien uitsluitsel kunnen geven over mogelijke correlaties.

Een tweede mogelijk reden waarom er geen correlaties zijn, kan gelinkt worden aan het feit dat er niet veel necrotrofie zichtbaar was op het moment dat zowel de foto's als de stalen werden genomen. Misschien waren de genen reeds op- of neergereguleerd, maar was dit nog niet zichtbaar in de chlorofylindex. Expressieveranderingen gaan namelijk vooraf aan eventuele wijzigingen in chlorofylgehalte. Indien dit vertragingseffect een rol speelt, zou de genexpressie misschien gelinkt kunnen worden aan de chlorofylindex op latere tijdstippen.

De correlatieplots geven echter meer hoop op het bestaan van een mogelijke link tussen de genexpressie van de glutaminesynthetase-genen en spectrale data. Een correlatie met de chlorofylindex zou erop kunnen wijzen dat tarweplanten hun stikstofmetabolisme aanpassen tijdens infecties met *F. graminearum*. Veranderingen in stikstofgehalten in niet-geïnoculeerde delen zouden een extra aanwijzing kunnen vormen voor het optreden van stikstofremobilisatie als defensiemechanisme tegen *F. graminearum*. Dit werd bijvoorbeeld reeds waargenomen bij zonnebloemen (*H. annuus*) die geïnfecteerd werden met *Botrytis cinerea*. Dulermo et al. (2009) detecteerden verschillende aminozuren, waaronder glutaminezuur, en maten met behulp van ¹³C-NMR spectroscopie de gehalten van die aminozuren. Tijdens de infectie met *B. cinerea*, een necrotrofe pathogeen, bleken de gehalten aan glutaminezuur te dalen in de niet-geïnfecteerde regio's (Dulermo et al., 2009; Seifi et al., 2013).

6 Besluit

De inoculaties van tarweplaten met *Z. tritici* slaagden bij geen enkele test. Mogelijke oorzaken zijn slechte groeiomstandigheden, verkeerde inoculatieomstandigheden, te oude planten, resistentie bij de planten tegen *Z. tritici* en tot slot kan *Z. tritici* zijn virulentie verloren zijn. Om te achterhalen wat de oorzaak is, zouden die mogelijke oorzaken getest moeten worden. Echter, het testen van andere cultivars, omstandigheden en pathogeenstammen was niet mogelijk omwille van de Corona-Covid19-crisis. Naar de toekomst toe zou het niet alleen interessant zijn om de mogelijke oorzaken te testen maar ook om te onderzoeken of het verloop van de bladvlekkenziekte m.b.v. de PathoViewer gevolgd kan worden. Tot op heden bestaat er geen uniforme objectieve manier om de ernst van een *Z. tritici*-infectie in te schatten en moet een of twee weken gewacht worden tot de eerste symptomen optreden (Arraiano et al., 2009; Arraiano, Brading, Dedryver, & Brown, 2006; Goodwin, 2007). De PathoViewer zou een tool kunnen zijn om, althans in onderzoekssituaties, reeds vroeger vast te kunnen stellen of de tarweplanten lijden aan de bladvlekkenziekte en in welke mate.

Naast een detectietool zou de PathoViewer ook gebruikt kunnen worden om de latente fase, de switch en de necrotrofe fase beter in beeld te brengen. Er zou bijvoorbeeld gekeken kunnen worden of de tarweplanten reeds in de latente fase stress ondervinden aan de hand van F_V/F_M en mARI. Door dit te combineren met RT-qPCR naar genen betrokken in de SA-, JA- en ET-signaleringspathways, zou misschien een indicatie bekomen kunnen worden wanneer tarwe de aanwezigheid van *Z. tritici* opmerkt en zijn defensiemechanismen activeert. Tot slot zouden de geplande experimenten naar de rol van het stikstofmetabolisme in het defensiemechanisme tegen *Z. tritici* alsnog kunnen worden uitgevoerd. Aan de hand daarvan zou eventueel een verband kunnen worden aangetoond tussen de chlorofyl-index en de expressie van de glutaminesynthetase-genen.

Omwille van de Corona-Covid19-crisis baseert deze thesis zich voor de interactie tussen tarwe en *F. graminearum* op resultaten van een case-study. Het bestaan van een correlatie tussen de chlorofyl-index en de verandering in genexpressie van de glutaminesynthetase-genen kon niet worden aangetoond. Het is evenwel niet uitgesloten dat zo'n verband alsnog bestaat. De hoeveelheid data was namelijk te beperkt en op basis van de correlatieplots is een verband niet uit te sluiten. Uit de resultaten bleek ook dat *F. graminearum* zich waarschijnlijk op het moment van staalname nog in de biotrofe fase bevond. Samen met het feit dat zowat alle spectrale parameters hetzelfde waren voor de geïnfecteerde planten en de controle, wil dit ook zeggen dat de veranderingen wellicht pas later zullen optreden. Het zou dus kunnen dat er een correlatie bestaat tussen de huidige genexpressie en de spectrale parameters op een later tijdstip.

Er zijn twee aanwijzingen dat tarweplanten tijdens de biotrofe fase van aarfusarium hun stikstofmetabolisme misschien niet inzetten in de defensie tegen *F. graminearum*. Ten eerste kon er geen correlatie tussen de glutaminesynthetase-genen en de chlorofylindex kon worden aangetoond en ten tweede leken de planten geen stikstof weg te remobiliseren in de biotrofe fase. Omdat de resultaten uit een case-study komen met een beperkte hoeveelheid stalen, is het moeilijk om conclusies met veel zekerheid te trekken. Een rol voor het stikstofmetabolisme in de biotrofe fase is dus, ondanks deze aanwijzingen, niet volledig uit te sluiten.

Het is nodig om de rol van het stikstofmetabolisme tijdens de interactie tussen tarwe en *F. graminearum* verder te onderzoeken. Wellicht zal dat onderzoek interessante resultaten opleveren. Eenzelfde experiment als in de case-study met meer biologische herhalingen en tijdstippen voor staalname bijvoorbeeld kan misschien een aantal zaken ophelderen. Zo was het niet helemaal zeker dat *F. graminearum* zich nog in de biotrofe fase bevond. Daarnaast kan dan misschien het bestaan van eventuele correlaties tussen de spectrale parameters en de glutaminesynthetase-genen worden

aangetoond. Indien er inderdaad een link bestaat tussen de chlorofylindex en de genexpressie van GS, zou die verder bestudeerd kunnen worden. Een correlatie betekent namelijk niet dat er een oorzakelijk verband bestaat. Wanneer tijdens de necrotrofe fase in niet-geïnfecteerde delen van de plant een opregulatie van GS wordt waargenomen, tegelijk met een neerregulatie in de geïnfecteerde delen, vormt dit een extra aanwijzing dat stikstofremobilisatie inderdaad optreedt bij een infectie met *F. graminearum*. Tot slot zou het ook interessant zijn om in zowel geïnfecteerde weefsels als niet-geïnfecteerde weefsel de hoeveelheden glutamine of glutaminezuur te meten. De concentratieveranderingen zouden nog meer aanwijzingen kunnen opleveren inzake de rol van het stikstofmetabolisme.

7 Bibliografie

- Adhikari, T. B., Anderson, J. M., & Goodwin, S. B. (2003). Identification and Molecular Mapping of a Gene in Wheat Conferring Resistance to *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*, *93*(9), 1158–1164. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.9.1158>
- Adhikari, T. B., Mamidi, S., Gurung, S., & Bonman, J. M. (2015). Mapping of new quantitative trait loci (QTL) for resistance to *Septoria tritici* blotch in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, *205*(3), 699–706. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1393-4>
- Ameys, M., Audenaert, K., De Zutter, N., Steppe, K., Van Meulebroek, L., Vanhaecke, L., ... Smagghe, G. (2015). Priming of wheat with the green leaf volatile Z-3-hexenyl acetate enhances defense against *Fusarium graminearum* but boosts deoxynivalenol production. *Plant Physiology*, *167*(4), 1671–1684. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00107>
- Arraiano, L. S., Balaam, N., Fenwick, P. M., Chapman, C., Feuerhelm, D., Howell, P., ... Brown, J. K. M. (2009). Contributions of disease resistance and escape to the control of *septoria tritici* blotch of wheat. *Plant Pathology*, *58*(5), 910–922. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02118.x>
- Arraiano, L. S., Brading, P. A., Dedryver, F., & Brown, J. K. M. (2006). Resistance of wheat to *septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) and associations with plant ideotype and the 1BL–1RS translocation. *Plant Pathology*, *55*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01319.x>
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M., & Haesaert, G. (2013). Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins*, *6*(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/toxins6010001>
- 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>
- Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, *69*(4), 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Bellincampi, D., Cervone, F., & Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5, p. 228. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00228>
- Ben M'Barek, S., Cordewener, J. H. G., van der Lee, T. A. J., America, A. H. P., Mirzadi Gohari, A., Mehrabi, R., ... Kema, G. H. J. (2015). Proteome catalog of *Zymoseptoria tritici* captured during pathogenesis in wheat. *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.018>
- Bernard, S. M., & Habash, D. Z. (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, *182*(3), 608–620. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02823.x>
- Bernard, S. M., Møller, A. L. B., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T. P., Dubois, F., ... Habash, D. Z. (2008). Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology*, *67*(1), 89–105. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9303-y>
- Brennan, C. J., Benbow, H. R., Mullins, E., & Doohan, F. M. (2019). A review of the known unknowns in the early stages of *septoria tritici* blotch disease of wheat. *Plant Pathology*, *68*(8), 1427–1438. <https://doi.org/10.1111/ppa.13077>
- Brown, J. K. M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., & Saintenac, C. (2015). Genetics of resistance to

- Zymoseptoria tritici and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.017>
- Caputo, C., Criado, M. V., Roberts, I. N., Gelso, M. A., & Barneix, A. J. (2009). Regulation of glutamine synthetase 1 and amino acids transport in the phloem of young wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.003>
- De Vleeschauwer, D., Gheysen, G., & Höfte, M. (2013). Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science*, 18(10), 555–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.07.002>
- De Vleeschauwer, D., Xu, J., & Höfte, M. (2014). Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00611>
- Ding, L., Xu, H., Yi, H., Yang, L., Kong, Z., Zhang, L., ... Ma, Z. (2011). Resistance to Hemi-Biotrophic *F. graminearum* Infection Is Associated with Coordinated and Ordered Expression of Diverse Defense Signaling Pathways. *PLOS ONE*, 6(4), e19008. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019008>
- Duba, A., Goriewa-Duba, K., & Wachowska, U. (2018). A Review of the Interactions between Wheat and Wheat Pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp. and *Parastagonospora nodorum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1138. <https://doi.org/10.3390/ijms19041138>
- Dulermo, T., Bligny, R., Gout, E., & Cotton, P. (2009). Amino acid changes during sunflower infection by the necrotrophic fungus *B. cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*, 4(9), 859–861. <https://doi.org/10.4161/psb.4.9.9397>
- European Commission. (2019). Agri-food markets. Retrieved October 2, 2019, from https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DataPortal/agricultural_markets.html
- Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., ... Masclaux-Daubresse, C. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5643–5656. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru323>
- Feller, U., & Fischer, A. (1994). Nitrogen Metabolism in Senescing Leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 241–273. <https://doi.org/10.1080/07352689409701916>
- Figueroa, M., Hammond-Kosack, K. E., & Solomon, P. S. (2018). A review of wheat diseases—a field perspective. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1523–1536. <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>
- Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- Fones, H. N., Eyles, C. J., Kay, W., Cowper, J., & Gurr, S. J. (2017). A role for random, humidity-dependent epiphytic growth prior to invasion of wheat by *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*, 106, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.07.002>
- Francisco, C. S., Ma, X., Zwysig, M. M., McDonald, B. A., & Palma-Guerrero, J. (2019). Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Scientific Reports*, 9(1), 9642. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45994-3>
- Garnica, D. P., Upadhyaya, N. M., Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2013). Strategies for Wheat Stripe Rust Pathogenicity Identified by Transcriptome Sequencing. *PloS One*, 8(6), e67150–e67150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067150>
- Giménez, M. J., Pistón, F., & Atienza, S. G. (2011). Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. *Planta*,

233(1), 163–173. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1290-y>

- Gitelson, A. A., Chivkunova, O. B., & Merzlyak, M. N. (2009). Nondestructive estimation of anthocyanins and chlorophylls in anthocyanic leaves. *American Journal of Botany*, *96*(10), 1861–1868. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800395>
- Gitelson, A. A., Gritz †, Y., & Merzlyak, M. N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant Physiology*, *160*(3), 271–282. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(1), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Goodwin, S. B. (2007). Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australasian Plant Pathology*, *36*(6), 532–538. <https://doi.org/10.1071/AP07068>
- Habash, D. Z., Massiah, A. J., Rong, H. L., Wallsgrave, R. M., & Leigh, R. A. (2001). The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Annals of Applied Biology*, *138*(1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00087.x>
- Hehir, J. G., Connolly, C., O’Driscoll, A., Lynch, J. P., Spink, J., Brown, J. K. M., ... Mullins, E. (2018). Temporal and spatial field evaluations highlight the importance of the presymptomatic phase in supporting strong partial resistance in *Triticum aestivum* against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology*, *67*(3), 573–583. <https://doi.org/10.1111/ppa.12780>
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, *168*(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(46), 16892–16897. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508467102>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kabbage, M., Yarden, O., & Dickman, M. B. (2015). Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: Switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Science*, *233*, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.018>
- Kazan, K., Gardiner, D. M., & Manners, J. M. (2012). On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 399–413. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x>
- Kema, G., & Annone, J. (1991). In vitro production of pycnidia by *Septoria tritici*. *Neth. J. Plant Pathol*, *97*, 65–72. <https://doi.org/10.1007/BF01974270>
- Kema, G., Yu, D. Z., Rijkenberg, F. H. J., Shaw, M., & Baayen, R. P. (1996). History of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* *86*: 777-786, *86*. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-777>
- Keon, J., Antoniw, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J. L., Baker, J. M., ... Rudd, J. J. (2007). Transcriptional Adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to Programmed Cell Death (PCD) of

- Its Susceptible Wheat Host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 178–193. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0178>
- Kettles, G. J., Bayon, C., Sparks, C. A., Canning, G., Kanyuka, K., & Rudd, J. J. (2018). Characterization of an antimicrobial and phytotoxic ribonuclease secreted by the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *New Phytologist*, 217(1), 320–331. <https://doi.org/10.1111/nph.14786>
- Kettles, G. J., & Kanyuka, K. (2016). Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 7, p. 508. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00508>
- Kilaru, S., Schuster, M., Ma, W., & Steinberg, G. (2017). Fluorescent markers of various organelles in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*, 105, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.001>
- King, R., Urban, M., Lauder, R. P., Hawkins, N., Evans, M., Plummer, A., ... Rudd, J. J. (2017). A conserved fungal glycosyltransferase facilitates pathogenesis of plants by enabling hyphal growth on solid surfaces. *PLOS Pathogens*, 13(10), e1006672. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006672>
- Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., & Steinberg, C. (2013). Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(1), 97–111. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0098-5>
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F. M., Visser, R. G. F., & Bovy, A. (2018). Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review . *Frontiers in Chemistry* , Vol. 6, p. 52. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2018.00052>
- Lopez, F. B., & Barclay, G. F. (2017). Chapter 4 - Plant Anatomy and Physiology. In S. Badal & R. B. T.-P. Delgoda (Eds.), *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies* (pp. 45–60). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00004-4>
- Lu, J., Zhang, L., Lewis, R. S., Bovet, L., Goepfert, S., Jack, A. M., ... Dewey, R. E. (2016). Expression of a constitutively active nitrate reductase variant in tobacco reduces tobacco-specific nitrosamine accumulation in cured leaves and cigarette smoke. *Plant Biotechnology Journal*, 14(7), 1500–1510. <https://doi.org/10.1111/pbi.12510>
- Ma, X., Keller, B., McDonald, B. A., Palma-Guerrero, J., & Wicker, T. (2017). Comparative Transcriptomics Reveals How Wheat Responds to Infection by *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(4), 420–431. <https://doi.org/10.1094/mpmi-10-17-0245-r>
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., ... Rudd, J. J. (2011). Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat. *Plant Physiology*, 156(2), 756 LP – 769. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176347>
- Mehrabi, R., van der Lee, T., Waalwijk, C., & Kema, G. H. J. (2006). MgSlr2, a Cellular Integrity MAP Kinase Gene of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*, Is Dispensable for Penetration but Essential for Invasive Growth. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(4), 389–398. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0389>
- Mehrabi, R., Zwiers, L.-H., de Waard, M. A., & Kema, G. H. J. (2006). MgHog1 Regulates Dimorphism and Pathogenicity in the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(11), 1262–1269. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1262>

- Meuninck, B. (2019). *Green leaf volatiles, what makes them toxic, what makes them effective*. Ghent University.
- Mishra, D., & Pradhan, P. (1973). Regulation of senescence in detached rice leaves by light, benzimidazole and kinetin. *Experimental Gerontology*, *8*(3), 153–155. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(73\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(73)90005-3)
- Mohammadi, N., Mehrabi, R., Mirzadi Gohari, A., Mohammadi Goltapeh, E., Safaie, N., & Kema, G. H. J. (2017). The ZtVf1 transcription factor regulates development and virulence in the foliar wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*, *109*, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.10.003>
- Muñoz-Huerta, R. F., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. V. (2013). A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *13*(8), 10823–10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Oliveira, I. C., & Coruzzi, G. M. (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *121*(1), 301–310. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.301>
- Palma-Guerrero, J., Torriani, S. F. F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J. J., ... Croll, D. (2016). Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Molecular Plant Pathology*, *17*(6), 845–859. <https://doi.org/10.1111/mpp.12333>
- Pandey, D., Rajendran, S. R. C. K., Gaur, M., Sajeesh, P. K., & Kumar, A. (2016). Plant Defense Signaling and Responses Against Necrotrophic Fungal Pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation*, *35*(4), 1159–1174. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9600-7>
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*(1), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Ponomarenko, A., Kema, G. H. J., & Goodwin, S. B. (2011). Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2011-0407-01>
- Rudd, J. J. (2015). Previous bottlenecks and future solutions to dissecting the *Zymoseptoria tritici*-wheat host-pathogen interaction. *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.005>
- Rudd, J. J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., ... Courbot, M. (2015). Transcriptome and Metabolite Profiling of the Infection Cycle of *Zymoseptoria tritici* on Wheat Reveals a Biphasic Interaction with Plant Immunity Involving Differential Pathogen Chromosomal Contributions and a Variation on the Hemibiotrophic Lifestyle. *Plant Physiology*, *167*(3), 1158–1185. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255927>
- Saintenac, C., Lee, W. S., Cambon, F., Rudd, J. J., King, R. C., Marande, W., ... Kanyuka, K. (2018). Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics*, *50*(3), 368–374. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0051-x>
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M. C., Solomon, P. S., & McDonald, B. A. (2015). Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.001>
- Sanchez-Vallet, A., Sardinha, C., Palma-Guerrero, J., Meile, L., Alassimone, J., Karisto, P., ... McDonald,

- B. (2018). Zymoseptoria tritici - a global threat for wheat production. Retrieved September 30, 2019, from <http://www.septoria-tritici-blotch.net/introduction.html>
- Seifi, H. S., Van Bockhaven, J., Angenon, G., & Höfte, M. (2013). Glutamate Metabolism in Plant Disease and Defense: Friend or Foe? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 475–485. <https://doi.org/10.1094/mpmi-07-12-0176-cr>
- Selin, C., de Kievit, T. R., Belmonte, M. F., & Fernando, W. G. D. (2016). Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00600>
- Sharma, R., De Vleeschauwer, D., Sharma, M. K., & Ronald, P. C. (2013). Recent Advances in Dissecting Stress-Regulatory Crosstalk in Rice. *Molecular Plant*, 6(2), 250–260. <https://doi.org/10.1093/mp/sss147>
- Shetty, N. P., Jensen, J. D., Knudsen, A., Finnie, C., Geshi, N., Blennow, A., ... Jørgensen, H. J. L. (2009). Effects of β -1,3-glucan from Septoria tritici on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4287–4300. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp269>
- Shetty, N. P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G. H. J., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. L. (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen Septoria tritici and wheat. *New Phytologist*, 174(3), 637–647. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02026.x>
- Steinberg, G. (2015). Cell biology of Zymoseptoria tritici: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.002>
- Taheri, P. (2018). Cereal diseases caused by Fusarium graminearum: from biology of the pathogen to oxidative burst-related host defense responses. *European Journal of Plant Pathology*, 152(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1471-2>
- United Nations, food and agricultural organisation. (2019). FAOstat. Retrieved October 2, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Walter, S., Nicholson, P., & Doohan, F. M. (2010). Action and reaction of host and pathogen during Fusarium head blight disease. *New Phytologist*, 185(1), 54–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x>
- Wilson, W., Dahl, B., & Nganje, W. (2018). Economic costs of Fusarium Head Blight, scab and deoxynivalenol. *World Mycotoxin Journal*, 11(2), 291–302. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2204>
- Wilson, W. W., McKee, G., Nganje, W., Dahl, B., & Bangsund, D. (2017). Economic Impact of USWBSI's Scab Initiative to Reduce FHB. In *Agribusiness & Applied Economics* 774. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.264672>
- Yemelin, A., Brauchler, A., Jacob, S., Laufer, J., Heck, L., Foster, A. J., ... Thines, E. (2017). Identification of factors involved in dimorphism and pathogenicity of Zymoseptoria tritici. *PLoS One*, 12(8), e0183065–e0183065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183065>

8 Bijlage A – optimalisatie qPCR protocol

Het optimaliseren van het temperatuursprofiel voor de qPCR werd gedaan a.d.h.v. een kleine test. Er werd gebruik gemaakt van vier tarweplanten, waarvan twee op voorhand een aantal uren in het donker werden geplaatst (D1 en D2). De andere twee bleven in het licht en dienden als controle (C1 en C2).

Als eerste werd een 58°C getest als annealingstemperatuur. Hierbij was er geen amplificatie van *GSe*, *Ta54227* en *actine* bij de stalen D1 en D2. Vervolgens werd een temperatuurgradiënt getest van 56,4°C t.e.m. 61,7°C. Op basis van de gemiddelde C_q-waarden werd in eerste instantie gekozen voor 59,8°C, 61°C of 61,7°C (Tabel 4). Op basis van de amplificatiecurven werd besloten om een temperatuur van 60°C te gebruiken.

Tabel 4: Cq waarden voor stalen C1 en D1 tussen 56°C en 62°C. 56,4°C en 61,7°C liggen daar dichtbij. Daarom werden 56°C en 62°C niet getest. Een liggend streepje geeft aan dat er geen amplificatie plaatsvond. Lichtblauw: C1, grijs: C2, donkerblauw: D1.

T (°C)	Actine		Ta54227		GS1		Actine		Ta54227		GS1		Gemiddelde
62	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
61,7	31,08	31,33	25,83	26,00	31,24	31,15	33,99	34,21	28,16	28,70	34,26	34,19	30,85
61	32,01	31,15	25,77	26,51	34,39	32,71	34,03	34,15	28,47	28,34	34,31	34,11	31,33
59,8	30,54	31,32	26,82	26,37	32,62	32,96	35,21	34,83	28,23	28,71	33,88	34,43	31,33
58,4	30,69	31,26	26,56	26,55	33,33	32,73	34,93	35,08	28,79	29,03	34,65	34,07	31,47
57,7	-	32,28	27,70	27,70	33,13	33,08	35,46	34,04	30,76	29,81	34,71	35,07	32,16
56,4	31,09	31,71	28,16	28,07	32,62	33,36	34,92	35,34	30,78	31,28	35,33	35,10	32,31
56	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/