

Pathogeniteitsstudie van *Botrytis* isolaten op sla door gebruik van fenotypering

Sander Verbruggen

Studentennummer: 01602147

Promotoren: Prof. dr. Ir. Monica Höfte

Prof. dr. Ir. Marie-Christine Van Labeke

Tutor: dr. Ir. Lijuan Meng

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad Master of Science in de biowetenschappen:
Biotechnologie

Academiejaar: 2019 - 2020

Auteursrechtelijke bescherming

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

The author and promotors give the permission to use this manuscript 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 dissertation.

10/06/2020

Auteur

Sander Verbruggen

Promotoren

Prof. dr. Ir. Monica Höfte

Prof. dr. Ir. Marie-Christine Van Labeke

Tutor

dr. Ir. Lijuan Meng

Woord vooraf

Graag wil ik mijn promotoren Marie-Christine Van Labeke en Monica Höfte bedanken voor de vele hulp tijdens deze thesis. De bijeenkomsten voor het bespreken van ideeën en resultaten waren altijd zeer hulpvol. Daarnaast wil ik jullie bedanken voor het nalezen van deze thesis en het geven van waardevolle commentaar. Jullie inzicht en inbreng waren steeds een zeer grote hulp.

Next, I would like to thank my tutor Lijuan Meng. You taught me a lot about the subject, showed me the ropes on all of the practical work and were always there for me when I needed your assistance. You were an amazing help during this thesis.

Ik zou graag Maarten Ameye van het LAMP te Schoonmeersen (Laboratory of Applied Mycology and Phenomics) bedanken voor de vele hulp en praktische uitleg over de Pathoviewer. Ik kon steeds met al mijn vragen bij u terecht en u heeft mij enorm geholpen met het mogelijk maken van de dagelijkse opvolging.

Ook Kris Audenaert van het LAMP wil ik van harte bedanken. Ik kon steeds op u rekenen voor hulp en u heeft mij enorm geholpen wanneer ik in nood zat. Ook de andere onderzoekers en medewerkers van het LAMP wil ik bedanken voor de vele hulp en toffe sfeer.

Van het labo Fytopathologie zou ik graag Ilse Delaere bedanken voor de uitleg en praktische info. Jolien Claerbout voor het steeds regelen van de slaplantjes die ik nodig had voor de praktische proeven. Lisa Heyman voor de uitleg en het watergeven van mijn slaplantjes. Verder zou ik graag alle andere onderzoekers en medewerkers van het labo Fytopathologie bedanken voor de hulp en toffe werksfeer.

Tot slot wil ik graag Christophe Petit van het labo Tuinbouw bedanken voor het steeds watergeven en verzorgen van mijn slaplantjes.

Sander Verbruggen,

Preambule: impact coronamaatregelen

De pathogeniteitstesten met de *Botrytis* isolaten waren reeds uitgevoerd. Hierdoor werden reeds veel data met de Pathoviewer verzameld voor het ingaan van de coronamaatregelen. Het opstellen van een fylogenetische boom van de gebruikte *Botrytis* isolaten kon echter niet meer worden uitgevoerd. Het was de doelstelling aan de hand van deze fylogenetische boom de verschillen binnen de niet beschreven *Botrytis* isolaten beter te verklaren vanuit hun evolutionaire achtergrond. De thesis werd afgewerkt met de reeds verzamelde data, voor de evolutionaire achtergrond werd gebruik gemaakt van literatuur van de reeds beschreven isolaten.

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

Abstract

Sla wordt in België hoofdzakelijk in serres geteeld. Hierbij wordt de hydroteelt, waarbij planten in goten via de nutrient film technique (NFT) water en nutriënten toegediend krijgen, in meerdere bedrijven toegepast. In de hydroteelt is extra toediening van belichting een standaard teelttechniek. LED's worden steeds meer toegepast, zo zijn ze energiezuiniger en duurzamer maar worden ze ook in verschillende lichtspectra aangeboden. De plantpathogene schimmel *Botrytis* is verantwoordelijk voor zware verliezen in de tuinbouw. In de hydroteelt van sla vormen *Botrytis* aantastingen een probleem door de hogere luchtvochtigheid van deze teelttechnieken.

Eerder onderzoek naar de invloed van lichtkwaliteit en lichtspectra op *Botrytis* bij sla en aardbei maakte duidelijk dat er een zeer grote variabiliteit is tussen *Botrytis* isolaten van diverse oorsprong bij hun reactie op licht maar ook in myceliumgroei en pathogeniteit. Door middel van fenotypering werd verder onderzoek gedaan naar de verschillen in pathogeniteit in de verschillende ontwikkelingsfasen van de schimmel. Om deze variabiliteit verder te verklaren werden in deze thesis verschillen in pathogeniteit nagegaan na inoculatie met mycelium en sporen van 16 *Botrytis* isolaten van diverse oorsprong. Slabladeren werden geïnoculeerd met een myceliumplug (MP₅) of sporenoplossing en werden fenotypisch gekarakteriseerd met een Pathoviewer. Groei en morfologie werden 6 dagen *in planta* opgevolgd. Verder werd nagegaan welk effect de ouderdom van het mycelium heeft op pathogeniteit, groei en morfologie, en of ouderdom een deel van de variabiliteit kan verklaren. Van jong (MP₅) en oud (MP₁₃) mycelium werd gedurende 4 dagen groei en morfologie *in planta* opgevolgd door middel van fenotypische karakterisering.

De isolaten verschilden duidelijk in pathogeniteit zowel bij infectie met jonge pluggen (MP₅) als met sporenoplossing en was maar in sommige gevallen te verklaren vanuit hun oorsprong. Infecties met sporen waren over het algemeen minder agressief, bij niet geslaagde sporen inoculaties was de anthocyaan stressrespons van de waardplant steeds actief. Na 3 dpi werd de meetbare concentratie aan anthocyanen zeer variabel. Bij een tweede experiment met jong (MP₅) en oud (MP₁₃) mycelium werd opnieuw veel variabiliteit bekomen afhankelijk van het isolaat, maar zonder rechtstreeks verband met ouderdom. De virulentie was over het algemeen lager in het tweede experiment. Mogelijke oorzaken zijn het vroegere evaluatietijdstip (3dpi) of verlies aan virulentie. De maximum kwantum opbrengst van fotosysteem II (F_v/F_m) parameter bleek de beste indicator voor virulentie te zijn naast de kwalitatieve visuele Ziekte Index (ZI). De Anthocyaan Index (ArIdx) is een goede indicator voor de stress die de waardplant ondervindt in de eerste dagen na infectie. De kwantitatieve parameters bekomen met behulp van de Pathoviewer zijn objectiever en statistisch correcter dan de visuele ziekte-evaluatie. Verder dient er rekening gehouden te worden met de enorme variabiliteit van *Botrytis*, niet alleen tussen isolaten van diverse oorsprong maar ook binnen eenzelfde isolaat.

Kernwoorden: *Botrytis* spp., *Lactuca sativa*, pathogeniteit, chlorofyl fluorescentie, stress indices, beeldverwerking

Lettuce is mainly grown in greenhouses in Belgium. Hydroponic cultivation, in which plants in gutters are given water and nutrients via the nutrient film technique (NFT), is applied in several companies. In hydroponic cultivation, extra lighting is a standard cultivation technique. LED's are being used more and more, they are more energy efficient and durable, but they are also offered in different light spectra. The plant pathogenic fungus *Botrytis* is responsible for heavy losses in horticulture. In the hydroponic cultivation of lettuce *Botrytis* infections are problematic due to the higher humidity of these cultivation techniques.

Earlier research on the influence of light quality and light spectra on *Botrytis* infections in lettuce and strawberry showed that there is a very large variability between *Botrytis* isolates of different origins in their reaction to light as well as in their mycelium growth and pathogenicity. By means of phenotyping further research was done into the differences in pathogenicity in the phases of the fungus's development. To further explain this variability, differences in pathogenicity were investigated between inoculation with mycelium and spores of 16 *Botrytis* isolates of different origins. Lettuce leaves were inoculated with a mycelium plug (MP₅) or spore solution and were phenotypically characterized with the help of a Pathoviewer. Growth and morphology were monitored in planta for 6 days. Furthermore, the effect of mycelium age on pathogenicity, growth and morphology, and whether age can explain part of the variability, were investigated. Young (MP₅) and old (MP₁₃) mycelium were monitored for 4 days in planta by phenotypic characterization.

Pathogenicity differed remarkably in infections with both young mycelium (MP₅) and spores and could only in some cases be explained by their origin. Spore infections were in general less aggressive, in unsuccessful spore inoculations the anthocyanin stress response of the host plant was always active. After 3dpi the measurable concentration of anthocyanins became very variable. In a second experiment with young (MP₅) and old (MP₁₃) mycelium again a lot of variability was found without a direct relation to age but instead depending on the isolate. In general virulence was lower in the second experiment. Possible explanations are the earlier evaluation time point (3dpi) or loss of virulence. The maximum quantum yield of Photosystem II (F_v/F_m) was found to be the best indicator of virulence in addition to the qualitative Visual Disease Index (ZI). The Anthocyanin Index (Arildx) is a good indicator of the stress experienced by the host plant in the first days after infection. The quantitative parameters using the Pathoviewer are more objective and statistically correct than visual disease assessment. Furthermore, the enormous variability of *Botrytis* needs to be taken into account, not only between isolates of different origin but also within the same isolate.

Keywords: *Botrytis* spp., *Lactuca sativa*, pathogenicity, chlorophyll fluorescence, stress indices, image processing

Inhoudstafel

1. Inleiding.....	13
2. Literatuurstudie	14
2.1. <i>Lactuca sativa</i> L.....	14
2.1.1. Economisch belang.....	14
2.1.2. Taxonomie en morfologie van sla.....	14
2.1.3. Botersla	15
2.1.4. Teeltsystemen onder glas in België.....	16
2.1.5. Teelt onder LED's.....	17
2.1.6. Abiotische stress	18
2.1.7. Biotische stress en resistentie verbetering	18
2.2. <i>Botrytis</i> spp.	18
2.2.1. Economisch belang.....	18
2.2.1. Taxonomie en levenscyclus.....	19
2.2.2. Infectie door <i>Botrytis cinerea</i>	21
2.2.3. Interessante stammen beschreven in de literatuur	24
2.1. Fenotypering.....	25
2.1.1. Pathoviewer.....	26
2.1.2. Werking Phenomate.....	27
2.1.3. Overzicht van enkele veelgebruikte parameters	27
2.1.4. Werking data analysis programma	30
3. Materiaal en methode	31
3.1. Groeimedia	31
3.2. <i>Botrytis</i> isolaten	31
3.3. Teelt van de waardplant sla	33
3.4. Proefopstelling en inoculatie van slabladen.....	33
3.5. Infectieproeven	34
3.5.1. Infectie met myceliumpluggen	34
3.5.2. Infectie met sporenoplossing	34
3.6. Bepalen van de infectiegraad.....	35
3.6.1. Visuele analyse - Ziekte index	35
3.6.2. Analyse met de Pathoviewer	35
3.7. Statistische dataverwerking.....	36
4. Resultaten.....	38
4.1. Proef 1: Pathogeniteit van pluggen (MP ₅) vs. sporenoplossing	38
4.1.1. Ziekte index en spreiding	38
4.1.2. Pathoviewer resultaten.....	39

4.2.	Proef 2: Infectiegraad van jonge (MP ₅) vs. oude pluggen (MP ₁₃).....	45
4.2.1.	Ziekte index en spreiding	45
4.2.2.	Pathoviewer resultaten.....	47
5.	Discussie.....	52
5.1.	Kwalitatieve en kwantitatieve parameters voor ziekte evaluatie	52
5.2.	Verklaringen uit de literatuur	55
5.3.	Rol van anthocyaanvorming.....	56
6.	Besluit.....	58
7.	Literatuurlijst.....	59

Tabellenlijst

Tabel 1:	Rassenproef bij 3 kropslarassen voor smet (waaronder Botrytis) en fysiologische afwijkingen zoals geel blad, rand en droogrand (Demeulemeester et al., 2017).....	16
Tabel 2:	Spectrale banden voor het bepalen van de pigmentinhoud gebaseerd op blad reflectie spectra. Algemene formule $[1/\rho(\lambda_1) - 1/\rho(\lambda_2)] * \rho(\lambda_3)$. (Gitelson et al., 2006).	29
Tabel 3:	Beschouwde Botrytis isolaten met waardplant en oorsprong (Mestdagh, 2018)	31
Tabel 4:	Scoresysteem voor de evaluatie van de Botrytis infectie bij sla, gebaseerd op % aantasting van het blad	35
Tabel 5:	Bepaling van een ROI rond de infectielocatie en potentiële aanpassingen bij het plaatsen van een ROI voor de data analyse	36
Tabel 6:	Analyseresultaten van experiment 1 bij 5dpi voor F_v/F_m , Chlldx en Arildx. Het gemiddelde en de standaard deviatie van de 6 inoculaties wordt weergegeven. De resultaten van de post-hoc van de ANOVA test tussen de isolaten zelf wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%). De resultaten van de gepaarde T-test tussen de 2 methoden van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van sterretjes in het geval van significantie ($P > 0.05$ 'ns'; $P \leq 0.05$ '*'; $P \leq 0.01$ '***'; $P \leq 0.001$ '****'; $P \leq 0.0001$ '*****').	44
Tabel 7:	Analyseresultaten van experiment 2 bij 3dpi voor F_v/F_m , Chlldx en Arildx. Het gemiddelde en de standaard deviatie van de 6 inoculaties wordt weergegeven. De resultaten van de post-hoc van de ANOVA test tussen de isolaten zelf wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%). De resultaten van de gepaarde T-test tussen de 2 methoden van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van sterretjes in het geval van significantie ($P > 0.05$ 'ns'; $P \leq 0.05$ '*'; $P \leq 0.01$ '***'; $P \leq 0.001$ '****'; $P \leq 0.0001$ '*****').	51
Tabel 8:	Vergelijkende tabel van ZI, F_v/F_m , Chlldx en Arildx voor de twee experimenten. De kleurencodes geven de trends weer en zijn gebaseerd op de waardeverdeling van de vier parameters. ZI en Arildx gaan van groen (laagste waarde) naar rood (hoogste waarde), voor F_v/F_m en Chlldx is dit omgekeerd.	52
Tabel 9:	Correlatietabel tussen de Ziekte index (ZI) en de drie parameters van de pathoviewer F_v/F_m , Chlldx en Arildx. De tabel toont steeds de R^2 waarde berekend met een betrouwbaarheidsinterval van 95%.	53

Figurenlijst

Figuur 1A: Floating Hydroponics teelt. Figuur 1B: Nutrient Film Technique teelt met Mobiel Goten Systeem van Hortiplan, voorbeeld van vergrotende tussenplantafstand.....	16
Figuur 2: Schema van de levenscyclus van <i>Botrytis cinerea</i> met reeds gekende en nog onzekere interacties tussen de verschillende groeifases (Fillinger & Elad, 2016).....	20
Figuur 3: Stadia van de seksuele voortplanting in <i>Botrytis cinerea</i> . Bevruchte sclerotia; Vorming apothecium: opkomst primordia (1), uitbreiding primordia (2), uitbreiding steel (3), steel met gezwollen uiteinde (4), onrijp apothecium (5) en rijp apothecium met asci en ascosporen (6); Vrije ascosporen. (Rodenburg, 2018).	20
Figuur 4: Correlatienetwerk voor de in vitro en in planta model gecorrigeerde eigenschapsgemiddelden van <i>Botrytis cinerea</i> . Alle rechten staan voor een Pearson's correlatie > 0.95, de groene rechten staan voor positieve correlaties en de rode voor negatieve. (Corwin et al., 2016).....	21
Figuur 5: Schematische doorsnede van <i>Botrytis cinerea</i> geïnfecteerd blad met hoge of lage calcium concentratie (Bennett, 2018).	22
Figuur 6: Multi-dimensionale benaderingen naar principes van plant senescence (Kim, Woo, & Nam, 2016).	25
Figuur 7: WIWAM xy robotarm en positioneringstafel (wiwam.be, 2020).....	26
Figuur 8: Phenomate sensor en LED licht bronnen voor rood, ver-rood, wit en NIR (phenovation.com, 2020)	27
Figuur 9A: Schematische voorstelling van gebruik van de geabsorbeerde lichtenergie in fotosysteem II. Normaal gebruikt voor de fotochemie maar bij stress kan dit als warmte of chlorofylfluorescentie dissiperen. (Baker, 2008). Figuur 9B: Niet-fotochemische dissipatie neemt toe in het geval van stress. De fotochemische dissipatie of fotosynthese zal afnemen door de verloren lichtenergie (arborcheck.com, 2020).....	27
Figuur 10: Fluorescence quenching analysis met behulp van gemoduleerde fluorescentie. Een donker geadapteerd blad wordt blootgesteld aan verschillende lichtbehandelingen. Parameters met ' aangeduid zijn afkomstig van het blad dat wordt blootgesteld aan actinisch licht, zonder zijn afkomstig van de donker aangepaste toestand. De verschillende kleuren van de lijn duiden op verschillende lichtbehandelingen. Alle parameters, behalve F_q' , F_v en F_v' , worden gemeten vanaf de baseline (Baker, 2008).....	28
Figuur 11: Regressierechte stikstof inhoud en chlorofyl-index voor mais en tarwe (Training Pathoviewer, 2020)	30
Figuur 12: Data analysis programma met ROI van uitgesneden vegetatie. De ROI werd automatisch bepaald op basis van een minimum chlorofyl-index mask. (Training Pathoviewer, 2020).....	30
Figuur 13: Proefopstelling inoculatie van slabladeren. Van boven naar onder: bevochtigde hydrofiele watten, steriel keukenpapier, halve petriplaat en vanboven het geïnoculeerde slablad.	33
Figuur 14: Pathogeniteit van 16 <i>Botrytis</i> isolaten op slabladeren, na inoculatie met myceliumpluggen (MP5) na 5dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.	38

Figuur 15: Pathogeniteit van 16 Botrytis isolaten op slabladeren, na inoculatie met een sporenoplossing na 5dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.	39
Figuur 16: Correlatie tussen de waarden van de ziekte-index bepaald via 2 methoden van inoculatie: infectie met jonge myceliumpluggen en met een sporenoplossing. De regressierechte door de oorsprong werd berekend met zijn helling. De stippellijn duidt op de bissectrice met volledige correlatie (helling=1).....	39
Figuur 17: Anthocyaan foto's van 3dpi tot 5dpi voor inoculatie B6_2 van de pluggen bij experiment 1. De valse kleurenschaal toont de overgang van lage tot hoge Arildx.....	41
Figuur 18: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 1 voor isolaten B2 en B6 van F_v/F_m , Chlldx en Arildx voor 0 tot 5dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%)...	42
Figuur 19: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 1 voor isolaten B8 en B16 van F_v/F_m , Chlldx en Arildx voor 0 tot 5dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%)...	43
Figuur 20: Pathogeniteit van 16 Botrytis isolaten op slabladeren, na inoculatie met jonge myceliumpluggen (MP_5) na 3dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.	46
Figuur 21: Pathogeniteit van 16 Botrytis isolaten op slabladeren, na inoculatie met oude myceliumpluggen (MP_{13}) na 3dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.	46
Figuur 22: Correlatie tussen de waarden van de ziekte-index bepaald via 2 methoden van inoculatie: infectie met jonge myceliumpluggen (MP_5) en oude myceliumpluggen (MP_{13}) bij experiment 2. De regressierechte door de oorsprong werd berekend met zijn helling. De stippellijn duidt op de bissectrice met volledige correlatie (helling=1).	47
Figuur 23: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 2 voor isolaten B2 en B6 van F_v/F_m , Chlldx en Arildx voor 0 tot 3dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%)...	49
Figuur 24: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 2 voor isolaten B8 en B16 van F_v/F_m , Chlldx en Arildx voor 0 tot 3dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%)...	50
Figuur 27: Stacked boxplot voor pluggen plantenproef 1&2 2018 (Mestdagh, 2019)	54
Figuur 28: Stacked boxplot voor sporen plantenproef 1&2 2018 (Mestdagh)	55
Figuur 26: Anthocyaan foto's bij 5dpi van niet-infecterende sporen inoculaties.....	57

Lijst met afkortingen

Afkorting	Descriptie
AI	Artificiele intelligentie
ANOVA	Analysis of variance
ARI	Anthocyanin reflectance index
Arldx	Anthocyaan index
BR	Basale resistentie
CAT	Catalase
Chlldx	Chlorofyl index
CWDE	Cel wand degradeerbare enzymen
DNA	Desoxyribonucleinezuur
DOF	Depth of field
dpi	Days post inoculation
EC	Electrical conductivity
EMS	Elecktromagnetische straling
FH	Floating hydroponics
F_v/F_m	Maximum quantum efficiency of PSII photochemistry
GEI	Genotype-by-environment interaction
GUI	Graphical user interface
HR	Hypersensitive respons
LED	Light emitting diode
MAMP	Microbe-associated molecular patterns
MGS	Mobiel Goten Systeem
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NDVI	Normalized difference vegetation index
NFT	Nutrient Film Technique
NIR	Near infrared
NOX	NADPH oxidase complexen
NPK	Stikstof, fosfor en kalium
NUV	Near ultraviolet
OAH	Oxaloacetaat acetylhydrolase
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth
POD	Peroxidase
PPFD	Photosynthetic photon flux density

PSII	Photosystem II
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
ROI	Region of interest
ROS	Reactieve zuurstofspecies
SOD	Dismutase
UIPP	Union pour la protection des plantes
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultraviolet
VIB	Vlaams Instituut voor Biotechnologie
VLAM	Vlaams Centrum voor Agro- en Visserijmarketing
WB	Wit + Blauw licht
WFR	Wit + ver-rood licht
WG	Wit + groen licht
WIWAM	Weighing, Imaging & Watering Machines
WR	Wit + rood licht
WY	Wit + geel licht
ZI	Ziekte index

1. Inleiding

Botrytis is een van de meest problematische pathogene schimmels, en is verantwoordelijk voor zware verliezen in een aantal economisch belangrijke gewassen. *Botrytis* soorten hebben een buitengewone variabiliteit in fenotypische eigenschappen. Binnen dit genus is *Botrytis cinerea* uniek door zijn breed gastheerbereik waardoor hij een zeer interessant modelsysteem is voor het bestuderen van necrotrofe pathogenen (Fillinger & Elad, 2016). In de beschutte teelt van sla (*Lactuca sativa* L.) vergroot de hoge luchtvochtigheid de kans op schimmelinfecties door *Botrytis cinerea*. Eerder onderzoek toonde aan hoe lichtspectra de morfologie en pathogeniteit van *Botrytis cinerea* op sla kan beïnvloeden en onderdrukken. Daglicht veroorzaakte oxidatieve stress en tragere myceliumgroei bij de *Botrytis* isolaten maar er was een grote variabiliteit in myceliumgroei en morfologie (Mestdagh, 2019). Sommige isolaten sporuleren enkel in het licht, anderen zijn lichtongevoelig en sporuleren ook in het donker. Een betere kennis van de verschillen tussen de *Botrytis* isolaten en hun pathogeniteit op sla is dus vereist. Door middel van fenotypering kunnen de verschillen in pathogeniteit tussen de verschillende *Botrytis* isolaten beter gekarakteriseerd worden.

De eerste onderzoeksvraag: 'Hoe verschillen de *Botrytis cinerea* isolaten onderling?' gaat verder op het onderzoek van Mestdagh (2019) en tracht de variabiliteit tussen de verschillende *Botrytis* isolaten verder te karakteriseren. De verschillen in pathogeniteit werden nagegaan aan de hand van een infectieproef met mycelium en met een sporenoplossing van 16 *Botrytis* isolaten. De groei en morfologie van de isolaten werden hiervoor 6 dagen *in planta* opgevolgd. Slabladeren werden geïnoculeerd met een myceliumplug of sporenoplossing en werden fenotypisch gekarakteriseerd met een fenotyperingsplatform, de Pathoviewer opgesteld in het Laboratory of Applied Mycology and Phenomics (LAMP). Er werd getracht eventuele verbanden en verschillen te verklaren door middel van de beschreven literatuur.

De tweede onderzoeksvraag: 'Welk effect heeft mycelium ouderdom op de pathogeniteit van *Botrytis*?' gaat na of ouderdom en dus ook groeisnelheid eventueel een deel van de variabiliteit tussen de verschillende isolaten kan verklaren. Hiervoor werden fenotypische pathogeniteitstesten met jong en oud mycelium uitgevoerd. De groei en morfologie van de isolaten werden hiervoor 4 dagen *in planta* opgevolgd. Slabladeren werden ditmaal geïnoculeerd met een 5 dagen (MP₅) of 13 dagen (MP₁₃) oude myceliumplug en werden fenotypisch gekarakteriseerd met de Pathoviewer uit het LAMP.

2. Literatuurstudie

2.1. *Lactuca sativa* L.

2.1.1. Economisch belang

Sla (*Lactuca sativa* L.) is een economisch belangrijk groentegewas. Oorspronkelijk domineerden Europa en Noord-Amerika de markt voor sla, maar tegen het einde van de twintigste eeuw verspreidde de consumptie van sla zich over de hele wereld. De wereldproductie van sla en cichorei samen bedroeg in 2017 27 miljoen ton, hiervan werd 56% door China geproduceerd (FAOSTAT, 2018). In termen van jaarlijkse consumptie per capita komt sla op de tweede plaats na aardappelen. In 2015 bedroeg de jaarlijkse consumptie van sla 11,7 kg per persoon, waarvan 51% kropsla. De slaconsumptie bleef de afgelopen drie jaar vrijwel gelijk, maar ten opzichte van tien jaar geleden daalde ze met ongeveer 20 procent (USDA ERS Yearbook Data, 2016).

In België wordt kropsla in openlucht en onder glas geteeld. Het areaal per teelt vertoont een dalende tendens gedurende de laatste jaren. In 2010 bedroeg het areaal in openlucht 44 ha en onder glas 209 ha. In 2018 daarentegen bedroeg dit in buitenlucht 21 ha en onder glas 142 ha (VLAM, 2019a). De vermarktbaar productie was in 2010 in openlucht 9600 ton en onder glas 47150 ton. In 2018 daarentegen was de productie in openlucht 6750 ton en onder glas 28000 ton (VLAM, 2019b). De totale export aan kropsla bedroeg in 2010 35637 ton en in 2018 nog 23212 ton (VLAM, 2020).

2.1.2. Taxonomie en morfologie van sla

Sla is een eenjarig gewas en behoort tot de composietenfamilie (*Asteraceae*). De wetenschappelijke naam is *Lactuca sativa* L., waarbij 'Lactuca' verwijst naar het melksap dat zich in de plant bevindt. *Lactuca sativa* is een erg polymorfe soort, waarvan de belangrijkste botanische variëteiten zijn:

Lactuca sativa var. *capitata*: kropsla of botersla, ijsbergsla

Lactuca sativa var. *romana*: bindsla, Romeinse sla (ook als var. *longifolia* aangeduid)

Lactuca sativa var. *acephala* (syn *secalina*): Lollo bionda, eikebladsla...

Lactuca sativa var. *augustana*: aspergesla of steelsla (geteeld in China)

(Křístková, Doležalová, Lebeda, Vinter, & Novotná, 2008).

Over het algemeen wordt sla geteeld als bladgroente. In Vlaanderen zijn kropvormende types het meest geteeld en is goede kropvorming dus belangrijk, in praktijk houdt dit in dat de plant niet mag bloeien.

Sla wordt over de hele wereld geteeld, maar groeit het best bij relatief koele temperaturen aangezien de planten vrij sterk reageren op hoge temperaturen en daglengte. Bij sla is morfologisch duidelijk een vegetatieve (kropvorming) en generatieve fase (bloemstengel) te onderscheiden. Na de vegetatieve fase is er een overgang naar de generatieve fase. Hierbij wordt er een onderscheid gemaakt tussen langedag of vroege rassen en dagneutrale of zomerrassen. De langedag rassen zijn geschikt voor de teelt in het voorjaar of de winter. Bij lange dagen (daglengte > 16 h) zullen deze rassen zeer snel bloeien en treedt slechte kropvorming op. Hoge temperaturen en lange dagen bevorderen dus in sterke mate het doorschieten van de plant. De dagneutrale zomerrassen hebben meer licht nodig voor goede kropvorming. Maar ook deze rassen gaan na de vorming van een bepaald aantal bladeren bloeien en uiteindelijk zaad vormen. (De Kraker, Bosch, & Zwanepol, 1994).

Wanneer de plant generatief wordt zal de stengel doorgroeien tot een vertakte bloemstengel van 1 meter hoog. De bloemen zijn zelf bestuivend en na bestuiving worden zaden met vruchtpluis gevormd. *L. sativa* kruist gemakkelijk binnen de soort en met een beperkt aantal andere soorten binnen het geslacht *Lactuca*. Het slazaad kiemt vanaf 2°C en heeft een vrij zwakke kiemkracht, de kieming verloopt optimaal bij 10 tot 18°C. Wanneer de planten voldoende gehard zijn, zijn ze bestand tegen temperaturen rond 0°C, herhaalde blootstelling aan temperaturen onder het vriespunt zal de plant echter beschadigen of doden. Het wortelstelsel bestaat uit een centrale penwortel met korte zijwortels. Sla heeft een relatief hoge waterbehoefte, irrigatie is daarom zeer nodig in de commerciële teelt. Verder worden slaplanten geplaagd door tekorten aan voedingsstoffen waarbij calciumtekort aanleiding geeft tot fysiologische afwijkingen zoals rand, maar ook insecten, schimmels en bacteriën kunnen een slateelt doen mislukken. (De Kraker et al., 1994).

2.1.3. Botersla

In deze thesis wordt gebruik gemaakt van *Lactuca sativa var. capitata* voor de experimenten, deze variëteit is beter bekend als botersla of kropsla. De botersla variëteit is gekend om zijn zachte, boterachtige bladeren die zeer losse 'hoofden' vormen. De bladeren hebben een milde, zoete en sappige smaak en kunnen in kleur variëren van lichtgroen tot purperrood afhankelijk van het aantal natuurlijke anthocyaan pigmenten (flavonoïden). Ijsbergsla is een andere variëteit die ook onder de *capitata* variëteit valt, ijsbergsla is beter houdbaar dan de 'gewone kropsla' en heeft een vrij knapperig blad.

In het onderzoek worden twee rassen, *Lucrecia* en *Presteria* gebruikt. Beide rassen zijn groene botersla types geproduceerd door Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V. (Nederland). *Lucrecia* is een royaal voorjaars- en zomertype. Het is een snellere groeier met een mooi gesloten onderzijde en makkelijk oogstbaar. *Lucrecia* heeft minder last van zijscheuten en is zeer uniform. Het ras heeft hoge resistentie tegen *Bremia lactuca* of valse meeldauw, groene slaluis en wortelluis. *Presteria* daarentegen is een royaal vroeg herfst- en voorjaarsras. Het is een snelle groeier met een sterk wortelgestel, mooi gesloten onderzijde en klein snijvlak. Het ras heeft hoge resistentie tegen *Bremia lactuca* en wortelluis (rijkzwaan.be, 2020).

Beide rassen werden vergeleken in een rassenproef op Inagro met het standaardras Gardia. Deze proef werd uitgevoerd onder glas in de vroege lente van 2017. *Lucrecia* en *Presteria* werden samen met het standaard ras vergeleken voor hun opbrengst, voor verschillende kwaliteitsparameters en voor hun gevoeligheid voor ziektes. Hierna wordt gefocust op de resultaten tegen ziekteverwekkers en op de fysiologische afwijkingen (Tabel 1). Bij geen enkel ras was smet aanwezig bij de oogst, smet is een verzamelnaam voor ziekten veroorzaakt door verschillende pathogenen, *Sclerotinia* (rattenkeutelziekte), *Rhizoctonia* (zwartpoot) en *Botrytis* (smeul). De hoeveelheid rand en droogrand was beperkt tot onbestaand maar geel onderblad was wel in grote mate aanwezig bij alle rassen, maar er werden geen significante verschillen tussen de rassen waargenomen (Demeulemeester, Bleyaert, & Versyck, 2017).

Tabel 1: Rassenproef bij 3 kropslarassen voor smet (waaronder *Botrytis*) en fysiologische afwijkingen zoals geel blad, rand en droogrand (Demeulemeester et al., 2017).

Nr	Object	Smet		Geel blad		Rand		Droogrand	
1	Gardia	9,0	a	6,6	a	9,0	a	8,9	a
2	Lucrecia	9,0	a	6,6	a	8,9	a	8,4	a
3	Presteria	9,0	a	6,4	a	9,0	a	8,9	a
	Gemiddeld	9,0		6,5		9,0		8,7	
	KWV	0		0,63		0,31		0,77	
	VC (%)	0		4,41		1,61		4,09	
	p-waarde Factor1	0,422		0,422		0,422		0,183	
	9=	Geen		Geen		Geen		Geen	
	1=	Veel		Veel		Veel		Veel	

2.1.4. Teeltsystemen onder glas in België

In België verloopt de slateelt voornamelijk onder glas, deze barrière zorgt voor een controleerbaar klimaat met omstandigheden die gunstig zijn voor de planten zoals een minder variabele temperatuur. Verder zorgt de barrière ook reeds deels voor de afscherming tegen schadeverwekkers. De drie meest gebruikte teeltsystemen onder glas zijn normale grondgebonden serreteelt, FH-teelt (Floating Hydroponics) en NFT-teelt (Nutrient Film Technique) (Mestdagh, 2019). De grondgebonden serreteelt is gevoelig aan grondgebonden ziekten zoals *Fusarium*, *Pythium*, etc. maar ook *Botrytis*. Daarom is een goede bodemontsmetting zeer belangrijk bij deze teelttechniek. Het grootste voordeel aan grondgebonden teelt is dat de grond een grote bufferwerking heeft, daarom is deze techniek minder gevoelig aan fouten bij het doseren van voeding (terracult.com, 2020).

De FH-teelt is een hydroponische teeltvorm, plantjes worden in een inert materiaal zoals rotswol gezaaid en drijven in water dat alle voedingsstoffen bevat. Bij deze techniek is aeratie met een luchtpomp noodzakelijk zodat de wortels zuurstof krijgen en de nutriënten in het water niet stagneren. Door de hogere luchtvochtigheid van deze techniek vergroot het de kans op schimmelinfecties zoals *Botrytis*, en moet de luchtvochtigheid via klimaatsturing sterk gecontroleerd worden (scienceinhydroponics.com, 2009). Deze teelttechniek is in België slechts beperkt toegepast.



Figuur 1A: Floating Hydroponics teelt. Figuur 1B: Nutrient Film Technique teelt met Mobiel Goten Systeem van Hortiplan, voorbeeld van vergrotende tussenplantafstand.

NFT-teelt is een andere hydroponische teeltvorm waarbij de plantjes in goten staan en een constant lopende waterfilm voor de watertoevoer zorgt. Door recirculatie wordt het water en

de voedingsstoffen hergebruikt na eventueel filteren of aanpassen van de voedingsstoffen. De turbulentie van de waterfilm zorgt reeds deels voor aeratie van de wortels maar een extra aeratie pomp in het reservoir is aanbevolen (scienceinhydroponics.com, 2009). Een relatief nieuw systeem is het Mobiel Goten Systeem (MGS) van Hortiplan, hiermee kan de tussenplantafstand tijdens de teelt zelf vergroot worden naarmate de planten zelf groeien (hortiplan.com, 2020). Zo wordt de teeltoppervlakte steeds optimaal benut. Opnieuw moet rekening gehouden worden met de hogere luchtvochtigheid van hydroponische technieken. Het MGS systeem is in België de belangrijkste hydroponische teelttechniek.

2.1.5. Teelt onder LED's

Recent onderzoek richt zich op het gebruik van LED's als extra lichtbron voor de serreteelt. Extra belichting en toenemend gebruik van LED's worden in de hydroteelt van sla toegepast. LED's zijn niet alleen veel energiezuiniger en duurzaam, ze bieden ook veel andere mogelijkheden zoals het onderling aanpassen van de golflengte en/of lichtregime. Dit heeft gevolgen voor de morfologie en gevoeligheid van de plant en zijn schadeverwekkers. Zo kan bijvoorbeeld een verbeterde roodverkleuring bekomen worden van de rode slasoorten met hoge hoeveelheid anthocyaan pigmenten bij bepaalde LED spectra. LED's geven de mogelijkheid om specifieke golflengtes die minder bijdragen tot de groei van de plant uit te schakelen en zo energie te besparen. De LED-lampen kunnen ook dichter tegen de plant geplaatst worden dan andere assimilatielampen (hoge druk natriumlampen), ze leveren namelijk zeer hoge lichtintensiteiten en relatief weinig warmteafgifte. De LED's moeten dan wel gekoeld worden maar dit valt ook te recupereren. Bij Slamotra, een hydroteelt slabedrijf in Kruibeke, worden de LED-lampen watergekoeld in een gesloten systeem. Via een warmtewisselaar kan deze warmte dan bijvoorbeeld gebruikt worden om het hydroponisch reservoir of goten te verwarmen en zo het microklimaat van de planten te verbeteren.

Morfologische effecten van spectrale lichtkwaliteit

Onderzoek door Yorio et al. (2001) toonde aan dat enkel rood licht voor de slaplanten nadelig is voor de opbrengst, bij toevoeging van blauw licht werd een normale opbrengst bekomen. Chen et al. (2015) onderzocht de effecten van de additie van een specifieke LED kleurspectra bij wit licht op sla planten. Zo werd W (wit licht) vergeleken met WB (wit + blauw), WG (wit + groen), WY (wit + geel), WR (wit + rood) en WFR (wit + ver-rood). Er werd een duidelijk hogere opbrengst van 163.2% en een hogere chlorofyl inhoud bekomen voor de planten onder WR licht. Dit wijst erop dat rood licht dus een positief effect heeft wanneer het in een hogere mate aanwezig is dan de andere golflengten. Voor de planten onder het WB licht werd ook een hogere opbrengst bekomen van 121.7% en een hogere chlorofylinhoud maar er was wel dwerggroei. Bij het WFR licht daarentegen werd er een lagere opbrengst bekomen van 64.1%. Het WG en WY licht zorgde niet voor significante verschillen in opbrengst.

2.1.6. Abiotische stress

Een studie door Weiguo et al. (2012) ging het effect van lichtstress op de antioxidatieve enzymactiviteit, opbrengst en kwaliteit van Romeinse sla na. Stress resulteert in de productie en accumulatie van reactieve zuurstofspecie (ROS). Een verdedigingsmechanisme tegen de oxidatieve schade door ROS zijn o.a. enzymatische antioxidanten zoals superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) en peroxidase (POD). Het effect van vier lichtintensiteiten, uitgedrukt in *photosynthetic photon flux density* (PPFD), werd vergeleken volgens de respons van de antioxidatieve enzymactiviteit. Er werden geen significante verschillen waargenomen voor de 100, 200 en 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ behandelingen. Lichte stress werd waargenomen bij de 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ behandeling en ernstige lichtstress trad op in de 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ behandeling.

Andere vormen van abiotische stress gaan ook gepaard met een stijging in antioxidanten. Kang & Saltveit (2002) voerden een studie uit naar het verwonden van ijsbergsla en Romeinse sla en de resulterende toename in antioxidanten en fenolverbindingen. De antioxiderende capaciteit van het weefsel nam toe na verwonding, deze toename was lineair gecorreleerd met de toename aan fenolverbindingen in ijsbergsla ($R^2 > 0,97$) en Romeinse sla ($R^2 > 0,95$) bladweefsel.

2.1.7. Biotische stress en resistentie verbetering

Maar antioxidanten zijn ook noodzakelijk voor de basale resistentie tegen biotische stress. Volgens AbuQamar et al. (2017) zijn verbeteringen van de basale resistentie gemedieerd door hormonale paden, ROS en antioxidanten nodig voor de verdediging van planten tegen *Botrytis cinerea*.

De basale resistentie (BR) of aangeboren immuniteit, is de eerste lijn van afweer. BR kan worden geactiveerd wanneer plantencellen *microbe-associated molecular patterns* (MAMP) herkennen zoals lipopolysacchariden, eiwitten of celwandcomponenten. Als een ziekteverwekker in staat is om de basale weerstand te onderdrukken, kunnen planten reageren met de *hypersensitieve respons* (HR). HR wordt gekenmerkt door apoptose of celdood van plantencellen op de infectieplaats om zo de rest van de plant te redden. De HR wordt vaak geactiveerd door effector eiwitten en is meer pathogeen-specifiek (Freeman & Beattie, 2008).

De HR kan gebruikt worden om gericht de resistentie prestaties van planten te verbeteren tegen specifieke pathogenen. De gastheer en ziekteverwekker vertonen een gen-omr-gen relatie waarbij een specifiek avirulentie gen (*Avr*) van de ziekteverwekker codeert voor een avirulentie eiwit dat herkent wordt door een resistentie eiwit van de gastheer dat het genproduct is van een resistentie gen (*R*). Dit resulteert meestal in apoptose op de plaats van infectie. *Omic* studies zoals *transcriptomics*, *proteomics*, *metabolomics* en *functional genomics* maken het mogelijk gericht naar deze kandidaat-genen te zoeken. Met deze genen kunnen strategieën voor gewasresistentie ontwikkeld worden door middel van gerichte kruisingen of een transgene aanpak. Deze strategie is echter niet effectief tegen necrotrofe pathogenen zoals *Botrytis cinerea*. In tegenstelling tot biotrofen kunnen necrotrofen zich ontwikkelen op dood weefsel. Een alternatief is het ontwikkelen van transgene planten die bepaalde enzymen produceren die de cel wand van schimmels kunnen hydrolyseren (AbuQamar et al., 2017).

2.2. *Botrytis* spp.

2.2.1. Economisch belang

Botrytis spp. zijn verantwoordelijk voor zware verliezen in een aantal economisch belangrijke gewassen in de tuinbouw en sierteelt. *Botrytis* soorten zijn in staat om een 200 plantenfamilies

te infecteren (Fillinger & Elad, 2016). De meeste ziekteverwekkers beperken zich tot ofwel monocotylen ofwel dicotylen en hebben dus een beperkt gastheerbereik. *Botrytis cinerea* en in mindere mate *Botrytis pseudocinerea* zijn een uitzondering op deze regel en hebben een breed gastheerbereik.

De totale markt aan *Botrytis* specifieke fungiciden was 540 miljoen euro waard in 2001, dit is 10% van de wereldwijde fungicidemarkt (UIPP, 2002). De grootste investering in *Botrytis* bescherming is te vinden bij hoogwaardige gewassen, zo vertegenwoordigt de druiventeelt 50% van de totale *Botrytis*-fungicidemarkt, bladgroenten daarentegen vertegenwoordigen maar 5%. De gemiddelde kosten voor de bescherming van alle gewassen in alle landen tegen *Botrytis* is ongeveer €40/ha, maar dit is afhankelijk van het te beschermen gewas. Deze hoge kosten in vergelijking met bescherming tegen andere ziekteverwekkers is te wijten aan de hogere waarde van de gewassen en de specificiteit van de werkzame stoffen. (Steiger, 2007). In de wijnindustrie zijn *Botrytis*-infecties van druiven onwenselijk omdat de schimmel deels verantwoordelijk lijkt te zijn voor de *off-flavors* en slechte bewaarbaarheid van de resulterende wijn, de schimmels *Aspergillus* en *Penicillium* die vaak samen voorkomen met *Botrytis cinerea* hebben hier ook een aandeel in (Fillinger & Elad, 2016).

2.2.1. Taxonomie en levenscyclus

Botrytis is een zeer divers geslacht dat 30 soorten omvat. Het laatste decennia zijn er 7 nieuwe soorten, een hybride en een soortencomplex geïdentificeerd door middel van nieuw onderzoek met fylogenetische merkers. Het *Botrytis* geslacht behoort tot de Ascomycete fungi van de Leotiomycetes klasse, Helotiales orde en Sclerotiniaceae familie. De belangrijkste en best beschreven soorten zijn:

Botrytis allii: veroorzaakt nekrot in bewaarde uien (*Allium* genus)

Botrytis cinerea: belangrijkste soort; infecteert zowel monocotylen als dicotylen, gymnospermen, pteridofyten, bryofyten en macroalgen

Botrytis elliptica: veroorzaakt *Lily Gray Mold* in ware lelies (*Lilium* genus)

Botrytis fabae: veroorzaakt chocoladevlekkenziekte in bonenplanten (*Vicia* genus)

Botrytis squamosa: veroorzaakt bladziekte (*leaf blight*) op uien (*Allium* genus)

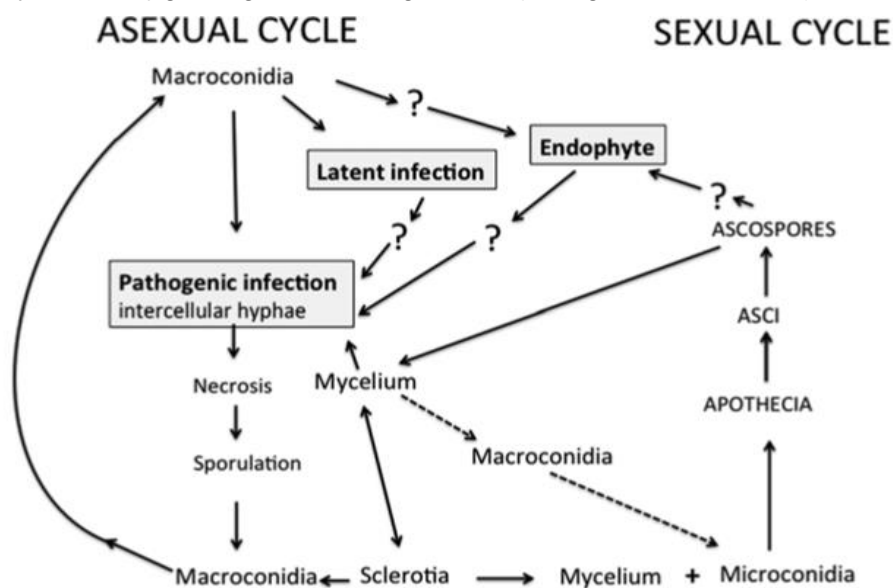
(Fillinger & Elad, 2016).

Levensstijl en voortplanting

Botrytis spp. werden lang als uitsluitend necrotrofe ziekteverwekkers beschouwd, maar bepaalde soorten kunnen als endofyten of endosymbionten aanwezig zijn in de plant zonder het opwekken van ziektesymptomen. Recent werd een nieuwe soort ontdekt, *Botrytis deweyae* die normaal als endofyt groeit in daglelies (*Hemerocallis* genus) maar facultatief pathogeen gedrag kan vertonen. De mogelijke overgang van endofytische ontwikkeling naar necrotrofie maakt de infectiecyclus complexer en de beheersing van *Botrytis* nog ingewikkelder. (Van Kan, Shaw, & Grant - Downton, 2014).

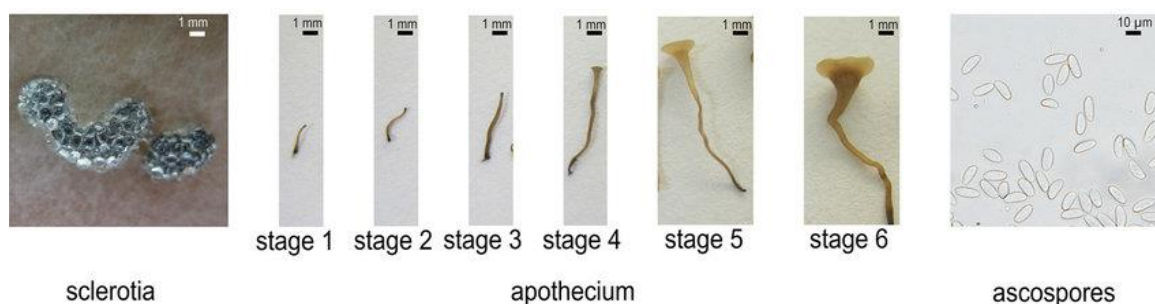
Botrytis wordt voornamelijk met zijn anamorfe (aseksuele fase) naam aangeduid omdat de aseksuele vorm het meeste wordt waargenomen. In de aseksuele fase produceren de meeste *Botrytis* soorten talrijke conidia aan de uiteinden van vertakte conidioforen. Deze vertakte conidioforen of botryose zijn morfologisch kenmerkend voor alle *Botrytis* spp. en zijn dan ook de reden voor hun naam. De conidia hebben een korte overlevingsduur die beïnvloed wordt door temperatuur, luchtvochtigheid en zonlicht. In ongunstige omstandigheden zoals de winter worden sclerotia gevormd, dit is een compacte massa aan gehard mycelium met

voedselreserves. Deze sclerotia kunnen enorm variëren in grootte en zullen opnieuw ontkiemen tot mycelium bij gunstige condities. Wanneer de omstandigheden echt extreem zijn zoals droogte of hoge temperatuur kunnen verdikte chlamyosporen worden gevormd. Ook deze overlevingsstructuren kunnen enorm variëren in grootte en vorm en ontkiemen tot mycelium bij gunstige omstandigheden. (Fillinger & Elad, 2016).



Figuur 2: Schema van de levenscyclus van *Botrytis cinerea* met reeds gekende en nog onzekere interacties tussen de verschillende groeifases (Fillinger & Elad, 2016).

De seksuele fase daarentegen wordt zelden waargenomen. De teleomorf (seksuele fase) wordt aangeduid met de naam *Botryotinia*. De seksuele voortplanting is meestal heterothallic en heeft dus de 2 mating types nodig, hierbij fungeren de microconidia als spermatia en kunnen ze de productie van het apothecia in asexueel sclerotia induceren. De microconidia zelf kunnen geproduceerd worden na kieming van de macroconidia of via endogene formatie in oude hyfen van het mycelium. Het gevormde apothecia of vruchtlichaam genereert de asci en de uiteindelijke ascosporen. (Fukumori, Nakajima, & Akutsu, 2004).



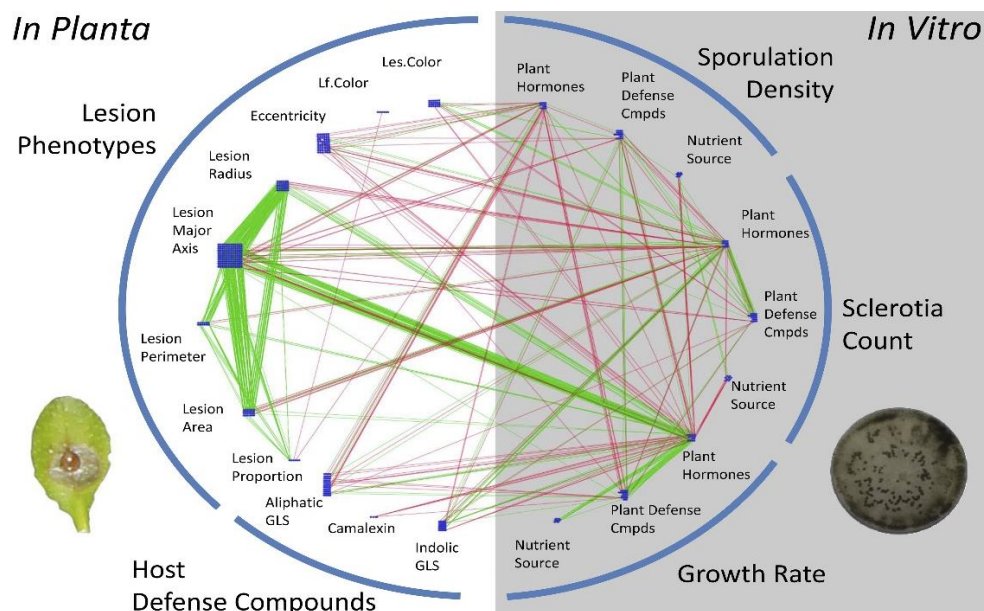
Figuur 3: Stadia van de seksuele voortplanting in *Botrytis cinerea*. Bevruchte sclerotia; Vorming apothecium: opkomst primordia (1), uitbreiding primordia (2), uitbreiding steel (3), steel met gezwollen uiteinde (4), onrijp apothecium (5) en rijp apothecium met asci en ascosporen (6); Vrije ascosporen. (Rodenburg, 2018).

Diversiteit binnen genus en species

Botrytis is een zeer divers genus, het laatste decennia werden er heel wat nieuwe soorten ontdekt en waarschijnlijk bestaan er nog vele onbeschreven soorten. De huidige taxonomische classificatie is grotendeels gebaseerd op morfologische eigenschappen zoals grootte en vorm van de conidia, de fysiologie en de voorkeur van gastheer. Een onderzoek door Staats, van Baarlen, & van Kan (2005) ging na of de moleculaire fylogenie van het genus overeenkomt met de classificatie op basis van morfologie. Drie eiwit coderende genen (*RPB2*, *G3PDH* en *HSP60*) werden onderzocht. Ook met de seksuele voortplanting en gastheer voorkeur werd

rekening gehouden. Er werd gevonden dat de huidige classificatie zeer goed overeen kwam met de moleculaire gegevens. Het *Botrytis* genus kon in twee grote groepen worden verdeeld, de eerste klade bevat vier soorten met uitsluitend dicotyle gastheren en de tweede groep bevat soorten met dicotyle en monocotyle gastheren. Verder werden enkele belangrijke evolutionaire gebeurtenissen geïdentificeerd. De hybride status van *Botrytis allii* werd bevestigd. Als gevolg van negatieve selectie is het verlies van seksuele voortplanting minstens drie keer gescheiden voorgekomen. Er is geen cospecië van gastheer en ziekteverwekker opgetreden maar wel mogelijk gastheerverschuivingen.

Verder is er ook zeer veel variatie binnen de soorten zelf. Een onderzoek door Corwin et al. (2016) ging de relatieve bijdrage van plasticiteit en genetische diversiteit op het fenotype van *Botrytis cinerea* na. De plasticiteit is een evolutionaire aanpassing aan de omgevingsvariatie. Het is redelijk voorspelbaar en stelt een individu in staat om zijn fenotype aan verschillende omgevingen aan te passen binnen zijn levensloop. In de studie werd een populatie van 15 *Botrytis cinerea* isolaten genomen, deze werden over heel de wereld onder verschillende *in vitro* en *in planta* condities opgevoed. De fenotypische verschillen tussen de isolaten onder *in planta* condities werden vooral bepaald door de combinatie van genotypische variatie en omgevingsvariatie. De verschillen onder *in vitro* condities daarentegen werden voornamelijk bepaald door de genetische variatie. Aan de hand van een correlatienetwerk werd gevonden dat de volledige fenotypische variatie binnen *Botrytis cinerea* gecontroleerd wordt door genetische variatie, de omgevingsvariatie en de variatie afkomstig van de interactie genotype x omgeving. In toekomstige studies moet meer rekening gehouden worden met de genetische variatie en de omgevingsvariatie.



Figuur 4: Correlatienetwerk voor de *in vitro* en *in planta* model gecorrigeerde eigenschapsgemiddelden van *Botrytis cinerea*. Alle rechten staan voor een Pearson's correlatie > 0.95, de groene rechten staan voor positieve correlaties en de rode voor negatieve. (Corwin et al., 2016).

2.2.2. Infectie door *Botrytis cinerea*

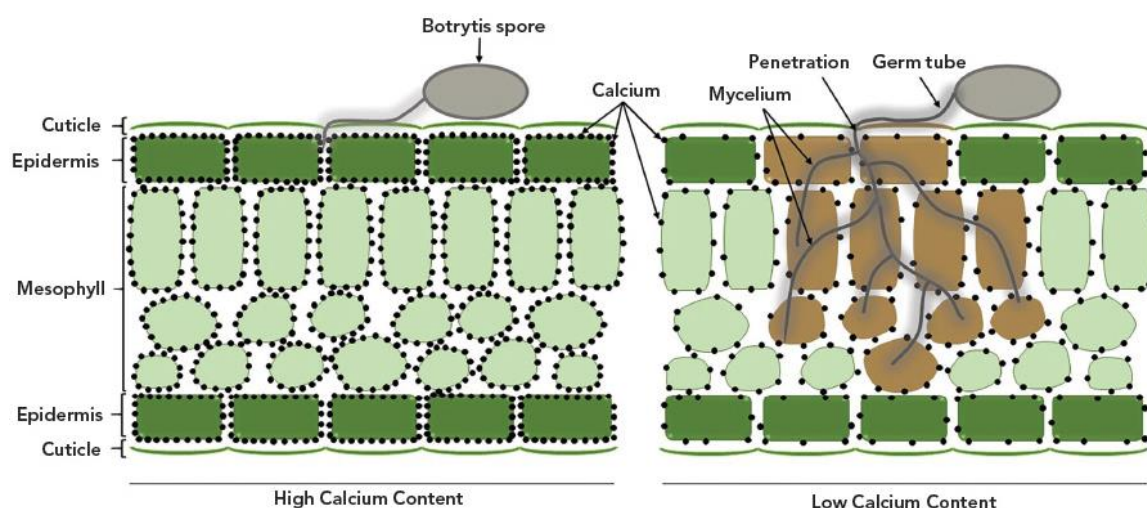
Botrytis cinerea is een necrotrofe schimmel die plantencellen volledig dood. Pas na dood van de cellen zal hij de cel componenten zelf gebruiken voor groei en reproductie.

Penetratie door middel van lytische enzymen

De infectie start met de vorming van een speciale hyfe of kiembuis. Voor het doorbreken van de cuticula en epidermale cellen zijn lytische enzymen of celwand degradeerbare enzymen

(CWDE) nodig (AbuQamar et al., 2017). Deze extracellulaire enzymen worden gesecreteerd door de schimmel en maken het mogelijk dat de kiembuis en verder uitgroeiende hyfen de celwanden van het plantenweefsel penetreren. Penetratie is mogelijk in gezond weefsel, of kan vergemakkelijkt worden door infectie via de stomata of aanwezige wonden op het plantenweefsel.

Botrytis cinerea produceert 132 CWDE's die de structurele polysachariden van de celwand kunnen afbreken. Hiervan zijn er 20 voor de afbraak van cellulose, 34 voor hemicellulose, 13 voor de zijketens van hemicellulose of pectine, 38 voor pectine zelf en tot slot 27 plant of schimmel CWDE's (Valero-Jiménez, Veloso, Staats, & van Kan, 2019). In vergelijking met andere *Botrytis* spp. maakt *cinerea* het grootste aantal CWDE's aan voor elke subgroep met uitzondering van de hemicellulose CWDE's waarvan *Botrytis elliptica* er meer aanmaakt (36). Dit is geen verrassing aangezien *Botrytis cinerea* ook het hoogste aantal genen voor hydrolase activiteit bezit (ca. 230) (Heard, Brown, & Hammond-Kosack, 2015).



Figuur 5: Schematische doorsnede van *Botrytis cinerea* geïnfecteerd blad met hoge of lage calcium concentratie (Bennett, 2018).

Tot deze 38 pectine CWDE's behoren twee endopolygalacturonasen (pectine depolymerase) BcPG1 en BcPG2 waarvan eerder aangetoond werd dat deze noodzakelijk zijn voor volledige virulentie (Kars et al., 2005). Recent onderzoek door Sasanuma et al. (2016) toonde aan dat een calciumbehandelingen de activiteit van polygalacturonase en CMCCase (endoglucanase dat amorf cellulose kan afbreken) significant kan verlagen in het late groeistadium. Dit werd getest door *Botrytis cinerea* in-vitro te kweken op calciumhoudend medium. Calcium speelt een belangrijke rol bij de vorming van dwarsbruggen voor de sterkte van de celwand. Exogeen aangebracht calcium daarentegen stabiliseert de celwand van de plant en beschermt deze tegen CWDE's. Bovendien heeft calcium directe effecten op pectinasen en de celwand van *Botrytis cinerea*.

Uitlokken van oxidatieve uitbarsting

Reactieve zuurstofcomponenten (ROS) spelen een fundamentele rol in plant - pathogeen interacties. Planten bezitten een evolutionair verdedigingsmechanisme dat gekend staat als de hypersensitieve respons (HR) (zie 2.1.7: Biotische stress en resistentie verbetering). Als reactie op een ziekteverwekker kan de plant grote hoeveelheden waterstofperoxide aanmaken. Waterstofperoxide is een ROS en is in staat om zeer gemakkelijk componenten van de plantencel te oxideren, deze oxidatieve uitbarsting resulteert in geprogrammeerde celdood. De hypersensitieve respons wordt verondersteld de ziekteverwekker van zijn voedsel te

beroven en zo te beperken tot zijn huidige infectieplaats. Echter verhoogt HR enkel de weerstand tegen biotrofe pathogenen, en begunstigt het necrotrofen zoals *Botrytis cinerea* aangezien zij dood weefsel als voedingsbron gebruiken. (Govrin & Levine, 2000)

Een onderzoek door Rossi et al. (2017) onderzocht de rol van chloroplastische ROS in de verdediging van planten tegen *Botrytis cinerea*. De relatieve bijdrage van verschillende ROS bronnen aan de plantenresistentie is echter nog niet volledig gekend. In het onderzoek werd een *Nicotiana tabacum* lijn met transgeen plastide gericht flavodoxine (pflid lijn) vergeleken met het wild-type bij infectie met *Botrytis cinerea*. Deze transgene pflid lijn vertoont een lagere accumulatie aan chloroplastische ROS als reactie op stress. De pflid lijn vertoont aanzienlijk minder weefselschade en schimmelgroei v en het is dus duidelijk dat ROS gegenereerd in de chloroplast een belangrijke rol speelt. Verder laat dit onderzoek zien dat de modulatie van chloroplastische ROS door middel van een heteroloog antioxidant eiwit een significante bescherming kan bieden tegen necrotrofe infecties.

Botrytis cinerea zal ook zelf ROS produceren, deze zijn cruciaal in het ontwikkelingsproces van de schimmel en dienen onder andere als signalisatie componenten onder complexe controle. Schimmels bezitten verder ook NADPH oxidase complexen (NOX). Dit complex is betrokken bij de seksuele differentiatie en virulentie, maar draagt niet veel bij tot de totale hoeveelheid ROS. NOX heeft waarschijnlijk ook een rol in het timen van ROS pieken. (Heller & Tudzynski, 2011).

Productie van oxaalzuur

Verder produceert *Botrytis* ook oxaalzuur om zo de pH van zijn omgeving te optimaliseren. Door de omgevings pH meer naar het pH optimum van de verscheidene pathogeniteitsfactoren te brengen kan hun activiteit verhoogt worden. Oxaalzuur speelt verder ook een rol in het vastleggen van calcium uit de gastheercelwanden onder de vorm van calciumoxalaatkristallen, dit verzwakt de celwanden waardoor de activiteit van polygalacturonase zal verhogen. Ook wordt de pH aanpassing gebruikt om de oplosbaarheid van voedingsstoffen in de bodem te verbeteren. (Dutton & Evans, 1996).

Een studie door Han et al. (2007) onderzocht de oxalaat pathway. Oxalaat wordt gevormd via de hydrolyse van oxaloacetaat door oxaloacetaat acetylhydrolase (OAH). Door middel een opzettelijke verstoring van het *Botrytis cinerea* oahA-gen werd aangetoond dat uitsluitend dit gen verantwoordelijk is voor de oxalaatvorming. Verder werd er ook een OAH-remmer ontdekt, het strak bindende 3,3-difluoroxaloacetaat zou via cellulaire opname de productie van oxalaat en zo ook de pathogeniteit van schimmels kunnen verminderen.

Productie van secundaire metabolieten

Botrytis cinerea produceert ook tal van fytoxische secundaire metabolieten. Acht families aan secundaire metabolieten zijn reeds uit mycelium geïsoleerd. Hiervan zijn de twee belangrijkste botcinic zuur en botrydial, waarvan botrydial ernstige chlorose veroorzaakt en zo bij de penetratie helpt. In het volledige genoom werden 40 gen clusters ontdekt voor de synthese van verscheidene andere metabolieten zoals polypeptiden, terpenen, niet-ribosomale peptiden en ook alkaloiden. Er is geen bewijs dat *Botrytis cinerea* gastheer specifieke toxinen produceert (Collado & Viaud, 2016).

2.2.3. Interessante stammen beschreven in de literatuur

Stam R16.

Resultaat van de kruising SAS56 x SAS405 in een onderzoek door Faretra & Pollastro (1991) naar de resistentie tegen benzimidazool en dicarboximide fungiciden in *Botryotinia fuckeliana*. De voorouders SAS56 en SAS405 zijn ascospore nakomelingen van veldisolaten die geïsoleerd werden van druif (Faretra, Antonacci, & Pollastro, 1988). In deze thesis wordt naar de kruising tussen SAS56 en SAS405 verwezen als B1.

Stam B05.10.

In een onderzoek door Büttner et al. (1994) werd de haploïde B05.10. stam bekomen door behandeling van de ascospore SAS56 lijn (polyploid) met benomyl. Voor de haploïde derivaten werd een verhoogde gevoeligheid voor mutagene stoffen als UV en EMS bekomen. Een RAPD analyse wees op een zeer beperkte mate van heterozygose van de moederstam SAS56. In deze thesis wordt naar de haploïde B05.10. stam verwezen als B6.

Stam Bd90.

Een wild-type stam die geïsoleerd werd van druif uit INRA Bordeaux. Naar deze stam wordt het eerst in de literatuur verwezen door Hamada et al. (1994) waar hij gebruikt werd voor transformatie met het hygromycine B-resistentiegen, hph. Protoplasten van Bd90 werden getransformeerd met het pAN7-1 plasmide, dit plasmide bevat het hygromycine fosfotransferasegen (hph) van *Escherichia coli* downstream van een *Aspergillus nidulans* promotor. Transformanten vertoonden fosfotransferase activiteit en bleven stabiel na enkele subculturen zonder selectieve druk. In deze thesis wordt naar de wild-type Bd90 verwezen als B2.

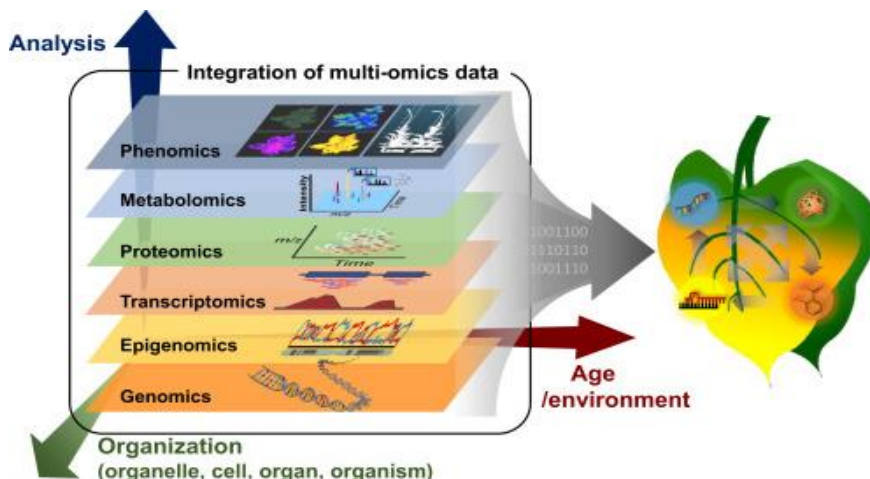
Stam A336.

Mutant van Bd90 verkregen door insertiemutagenese (Ph Reignault et al., 2000). Deze mutant is niet pathogeen maar is nog steeds in staat zijn om de gastheerplant te penetreren. Door zijn oxaalzuur-deficiëntie verschilt hij van alle tot nu toe beschreven niet-pathogene *Botrytis cinerea* mutanten. Onderzoek door Kunz et al. (Kunz et al., 2006) ondervond dat de mutante A336 een sterkere plantverdedigingsreactie uitlokt dan wilt-type Bd90. Wanneer mutant en wild-type cultuur filtraten gebruikt werden om druivenbladeren te behandelen werd een veel hogere concentratie aan ROS (H₂O₂) gevonden bij de mutante A336. In deze thesis wordt naar deze stam verwezen als B7.

2.1. Fenotypering

De mens is afhankelijk van planten voor zijn voeding, door klimaatsverandering en populatie groei is er een steeds stijgende behoefte aan gewassen. De productie van gewassen zal moeten verdubbelen tegen 2050 om aan de stijgende eisen van de wereldbevolking te voldoen. Om deze verdubbeling mogelijk te maken is een stijging in gewasproductie van 2,4% per jaar nodig wat momenteel niet behaald wordt (Ray, Mueller, West, & Foley, 2013). Veredeling en het introduceren van productievare rassen of van resistente rassen is één mogelijkheid om de gewasproductiviteit te verhogen. Anderzijds kan men via teelttechnieken trachten om zowel biotische (ziekten, plagen) als abiotische (droogte, voedingstekorten,..) verliezen te verlagen. Zowel in veredelingsonderzoek als bij een meer gerichte toepassing van bijvoorbeeld gewasbeschermingsmiddelen of bij het detecteren van een beginnende infectie kunnen nieuwe 'image based' technologieën behulpzaam zijn. De snelle ontwikkeling en automatisering van 'image based' technologieën hebben geleid tot een nieuwe onderzoeksdiscipline die men phenomics noemt.

Phenomics kan gedefinieerd worden als het onderzoeksveld dat zich richt op het meten en analyseren van de verzamelingen aan fenotypes. Zo meet men kwantitatieve en kwalitatieve eigenschappen op cel-, orgaan-, plant- en populatieniveau voor het verfijnen en karakteriseren van een fenotype. De daaropvolgende fenomische analyse verwijst naar het evalueren en zoeken naar patronen en relaties tussen genotype-fenotype of tussen individuen met verwante fenotypen. Door de grote variabiliteit bij gewassen wordt er bij het fenotyperen gefocust op high-throughput en big-data. Dit doet men door op een intelligente en automatische manier te meten.



Figuur 6: Multi-dimensionale benaderingen naar principes van plant senescence (Kim, Woo, & Nam, 2016).

Gewasfenotypen zijn het resultaat van een niet evidente interactie tussen genotypes (G) en een of meerdere envirotypes (E). Envirotyping wordt hierbij voorgesteld als een derde typing-technologie, het is de reeks aan exogene omgevingsfactoren die het fenotype beïnvloeden. Omgevingsfactoren worden verzameld door middel van milieuonderzoeken, klimaatdata, geografische gegevens, bodemmetingen en de evaluatie van andere organismen die invloed hebben. Envirotyping draagt zo bij aan de gewasmodellering en het voorspellen van fenotypes door middel van de genen die reageren op de omgevingsignalen, abiotische en biotische stress en *genotype-by-environment interaction* (GEI) (Xu, 2016). Deze interactie tussen genotypes en envirotypes heeft niet alleen invloed op het groeiproces van gewassen en hun ontwikkeling maar ook op het functioneren van de plant zoals bepaald door zijn fysiologische

responsen (bvb fotosynthese, celstrekking,...). De interne fenotypen van de plant bepalen op hun beurt de externe fenotypen zoals biomassa, morfologie en gewasopbrengsten.

Onderzoek naar *Crop Phenomics* is een samenwerking tussen agronomie, biowetenschappen, ingenieurwetenschappen, informatica en wiskunde. Nieuwe computertechnologieën zoals artificiële intelligentie (AI) maken de complexe integratie van al deze parameters mogelijk.

2.1.1. Pathoviewer

De Pathoviewer bestaat uit 2 grote componenten, de PhenoMate en de WIWAM xy. De WIWAM xy is een robot die instaat voor de high-throughput mogelijkheden en de reproduceerbaarheid van de fenotypering, hij is het resultaat van intensieve samenwerking tussen het SMO en het Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB). De WIWAM xy die voor de Pathoviewer gebruikt wordt bestaat uit een robotarm, een pot positioneringstafel en de artificiële belichting voor de planten. Aan de robotarm is de PhenoMate voor de beeldvorming verbonden, de robotarm kan op regelmatige tijdstippen over de positioneringstafel rijden en van individuele planten de vooraf ingestelde analyses uitvoeren. De te analyseren planten worden ingesteld op het WIWAM programma aan de hand van het coördinatensysteem van de positioneringstafel.



Figuur 7: WIWAM xy robotarm en positioneringstafel (wiwam.be, 2020)

Verder wordt ook de artificiële belichting geregeld door het WIWAM programma, ook de omgeving kan gemonitord worden door de integratie van licht-, temperatuur- en vochtigheidssensoren. Dit zorgt voor een gedetailleerde registratie van de experimentele groeiomstandigheden. Het complete systeem wordt geïmplementeerd in een groeikamer en hierdoor kunnen omgevingsparameters constant gehouden worden. De WIWAM xy is dus een robot met bijbehorend besturingsprogramma die het mogelijk maakt veel handmatige handelingen te automatiseren op reguliere tijdstippen en met hoge precisie. De opstelling voor de Pathoviewer is een aangepaste opstelling van het standaard systeem (wiwam.be, 2020).

2.1.2. Werking Phenomate

De PhenoMate van PhenoVation (Wageningen, Nederland) staat in voor de fenotypische analyses. Het meten van de verzamelingen aan fenotypes gebeurt aan de hand van allerlei visuele detectietechnieken. De Phenomate is een niet-invasieve fluorescentie en multispectrale beeldvormer. Beelden worden met hoge scherptediepte (DOF) en op milliseconde tijdschaal genomen van een gebied van $20 \times 20 \text{ cm}^2$. De fluorescentieparameters worden per pixel berekend en weergegeven als foto's. Ook de multispectrale beelden worden vastgelegd met dezelfde optische lay-out van de fluorescentiebeelden en een optisch filterwiel met 6 banden. Zo kunnen beelden bepaald worden van secundaire parameters zoals de F_v/F_m (*maximum quantum efficiency of PSII photochemistry*), Chl-index (correleert met hoeveelheid chlorofyl), Ari-index (correleert met hoeveelheid anthocyaan), NDVI (*normalized difference vegetation index*). Daarnaast worden ook beelden van NIR (*near-infrared*) en RGB (kleur in rood, groen en blauw) weergegeven (phenovation.com, 2020).

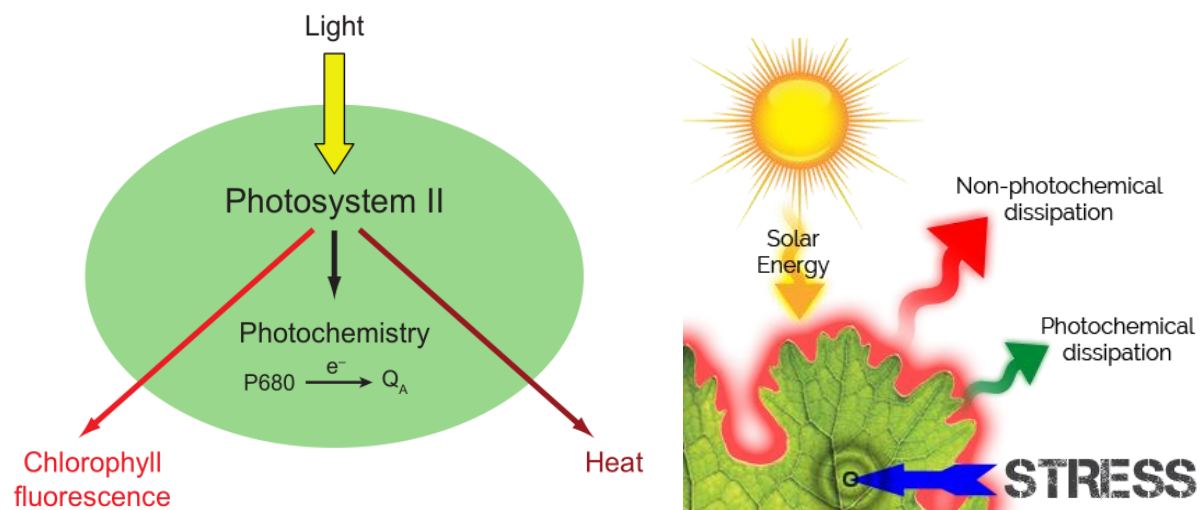


Figuur 8: Phenomate sensor en LED licht bronnen voor rood, ver-rood, wit en NIR (phenovation.com, 2020)

2.1.3. Overzicht van enkele veelgebruikte parameters

Chlorofyl fluorescentie (F_v/F_m)

Chlorofyl fluorescentie wordt gebruikt als maat voor de stress die een plant ondervindt (Figuur 9).

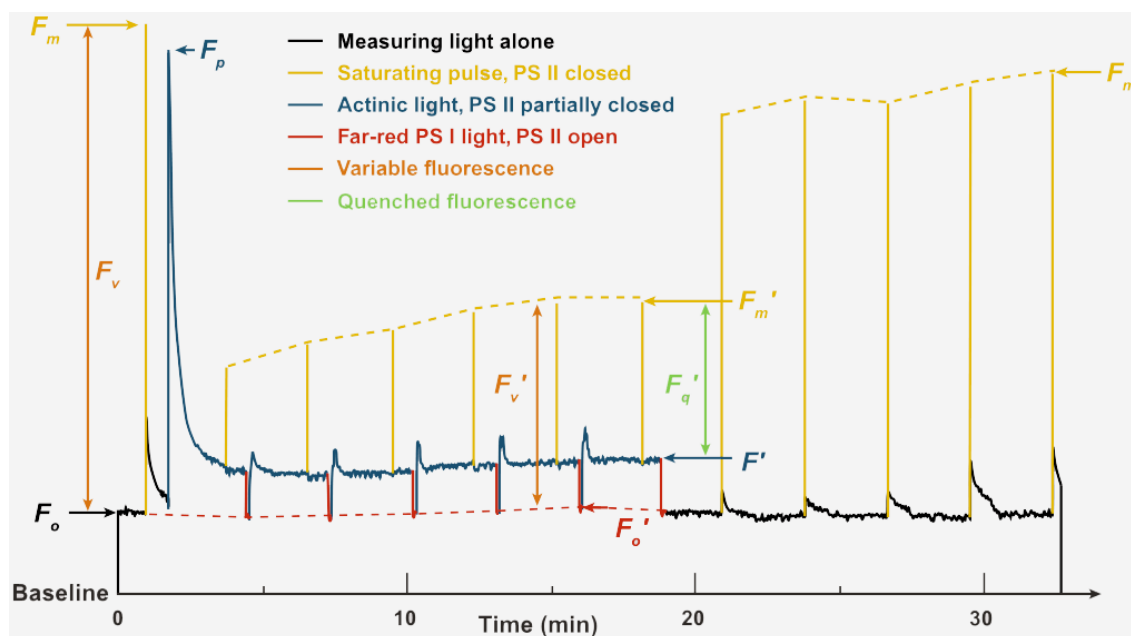


Figuur 9A: Schematische voorstelling van gebruik van de geabsorbeerde lichtenergie in fotosysteem II. Normaal gebruikt voor de fotochemie maar bij stress kan dit als warmte of chlorofylfluorescentie dissiperen. (Baker, 2008).
Figuur 9B: Niet-fotochemische dissipatie neemt toe in het geval van stress. De fotochemische dissipatie of fotosynthese zal afnemen door de verloren lichtenergie (arborcheck.com, 2020).

Licht, dat wordt geabsorbeerd door de chlorofylen van fotosysteem II (PSII) wordt normaal gezien gebruikt voor de energieoverdracht waarbij een elektron van het PSII reactiecentra naar de primaire chinon acceptor Q_A gaat. Maar de geabsorbeerde lichtenergie kan ook verloren

gaan onder de vorm van chlorofylfluorescentie (ver-rode straling) of warmte (infrarood straling). De fotochemie, chlorofylfluorescentie en warmteverlies zijn namelijk in concurrentie met elkaar voor dezelfde excitatie-energie van het geabsorbeerde licht. Elke vorm van biotische of abiotische stress zorgt voor een hogere hoeveelheid aan energie dat gedissipeerd wordt naar niet-fotochemische processen (Baker, 2008).

De meest gebruikte protocollen zijn gericht op het meten van de kwantumefficiëntie van de PSII fotochemie. De kwantumefficiëntie is de fractie van het aantal moleculen, die het proces ondergaan, gedeeld door het totaal aantal fotonen die door het systeem geabsorbeerd zijn. Voor deze bepaling wordt de Kautsky inductiecurve opgesteld (Figuur 10). Dit is een fluorescentie quenching analyse waarbij de fluorescentie wordt gemeten van een donker geadapteerd blad dat wordt blootgesteld aan verschillende lichtbehandelingen. De F_v/F_m parameter benaderd de maximale kwantumefficiëntie van de PSII fotochemie in een donker aangepaste toestand, hierbij is F_m de maximale fluorescentie en F_v de variabele fluorescentie of het verschil tussen de maximale en minimale fluorescentie ($F_v = F_m - F_0$). Dit model vereist echter een aantal assumpties die niet steeds correct zijn, bijvoorbeeld de maximale en minimale fluorescentie wordt verondersteld als een homogeen systeem waarbij alle aangeslagen toestanden van de chlorofylen gelijk zijn. De F_v/F_m parameter wordt daarom niet beschouwd als kwantitatieve waarde maar als relatieve benadering voor de kwantum efficiëntie van de PSII fotochemie (Baker, 2008). Om meer inzicht in de effecten op de fotosynthese te verkrijgen wordt het blad vervolgens belicht en opnieuw met saturatie lichtflitsen behandeld. De fluorescentie signalen (parameters met ' aangeduid in Figuur 10). Deze parameters laten toe de fractie van het licht dat voor fotosynthese en niet-fotosynthese processen (bijvoorbeeld warmtedissipatie) wordt gebruik te bepalen. Op deze parameters wordt hier niet verder ingegaan.



Figuur 10: Fluorescence quenching analysis met behulp van gemoduleerde fluorescentie. Een donker geadapteerd blad wordt blootgesteld aan verschillende lichtbehandelingen. Parameters met ' aangeduid zijn afkomstig van het blad dat wordt blootgesteld aan actinisch licht, zonder zijn afkomstig van de donker aangepaste toestand. De verschillende kleuren van de lijn duiden op verschillende lichtbehandelingen. Alle parameters, behalve F'_q , F_v en F'_v , worden gemeten vanaf de baseline (Baker, 2008).

Anthocyaan-index (Arldx)

De Arldx parameter is een maat voor de hoeveelheid aan anthocyaan pigmenten. Anthocyanen worden beschouwd als een indicator voor verschillende soorten plantstress en geven waardevolle informatie over de fysiologische status van een plant. Deze parameter wordt in de literatuur ARI genoemd naar *Anthocyanin Reflectance Index*. ARI wordt berekend door het verschil van de reciproke waarde van de reflectie van anthocyaan in het groen met die in het rode-rand gebied te nemen, dit verschil is een maat voor de absorptie door anthocyaan (Gitelson, Keydan, & Merzlyak, 2006). De reflectie van anthocyaan is namelijk het hoogst rond 550nm maar deze golflengten worden ook door chlorofyl gereflecteerd, daarom wordt de 710nm spectrale band die enkel chlorofyl reflecteert afgetrokken om zo de anthocyaan reflectie te isoleren.

Tabel 2: Spectrale banden voor het bepalen van de pigmentinhoud gebaseerd op blad reflectie spectra. Algemene formule $[1/\rho(\lambda_1) - 1/\rho(\lambda_2)] * \rho(\lambda_3)$. (Gitelson et al., 2006).

Pigment	λ_1	λ_2	λ_3
Chlorophylls, Anth-free	540–560	760–800	760–800
Chlorophylls, Anth-free	690–720	760–800	760–800
Chlorophylls, Anth-cont	690–720		760–800
Carotenoids	510–520	540–560	760–800
Carotenoids	510–520	690–710	760–800
Anthocyanins	540–560	690–710	760–800

De ARI werd later aangepast (met het label MARI) om de variabiliteit in bladdikte te beschrijven, dit werd gedaan door te vermenigvuldigen met de NIR-reflectie (Gitelson, Chivkunova, & Merzlyak, 2009).

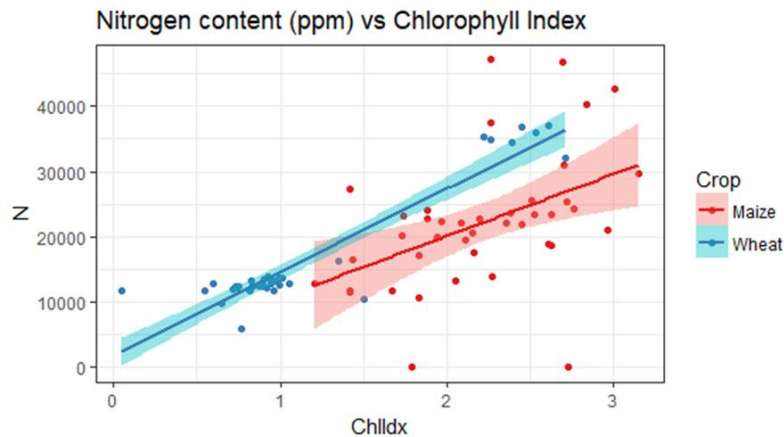
$$\begin{aligned} AriIdx = MARI &= \left[\rho(\lambda_{green})^{-1} - \rho(\lambda_{red\ edge})^{-1} \right] * \rho(\lambda_{NIR}) \\ &= \left[\frac{1}{\rho(550nm)} - \frac{1}{\rho(710nm)} \right] * \rho(770nm) \end{aligned}$$

Chlorofyl-index (Chldx)

De Chldx parameter is een maat voor de hoeveelheid aan chlorofyl pigmenten. De chlorofyl-index wordt met dezelfde algemene formule berekend die bepaald werd door Gitelson et al. (2006). Voor de reflectie van chlorofyl wordt de rode band bij 710nm gebruikt maar het groene gebied bij 550nm kan ook gebruikt worden (zie Tabel 2), twee mogelijkheden voor *anthocyanin-free chlorophylls*). De spectrale band van het NIR licht bij 770nm wordt afgetrokken om enkel de chlorofyl reflectie te isoleren. Opnieuw wordt vermenigvuldigd met de NIR-reflectie om de variabiliteit in bladdikte te beschrijven.

$$\begin{aligned} Chldx &= \left[\rho(\lambda_{red\ edge})^{-1} - \rho(\lambda_{NIR})^{-1} \right] * \rho(\lambda_{NIR}) \\ &= \left[\frac{1}{\rho(710nm)} - \frac{1}{\rho(770nm)} \right] * \rho(770nm) = \frac{\rho(770nm)}{\rho(710nm)} - 1 \end{aligned}$$

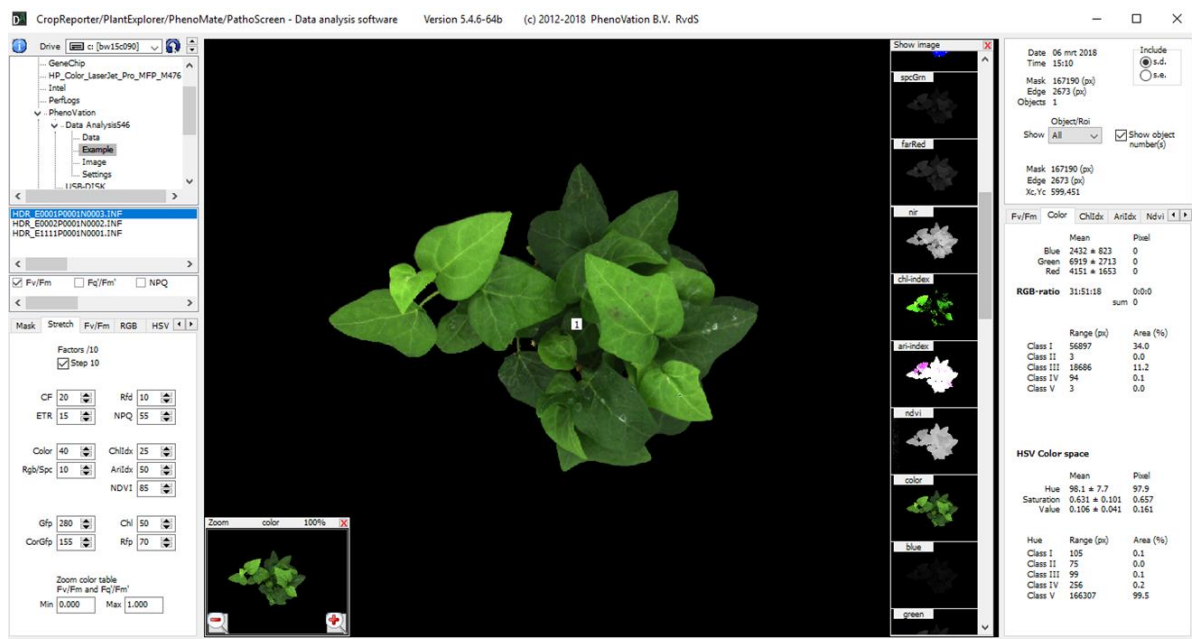
Een andere handige eigenschap van de Chlorofyl-index is dat deze correleert met de stikstof inhoud van de bladeren. In Figuur 11 is een voorbeeld van een experiment met mais en met tarwe waar beide parameters positief gecorreleerd zijn.



Figuur 11: Regressierechte stikstof inhoud en chlorofyl-index voor mais en tarwe (Training Pathviewer, 2020)

2.1.4. Werking data analysis programma

Het data analysis programma is een *graphical user interface* (GUI), die het mogelijk maakt om op een efficiënte manier parameters te berekenen uit de visuele beelden en ruwe pixel data. Parameters kunnen berekend worden uit de gekozen *region of interest* (ROI) door voorgaande formules te bepalen per pixel. En daarna het gemiddelde en de standaard afwijking te berekenen van alle pixels in een ROI. De ROI's kunnen aan de hand van bepaalde *value-masks* automatisch bepaald worden, zo is het mogelijk om de vegetatie van de ongewenste achtergrond automatisch uit te snijden. Het plaatsen van vierkante ROI's is ook mogelijk en wordt in sommige gevallen geprefereerd. Automatisering door middel van een data analyse programma is noodzakelijk voor de *high throughput* nood van fenologisch onderzoek.



Figuur 12: Data analysis programma met ROI van uitgesneden vegetatie. De ROI werd automatisch bepaald op basis van een minimum chlorofyl-index mask. (Training Pathviewer, 2020).

3. Materiaal en methode

3.1. Groeimedia

Potato Dextrose Agar (PDA) werd gebruikt als groeimedium voor het mycelium van de *Botrytis* isolaten. Dit werd aangemaakt door 19,5g PDA-poeder (Becton, Dickinson & Company) op te lossen in 0,5l bidest water. Hierna werd geautoclaveerd bij 121°C gedurende 21 minuten. Na licht afkoelen kon 0,5l medium gebruikt worden voor het vullen van 32 Petriplaten onder een laminaire flow. Er werd aandacht besteed dat elke plaat ongeveer dezelfde hoeveelheid medium bevat. Hierna kon het media volledig afgekoeld worden waarna de platen steriel bewaard werden bij 4°C.

Verdund Potato Dextrose Broth (PDB) werd bereid voor de sporenoplossing (verdunding 1/8). 1,5g, werd afgewogen en aangelegd met 0,5l bidest water. Deze 1/8^{ste} PDB oplossing werd geautoclaveerd maar werd nadien op kamertemperatuur bewaard. Net voor de aanmaak van de sporenoplossing werd 0.01% Tween 20 toegevoegd aan de verdunde PDB oplossing. Tween20 is een detergent of oppervlakte-actieve stof die de oppervlaktespanning kan verlagen zodat de sporen in oplossing komen.

3.2. *Botrytis* isolaten

Botrytis is gekarakteriseerd door een grote variabiliteit, daarom werken we in deze thesis met 16 verschillende isolaten B1 tot en met B16 (Tabel 3). Deze isolaten zijn enerzijds gekarakteriseerde labo-isolaten of werden geïsoleerd bij druif, sla, tomaat of appel (mycelium of sporenisolatie).

Tabel 3: Beschouwde *Botrytis* isolaten met waardplant en oorsprong (Mestdagh, 2018)

Isolaat	Waardplant	Oorsprong
B1	Druif	R16. Resultaat van de kruising tussen ascospore SAS56 x SAS405 (Faretra & Pollastro, 1991). Collectie labo Fytopathologie, UGent.
B2	Druif	Bd90. Bordeaux, Frankrijk. Wild-type stam (Hamada et al., 1994). Collectie labo Fytopathologie, UGent.
B3	Sla	Proefstation voor de groententeelt vzw.
B4	Tomaat	Collectie labo Fytopathologie, UGent.
B5	Sla	Lidl, Gent.
B6	Druif	B05.10. Duitsland, haploïde stam bekomen door behandeling Bd90 met benomyl. Vertoont een hogere gevoeligheid voor mutagenen. (Büttner et al., 1994). Collectie labo Fytopathologie, UGent.
B7	Druif	A336. Bordeaux, Frankrijk. Niet-pathogene mutant van Bd90 bekomen door insertiemutagenese (Reignault et al., 2000, Kunz et al. 2006). Collectie labo Fytopathologie, UGent.
B8	Sla	Provinciaal Proefcentrum voor de Groenteteelt Oost-Vlaanderen vzw.
B9	Sla	Inagro vzw.
B10	Appel	Proefcentrum Fruitteelt vzw.
B11	Druif	Gent.

B12	Sla	Proefstation voor de groententeelt vzw.
B13	Tomaat	Proefstation voor de groententeelt vzw.
B14	Sla	Provinciaal Proefcentrum voor de Groenteteelt Oost-Vlaanderen vzw.
B15	Sla	Proefstation voor de groententeelt vzw.
B16	Sla	Groeikamer Coupure UGent, 2019

De isolatie van mycelium gebeurde a.d.h.v. stukjes besmet plantenweefsel met een duidelijke overgang van ziek naar gezond weefsel. Stukjes weefsel met een duidelijke overgang werden afgesneden en oppervlakkig gesteriliseerd. Het afgesneden weefsel werd 1 min lang in 1ml 70% ethanol gedesinfecteerd en daarna driemaal gespoeld met bidest water. De isolatie van sporen was rechtstreeks, sporen werden met een entnaald opgenomen en geënt op PDA media. Verdere isolatie gebeurde door het opvolgen van de platen bij kamertemperatuur (18-20°C) onder een lichtcyclus van 12 h. Het gewenste mycelium werd opnieuw geïsoleerd door in een nieuwe PDA media plaat over te enten. Dit werd eventueel herhaald totdat een zuiver niet-gecontamineerd *Botrytis* isolaat bekomen werd (Mestdagh, 2019). Van de zuivere *Botrytis* isolaten werd er meteen een cryo collectie aangemaakt bij -80°C. Dit legt het metabolisme van de schimmel stil zodat deze niet meer kan muteren.

Ontwaken isolaten en aanmaak collectie

De isolaten komen uit een collectie bij -80°C. Van elk isolaat was er een cryotube met daarin 3 mycelium plugs in glycerol. De glycerol zorgt ervoor dat kristalvorming de cellen niet kunnen beschadigen. Het is belangrijk steeds van dezelfde cryo collectie te werken om correcte conclusies van de onderlinge isolaten te kunnen rapporteren, micro organismen muteren namelijk zeer snel.

De plugs uit de cryotube werden een eerste maal geënt op PDA media. Van elk isolaat werden er 3 replica's aangemaakt. Onder een steriele horizontale flow werd elke plug in het midden van een PDA Petriplaat geplaatst (100mm diameter). Hierna werden de culturen in een incubator bij 24°C opgegroeid. Wanneer de culturen bijna tot aan de rand volgroeid zijn met mycelium konden deze enkele weken bij 4°C bewaard worden.

Toch kan het gewenst zijn de isolaten om de 2 weken over te enten op nieuw media, dit om media uitputting tegen te gaan en het mycelium in de juiste groeifase te houden. Dit gebeurde door pluggen van vers mycelium met een diameter van 6 mm uit te steken en deze in het midden van een nieuwe PDA plaat te enten. Ook werd er een nieuwe cryo collectie aangemaakt door 3 myceliumpluggen van elk isolaat in een 20% glyceroloplossing onder te dompelen in een cryotube en te bewaren bij -80°C. Bij deze temperatuur wordt het metabolisme stilgelegd waardoor de stammen houdbaar blijven en niet kunnen muteren.

3.3. Teelt van de waardplant sla

De proeven werden uitgevoerd met kropsla, cultivar *Lucrecia* (experiment 1) en cultivar *Presteria* (experiment 2). Plantjes werden bekomen via Inagro, Rumbek-Beitem en geleverd in het 2-3 blad stadium. Bij aankomst werden de jongplanten verplant in 0.5 l potten in een potgrond op basis van turf (Saniflor potgrond voor zaaien en stekken). Ze kregen een fotoperiode van 16h licht door plasma lampen (600 W, Gavita). Fertigatie werd toegepast, dit gebeurde met een samengestelde oplosbare meststof (Soluplant, NPK 19-8-16 +4 MgO, EC oplossing 1.3 mS cm⁻¹) (Mestdagh, 2018).

De kropsla gebruikt bij experiment 2 onderging ook enkele fungicide behandelingen, twee keer Proplant (Protex n.v.) en één keer Paraat (BASF SE). De actieve stoffen in deze behandelingen hebben een werking tegen grondgebonden kiemschimmels zoals *Pythium* en *Phytophthora*, maar hebben geen direct effect op *Botrytis*.

3.4. Proefopstelling en inoculatie van slabladeren

Voor de opstelling van de inoculatie van volledige slabladeren werd steeds hetzelfde laboprotocol gebruikt. Op de bodem van steriele plasticen bakjes (230 x 170 x 85mm) werd een laag hydrofiële watten en steriel keukenpapier geplaatst en bevochtigd met bidest of AD water. Hierboven werd een halve petriplaat geplaatst zodat de afgesneden sla het vochtige papier niet rechtstreeks raakt (Figuur 13). Deze opstelling resulteert in hoge luchtvochtigheid tijdens de inoculatie en verhindert droogtestress op de te inoculeren bladeren.



Figuur 13: Proefopstelling inoculatie van slabladeren. Van boven naar onder: bevochtigde hydrofiële watten, steriel keukenpapier, halve petriplaat en vanboven het geïnoculeerde slabladeren.

De gebruikte slabladeren hebben ongeveer dezelfde ouderdom (8-10^{de} blad, te tellen vanaf de jongste bladeren met lengte 2-3cm). De inoculatie gebeurde met mycelium plugs met een diameter van 6 mm. Er werd geïnoculeerd met 2 plugs per blad, langs de linker en rechterzijde van de hoofdnerf. Er werd voor direct contact gezorgd door de plugs met de myceliumkant op het blad te plaatsen. Voor de sporenproef werd er langs elke zijde van de nerf 10µl 2*10⁵ sporen/ml sporenoplossing gepipetteerd. De bakjes werden hierna gesloten en bewaard in het donker bij kamertemperatuur.

3.5. Infectieproeven

In de eerste proef werd onderzocht of er verschillen zijn in pathogeniteit tussen de infectie van sla door jonge myceliumpluggen (MP₅) en de infectie door een sporenoplossing. Ook werden de verschillen in agressiviteit en spreiding tussen de verschillende isolaten vergeleken met elkaar. De pathogeniteit werd 6 dagen lang geëvalueerd met behulp van de Pathoviewer (zie 1.6.2). Op de 6de dag werd elke inoculatie (dus tweemaal per blad) ook visueel gescoord met behulp van het ziekte scoresysteem (Tabel 4).

Voor de tweede proef werd de pathogeniteit in functie van de ouderdom van het mycelium nagegaan. Hiervoor werd de infectie met jonge myceliumpluggen (MP₅) vergeleken met oude myceliumpluggen (MP₁₃). Gebaseerd op de resultaten van proef 1 werd besloten om maar 4 dagen te evalueren met de Pathoviewer, de visuele ziekte scoring werd ook op dag 4 gedaan.

3.5.1. Infectie met myceliumpluggen

Botrytis isolaten werden 5 (MP₅) of 13 dagen (MP₁₃) opgegroeid op PDA media bij 24°C. Voor alle 16 isolaten plus een blanco als controle werd er in 3 replica's een opstelling zoals hierboven beschreven gemaakt. In totaal werden er 51 bakjes klaargemaakt met slabladeren van dezelfde ouderdom. De inoculatie van het mycelium gebeurde voor alle isolaten om 9u. Voor de 3 blanco's werden steeds 2 pluggen PDA media gebruikt.

3.5.2. Infectie met sporenoplossing

Een plug van 5 dagen oud mycelium werd op een nieuwe PDA media plaat geënt. Deze platen werden eerst gedurende 7 dagen opgegroeid in de incubator bij 24°C. Hierna werden de platen onder NUV licht geplaatst voor 4 dagen, wanneer het begin van sporenvorming wordt waargenomen. De platen werden hierna nog 1 dag op kamertemperatuur en in het donker bewaard om de sporenvorming te finaliseren en werd de sporenoplossing gemaakt.

Voor het maken van de sporenoplossing werd aan elke plaat 4ml 1/8^{ste} verdunde PDB oplossing met 0,01% Tween 20 toegevoegd. De PDB oplossing werd met een spreider over de sporen verspreid tot ze loskwamen. Hierna werd de sporenoplossing gefilterd met een steriele filter van 250µm. Zo werden eventuele losgekomen stukjes mycelium verwijderd.

De concentratie aan sporen werd bepaald met de Bürker haemocytometer onder een lichtmicroscop. Het aantal sporen werd at random geteld door in de bovenste in onderste telkamers elk 10 vierkantjes te tellen en het gemiddelde te nemen. Het aantal sporen kan dan per ml bepaald worden door rekening te houden met het volume dat in elk vierkantje past. Indien te veel sporen aanwezig waren werd de oplossing eerst verdund en opnieuw geteld met de Bürker haemocytometer. Daarna kon berekend worden hoeveel elke sporenoplossing verdund moest worden voor het verkrijgen van een finale sporenconcentratie van $2 \cdot 10^5$ sporen/ml. Er werd verdund met 1/8^{ste} PDB oplossing en de finale sporenoplossingen werden 1 nacht bij 4°C bewaard.

Er werden opnieuw 51 bakjes met slabladeren klaargemaakt waarna ze om 9u geïnoculeerd werden door 2 keer 10µl $2 \cdot 10^5$ sporen/ml sporenoplossing te pipetteren. Voor de blanco werd enkel 1/8^{ste} PDB oplossing gebruikt.

3.6. Bepalen van de infectiegraad

3.6.1. Visuele analyse - Ziekte index






De ziekte index werd visueel bepaald via een scoresysteem (Tabel 4). Dit scoresysteem is gebaseerd op het aantastingspercentage door de *Botrytis* inoculatie op sla (van de helft van het blad). Een score van 0 duidt op geen aantasting ofwel enkel plaatselijke aantasting waar de plug direct contact had met het blad, terwijl de hoogste score 4 duidt op een aantasting van 76-100%.

Hieruit kan de totale gemiddelde ziekte index (ZI) per isolaat berekend worden. Hierbij wordt een gemiddelde berekening gemaakt waarbij voor elke inoculatie de bovenste marge van zijn score als de ZI beschouwd werd. Formule met voorbeeldberekening voor B5:

$$ZI (\%) = \sum_{score=0}^4 \text{ fractie met score} * ZI \text{ van score}$$

$$ZI_{\text{isolaat B5}} = \frac{3}{6} * 50\% + \frac{1}{6} * 75\% + \frac{2}{6} * 100\% = 71\%$$

Tabel 4: Scoresysteem voor de evaluatie van de *Botrytis* infectie bij sla, gebaseerd op % aantasting van het blad

				
Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
0% ; geen spreiding	1 - 25%	26 - 50%	51 - 75%	76 - 100%

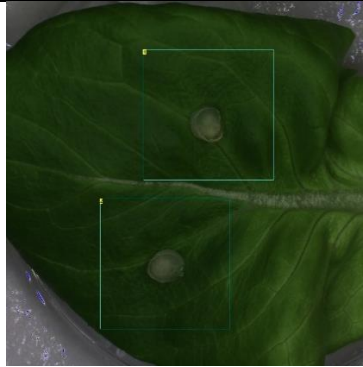

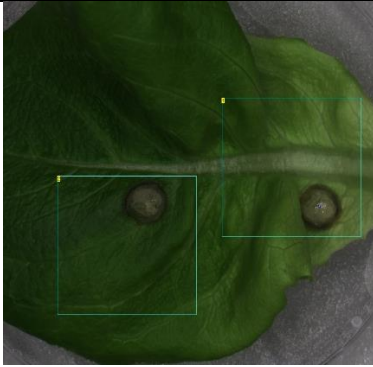
3.6.2. Analyse met de Pathoviewer

De beeldverzameling met de Pathoviewer gebeurde voor elke opvolgingsdag van 10 tot 12u. Van elk van de 51 slabladeren werden multi-spectrale foto's genomen voor de bepaling van de parameters F_v/F_m , Chlldx en Arlldx (zie 2.1.3: Overzicht van enkele veelgebruikte parameters). Voor de Pathoviewer werd een hoogte van 400mm gekozen en een scherptediepte (DOF) van 306.

De verdere verwerking van de ruwe data/foto's van de Pathoviewer gebeurde met de Data Analysis Software van PhenoVation. Om de resultaten te kunnen vergelijken met die van vorige proeven werden dezelfde opties gebruikt. Er werd met 2 ROI's of regions of interest gewerkt, 1 voor elke regio rond de inoculatie met plug of sporenoplossing per blad. De grootte van de ROI of de zijde van het vierkant waaruit de data berekend werd is 500px. Deze ROI's werden voor elk blad handmatig geplaatst met de Data Analysis Software. Er werd echter steeds gezorgd dat het inoculatie punt zich zo goed mogelijk in het midden van de ROI bevond.

Wanneer dit niet mogelijk was door bijvoorbeeld de nerf of het verschuiven van de plug na de eerste dag werden enkele toegevingen gedaan. Tabel 5 geeft de bepaling van een ROI weer alsook twee voorbeelden van vastgestelde uitzonderingen.

Tabel 5: Bepaling van een ROI rond de infectielocatie en potentiële aanpassingen bij het plaatsen van een ROI voor de data analyse

		
Normale plaatsing ROI	Inoculatiepunt niet in het midden van ROI door nerf	Plug bij tweede reeks foto's (1dpi) verschoven

Verder zijn er nog enkele pure visuele opties, deze hebben geen invloed op de data maar maken de foto's duidelijker voor de verwerking en export. De stretch optie werd hiervoor aangepast voor volgende parameters/foto's; Color:17, Chlldx:65 en Arlldx:50. De stretch optie past de grootte van de valse kleurenschaal aan waardoor foto's helderder zijn of de visuele voorstelling van het anthocyaan of chlorofyl gehalte duidelijker is.

3.7. Statistische dataverwerking

Het effect van de verschillende isolaten en of behandelingen werd geanalyseerd met de programma's SPSS en R.

De ANOVA test werd gebruikt om verschillen tussen de *Botrytis* isolaten te bepalen. Allereerst werd nagegaan of de data aan de 2 voorwaarden voldoen om verschillen te kunnen vergelijken met een ANOVA. De data moeten normaal verdeeld zijn, dit werd via de Shapiro-Wilk test nagegaan. Ook moet de data een gelijke variatie hebben, de homoscedasticiteit werd nagegaan met Levene's test. Er wordt een nulhypothese opgesteld die stelt dat er geen verschillen voorkomen tussen de isolaten voor eenzelfde behandeling. Deze nulhypothese werd getest via een one-way ANOVA test op het 5% significantieniveau. Indien de nulhypothese kon verworpen worden dan werd er een post-hoc test uitgevoerd voor het verder onderzoeken tussen welke subsets van de data de significante verschillen zich nu net bevinden. Als post-hoc test bij ANOVA werd de Tukey test gebruikt.

Wanneer de data niet aan de voorwaarden van normaliteit en homoscedasticiteit voldoen wordt een niet-parametrische test toegepast, nl de Kruskal-Wallis test (niet-parametrische equivalent van de one-way ANOVA). Deze test werd opnieuw uitgevoerd op het 5% significantieniveau. Als post-hoc bij de Kruskal-Wallis test werd gekozen voor de Dunn test met correctie voor ties (Dunn, 1964). Verder werd de Bonferroni correctie gebruikt wanneer verschillende hypothesen werden getest. Deze correctie zorgt ervoor dat de type 1 fout, de kans op de nulhypothese te onrecht te verwerpen, verlaagd wordt.

Anderzijds werd gebruikgemaakt van de gepaarde T-test voor het nagaan van verschillen tussen de 2 methoden van inoculatie voor eenzelfde *Botrytis* isolaat. De voorwaarde is hier opnieuw dat de data normaal verdeeld zijn, dit werd met de Shapiro-Wilk test nagegaan. De

nulhypothese bij de T-test gaat ervan uit dat er geen significante verschillen zijn tussen de 2 verschillende behandelingen. Voor het weergeven van het significantieniveau of *P-waarden* bij de de T-test werd gekozen voor de GraphPad-stijl met asterisks.

Voor het automatiseren van de output van figuren werd gebruik gemaakt van R. De Dunn test werd uitgevoerd door de *posthoc.kruskal.dunn.test* functie uit de externe MCPMR R library (Pohlert, 2014). Voor de outputs van alle post-hoc testen werden de homogene subsets steeds voorgesteld aan de hand van dezelfde letters. Dit werd mogelijk gemaakt door de externe *multcompView* R library (Graves, Piepho, Selzer, & Dorai-Raj, 2015).

4. Resultaten

4.1. Proef 1: Pathogeniteit van pluggen (MP₅) vs. sporenoplossing

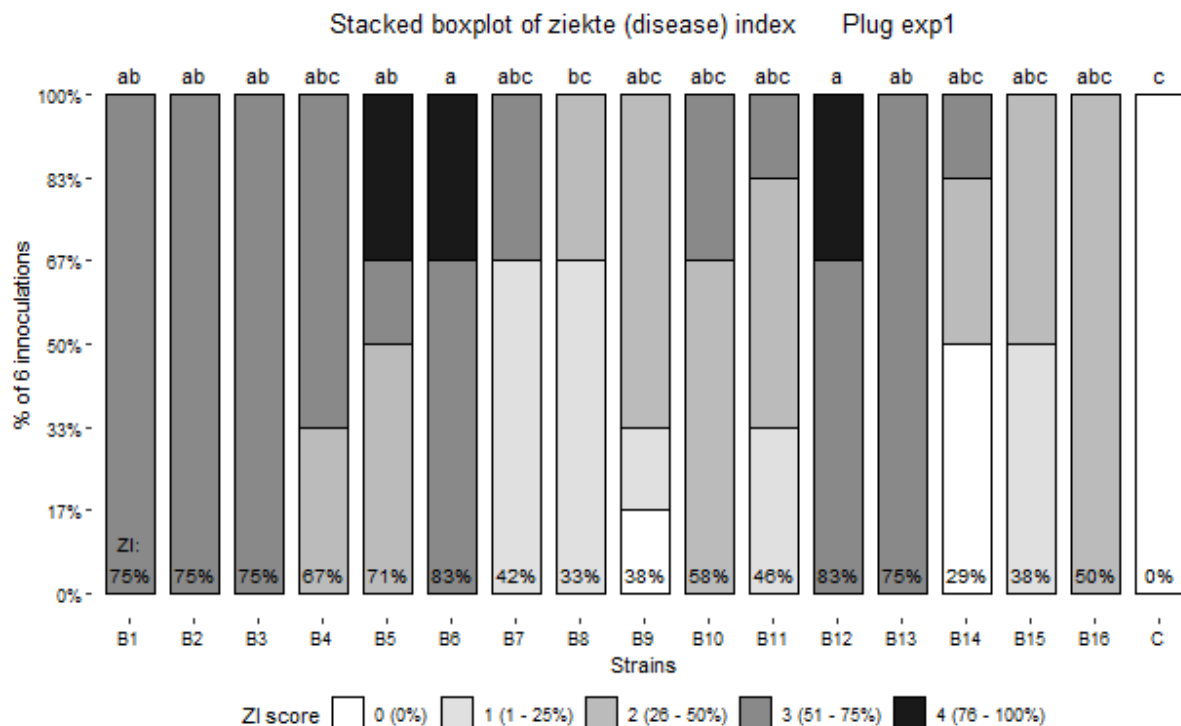
4.1.1. Ziekte index en spreiding

De pathogeniteit van de jonge myceliumpluggen (5 dagen oud) is weergegeven in Figuur 14. Dit werd geëvalueerd op 5 dpi a.d.h.v. het visuele scoresysteem en de hierop berekende ziekte index (Tabel 4) voor de 16 *Botrytis* isolaten. B6 en B12 zijn de meest virulente isolaten en werden voor 2 van de 6 inoculaties beoordeeld met score 4, naast score 3 voor de andere herhalingen. De sla-isolaten B8 en B14 zijn de minst virulente isolaten terwijl het niet-pathogene isolaat B7/A336 toch een beperkte virulentie vertoonde. De isolaten die een ziekte index lager dan 50% veroorzaakten zijn B8, B9, B14 en B15 (sla) en B7 en B11 (druif).

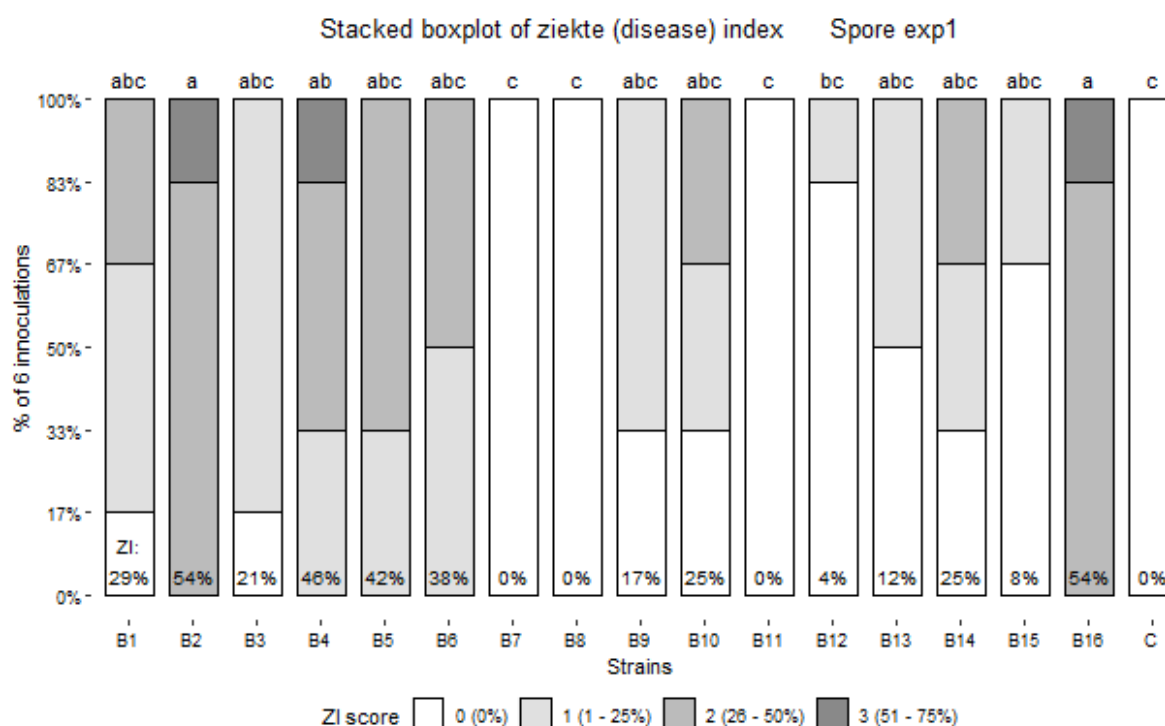
Bij de infectie met een sporenoplossing ontwikkelden er 3 isolaten (B7, B8, B11) geen symptomen (Figuur 15). B2 en B16 waren significant virulenter dan deze 3 isolaten, terwijl de andere isolaten een intermediaire symptoomontwikkeling vertoonden (Figuur 15). Het zijn ook enkel B2 en B16 die een gemiddelde ziekte index van 54% veroorzaakten, voor de andere isolaten is dit < 50%.

Over het algemeen was de infectie met de sporenoplossingen veel minder agressief voor de slabladeren dan de infectie met jonge myceliumpluggen. De pathogeniteit van de isolaten is ook helemaal niet gelijk voor de sporen en pluggen (Figuur 14 en Figuur 15).

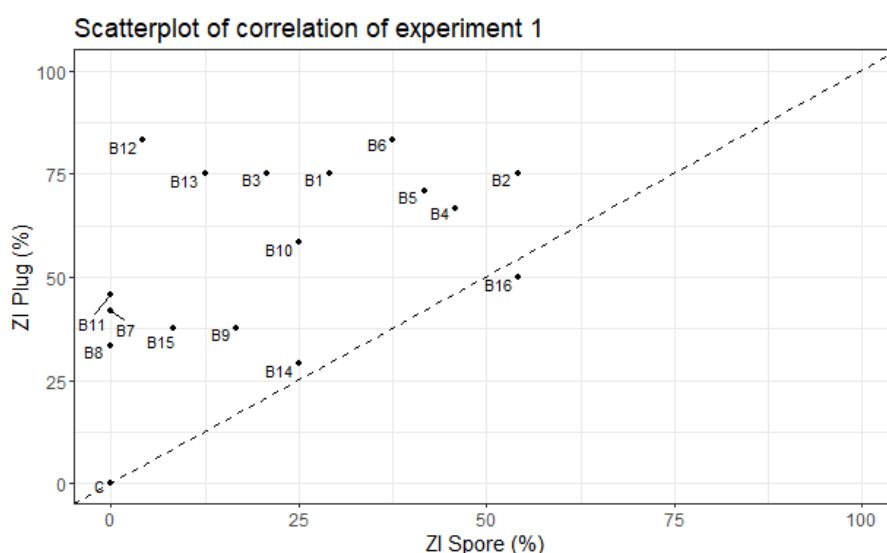
Een scatterplot tussen beide inoculatiemethodes is weergegeven in Figuur 16. Hieruit is duidelijk af te leiden dat enkel voor B14 en B16 de inoculatie methode de pathogeniteit van het isolaat niet beïnvloedde. De andere isolaten vertonen duidelijk een hogere pathogeniteit wanneer een inoculatie met jonge myceliumpluggen gebeurt dan met een sporenoplossing.



Figuur 14: Pathogeniteit van 16 *Botrytis* isolaten op slabladeren, na inoculatie met myceliumpluggen (MP₅) na 5dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.



Figuur 15: Pathogeniteit van 16 *Botrytis* isolaten op slabladeren, na inoculatie met een sporenoplossing na 5dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.



Figuur 16: Correlatie tussen de waarden van de ziekte-index bepaald via 2 methoden van inoculatie: infectie met jonge myceliumpluggen en met een sporenoplossing. De regressierechte door de oorsprong werd berekend met zijn helling. De stippellijn duidt op de bissectrice met volledige correlatie (helling=1).

4.1.2. Pathoviewer resultaten

Voor de bespreking van de 3 parameters, bepaald met de Pathoviewer, werd ervoor gekozen om enkel de pathogeniteit van de isolaten B2, B6 (beide virulent), B8 (weinig virulent) en B16 (intermediair virulent) te tonen in functie van de infectietijd. Voor het volledig overzicht van de andere isolaten wordt verwezen naar de bijlage. De pathogeniteit van alle isolaten op 5 dpi en ook de vergelijking tussen de inoculatiemethodes is weergegeven in Tabel 6.

Chlorofylfluorescentie

F_v/F_m is een maat voor de gezondheid of stress van de plant gebaseerd op de maximale efficiëntie van fotosysteem II. In Figuur 18 en Figuur 19 wordt het verloop van F_v/F_m in functie van de infectietijd weergegeven voor de geselecteerde isolaten. Voor zowel de pluggen als sporen werd steeds een dalende tendens bekomen voor B2, B6 en B16 terwijl voor B8 enkel de inoculatie met pluggen resulteerde in een afname van F_v/F_m . De inoculatie met pluggen zorgde voor een significante daling op 2 dpi voor B6 en B8 en op 3 dpi voor B2 en B16. De infectie met sporenoplossing zorgde voor een significante daling op 2 dpi voor B2, op 3 dpi voor B16 en op 4 dpi voor B6 terwijl bij de inoculatie met B8 geen significante wijziging werd vastgesteld.

Tabel 6 geeft weer welke isolaten op 5dpi resulteren in de sterkste afname van F_v/F_m . Bij de inoculatieproef met jonge pluggen is dit het isolaat B6, gevolgd door de isolaten B5, B12 en B13. De isolaten die minder virulent zijn, zijn de isolaten B14 en B15. Bij de inoculatie met sporen heeft B2 de laagste F_v/F_m waarden en is dus het meest virulent, gevolgd door B16 en B6. De sporeninoculaties die weinig virulent zijn vinden we bij de isolaten B7 en B12, gevolgd door B8. (zie ook Figuur 18 en Figuur 19).

Algemeen is duidelijk dat de proef met sporenoplossing voor een minder sterke daling in F_v/F_m zorgde (Tabel 6). De vergelijking tussen de inoculatie methode toont aan dat enkel voor B2, B4, B14 en B16 geen significant verschil tussen de inoculatiemethode werd aangetroffen voor F_v/F_m . Er was een zeer significante hogere F_v/F_m voor de isolaten B7, B8, B11 en B13 ($P < 0.01$) en voor B12 ($P < 0.001$). De sporen waren dus algemeen minder agressief en dit sluit goed aan bij de visuele resultaten voor ziekte index en spreiding (Figuur 18 en Figuur 19).

Chlorofyl index

De chlorofyl index is een maat voor het gehalte aan chlorofyl pigmenten. De waardplant zal chlorofyl verliezen door de spreidende infectie van de schimmel. In Figuur 18 en Figuur 19 wordt het verloop van Chlldx in functie van de infectietijd weergegeven voor de geselecteerde isolaten. Voor zowel de pluggen als sporen werd opnieuw een dalende tendens bekomen voor B2, B6 en B16 terwijl voor B8 enkel bij de inoculatie met pluggen een lichte afname in Chlldx werd waargenomen. De inoculatie met pluggen zorgde voor een significante daling op 2 dpi voor B6, op 3 dpi voor B2, op 4 dpi voor B16 en maar op 5 dpi voor B8. De infectie met sporenoplossing zorgde voor een significante daling op 2 dpi voor B2, op 4 dpi voor B6 en op 5 dpi voor B16 terwijl bij de inoculatie met B8 geen significante wijziging werd vastgesteld.

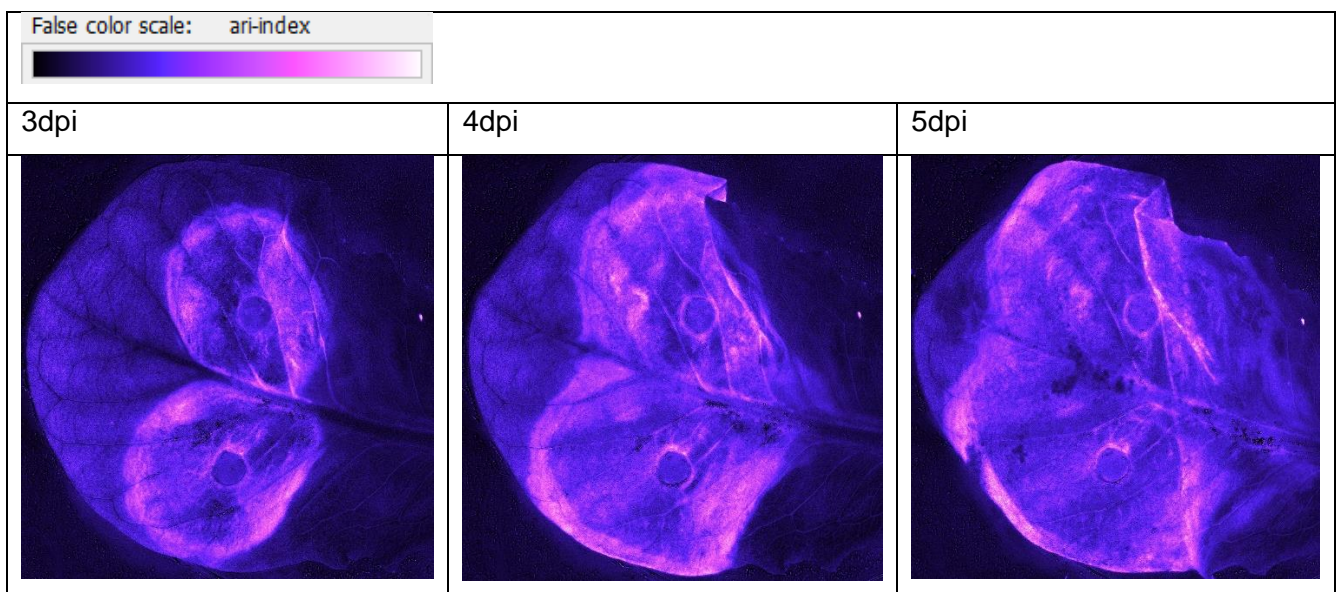
Tabel 6 geeft weer welke isolaten op 5dpi resulteren in de sterkste afname van Chlldx. Bij de inoculatieproef met jonge pluggen zijn dit isolaten B1, B3, B5, B6, B9, B11 en B13. Isolaat B15 was significant minder virulent. Bij de inoculatie met sporen heeft B2 de laagste Chlldx waarden en is dus het meest virulent, gevolgd door B6 en B14. De sporeninoculaties die weinig virulent zijn vinden we bij de isolaten B11 en B12, gevolgd door B7, B8 en B13. (zie ook Figuur 18 en Figuur 19).

Over het algemeen werd een gelijkaardige afname in chlorofyl index bekomen tussen de inoculatie met myceliumpluggen en met sporen (Tabel 6). De vergelijking tussen de inoculatie methode toont aan dat enkel voor B2, B4, B9, B11, B13 en B14 een significant verschil tussen de inoculatiemethode werd aangetroffen voor Chlldx. Er was een zeer significante lagere Chlldx bij sporeninoculatie voor de isolaten B4 maar significant hogere Chlldx voor de sporeninoculatie bij B11 en B13 ($P < 0.01$).

Anthocyaan index

De anthocyaan index is een maat voor het gehalte aan anthocyaan pigmenten. De waardplant maakt deze aan als respons op stress. In Figuur 18 en Figuur 19 wordt het verloop van Arildx in functie van de infectietijd weergegeven voor de geselecteerde isolaten. Voor zowel de pluggen als sporen werd een stijgende tendens bekomen voor B2, B6 en B16 terwijl voor B8 enkel bij de inoculatie met pluggen een stijging in Arildx werd waargenomen. De inoculatie met pluggen zorgde voor een significante stijging op 2 dpi voor B6, op 3 dpi voor B2 en op 4dpi voor B8 en B16. De infectie met sporenoplossing zorgde voor een significante stijging op 2 dpi voor B2 terwijl er bij de inoculatie met B6, B8 en B16 geen significante wijziging werd vastgesteld. Voor de laatste 3 dagen werden er variabele resultaten bekomen. Vaak bereikte de Arildx een plateau waarde of liep zelfs terug vanaf 3 of 4 dpi. Voorbeeld bij isolaat B6 replica 2 bij de pluggenproef: Tot en met 3dpi is er een stijging te zien in de anthocyaan index en dus ook het gehalte aan anthocyanen.

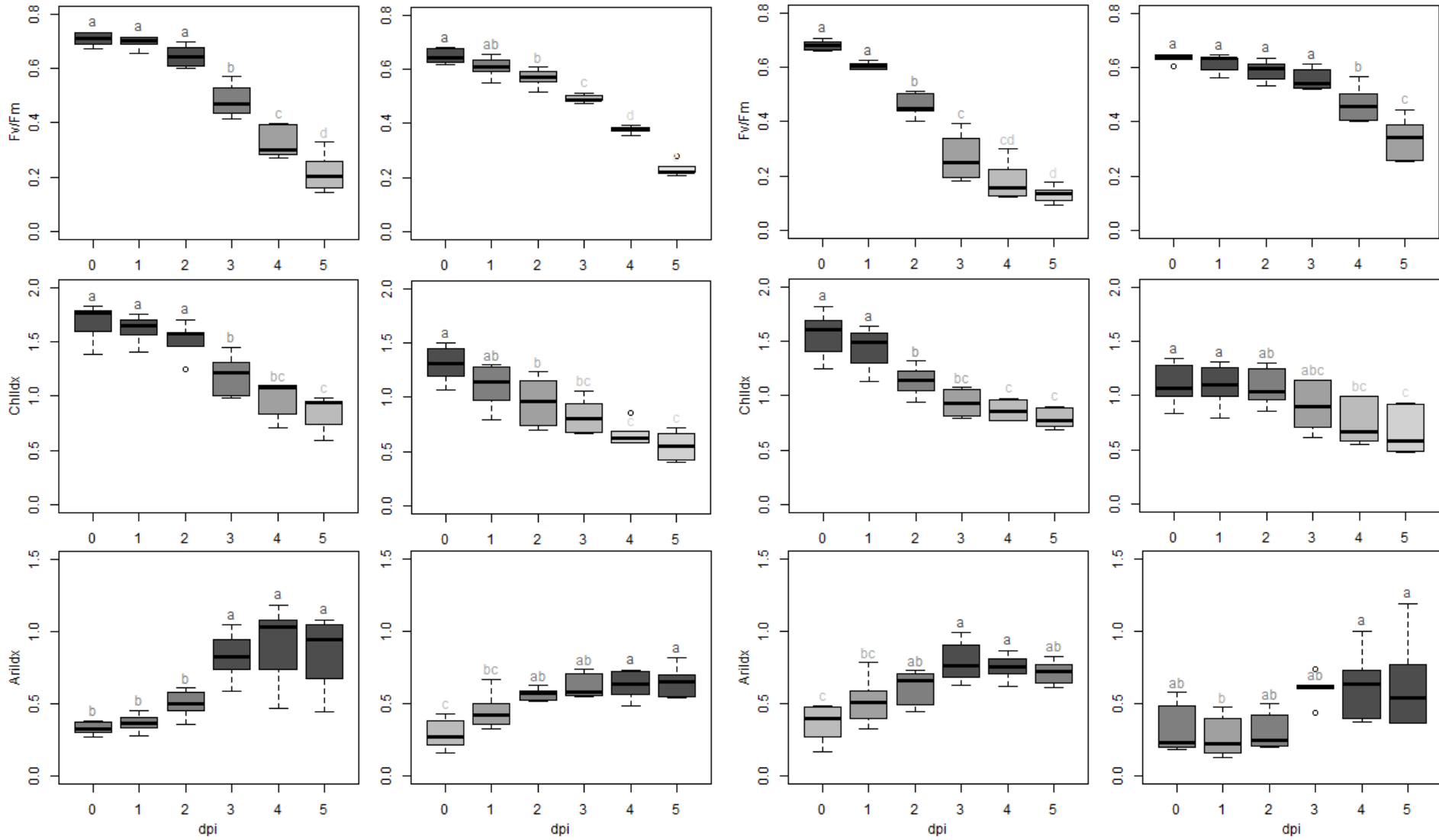
Figuur 17 geeft visueel weer hoe de locatie het dichtst bij het inoculatiepunt terug daalt in anthocyaan gehalte op 4 en 5 dpi. De locatie met de hoogste anthocyaan index is steeds het front van de infectie radius.



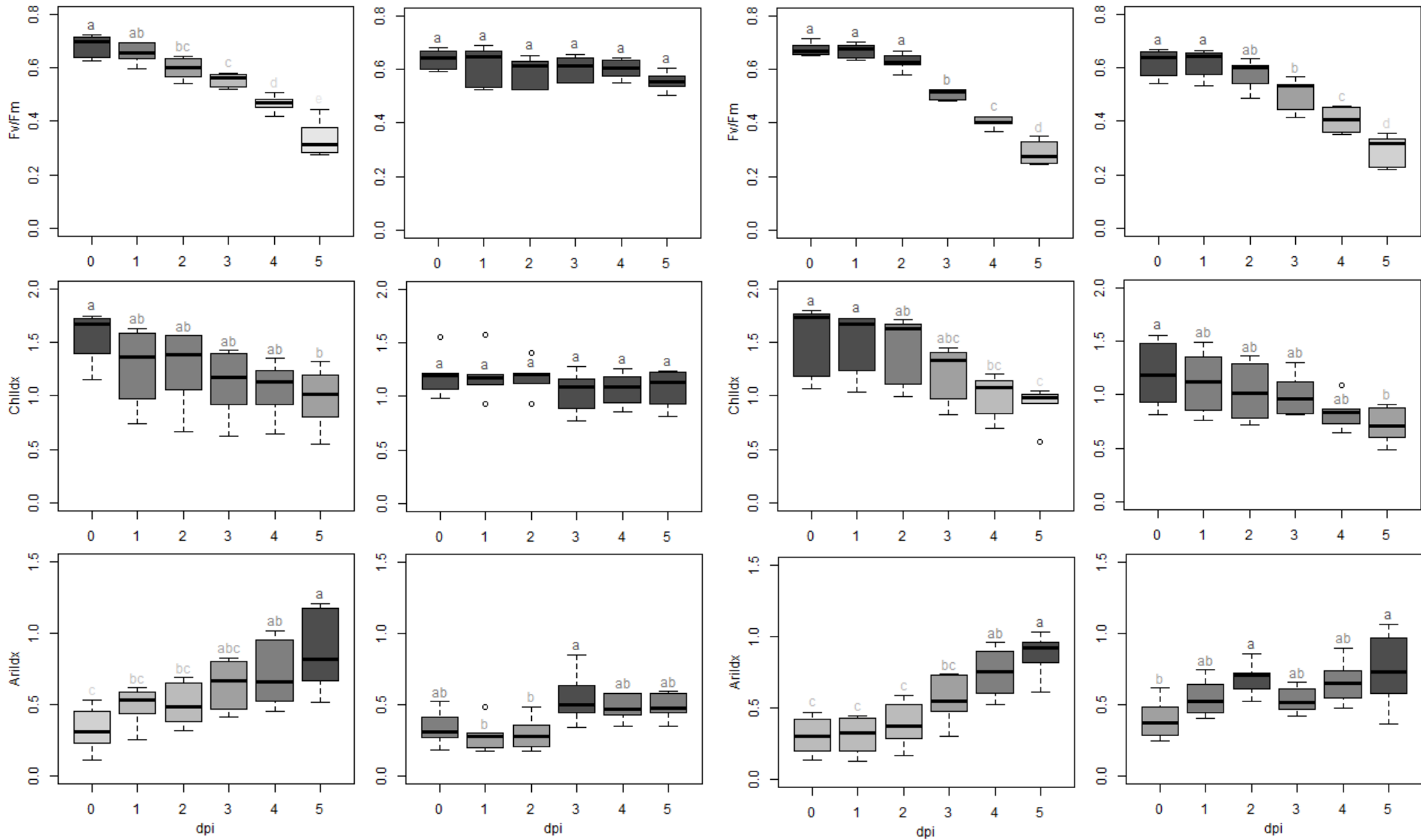
Figuur 17: Anthocyaan foto's van 3dpi tot 5dpi voor inoculatie B6_2 van de pluggen bij experiment 1. De valse kleurenschaal toont de overgang van lage tot hoge Arildx.

Tabel 6 die de waarden voor de laatste opvolgdag weergeeft is dus minder nauwkeurig voor de anthocyaan index. Bij de inoculatieproef met jonge pluggen zorgt enkel isolaat B4 voor een significant stijging in anthocyaan. Bij de inoculatie met sporen heeft B1 de hoogste Arildx waarden en is dus het meest virulent. Isolaat B12 van de sporeninoculaties heeft significant lage Arildx waarden.

Over het algemeen veroorzaken de inoculaties met pluggen een hogere Arildx en dus ook biotische stress. De vergelijking tussen de inoculatie methode toont aan dat er voor isolaten B4, B7, B8, B11, B12 en B15 een significant verschil tussen de inoculatiemethode werd aangetroffen voor Arildx. Er was een zeer significante hogere Arildx voor de isolaten B4 en B15 ($P < 0.01$) (Tabel 6).

Exp1: B2 Jonge plug (MP₅)**B2 Sporenoplossing****B6 Jonge plug (MP₅)****B6 Sporenoplossing**

Figuur 18: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 1 voor isolaten B2 en B6 van F_w/F_m, Chlldx en Arlldx voor 0 tot 5dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significatieniveau 5%).

Exp1: B8 Jonge plug (MP₅)**B8 Sporenoplossing****B16 Jonge plug (MP₅)****B16 Sporenoplossing**

Figuur 19: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 1 voor isolaten B8 en B16 van Fw/Fm, Chlidx en Arlidx voor 0 tot 5dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%).

Tabel 6: Analyseresultaten van experiment 1 bij 5dpi voor F_v/F_m , Chlldx en Arildx. Het gemiddelde en de standaard deviatie van de 6 inoculaties wordt weergegeven. De resultaten van de post-hoc van de ANOVA test tussen de isolaten zelf wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%). De resultaten van de gepaarde T-test tussen de 2 methoden van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van sterretjes in het geval van significantie ($P > 0.05$ 'ns'; $P \leq 0.05$ '*'; $P \leq 0.01$ '**'; $P \leq 0.001$ '***'; $P \leq 0.0001$ '****').

Exp1 5dpi	F_v/F_m			Chlldx			Arildx		
Botrytis isolaten	Gemiddelde en ANOVA sig.		T-test	Gemiddelde en ANOVA sig.		T-test	Gemiddelde en ANOVA sig.		T-test
	Jonge pluggen	Sporen	sig.	Jonge pluggen	Sporen	sig.	Jonge pluggen	Sporen	sig.
B1	0.170 ± 0.176 cde	0.444 ± 0.094 abcde	**	0.798 ± 0.195 c	0.872 ± 0.204 abcd	ns	0.871 ± 0.344 ab	0.839 ± 0.310 a	ns
B2	0.216 ± 0.181 cde	0.231 ± 0.158 f	ns	0.860 ± 0.204 bc	0.550 ± 0.160 d	*	0.855 ± 0.323 ab	0.650 ± 0.254 abc	ns
B3	0.193 ± 0.208 cde	0.486 ± 0.080 abcd	**	0.767 ± 0.203 c	0.933 ± 0.217 abcd	ns	0.905 ± 0.332 ab	0.594 ± 0.283 abc	ns
B4	0.301 ± 0.166 bcd	0.392 ± 0.101 bcdef	ns	0.975 ± 0.241 bc	0.785 ± 0.183 bcd	**	1.136 ± 0.535 a	0.666 ± 0.291 abc	**
B5	0.164 ± 0.164 de	0.373 ± 0.121 cdef	*	0.790 ± 0.192 c	0.760 ± 0.169 bcd	ns	0.740 ± 0.288 abc	0.611 ± 0.255 abc	ns
B6	0.132 ± 0.163 e	0.339 ± 0.118 def	**	0.789 ± 0.226 c	0.663 ± 0.162 cd	ns	0.715 ± 0.278 bc	0.627 ± 0.261 abc	ns
B7	0.271 ± 0.142 bcde	0.582 ± 0.049 a	***	0.921 ± 0.252 bc	1.107 ± 0.222 ab	ns	0.814 ± 0.376 ab	0.570 ± 0.163 abc	*
B8	0.334 ± 0.122 bc	0.556 ± 0.050 ab	***	0.985 ± 0.306 bc	1.078 ± 0.260 ab	ns	0.866 ± 0.465 ab	0.487 ± 0.216 abc	*
B9	0.297 ± 0.145 bcde	0.521 ± 0.077 abc	**	0.773 ± 0.207 c	0.970 ± 0.200 abc	*	0.592 ± 0.249 bc	0.637 ± 0.329 abc	ns
B10	0.244 ± 0.157 bcde	0.440 ± 0.099 abcde	**	0.845 ± 0.233 bc	0.933 ± 0.249 abcd	ns	0.813 ± 0.316 ab	0.752 ± 0.338 ab	ns
B11	0.250 ± 0.168 bcde	0.561 ± 0.048 ab	***	0.761 ± 0.221 c	1.198 ± 0.261 a	**	0.624 ± 0.263 bc	0.455 ± 0.178 bc	*
B12	0.144 ± 0.180 de	0.591 ± 0.052 a	****	0.846 ± 0.237 bc	1.213 ± 0.258 a	ns	0.784 ± 0.362 ab	0.360 ± 0.189 c	*
B13	0.166 ± 0.173 de	0.502 ± 0.087 abcd	***	0.734 ± 0.198 c	1.069 ± 0.250 ab	**	0.587 ± 0.284 bc	0.500 ± 0.281 abc	ns
B14	0.399 ± 0.129 b	0.397 ± 0.108 bcdef	ns	0.930 ± 0.203 bc	0.639 ± 0.169 cd	*	0.551 ± 0.215 bc	0.535 ± 0.234 abc	ns
B15	0.404 ± 0.127 b	0.526 ± 0.058 abc	*	1.121 ± 0.276 ab	0.978 ± 0.201 abc	ns	0.810 ± 0.333 ab	0.518 ± 0.171 abc	*
B16	0.287 ± 0.158 bcde	0.295 ± 0.138 ef	ns	0.923 ± 0.260 bc	0.715 ± 0.212 bcd	ns	0.877 ± 0.429 ab	0.741 ± 0.305 ab	ns
Controle	0.636 ± 0.035 a	0.588 ± 0.046 a	ns	1.382 ± 0.256 a	1.187 ± 0.267 a	ns	0.370 ± 0.152 c	0.346 ± 0.165 c	ns

4.2. Proef 2: Infectiegraad van jonge (MP₅) vs. oude pluggen (MP₁₃)

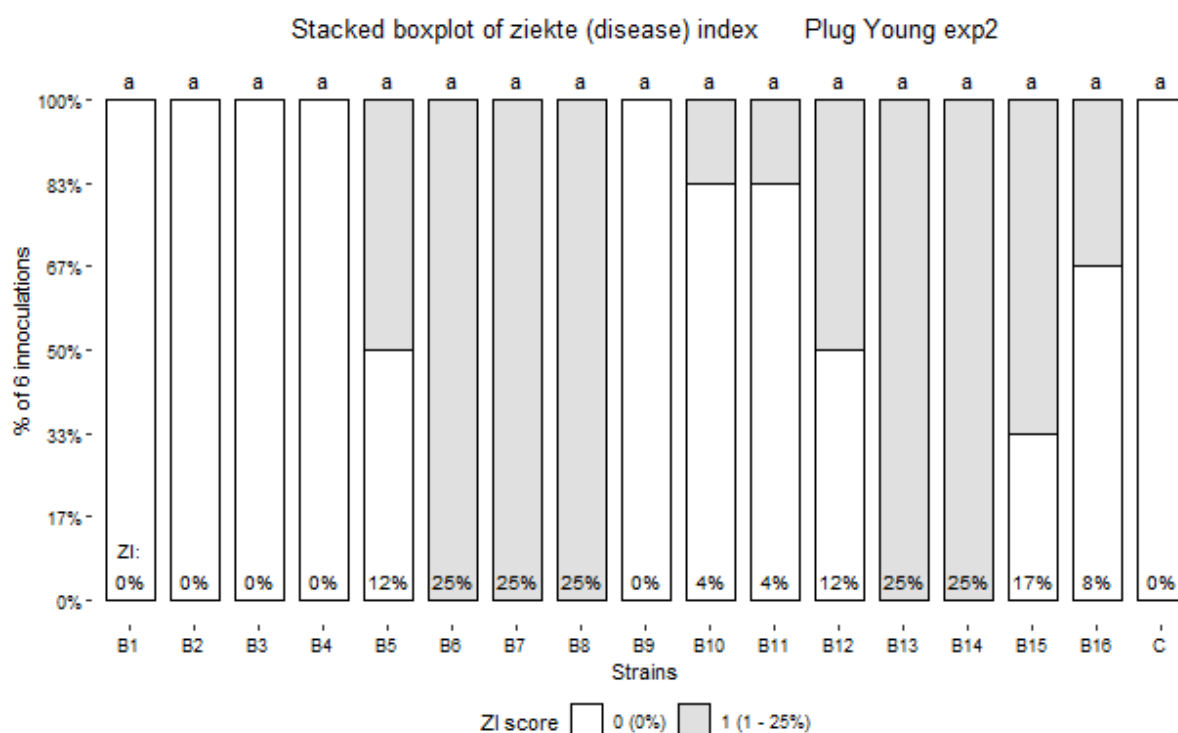
4.2.1. Ziekte index en spreiding

De pathogeniteit van de jonge myceliumpluggen (5 dagen oud, MP₅) bij het tweede experiment is weergegeven in Figuur 20. De pathogeniteit werd geëvalueerd op 3 dpi a.d.h.v. het visuele scoresysteem en de hierop berekende ziekte index (Tabel 4) voor de 16 *Botrytis* isolaten. Wat opvalt is dat de agressiviteit van de isolaten over het algemeen zeer laag is bij de tweede proef, er werd voor geen enkele inoculatie een score hoger dan 1 waargenomen. Isolaten B6, B7, B8, B13 en B14 zijn de meest virulente en werden voor alle 6 inoculaties/isolaat beoordeeld met een score 1. De sla-isolaten B5, B10, B11, B12, B15 en B16 zijn minder virulent en vertoonden maar voor 1 of meer inoculaties/isolaat een score van 1. De isolaten die geen of enkel plaatselijke aantasting veroorzaakten zijn B1, B2, B3, B4 en B9. Volgens de statistische analyse is er geen verschil in pathogeniteit, alle 16 isolaten en de controle behoren tot dezelfde subset.

Bij de infectie met oude myceliumpluggen (13 dagen oud, MP₁₃) werd eveneens een zeer lage pathogeniteit bekomen. Voor 10 isolaten (B1, B2, B3, B4, B8, B10, B11, B13, B15, B16) werd geen infectie vastgesteld na inoculatie (Figuur 21). Isolaat B6 is significant virulenter dan deze 10 isolaten, terwijl de andere isolaten een intermediaire symptoomontwikkeling vertoonden. Isolaat B9 vertoonde maar voor 1 van de 6 inoculaties een score 1 waardoor hij een ZI heeft van 4% en de resultaten niet significant genoeg zijn om ook tot subset b te horen. Isolaat B6 veroorzaakte een gemiddelde ziekte index van 29%, voor alle andere isolaten is dit <10%.

Over het algemeen was de infectie met oude myceliumpluggen minder agressief voor de slabladeren dan de infectie met jonge myceliumpluggen.

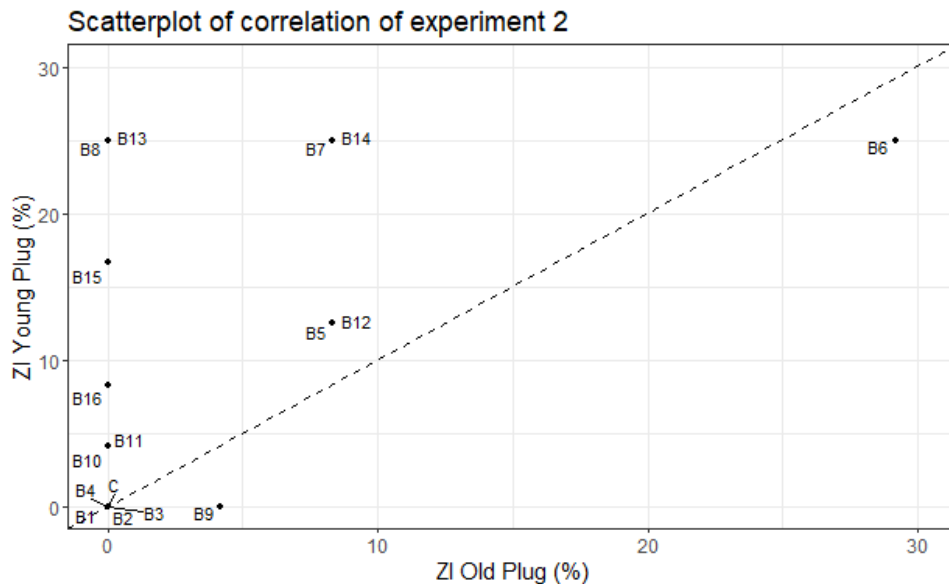
Een scatterplot tussen de inoculatiemethode (MP₅ en MP₁₃) op de pathogeniteit bij sla is weergegeven in Figuur 22. Hieruit is af te leiden dat bij isolaten B5, B6 en B12 de inoculatie methode de pathogeniteit van het isolaat niet beïnvloedde aangezien deze drie isolaten zich dicht bij de bissectrice bevinden. Ook de isolaten in de oorsprong maar deze vertoonden geen pathogeniteit. De isolaten die zich links van de bissectrice bevinden vertonen duidelijk een hogere pathogeniteit wanneer een inoculatie met jonge myceliumpluggen gebeurt dan met oude. Enkele isolaten reageerden gelijkaardig volgens de gemiddelde ZI bij jonge en oude myceliumleeftijd. Dit zijn isolaten B5 en B12; B7 en B14; B8 en B13; en B10 en B11.



Figuur 20: Pathogeniteit van 16 Botrytis isolaten op slabladeren, na inoculatie met jonge myceliumpluggen (MP₅) na 3dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.



Figuur 21: Pathogeniteit van 16 Botrytis isolaten op slabladeren, na inoculatie met oude myceliumpluggen (MP₁₃) na 3dpi. De evaluatie gebeurde met een scoresysteem van geen aantasting (score 0) tot > 75% (score 4). De significante verschillen in ZI score tussen de isolaten wordt aangetoond a.d.h.v. de letters boven de balken (Dunn's post-hoc na Kruskal-Wallis test met significantieniveau 5%). Ook wordt de totale gemiddelde Ziekte Index (ZI) bij ieder isolaat onderaan de figuur weergegeven.



Figuur 22: Correlatie tussen de waarden van de ziekte-index bepaald via 2 methoden van inoculatie: infectie met jonge myceliumpluggen (MP₅) en oude myceliumpluggen (MP₁₃) bij experiment 2. De regressierechte door de oorsprong werd berekend met zijn helling. De stippellijn duidt op de bissectrice met volledige correlatie (helling=1).

4.2.2. Pathoviewer resultaten

Opnieuw worden enkel de boxplots van isolaten B6 en B8 (beide virulent) en B2 en B16 (weinig virulent) vertoont in functie van de infectietijd. Voor het volledig overzicht van de andere isolaten wordt verwezen naar de bijlage. De pathogeniteit van alle isolaten op 5 dpi en ook de vergelijking tussen de inoculatiemethodes is weergegeven in Tabel 7.

Chlorofylfluorescentie

In Figuur 23 en Figuur 24 wordt het verloop van F_v/F_m in functie van de infectietijd weergegeven voor de geselecteerde isolaten. Voor zowel de pluggen als sporen werd steeds een dalende tendens bekomen voor isolaten B2 en B6 terwijl voor B8 en B16 enkel de inoculatie met jonge pluggen resulteerde in een significante afname van F_v/F_m . De inoculatie met jonge pluggen (MP₅) zorgde voor een significante daling op 1 dpi voor B6, op 2 dpi voor B2 en B8 en op 3 dpi voor. Bij de infectie met oude pluggen (MP₁₃) zorgde B6 voor een significante daling op 2 dpi, en B2 op 3 dpi terwijl bij de inoculatie met B8 en B16 geen significante wijziging werd vastgesteld.

Tabel 7 geeft weer welke isolaten op 3dpi resulteren in de sterkste afname van F_v/F_m . Bij de inoculatieproef met jonge pluggen is dit isolaat B6, gevolgd door isolaat B8. De isolaten die minder virulent zijn, zijn de isolaten B4 en B9. Bij de inoculatie met oude pluggen heeft enkel isolaat B6 de laagste F_v/F_m waarden en is dus het meest virulent. Alle andere isolaten zijn weinig virulent. (zie ook Figuur 23 en Figuur 24).

Algemeen is duidelijk dat de proef met oude pluggen voor een minder sterke daling in F_v/F_m zorgde (Tabel 7). De vergelijking tussen de inoculatie methode toont aan dat enkel voor B8, B11, B13 en B14 er een significant verschil tussen de inoculatiemethode werd aangetroffen voor F_v/F_m . Er was een zeer significante hogere F_v/F_m voor isolaat B8 bij oude pluggen ($P < 0.001$), dit verschil is dan ook duidelijk visueel te zien op Figuur 24.

Chlorofyl index

In Figuur 23 en Figuur 24 wordt het verloop van Chlldx in functie van de infectietijd weergegeven voor de geselecteerde isolaten. Er waren geen isolaten die zowel voor de jonge (MP₅) als oude pluggen (MP₁₃) een dalende tendens vertoonden, bij B6, B8 en B16 vertoonde enkel de inoculatie met jonge pluggen een significante afname van Chlldx. De inoculatie met jonge pluggen zorgde voor een significante daling op 2 dpi voor B6 en B8, op 3 dpi voor B16 terwijl bij de inoculatie met B2 geen significante wijziging werd vastgesteld. Bij de infectie met oude pluggen (MP₁₃) werden er voor alle vier de isolaten geen significante wijzigingen vastgesteld.

Tabel 7 geeft weer welke isolaten op 3dpi resulteren in de sterkste afname van Chlldx. Bij de inoculatieproef met jonge pluggen is dat isolaat B8. Isolaat B4 en B9 waren significant minder virulent. Bij de inoculatie met oude pluggen heeft B6 de laagste Chlldx waarden gevolgd door B2. De isolaten die weinig virulent zijn, zijn B11 gevolgd door B8. (zie ook Figuur 23 en Figuur 24).

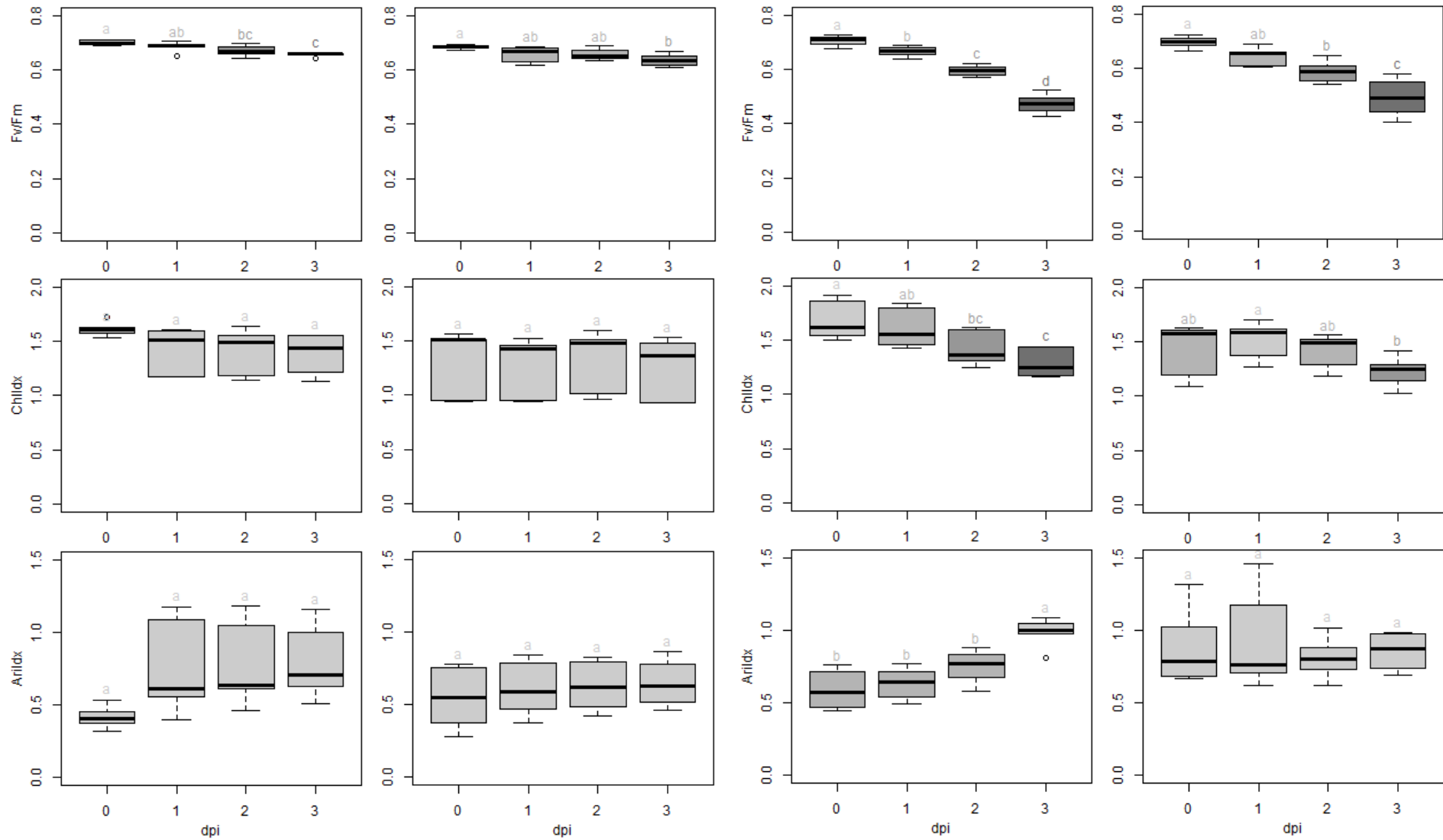
Over het algemeen werd een minder sterke daling in Chlldx bekomen voor de oude pluggen (Tabel 7). De vergelijking tussen de inoculatie methode toont aan dat enkel voor B7, B8, B11 en B16 een significant verschil tussen de inoculatiemethode werd aangetroffen voor Chlldx. Er was een zeer significante hogere Chlldx voor isolaat B16 ($P < 0.01$) en B8 ($P < 0.0001$) bij inoculatie met oudere pluggen.

Anthocyaan index

In Figuur 23 en Figuur 24 wordt het verloop van Arildx in functie van de infectietijd weergegeven voor de geselecteerde isolaten. Er waren geen isolaten die zowel voor de jonge (MP₅) als oude pluggen (MP₁₃) een stijgende tendens vertoonden, bij B6, B8 en B16 vertoonde enkel de inoculatie met jonge pluggen een stijging in Arildx. De inoculatie met jonge pluggen zorgde voor een significante stijging op 1dpi voor B8, op 2 dpi voor B16 en op 3 dpi voor B16 terwijl bij de inoculatie met B2 geen significante wijziging werd vastgesteld. Bij de infectie met oude pluggen (MP₁₃) werden er voor alle vier de isolaten geen significante wijzigingen vastgesteld.

Tabel 7 geeft weer welke isolaten op 3dpi resulteren in de sterkste stijging van Arildx. Bij de inoculatieproef met jonge pluggen zorgt enkel isolaat B6 voor een significante stijging in anthocyaan. Isolaten B5 en B12 hadden een lage Arildx. Bij de inoculatie met oude pluggen is er volgens de significantietest niet genoeg bewijs om te stellen dat de isolaten van elkaar verschillen, alle 16 isolaten behoren tot dezelfde subset.

Over het algemeen veroorzaken de inoculaties met jonge pluggen meer anthocyaan en dus ook biotische stress. De vergelijking tussen de inoculatie methode toont aan dat er voor isolaten B2, B6, B8, B10, B13, B14 en B15 een significant verschil tussen de inoculatiemethode werd aangetroffen voor Arildx (zie ook Figuur 23 en Figuur 24).

Exp2: B2 Jonge plug (MP₅)**B2 Oude plug (MP₁₃)****B6 Jonge plug (MP₅)****B6 Oude plug (MP₁₃)**

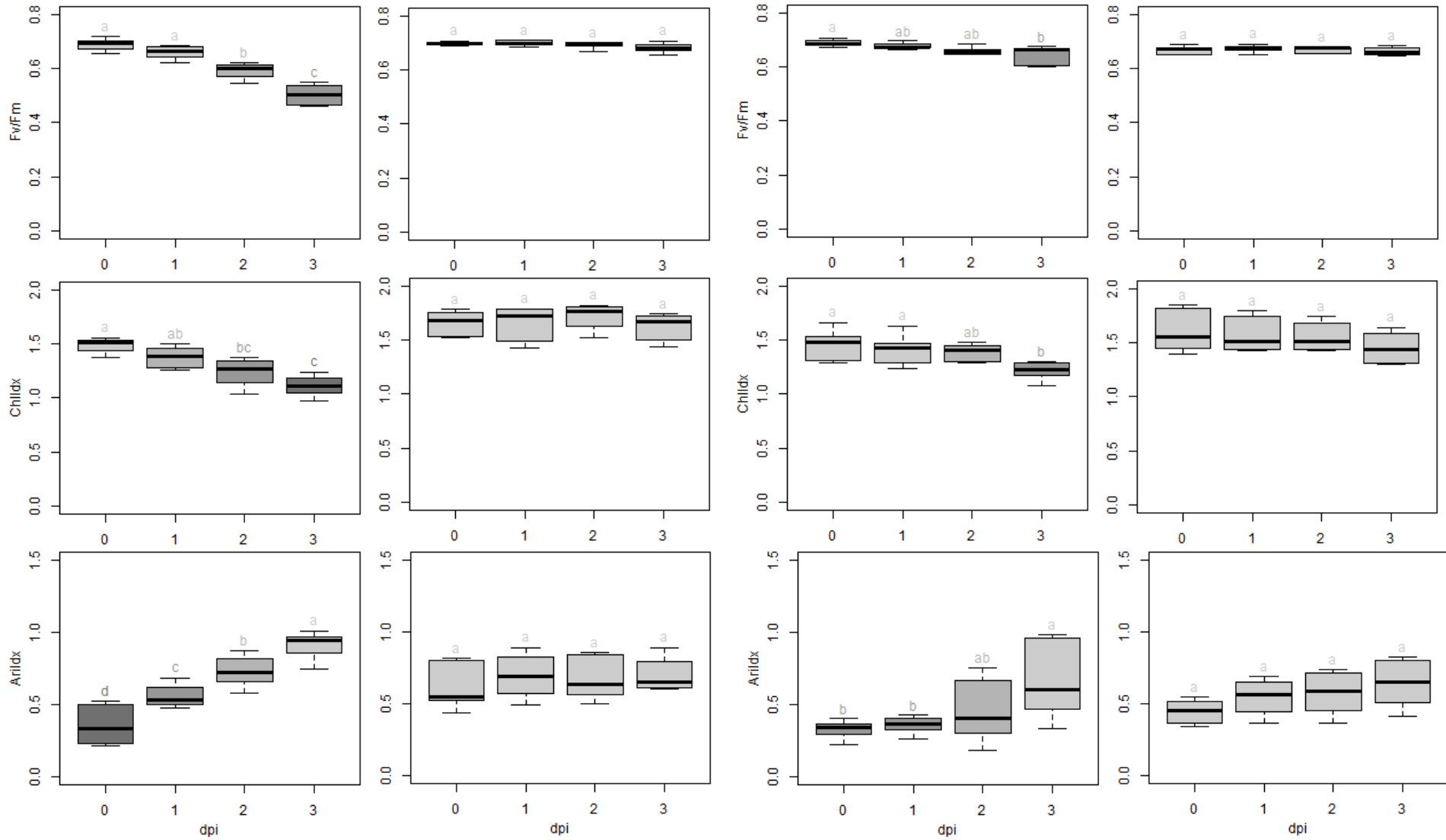
Figuur 23: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 2 voor isolaten B2 en B6 van F_v/F_m , Chlidx en Arlidx voor 0 tot 3dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significatieniveau 5%).

Exp2: B8 Jonge plug (MP₅)

B8 Oude plug (MP₁₃)

B16 Jonge plug (MP₅)

B16 Oude plug (MP₁₃)



Figuur 24: Geclusterde figuur van de boxplots bij experiment 2 voor isolaten B8 en B16 van Fw/Fm, Chldx en Arldx voor 0 tot 3dpi. De post-hoc resultaten van de ANOVA test tussen de verschillende opvolgingsdagen voor elke parameter en elke methode van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%).

Tabel 7: Analyseresultaten van experiment 2 bij 3dpi voor F_v/F_m , Chlldx en Arlldx. Het gemiddelde en de standaard deviatie van de 6 inoculaties wordt weergegeven. De resultaten van de post-hoc van de ANOVA test tussen de isolaten zelf wordt voorgesteld aan de hand van letters voor de homogene subsets (significantieniveau 5%). De resultaten van de gepaarde T-test tussen de 2 methoden van inoculatie wordt voorgesteld aan de hand van sterretjes in het geval van significantie ($P > 0.05$ 'ns'; $P \leq 0.05$ '*'; $P \leq 0.01$ '**'; $P \leq 0.001$ '***'; $P \leq 0.0001$ '****').

Exp2 3dpi	F_v/F_m			Chlldx			Arlldx		
	Gemiddelde en ANOVA sig.		T-test	Gemiddelde en ANOVA sig.		T-test	Gemiddelde en ANOVA sig.		T-test
	Jonge pluggen	Oude pluggen	sig.	Jonge pluggen	Oude pluggen	sig.	Jonge pluggen	Oude pluggen	sig.
B1	0.663 ± 0.033 abc	0.650 ± 0.033 a	ns	1.393 ± 0.240 abc	1.328 ± 0.239 abcd	ns	0.800 ± 0.220 ab	0.756 ± 0.198 a	ns
B2	0.658 ± 0.035 abc	0.637 ± 0.034 a	ns	1.391 ± 0.269 abc	1.268 ± 0.233 cd	ns	0.786 ± 0.224 ab	0.643 ± 0.170 a	*
B3	0.653 ± 0.040 abc	0.661 ± 0.034 a	ns	1.351 ± 0.279 abc	1.400 ± 0.276 abcd	ns	0.762 ± 0.243 ab	0.769 ± 0.205 a	ns
B4	0.681 ± 0.035 a	0.682 ± 0.029 a	ns	1.587 ± 0.288 a	1.561 ± 0.261 abc	ns	0.652 ± 0.224 ab	0.600 ± 0.179 a	ns
B5	0.647 ± 0.047 abc	0.642 ± 0.074 a	ns	1.457 ± 0.301 ab	1.505 ± 0.295 abcd	ns	0.598 ± 0.213 b	0.726 ± 0.297 a	ns
B6	0.474 ± 0.146 f	0.492 ± 0.131 b	ns	1.287 ± 0.284 abc	1.228 ± 0.273 d	ns	0.989 ± 0.458 a	0.853 ± 0.470 a	*
B7	0.604 ± 0.072 bcd	0.630 ± 0.053 a	ns	1.278 ± 0.225 abc	1.510 ± 0.327 abcd	*	0.719 ± 0.396 ab	0.564 ± 0.289 a	*
B8	0.504 ± 0.106 ef	0.683 ± 0.035 a	***	1.109 ± 0.214 c	1.626 ± 0.313 ab	****	0.913 ± 0.520 ab	0.698 ± 0.239 a	*
B9	0.688 ± 0.030 a	0.668 ± 0.049 a	ns	1.556 ± 0.267 a	1.561 ± 0.278 abc	ns	0.687 ± 0.225 ab	0.788 ± 0.325 a	ns
B10	0.656 ± 0.052 abc	0.639 ± 0.035 a	ns	1.476 ± 0.265 ab	1.356 ± 0.216 abcd	ns	0.746 ± 0.282 ab	0.575 ± 0.175 a	*
B11	0.636 ± 0.052 abcd	0.686 ± 0.033 a	*	1.321 ± 0.242 abc	1.656 ± 0.297 a	*	0.666 ± 0.227 ab	0.661 ± 0.221 a	ns
B12	0.632 ± 0.043 abcd	0.640 ± 0.052 a	ns	1.264 ± 0.271 abc	1.403 ± 0.227 abcd	ns	0.561 ± 0.216 b	0.598 ± 0.226 a	ns
B13	0.567 ± 0.132 de	0.686 ± 0.033 a	*	1.322 ± 0.259 abc	1.447 ± 0.283 abcd	ns	0.926 ± 0.437 ab	0.664 ± 0.208 a	*
B14	0.591 ± 0.116 cd	0.662 ± 0.048 a	*	1.288 ± 0.273 abc	1.405 ± 0.266 abcd	ns	0.822 ± 0.396 ab	0.662 ± 0.230 a	*
B15	0.642 ± 0.072 abc	0.655 ± 0.034 a	ns	1.416 ± 0.252 abc	1.332 ± 0.249 abcd	ns	0.695 ± 0.283 ab	0.524 ± 0.159 a	*
B16	0.648 ± 0.058 abc	0.665 ± 0.034 a	ns	1.218 ± 0.249 bc	1.455 ± 0.311 abcd	**	0.658 ± 0.262 ab	0.639 ± 0.229 a	ns
Controle	0.670 ± 0.030 ab	0.639 ± 0.051 a	ns	1.394 ± 0.285 abc	1.325 ± 0.264 bcd	ns	0.604 ± 0.204 ab	0.708 ± 0.281 a	ns

5. Discussie

5.1. Kwalitatieve en kwantitatieve parameters voor ziekte evaluatie

Tabel 8: Vergelijkende tabel van ZI, F_v/F_m , Chlldx en Arlldx voor de twee experimenten. De kleurencodes geven de trends weer en zijn gebaseerd op de waardeverdeling van de vier parameters. ZI en Arlldx gaan van groen (laagste waarde) naar rood (hoogste waarde), voor F_v/F_m en Chlldx is dit omgekeerd.

	Exp 1		Exp 2		Exp 1		Exp 2	
	Young plugs MP5 (5dpi)	Old spores (5dpi)	Young plugs MP5 (3dpi)	Old plugs MP13 (3dpi)	Young plugs MP5 (5dpi)	Old spores (5dpi)	Young plugs MP5 (3dpi)	Old plugs MP13 (3dpi)
	Ziekte index (ZI)				Chlorofyl fluorescentie (F_v/F_m)			
B1	75	29	0	0	0,170	0,444	0,663	0,650
B2	75	54	0	0	0,216	0,231	0,658	0,637
B3	75	21	0	0	0,193	0,486	0,653	0,661
B4	67	46	0	0	0,301	0,392	0,681	0,682
B5	71	42	12	8	0,164	0,373	0,647	0,642
B6	83	38	25	29	0,132	0,339	0,474	0,492
B7	42	0	25	8	0,271	0,582	0,604	0,630
B8	33	0	25	0	0,334	0,556	0,504	0,683
B9	38	17	0	4	0,297	0,521	0,688	0,668
B10	58	25	4	0	0,244	0,440	0,656	0,639
B11	46	0	4	0	0,250	0,561	0,636	0,686
B12	83	4	12	8	0,144	0,591	0,632	0,640
B13	75	12	25	0	0,166	0,502	0,567	0,686
B14	29	25	25	8	0,399	0,397	0,591	0,662
B15	38	8	17	0	0,404	0,526	0,642	0,655
B16	50	54	8	0	0,287	0,295	0,648	0,665
C	0	0	0	0	0,636	0,588	0,670	0,639
	Anthocyaan index (Arlldx)				Chlorofyl index (Chlldx)			
B1	0,871	0,839	0,800	0,756	0,798	0,872	1,393	1,328
B2	0,855	0,650	0,786	0,643	0,860	0,550	1,391	1,268
B3	0,905	0,594	0,762	0,769	0,767	0,933	1,351	1,400
B4	1,136	0,666	0,652	0,600	0,975	0,785	1,587	1,561
B5	0,740	0,611	0,598	0,726	0,790	0,760	1,457	1,505
B6	0,715	0,627	0,989	0,853	0,789	0,663	1,287	1,228
B7	0,814	0,570	0,719	0,564	0,921	1,107	1,278	1,510
B8	0,866	0,487	0,913	0,698	0,985	1,078	1,109	1,626
B9	0,592	0,637	0,687	0,788	0,773	0,970	1,556	1,561
B10	0,813	0,752	0,746	0,575	0,845	0,933	1,476	1,356
B11	0,624	0,455	0,666	0,661	0,761	1,198	1,321	1,656
B12	0,784	0,360	0,561	0,598	0,846	1,213	1,264	1,403
B13	0,587	0,500	0,926	0,664	0,734	1,069	1,322	1,447
B14	0,551	0,535	0,822	0,662	0,930	0,639	1,288	1,405
B15	0,810	0,518	0,695	0,524	1,121	0,978	1,416	1,332
B16	0,877	0,741	0,658	0,639	0,923	0,715	1,218	1,455
C	0,370	0,346	0,604	0,708	1,382	1,187	1,394	1,325

Tabel 9: Correlatietabel tussen de Ziekte index (ZI) en de drie parameters van de pathoviewer F_v/F_m , Chlldx en Arildx. De tabel toont steeds de R^2 waarde berekend met een betrouwbaarheidsinterval van 95%.

	Exp 1		Exp 2	
	Young plugs MP5 (5dpi)	Old spores (5dpi)	Young plugs MP5 (3dpi)	Old plugs MP13 (3dpi)
	Ziekte index (ZI)			
Chlorofyl fluorescentie (F_v/F_m)	0,8552	0,9197	0,6850	0,7763
Chlorofyl index (Chlldx)	0,2697	0,4876	0,2849	0,1978
Anthocyaan index (Arildx)	0,5456	0,8052	0,3724	0,1065

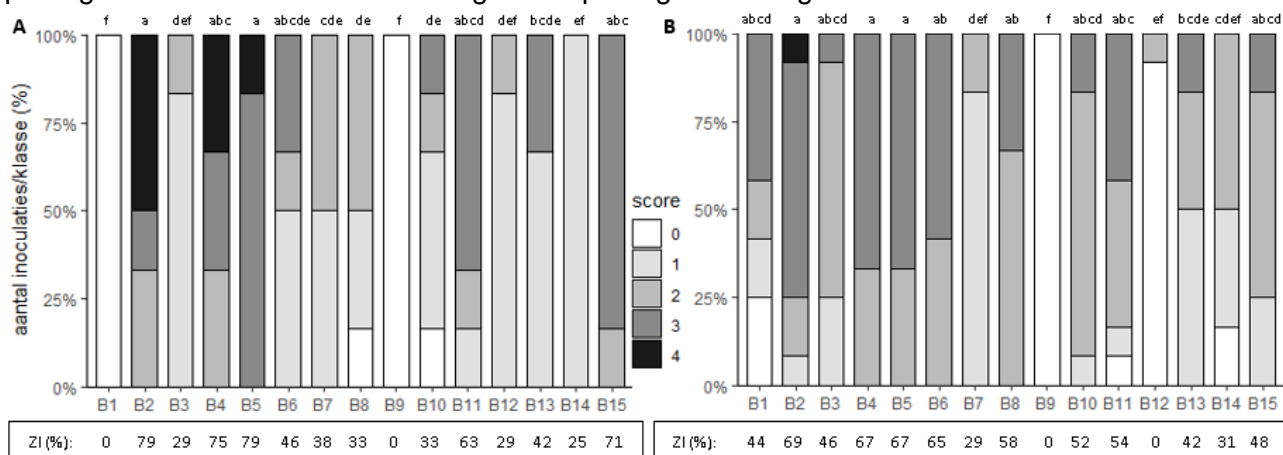
De correlatietabel (Tabel 9) tussen de kwalitatieve Ziekte Index parameter en de drie kwantitatieve Pathoviewer parameters maakt duidelijk dat de Chlorofyl fluorescentie of Maximum kwantum opbrengst van fotosysteem II (F_v/F_m) de meest indicatieve parameter is voor de gezondheid van de bladeren naast de visuele ZI. Voor de virulentie van de isolaten zal dus vooral gefocust worden op de ZI en F_v/F_m , de andere parameters vertellen iets meer over de stress die de waardplant ondervindt. Opmerkelijk is dat de Anthocyaan index (Arildx) ook een goede correlatie vertoont bij de inoculatie met sporenoplossing. Voor een infectie met sporen is de anthocyaan inhoud dus ook een goede indicator voor de pathogeniteit. Volgens onderzoek door Mestdagh (2019) is F_v/F_m de beste parameter voor het opvolgen van de efficiëntie van het fotosysteem II en Arildx de beste parameter om de gezondheid van de bladeren na te gaan. Dit onderzoek toont echter aan dat F_v/F_m algemeen een betere indicator is voor de pathogeniteit, de Arildx parameter wordt verder onderzocht (5.3 Rol van anthocyaanvorming).

Tabel 8 toont dat in experiment 1 de isolaten B1, B2, B3, B5, B6, B12 en B13 het meest virulent zijn bij de inoculatie met jonge pluggen. Dezelfde conclusies blijken uit Tabel 6 waarbij deze isolaten geen significante verschillen vertoonden voor de F_v/F_m parameter. Bij de proef met sporen inoculaties werden variabele resultaten bekomen, er werd geen duidelijk rechtstreeks verband met de mycelium inoculaties gevonden. Inoculaties B1, B2, B3, B4 en B9 slaagden er niet in de waardplant te infecteren, bij de kleurencodes voor de F_v/F_m parameter kan dezelfde trend waargenomen worden. Voor de andere parameters is opmerkelijk dat de sterkste dalingen in chlorofyl index, hoewel soms beperkt, steeds bij inoculatie met sporen voorkwam. Er waren 3 isolaten B2, B6 en B14 bij de sporenproef die voor een gemiddelde Chlldx lager dan 0.7 zorgden in Tabel 6, de kleurencodes in Tabel 8 vertonen hetzelfde. Anderzijds werd voor de pluggenproef nooit een gemiddelde Chlldx lager dan 0.7 behaald, zelfs niet voor de isolaten die volgens de ZI het agressiefst waren. Dit is een opmerkelijk verschil tussen de pluggen en sporen, hoewel de pluggenproef agressiever was volgens de ZI en F_v/F_m parameters lijkt een succesvolle infectie met sporenoplossing een nadeliger effect te hebben op het gehalte aan chlorofyl. Ook opmerkelijk was dat er voor de anthocyaan index variabele resultaten bekomen werden voor de laatste 3 dagen. Initieel werd een stijging in de anthocyaan index waargenomen maar Figuur 8 toont hoe de plaatsen het dichtst bij de inoculatieplaats terug dalen in anthocyaan gehalte. De plaats met de hoogste anthocyaan index is steeds het front van de infectie radius. Dit is te verwachten omdat de waardplant initieel anthocyaan zal aanmaken maar naarmate de schimmel overneemt zullen de delen van het blad het dichtste bij de inoculatieplaats volledig sterven. Daardoor zal het anthocyaangehalte eerst toenemen en daarna stabiliseren of terug afnemen.

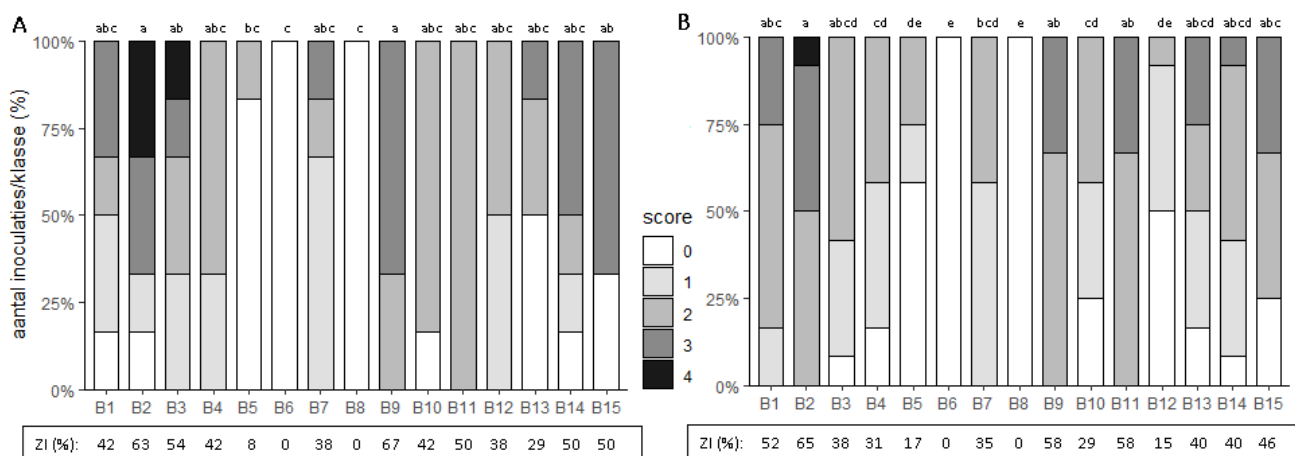
Verder maakt Tabel 8 duidelijk dat de agressiviteit over het algemeen zeer laag is bij het tweede experiment. Dit kan twee oorzaken hebben, door de vroegere evaluatie bij 3dpi was de infectie mogelijk nog in een te vroeg stadia. Of door het incorrect invriezen van het mycelium

met eventueel mutaties en/of virulentieverlies als gevolg. Het gebruikt van de andere sla cultivar (*Presteria*) heeft geen invloed volgens de rassenproef door Demeulemeester et al. (Demeulemeester et al., 2017) (Tabel 1). Naast de algemeen verlaagde agressiviteit werd bij heel wat isolaten geen infectie of geen spreiding waargenomen. Er werden enkele gelijkenissen waargenomen volgens de ZI, voor zowel de jonge als oude myceliumpluggen vertoonden isolaat B1, B2, B3 en B4 geen pathogeniteit. Bij experiment 1 vertoonden deze vier isolaten wel telkens een infectie met hoge score. De F_v/F_m parameter bevestigt dit maar er was volgens Tabel 7 geen significant verschil tussen deze vier isolaten en de andere. Het is mogelijk dat deze vier isolaten aangetast zijn door het incorrect invriezen en opnieuw ontdooien, of door het gebruik van een andere sla cultivar als waardplant. Anderzijds vertoont isolaat B6 duidelijk meer virulentie bij de jonge en oude pluggen dan de andere bij experiment 2. Dit werd bevestigd in Tabel 7. Voor de chlorofyl index werd ook een interessant punt gevonden in Tabel 7. Bij de jonge pluggen (MP_5) behoort de controle tot alle drie de mogelijke subsets a, b en c. Bij de oude pluggen (MP_{13}) werd hetzelfde waargenomen, opnieuw behoort de controle tot drie subsets b, c en d en heeft de controle dus zeer veel variatie voor de Chldx parameter. Dit wijst erop dat de infectie door *Botrytis* niet de enige variabele is die chlorofyl inhoud bepaald, andere factoren kunnen ook invloed hebben. Zo wordt de chlorofylinhoud ook hoofdzakelijk bepaald door de ouderdom van de bladeren maar ook hun genetica evenals stress door andere factoren kan invloed hebben die doorweegt.

Wanneer we de resultaten van experiment 1 bij 5dpi vergelijken met de resultaten door Mestdagh (2019) bij 5dpi kunnen we volgende conclusies nemen. Voor de pluggenproef werden myceliumpluggen van 13 dagen oud gebruikt. De resultaten komen echter goed overeen, bij beiden zijn B8, B9 en B14 de minst agressieve met de minste totale ZI (Figuur 14). Bij de proeven door Mestdagh was B12 ook telkens een van de minst agressieve maar dit was niet reproduceerbaar. Over het algemeen werden meer agressieve isolaten bekomen in vergelijking met de resultaten van Mestdagh. B1, B3, B6 en B10 zijn agressiever wanneer het mycelium jonger is. Voor de sporenproef werd er over het algemeen minder agressieve resultaten en minder geslaagde inoculaties waargenomen (Figuur 15). B2 is bij beiden de meest agressieve en B8 vertoonde bij beiden geen infectie. Voor B7, B9, B11, B12 en B15 vertoonden de resultaten minder agressiviteit en een lagere gemiddelde ziekte index in vergelijking met de resultaten door Mestdagh. B7, B11, B12 en B15 vertoonden zelfs geen of maar enkele geslaagde inoculaties. Voor isolaat B6 werd wel infectie waargenomen in vergelijking met de resultaten van Mestdagh. Ook B5 leek veel agressiever dan de vorige resultaten. Er is veel variatie tussen de experimenten maar de twee extremen B2 met hoge pathogeniteit en B8 met geen pathogeniteit geven dezelfde resultaten.



Figuur 25: Stacked boxplot voor pluggen plantenproef 1&2 2018 (Mestdagh, 2019)



Figuur 26: Stacked boxplot voor sporen plantenproef 1&2 2018 (Mestdagh)

5.2. Verklaringen uit de literatuur

B1 en B6

B1 is de kruising tussen 2 ascospore nakomelingen van wild-type veld isolaten (Faretra & Pollastro, 1991). Bij experiment 1 vertoonde B1 volgens de ZI veel virulentie bij de pluggen, bij de sporen werd ook virulentie bekomen maar met veel variatie tussen de herhalingen (Figuur 14). B6 daarentegen is een geïnduceerde haploïde stam van een wild-type veld isolaat, dit wild-type isolaat is verwant aan B1 (Büttner et al., 1994). Door de haploïdie vertoont B6 verhoogde gevoeligheid voor mutagene stoffen. Bij experiment 1 behoorde B6 tot een van de meest agressieve isolaten bij de infectie met pluggen en de infectie met sporen (Figuur 15). De verhoogde gevoeligheid van B6 werd niet waargenomen bij dit experiment. B1 en B6 zijn verwant aan elkaar en ze reageren dan ook gelijkaardig volgens de ziekte index. Volgens de F_v/F_m parameter vertonen B1 en B6 beiden een significant verschil tussen inoculatie met pluggen en sporen, voor de andere twee parameters werd steeds geen significantie gevonden tussen de twee inoculatiemethoden (Tabel 6). Voor de significantie tussen isolaat B1 en B6 werd voor alle parameters F_v/F_m , Chlldx en Arlldx gevonden dat ze niet significant verschillend zijn, dit sluit goed aan bij de achtergrond dat B1 en B6 verwant zijn aan elkaar en dat de verhoogde gevoeligheid van B6 geen effect heeft op zijn virulentie.

Bij experiment 2 vertoonde B1 volgens de ZI geen virulentie bij de jonge en oude pluggen (Figuur 20). De geïnduceerde haploïde stam B6 daarentegen had matige virulentie bij de jonge pluggen, maar behoorde toch tot de meest virulente. En vertoonde de hoogste virulentie bij de oude pluggen (Figuur 21). Volgens de parameters van de Pathoviewer vertonen B1 en B6 beiden geen significant verschil tussen inoculatie met jonge pluggen en met oude pluggen voor de parameters F_v/F_m en Chlldx (Tabel 7). Voor de Arlldx vertoonde enkel B6 een significant verschil tussen inoculatie met jonge en oude pluggen. Voor de significantie tussen isolaat B1 en B6 werd enkel voor de parameter F_v/F_m een significant verschil gevonden, dit verschil was te zien bij de jonge pluggen maar ook bij de oude pluggen. De visuele evaluatie en parameters van de Pathoviewer geven dus hetzelfde resultaat, B1 en B6 reageerde significant verschillend bij de jonge pluggen en bij de oude pluggen ondanks dat ze verwant zijn.

B2 en B7

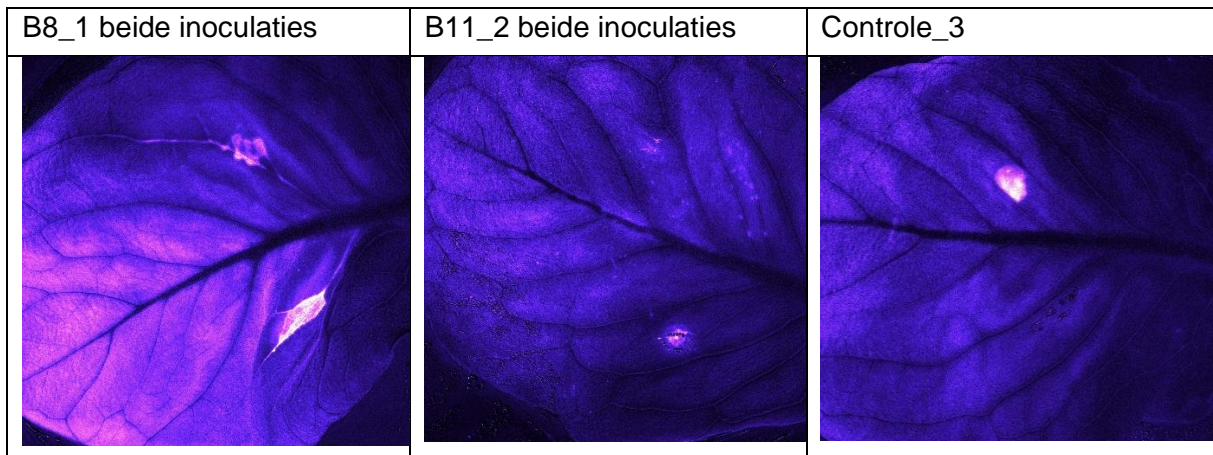
B2 is een wild-type veld isolaat van druif (Hamada et al., (1994). Voor experiment 1 behoorde B2 tot de meest virulente volgens de ZI bij de infectie met pluggen, maar ook voor de infectie met sporen (Figuur 14). B7 is een mutant van B2 verkregen door insertiemutagenese (Ph Reignault et al., 2000). Hij is niet pathogeen maar nog steeds in staat zijn om de gastheerplant

te penetreren, verder heeft deze mutant een oxaalzuur-deficiëntie en lokt hij een hogere plantverdedigingsrespons uit (Kunz et al., 2006). B7 behoorde tot de minst virulente isolaten bij de pluggen en sporen volgens de ZI (Figuur 15). B2 en B7 zijn dus ook verwant aan elkaar maar doordat de mutante B7 niet pathogeen is werd een groot verschil in virulentie bekomen. Voor de F_v/F_m parameter vertoonde B2 geen significant verschil tussen inoculatie met pluggen en sporen, B7 daarentegen vertoonde een zeer significant verschil (Tabel 6). Voor de Chlldx werd enkel een significantie gevonden voor B2 en voor de Arildx werd enkel een significantie gevonden voor B7. Voor de significantie tussen de twee isolaten B1 en B6 werd echter een significant verschil gevonden voor de F_v/F_m en Chlldx voor de inoculatie met sporen. Dus volgens de ZI werd een groot verschil in virulentie bekomen tussen B2 en B7 voor de proef met pluggen en met sporen. De parameters van de Pathoviewer maken echter duidelijk dat het grootste verschil zich bevindt in de inoculatie met sporen. Dit is te verklaren doordat B7 of A336 een hogere plantverdediging uitlokt (Kunz et al., 2006). En deze plantverdediging kan effectiever zijn tegen de ontkieming van de sporen dan mycelium.

Voor experiment 2 vertoonde B2 geen virulentie bij de infectie met jonge en met oude pluggen volgens de ZI (Figuur 20). De mutante B7 vertoonde echter wel lage virulentie bij de jonge en oude pluggen (Figuur 21). Dit is een zeer eigenaardig resultaat maar kan mogelijks te verklaren zijn doordat B2 zijn virulentie deels verloren is door incorrect invriezen. Voor de F_v/F_m parameter vertoonde B2 en B7 geen significant verschil tussen inoculatie met jonge pluggen en oude pluggen (Tabel 7). Voor de Chlldx werd enkel een significantie gevonden voor B7 en voor de Arildx werd een significant verschil gevonden voor B2 en B7. Voor het verschil tussen de twee isolaten B2 en B7 werd echter geen significant verschil gevonden voor alle drie de parameters bij beide methoden van inoculatie. De parameters van de Pathoviewer maken dus duidelijk dat het visuele verschil in ZI dus niet significant genoeg is en dat B2 en B7 gelijkaardig weinig virulentie vertonen. Normaal werd verwacht dat het niet-pathogene isolaat B7 significant minder virulentie dan B2 zou vertonen, de resultaten vertoonden over het algemeen te weinig virulentie om hier significante verschillen in te zien.

5.3. Rol van anthocyaanvorming

De isolaten die een score 0 kregen B8 en B11 bij de sporenoplossing werden extra onderzocht. Dit wijst op geen spreiding door het niet kunnen infecteren van de waardplant. In de literatuurstudie werd duidelijk dat het gehalte aan anthocyaan pigmenten in bladeren zal stijgen als stressrespons tegen het koloniseren van een schimmel (Chalker-Scott, 1999). Er wordt gefocust op B8 en B11 omdat bij deze geen enkele van de 6 inoculaties slaagden. Bij de inoculaties van B8 replica 1 wordt een hoge plaatselijke anthocyaan reflectie waargenomen. Op de kleurenfoto's zijn deze plaatsen op het blad bijna zwart gekleurd maar toch niet verzwakt door de schimmel. Voor B11 replica 2 wordt hetzelfde waargenomen, donker zwarte plekken op de plaats van inoculatie die een hoge hoeveelheid anthocyaan bevatten. Bij de controle werd er voor 5 van de 6 inoculaties bijna niets van anthocyaan gemeten. Er was 1 uitzondering, bij replica 3 van de Controle vertoond de bovenste inoculatie hoge anthocyaan index maar op de kleurenfoto's is er geen zwarte plek te zien maar eerder een zeer kleine plaatselijke aantasting door een schimmel. Dit is waarschijnlijk een contaminatie uit de lucht door het openen van de bakjes.



Figuur 27: Anthocyaan foto's bij 5dpi van niet-infecterende sporen inoculaties.

Voor alle niet geslaagde inoculaties met sporenoplossing werd een zwarte plek of stipjes waargenomen op de bladeren met een hoge anthocyaan reflectie, dit is wellicht een HR respons met plaatselijke celdood als gevolg. Bij de controles is dit niet het geval, dit wijst erop dat het verdedigingsmechanisme met anthocyaan van de waardplant een rol speelt in het afweren van sporen. Het lijkt alsof het infecteren met mycelium pluggen veel agressiever is en het verdedigingsmechanisme van de waardplant veel effectiever en specifiek is tegen sporen dan tegen het mycelium. Dit is een logische verklaring vanuit de evolutionaire achtergrond omdat bladeren meer sporadisch in contact komen met sporen uit de lucht. Zo hebben ze de kans om een infectie te overwinnen en dit is een vorm van selectie. Wanneer een mycelium infectie via direct contact zich voortdoet is de infectie meestal reeds in een later stadia en is verdediging moeilijker.

De correlatie uit Tabel 9 maakte ook reeds duidelijk dat de Anthocyaan index (Arildx) een goede indicator is bij inoculaties met sporenoplossing. Dit kan ook te verklaren zijn doordat sporeninfecties een hogere anthocyaan stressrespons uitlokken en deze stressrespons een betere correlatie vertoont met de pathogeniteit van sporen. Volgens onderzoek door Mestdagh (2019) is Arildx de beste parameter om de gezondheid van de bladeren na te gaan. Dit onderzoek toont echter aan dat dit enkel het geval is wanneer de anthocyaan stressrespons correleert met de gezondheid van het blad.

6. Besluit

De eerste onderzoeksvraag 'Hoe verschillen de *Botrytis cinerea* isolaten onderling?' tracht de variatie tussen de *Botrytis cinerea* isolaten verder te verklaren. Dit werd nagegaan aan de hand van kwalitatieve en kwantitatieve parameters. De pathogeniteit tussen de 16 *Botrytis* isolaten verschilde duidelijk van elkaar bij zowel infectie met jonge pluggen (MP₅) dan met sporenoplossing. Deze variabiliteit was maar in sommige gevallen te verklaren vanuit hun oorsprong. Ook werd een duidelijk verschil in virulentie waargenomen tussen de inoculatie met pluggen in vergelijking met de virulentie bij de sporen inoculatie voor dezelfde isolaten. De inoculatie met sporen was over het algemeen minder agressief. Isolaten B1, B2, B3, B5, B6, B12 en B13 vertoonden het meeste virulentie bij de inoculatie met jonge pluggen, bij de sporen inoculaties slaagden B1, B2, B3, B4 en B9 er niet in de waardplant te infecteren. Extra visueel onderzoek naar de isolaten zonder succesvolle spreiding en infectie maakte duidelijk dat de stressrespons van de waardplant (anthocyaan) steeds actief was bij de niet geslaagde sporen inoculaties. Dit kan erop wijzen dat het verdedigingsmechanisme van de waardplant veel effectiever en specifiek is tegen sporen aangezien sporadisch contact met sporen uit de lucht vaak voorkomt in de natuur. Wanneer een inoculatie met sporen echter wel voor virulentie zorgde werd een sterkere daling in het gehalte aan chlorofyl waargenomen dan bij een succesvolle inoculatie met myceliumplug. Verder werd er een vaststelling gedaan dat de meetbare concentratie aan anthocyanen zeer variabel wordt vanaf 3dpi. Na initiële stijging als respons op stress zullen delen van het blad het dichtst bij de inoculatieplaats volledig sterven als gevolg van de vorderende infectie. Daarom is de ARI enkel een betrouwbare maat voor de eerste dagen na inoculatie. De tweede onderzoeksvraag 'Welk effect heeft mycelium ouderdom op de pathogeniteit?' ging verder na of ouderdom eventueel een deel van de variabiliteit tussen de verschillende isolaten kan verklaren. De virulentie tussen de 16 *Botrytis* isolaten varieerde weer enorm van elkaar bij infectie met jong (MP₅) en oud (MP₁₃) mycelium. Het was niet mogelijk om een rechtstreeks verband te vormen tussen ouderdom en variabiliteit aangezien dit sterk afhankelijk was per isolaat. Voor zowel de jonge als oude myceliumpluggen vertoonden isolaat B1, B2, B3 en B4 geen pathogeniteit, anderzijds vertoonde isolaat B6 duidelijk meer virulentie bij de jonge en oude pluggen. Er was een duidelijk verschil in algemene agressiviteit tussen de twee experimenten waarbij de tweede proef zeer weinig geslaagde infecties veroorzaakte. Eventuele oorzaken zijn de vroegere evaluatie bij 3dpi of het verlies van virulentie door incorrect invriezen.

Er werd gevonden dat maximale kwantum efficiëntie van fotosysteem II F_v/F_m de beste indicator was voor virulentie naast de kwalitatieve visuele ZI. Voor de inoculaties met sporen is Arildx ook een goede indicator aangezien anthocyaanvorming bij sporen beter correleert met de gezondheid van de plant. Verder zijn de Pathoviewer parameters objectiever en kunnen er statistisch gezien correctere besluiten uit getrokken worden. Voor volgend onderzoek moet rekening gehouden worden met het type onderzoek, een afweging tussen de voor en nadelen van beide soorten parameters met betrekking tot *high throughput* mogelijkheden en nodige details is dan aan de orde. Verder dient er ook meer rekening gehouden te worden met de enorme variabiliteit van *Botrytis*, onderzoek baseert zich nog steeds te vaak op resultaten van één isolaat. Maar niet alleen tussen de verschillende isolaten maar ook binnen eenzelfde isolaat wordt heel wat variatie waargenomen. Hier moet rekening mee gehouden worden door het aantal herhalingen te verhogen en de *high throughput* mogelijkheden te verbeteren. Stijgende automatisering van fenotyperingsonderzoek zal dit mogelijk maken.

7. Literatuurlijst

- AbuQamar, S., Moustafa, K., & Tran, L. S. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 262-274.
- arborcheck.com. (2020). Chlorophyll Fluorescence.
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59, pp. 89-113). Palo Alto: Annual Reviews.
- Bennett, K. (2018). How to Prevent Petunia Flower Meltdown From Botrytis. *Greenhouse Grower*.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaiich, R., . . . Tudzynski, P. (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current genetics*, 25(5), 445-450.
- Collado, I. G., & Viaud, M. (2016). Secondary metabolism in *Botrytis cinerea*: combining genomic and metabolomic approaches. In *Botrytis—The Fungus, The Pathogen and Its Management in Agricultural Systems* (pp. 291-313): Springer.
- Corwin, J. A., Subedy, A., Eshbaugh, R., & Kliebenstein, D. J. (2016). Expansive phenotypic landscape of *Botrytis cinerea* shows differential contribution of genetic diversity and plasticity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(4), 287-298.
- De Kraker, J., Bosch, H., & Zwanepol, S. (1994). *Teelt van sla in al haar soorten*. Retrieved from
- Demeulemeester, M., Bleyaert, P., & Versyck, R. (2017). *Kropsla onder glas, Rassenproef Vroege lente 2017 (Inagro VZW)*. Retrieved from https://inagro.be/DNN_DropZone/Nieuws/2998/17KSL_RA01%20Vroege%20lente%202017.pdf:
- Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6(3), 241-252.
- Dutton, M. V., & Evans, C. S. (1996). Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian journal of microbiology*, 42(9), 881-895.
- Faretra, F., Antonacci, E., & Pollastro, S. (1988). Improvement of the technique used for obtaining apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) under controlled conditions. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 38(1), 29-40.
- Faretra, F., & Pollastro, S. (1991). Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 95(8), 943-951.
- Fillinger, S., & Elad, Y. (2016). *Botrytis: the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*: Springer.
- Freeman, B. C., & Beattie, G. A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*.
- Fukumori, Y., Nakajima, M., & Akutsu, K. (2004). Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 70(5), 256-260.
- 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.
- Gitelson, A. A., Keydan, G. P., & Merzlyak, M. N. (2006). Three - band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophysical research letters*, 33(11).
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13), 751-757.
- Graves, S., Piepho, H.-P., Selzer, L., & Dorai-Raj, S. (2015). multcompView: visualizations of paired comparisons. *R package version 0.1-7*.
- Han, Y., Joosten, H.-J., Niu, W., Zhao, Z., Mariano, P. S., McCalman, M., . . . Dunaway-Mariano, D. (2007). Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9581-9590.
- Heard, S., Brown, N. A., & Hammond-Kosack, K. (2015). An interspecies comparative analysis of the predicted secretomes of the necrotrophic plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS one*, 10(6), e0130534.
- Heller, J., & Tudzynski, P. (2011). Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology*, 49, 369-390.
- hortiplan.com. (2020). Mobiele Goten Systeem oplossingen.

- Kang, H.-M., & Saltveit, M. E. (2002). Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7536-7541.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A., & Van Kan, J. A. (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal*, 43(2), 213-225.
- Kim, J., Woo, H. R., & Nam, H. G. (2016). Toward systems understanding of leaf senescence: an integrated multi-omics perspective on leaf senescence research. *Molecular plant*, 9(6), 813-825.
- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., . . . Pugin, A. (2006). Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New phytologist*, 170(3), 537-550.
- Křístková, E., Doležalová, I., Lebeda, A., Vinter, V., & Novotná, A. (2008). Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Horticultural Science*, 35(3), 113-129.
- Mestdagh, H. (2019). *Invloed van lichtkwaliteit op groei, morfologie en pathogeniteit van Botrytis isolaten van diverse oorsprong*. .
- Pohlert, T. (2014). The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). *R package*, 27(2020), 10.
- Reignault, P., Kunz, C., Delage, N., Moreau, E., Vedel, R., Hamada, W., . . . Boccara, M. (2000). Host-and symptom-specific pectinase isozymes produced by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 104(4), 421-428.
- Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G., & Boccara, M. (1994). Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and immunochemical studies. *Microbiology*, 140(12), 3249-3255.
- rijkzwaan.be. (2020). Vind uw ras: beschrijving, teeltschema en resistenties.
- Rossi, F. R., Krapp, A. R., Bisaro, F., Maiale, S. J., Pieckenstain, F. L., & Carrillo, N. (2017). Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, 92(5), 761-773.
- Sasanuma, I., & Suzuki, T. (2016). Effect of calcium on cell-wall degrading enzymes of *Botrytis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(9), 1730-1736.
- scienceinhydroponics.com. (2009). Hydroponic Floating System for Lettuce Production.
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. L. (2005). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22(2), 333-346. doi:10.1093/molbev/msi020
- Steiger, D. (2007). *Global economic importance of Botrytis protection*. Paper presented at the Book of Abstracts, 14th International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa.
- terracult.com. (2020). What does 'soil buffering' mean?
- UIPP. (2002). *Annual Report*. Retrieved from <http://uipp.org/>:
- Valero-Jiménez, C. A., Veloso, J., Staats, M., & van Kan, J. A. (2019). Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis* species with distinct host specificity. *BMC genomics*, 20(1), 203.
- Van Kan, J. A., Shaw, M. W., & Grant - Downton, R. T. (2014). *Botrytis* species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Molecular Plant Pathology*, 15(9), 957-961.
- VLAM. (2019a). Groenteareaal (2009-2018), Oppervlakte besteed aan de teelt van groenten in België. In. https://www.vlaanderen.be/vlam/sites/default/files/publications/Groenteareaal_2009-2018_n.pdf.
- VLAM. (2019b). Groenteproductie (2009-2018), Belgische vermarktbare productie. In. https://www.vlaanderen.be/vlam/sites/default/files/publications/groenteproductie_2009-2018.pdf.
- VLAM. (2020). Export van groenten (2010-2019), Belgische export van verse groenten. In. <https://www.vlaanderen.be/vlam/sites/default/files/publications/2020-07/BE%20export%20groenten%202010-2019.pdf>.
- Weiguo, F., Pingping, L., Yanyou, W., & Jianjian, T. (2012). Effects of different light intensities on anti-oxidative enzyme activity, quality and biomass in lettuce. *Horticultural Science*, 39(3), 129-134.

- Xu, Y. B. (2016). Envirotyping for deciphering environmental impacts on crop plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(4), 653-673. doi:10.1007/s00122-016-2691-5
- Yang, W., Zilong, G., Chenglong, H., Ke, W., Ni, J., Hui, F., . . . Lihong, X. (2015). Genome-wide association study of rice (*Oryza sativa* L.) leaf traits with a high-throughput leaf scorer. *Journal of experimental botany*, 66. doi:10.1093/jxb/erv100
- Yorio, N. C., Goins, G. D., Kagie, H. R., Wheeler, R. M., & Sager, J. C. (2001). Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. *HortScience*, 36(2), 380-383.

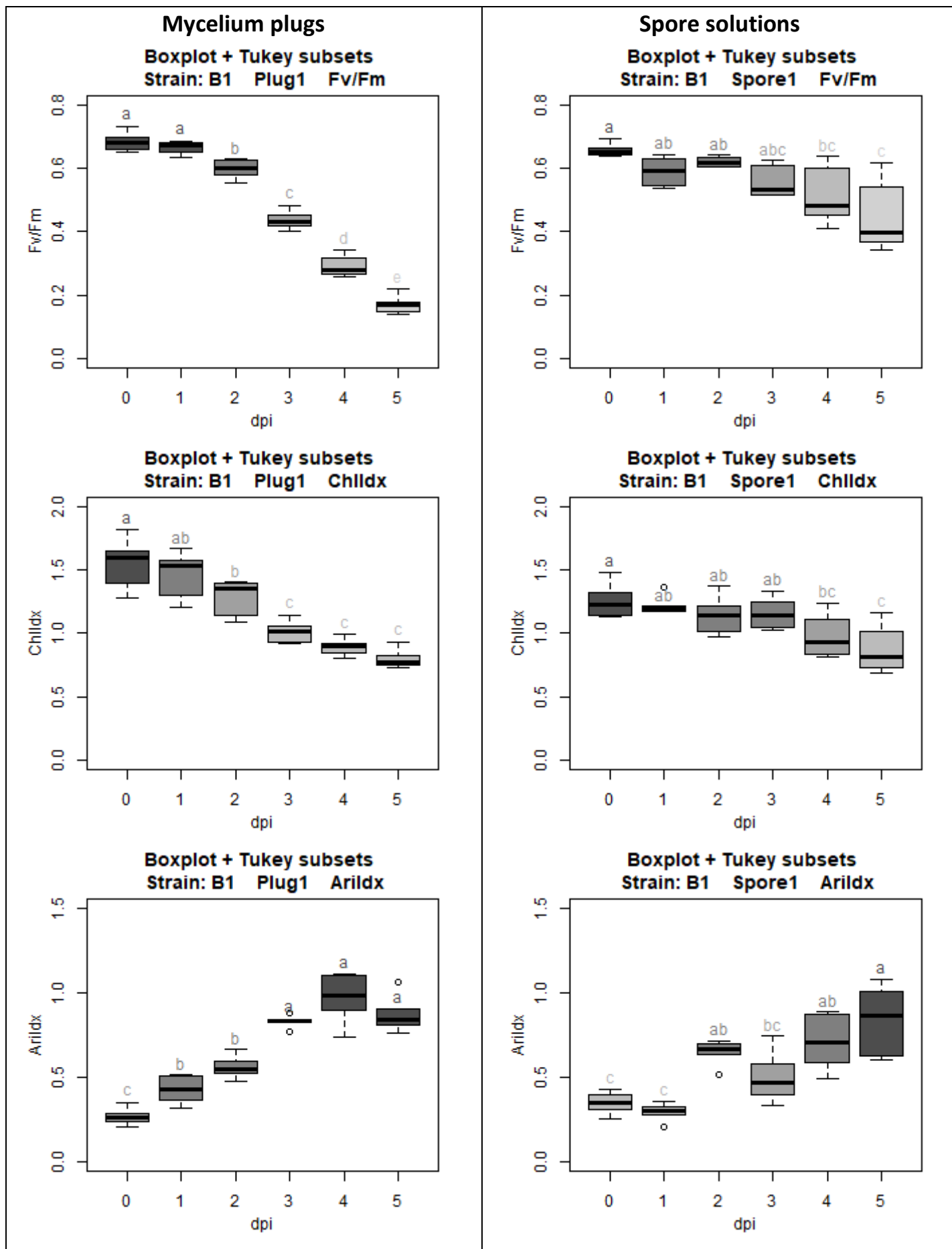
1. Bijlagen

Experimentele data voor parameters: F_v/F_m , Arildx & ChlIdx

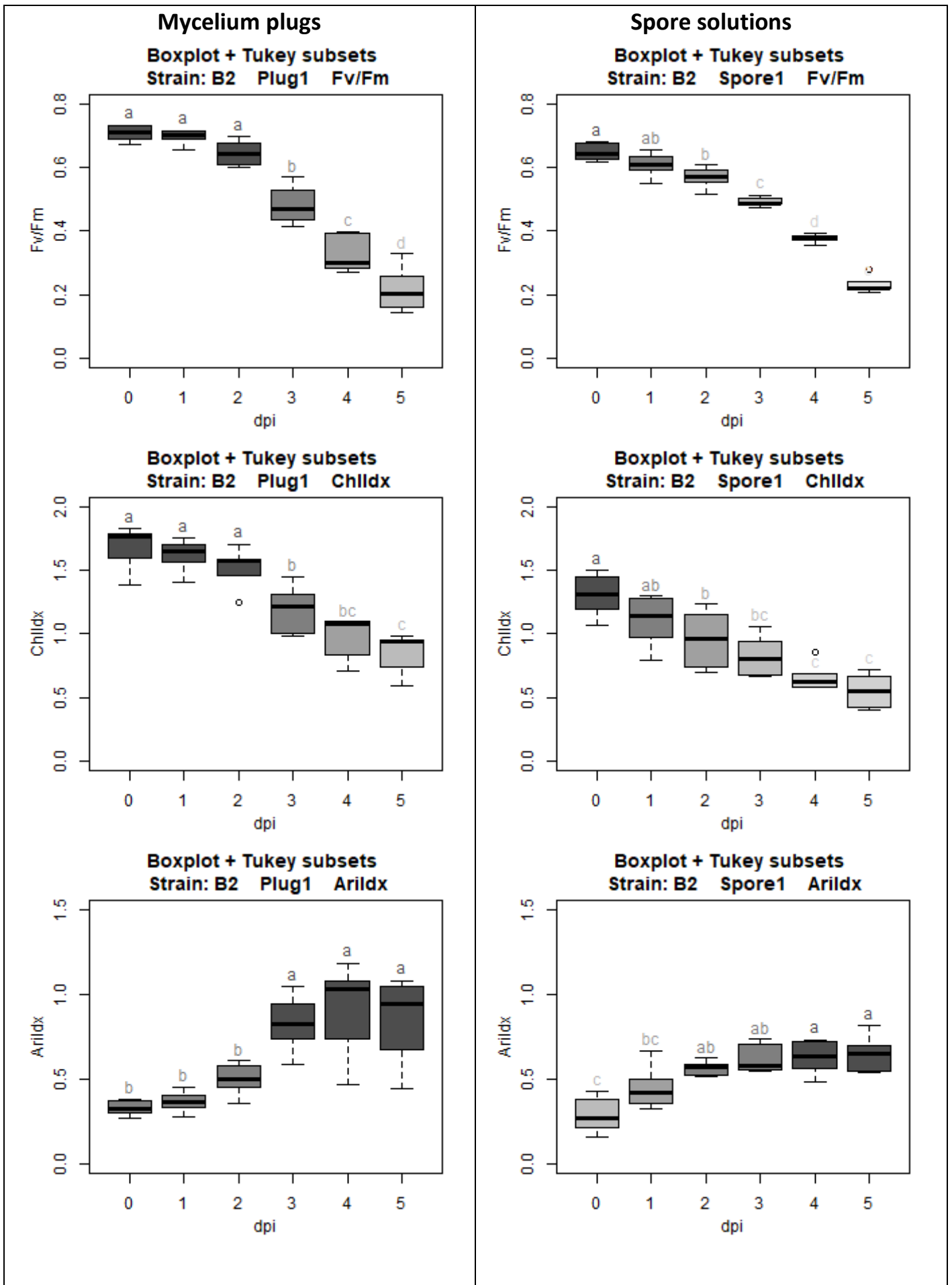
1. Boxplots experiment 1: Plugs vs. Spores van 0 tot 5dpi	2
1.1. Isolaat B1	2
1.2. Isolaat B2	3
1.3. Isolaat B3	4
1.4. Isolaat B4	5
1.5. Isolaat B5	6
1.6. Isolaat B6	7
1.7. Isolaat B7	8
1.8. Isolaat B8	9
1.9. Isolaat B9	10
1.10. Isolaat B10	11
1.11. Isolaat B11	12
1.12. Isolaat B12	13
1.13. Isolaat B13	14
1.14. Isolaat B14	15
1.15. Isolaat B15	16
1.16. Isolaat B16	17
1.17. Controle	18
2. Boxplots experiment 2: Jonge plugs (MP_5) vs. Oude plugs (MP_{13}) van 0 tot 3dpi	19
2.1. Isolaat B1	19
2.2. Isolaat B2	20
2.3. Isolaat B3	21
2.4. Isolaat B4	22
2.5. Isolaat B5	23
2.6. Isolaat B6	24
2.7. Isolaat B7	25
2.8. Isolaat B8	26
2.9. Isolaat B9	27
2.10. Isolaat B10	28
2.11. Isolaat B11	29
2.12. Isolaat B12	30
2.13. Isolaat B13	31
2.14. Isolaat B14	32
2.15. Isolaat B15	33
2.16. Isolaat B16	34
2.17. Controle	35

1. Boxplots experiment 1: Plugs vs. Spores van 0 tot 5dpi

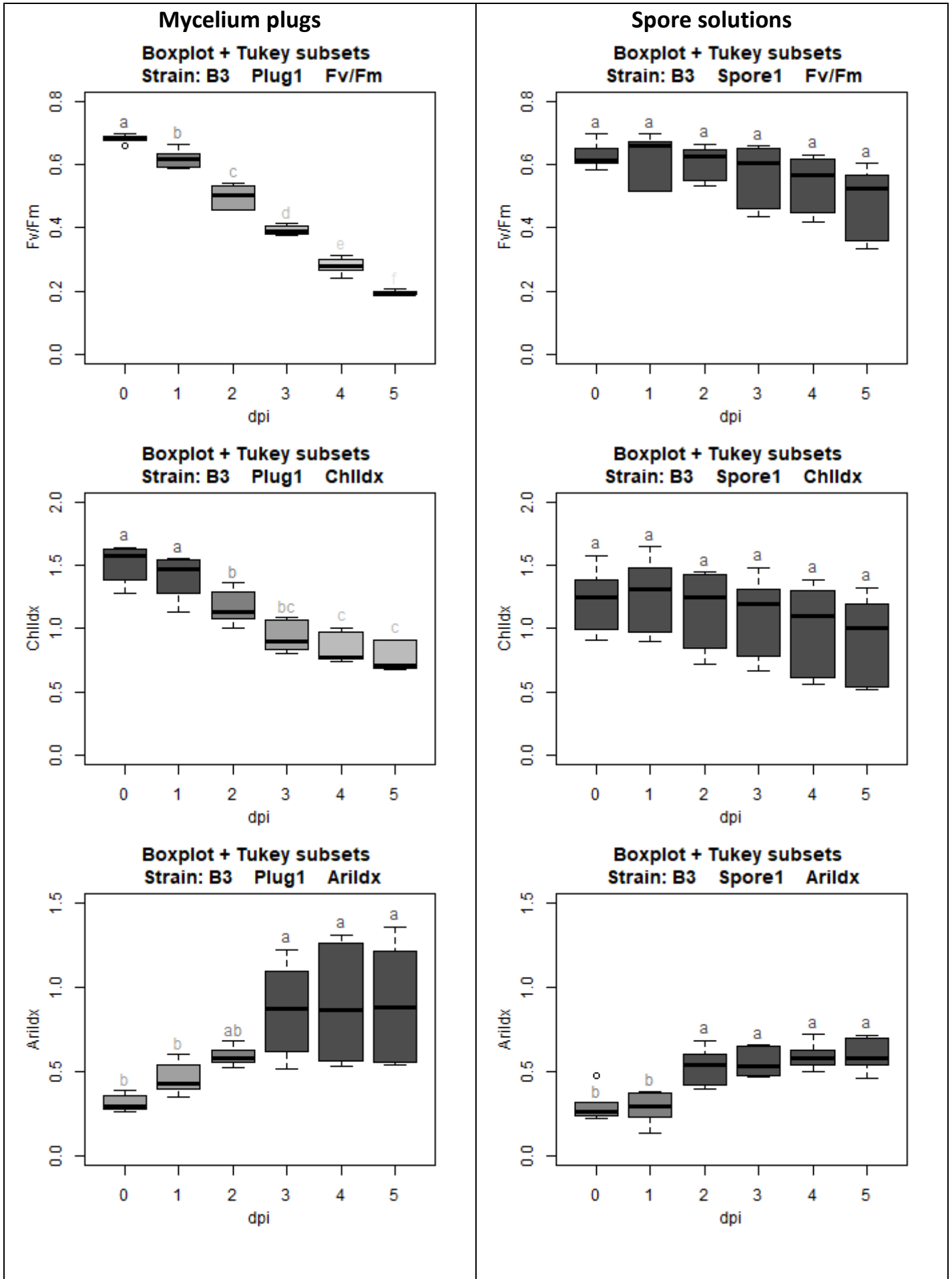
1.1. Isolaat B1



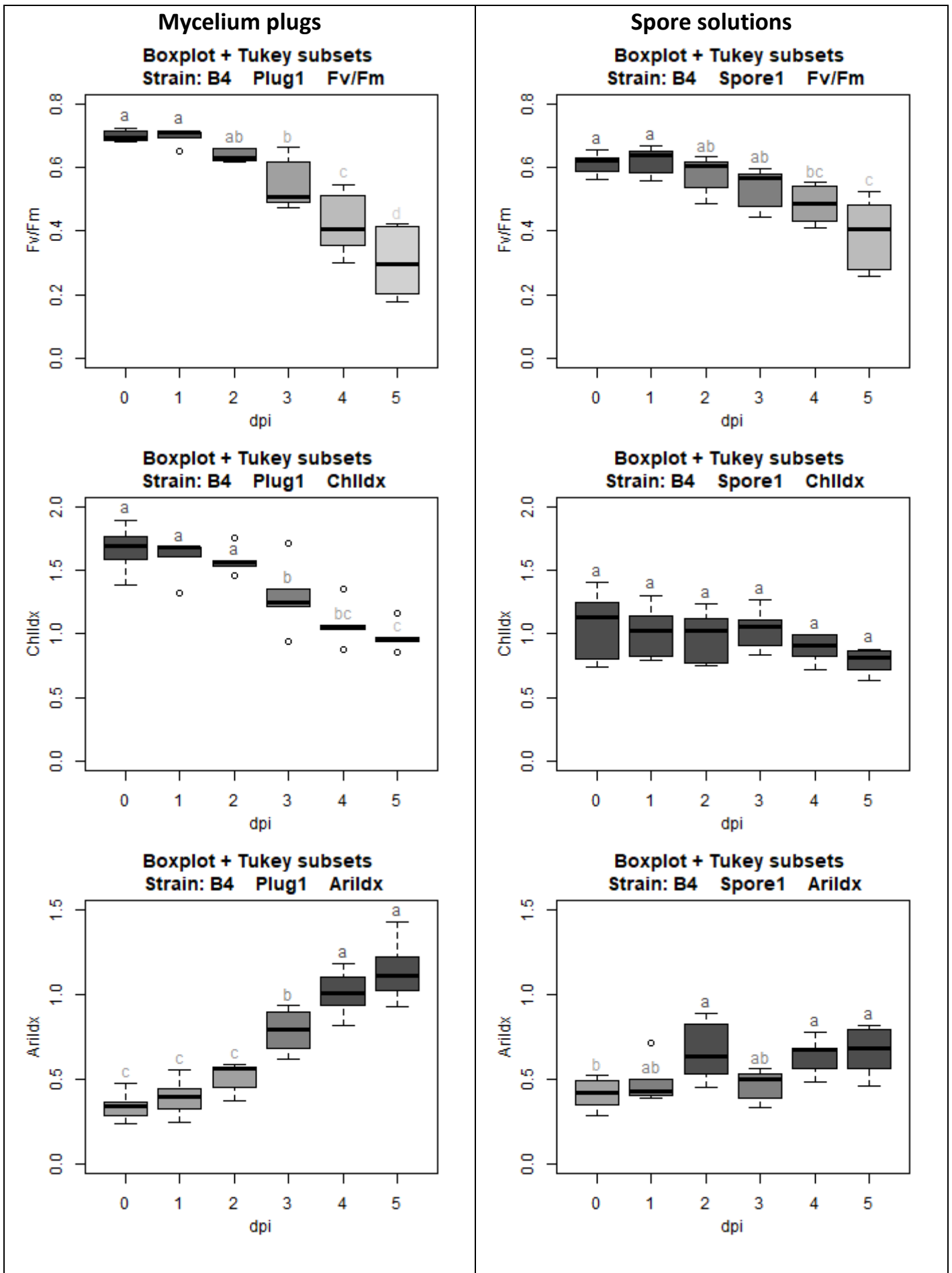
1.2. Isolaat B2



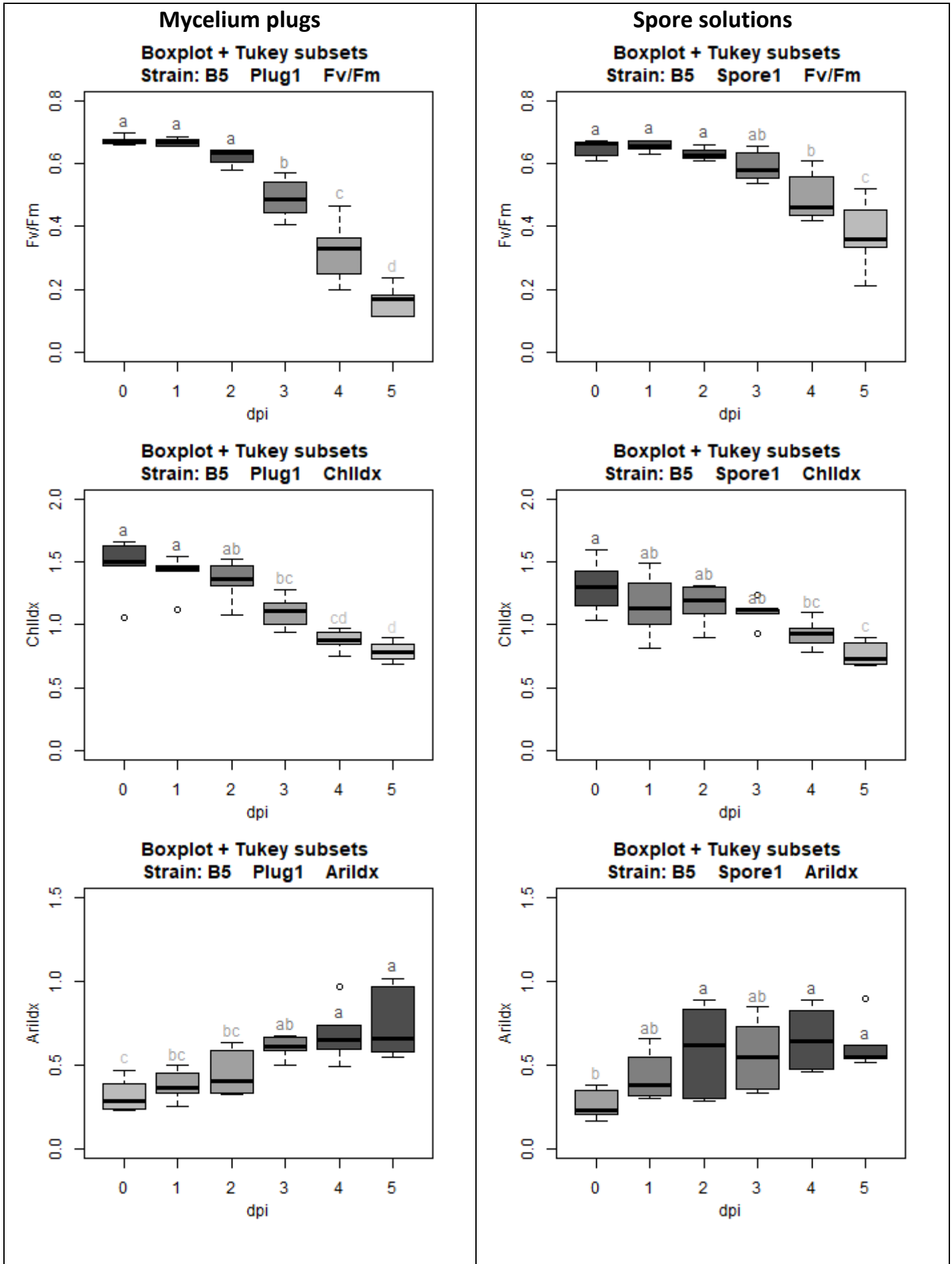
1.3. Isolaat B3



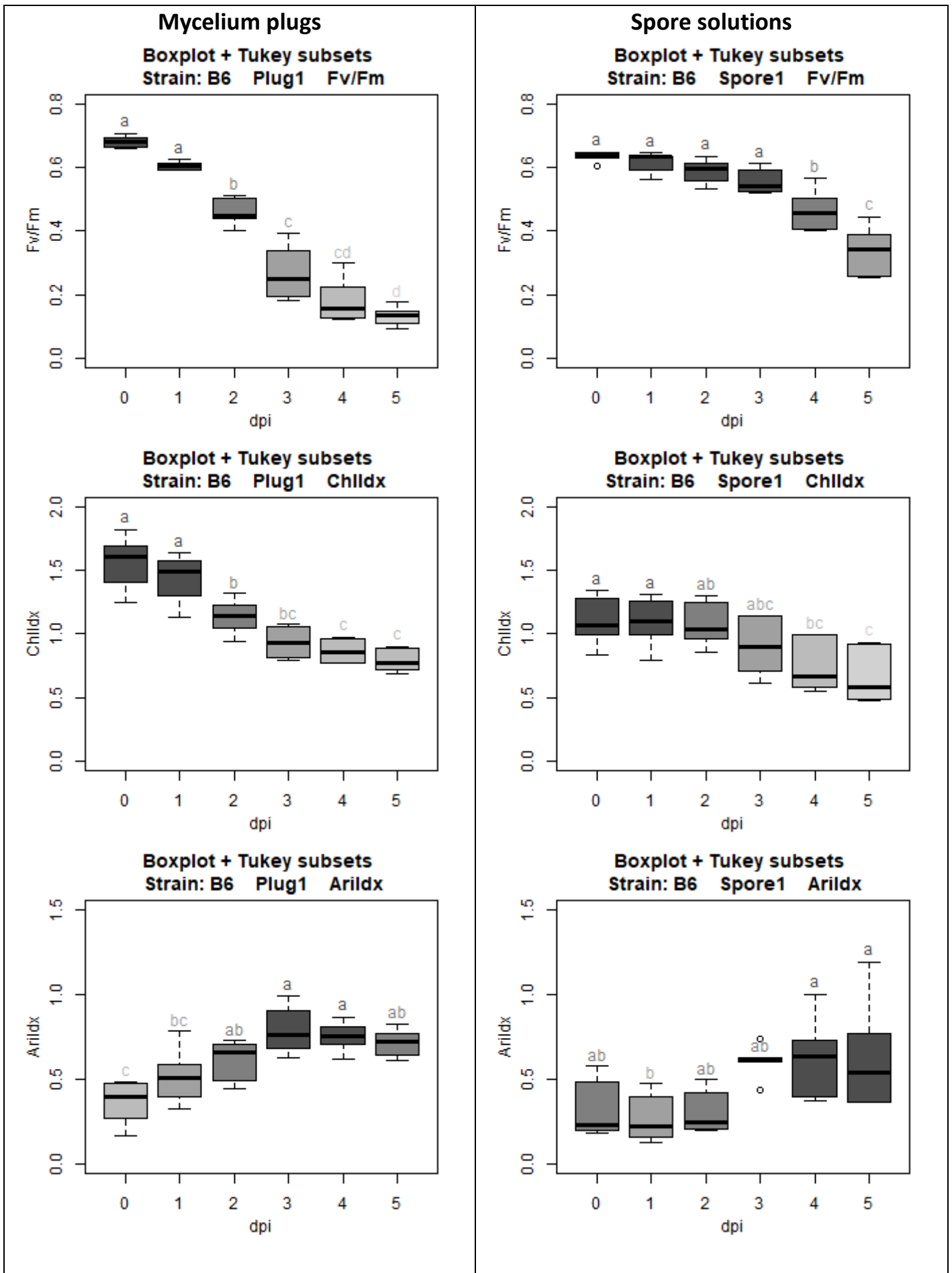
1.4. Isolaat B4



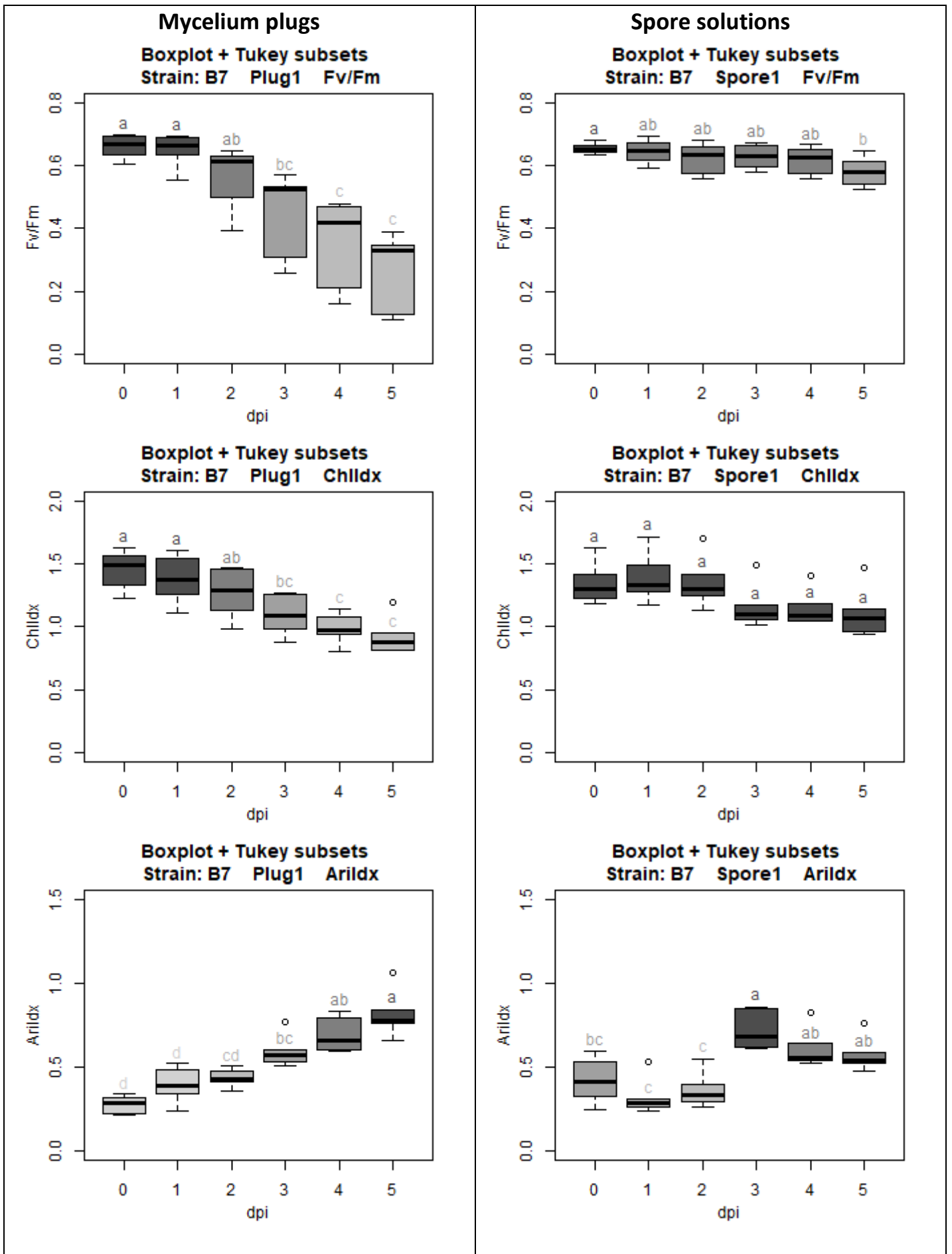
1.5. Isolaat B5



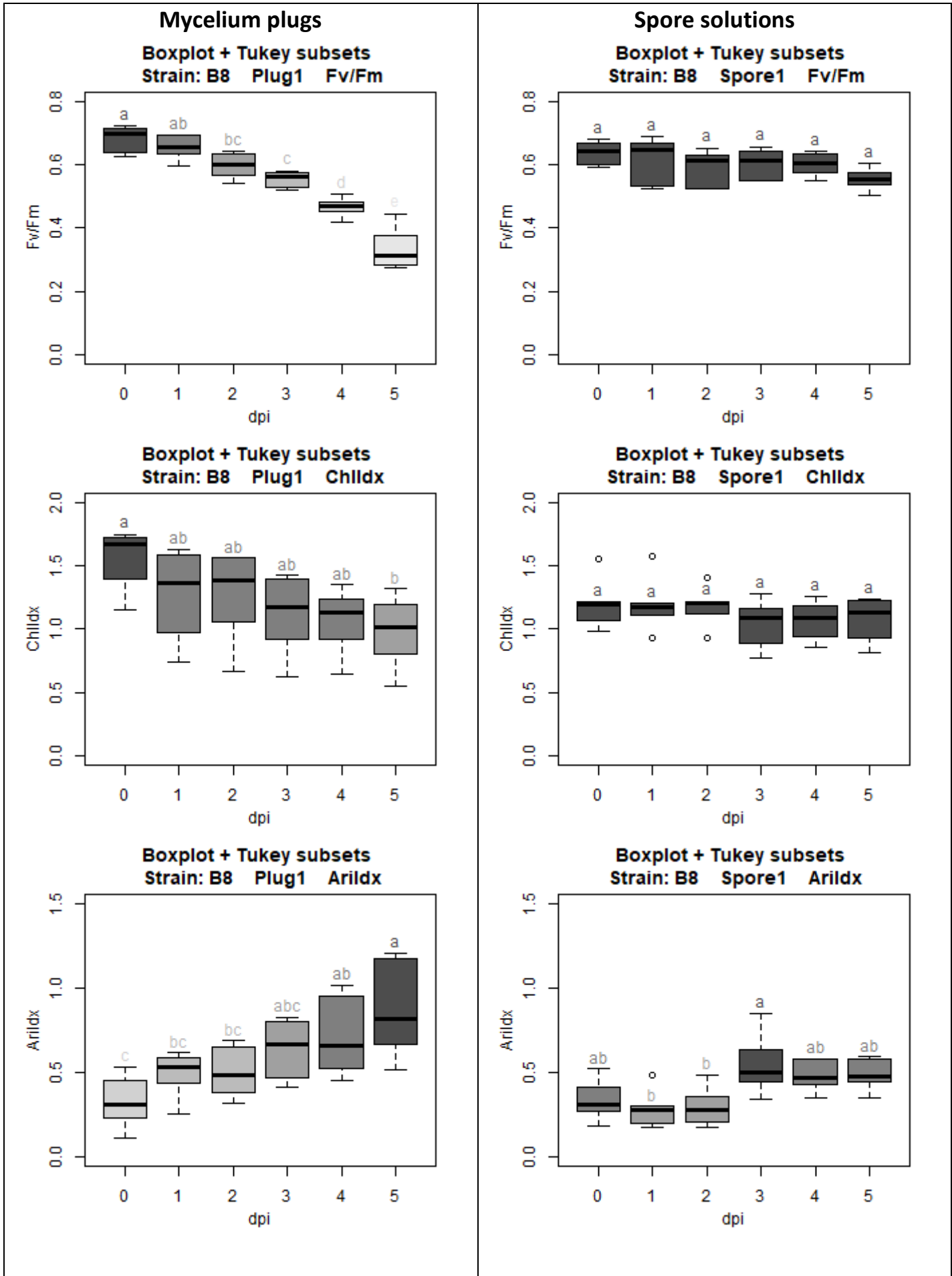
1.6. Isolaat B6



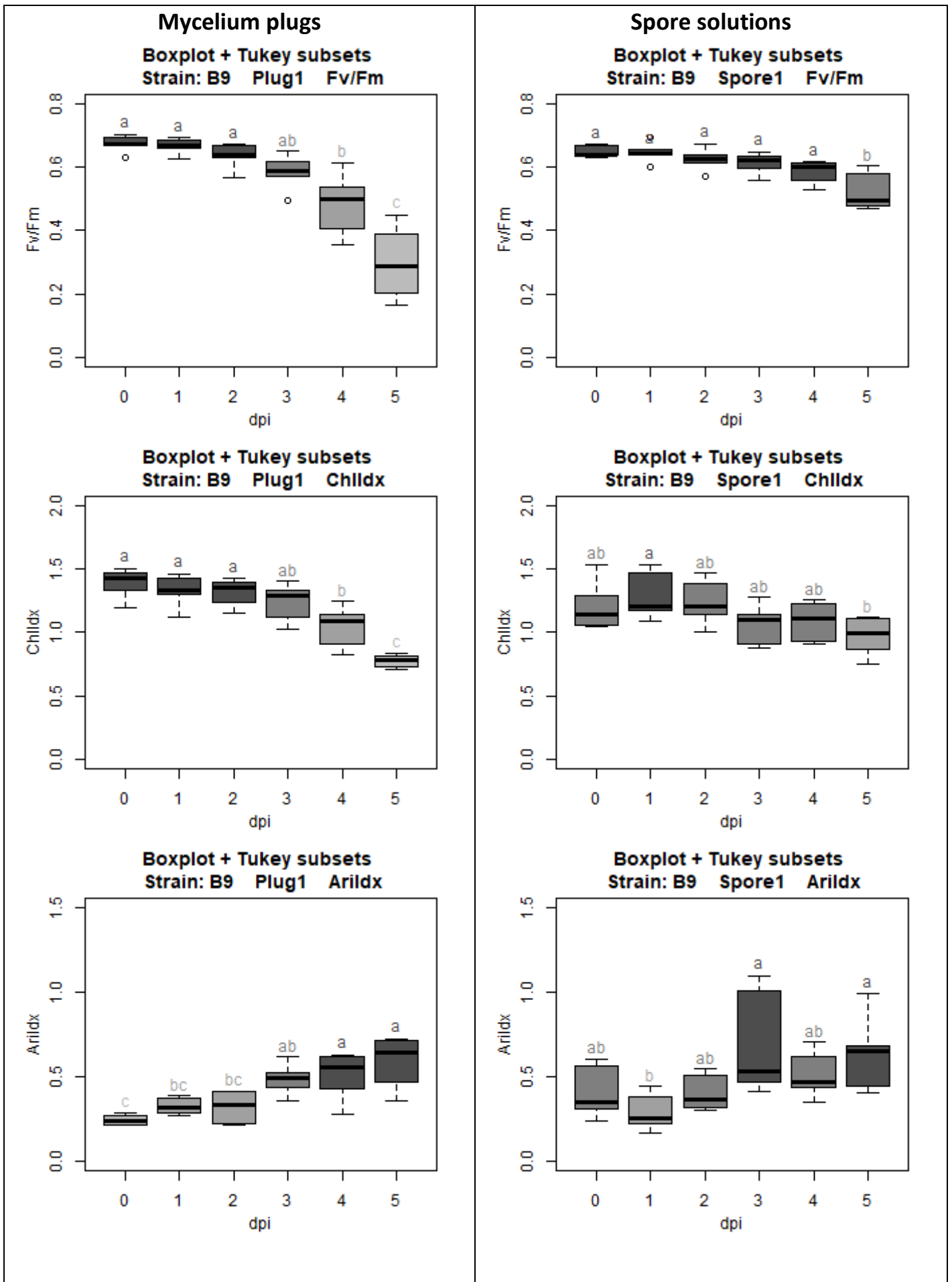
1.7. Isolaat B7



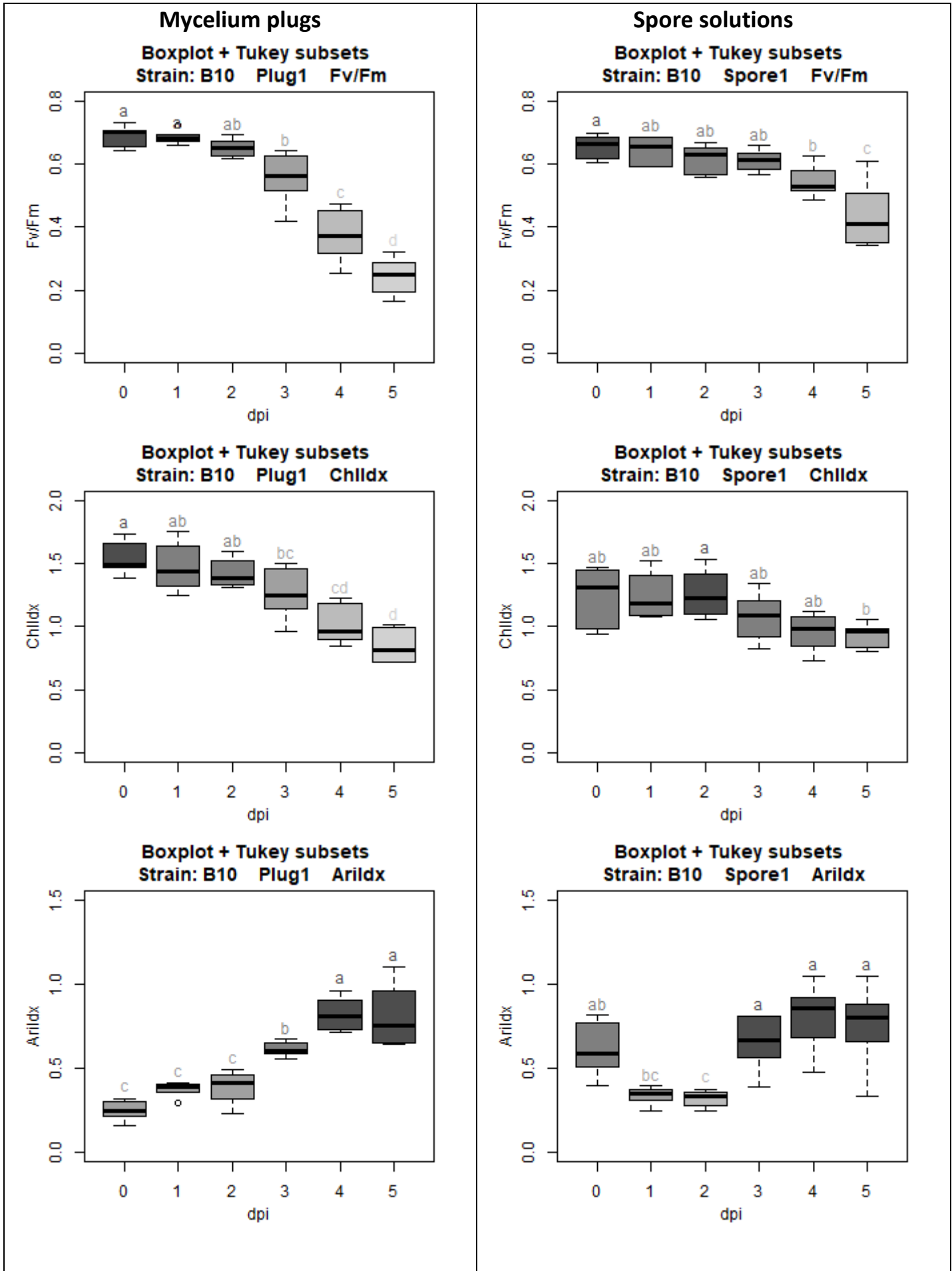
1.8. Isolaat B8



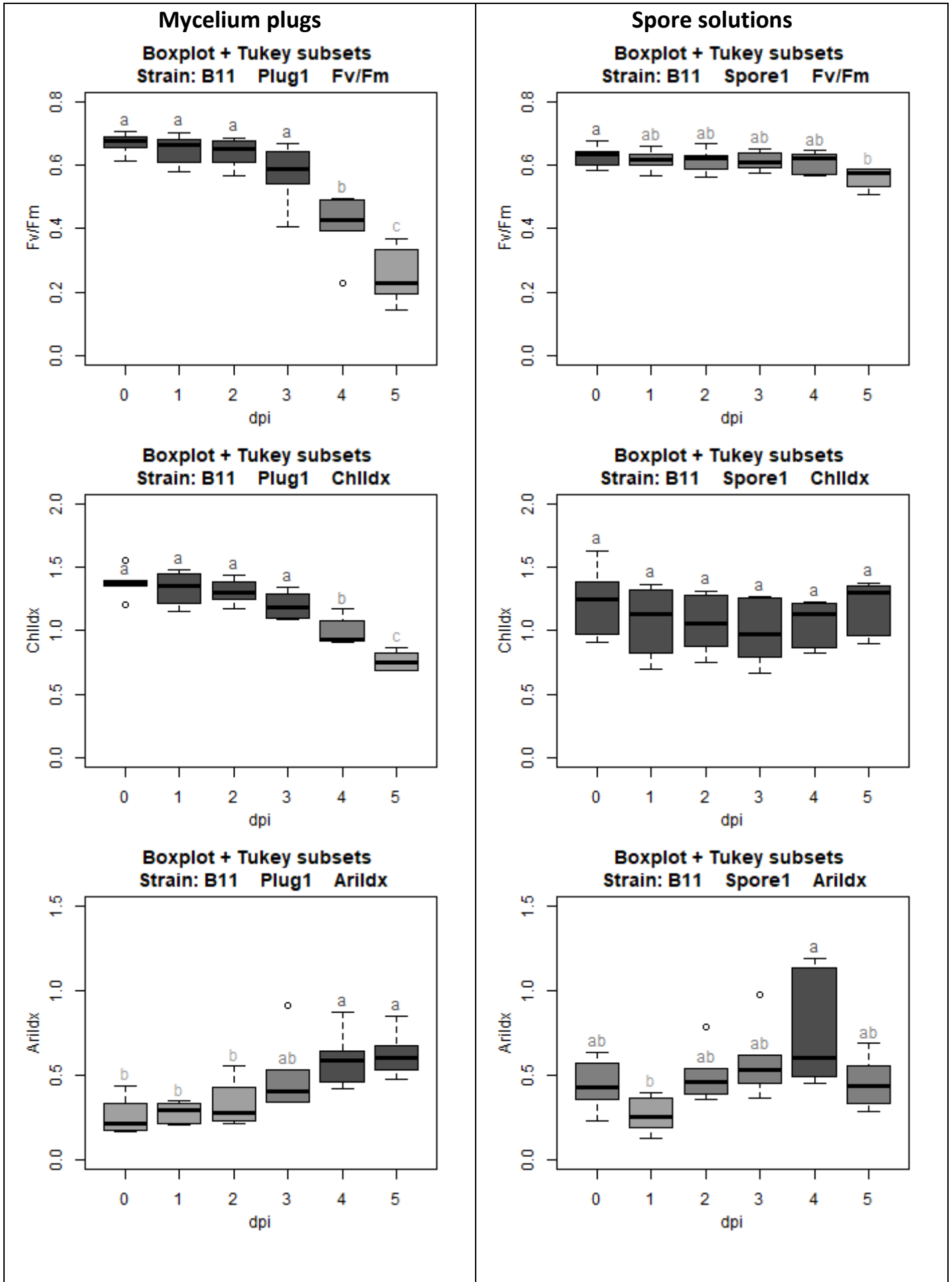
1.9. Isolaat B9



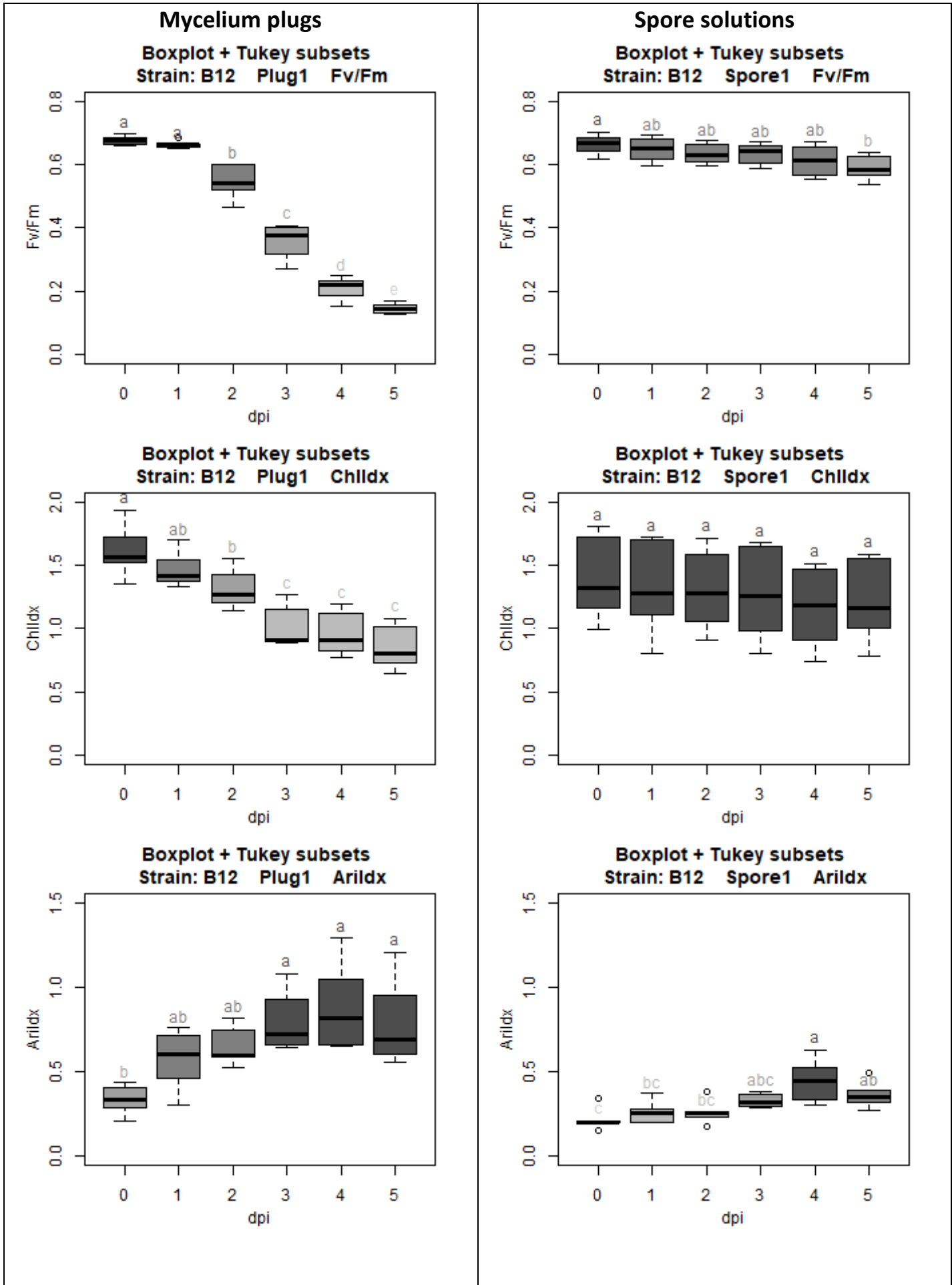
1.10. Isolaat B10



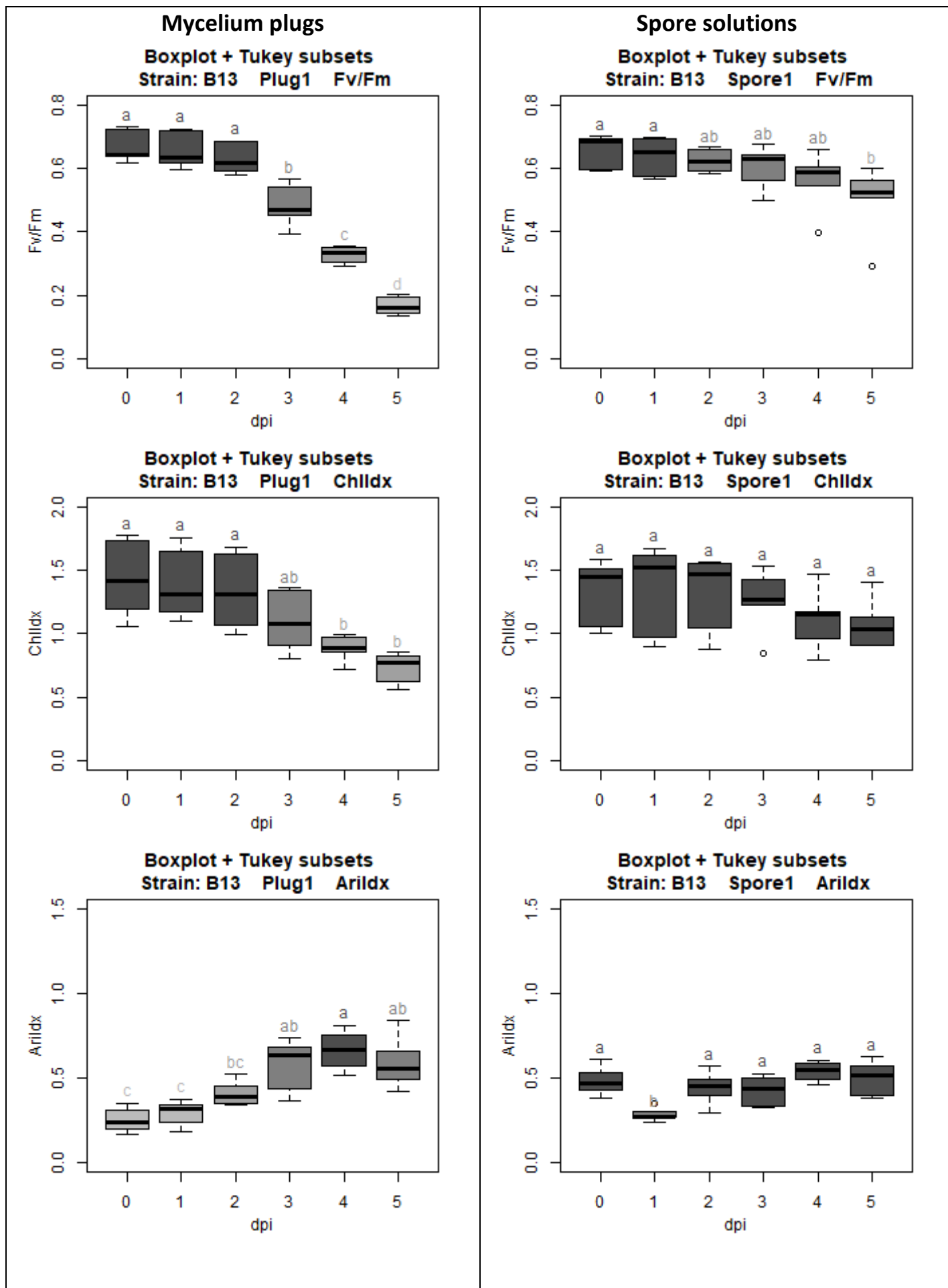
1.11. Isolaat B11



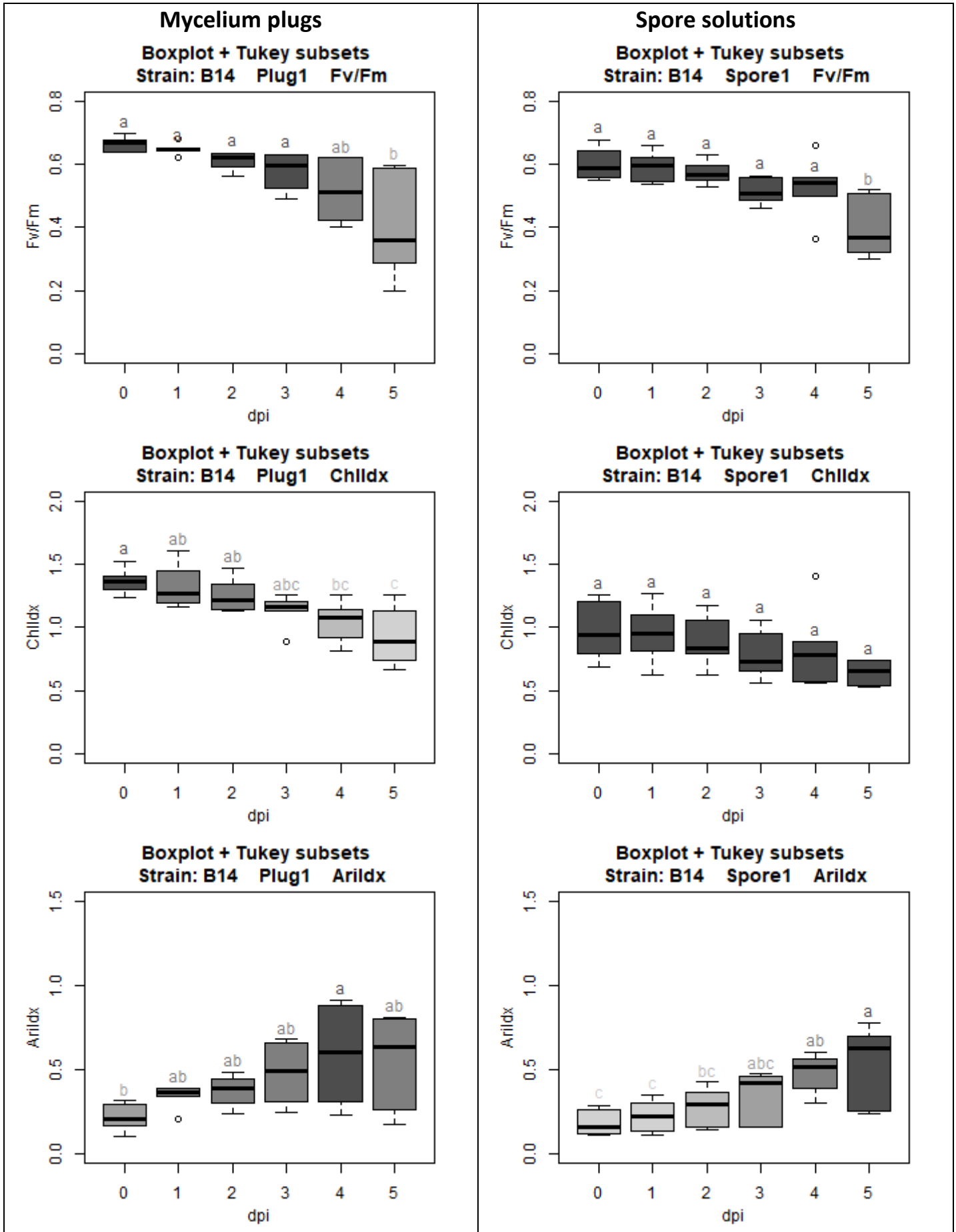
1.12. Isolaat B12



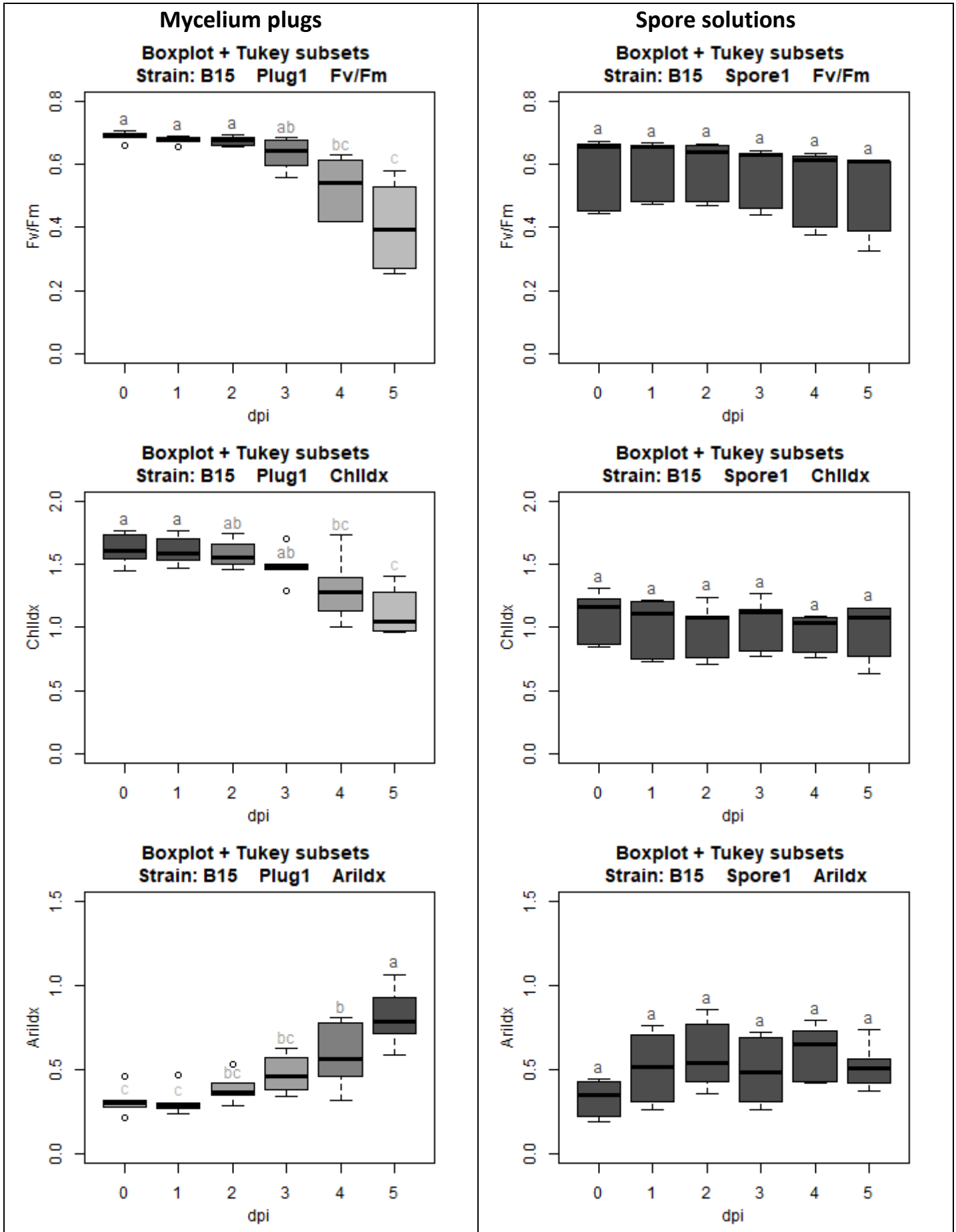
1.13. Isolaat B13



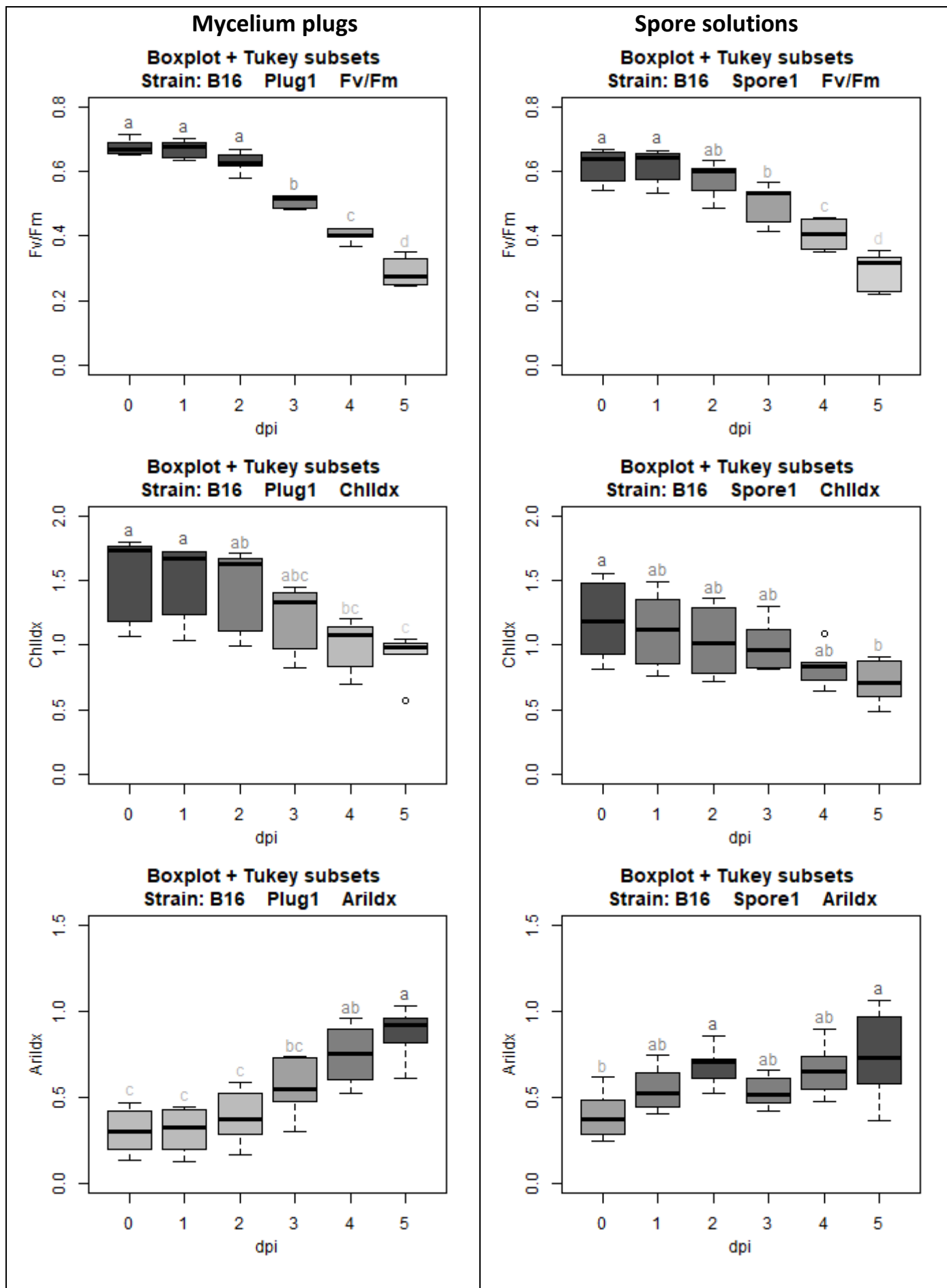
1.14. Isolaat B14



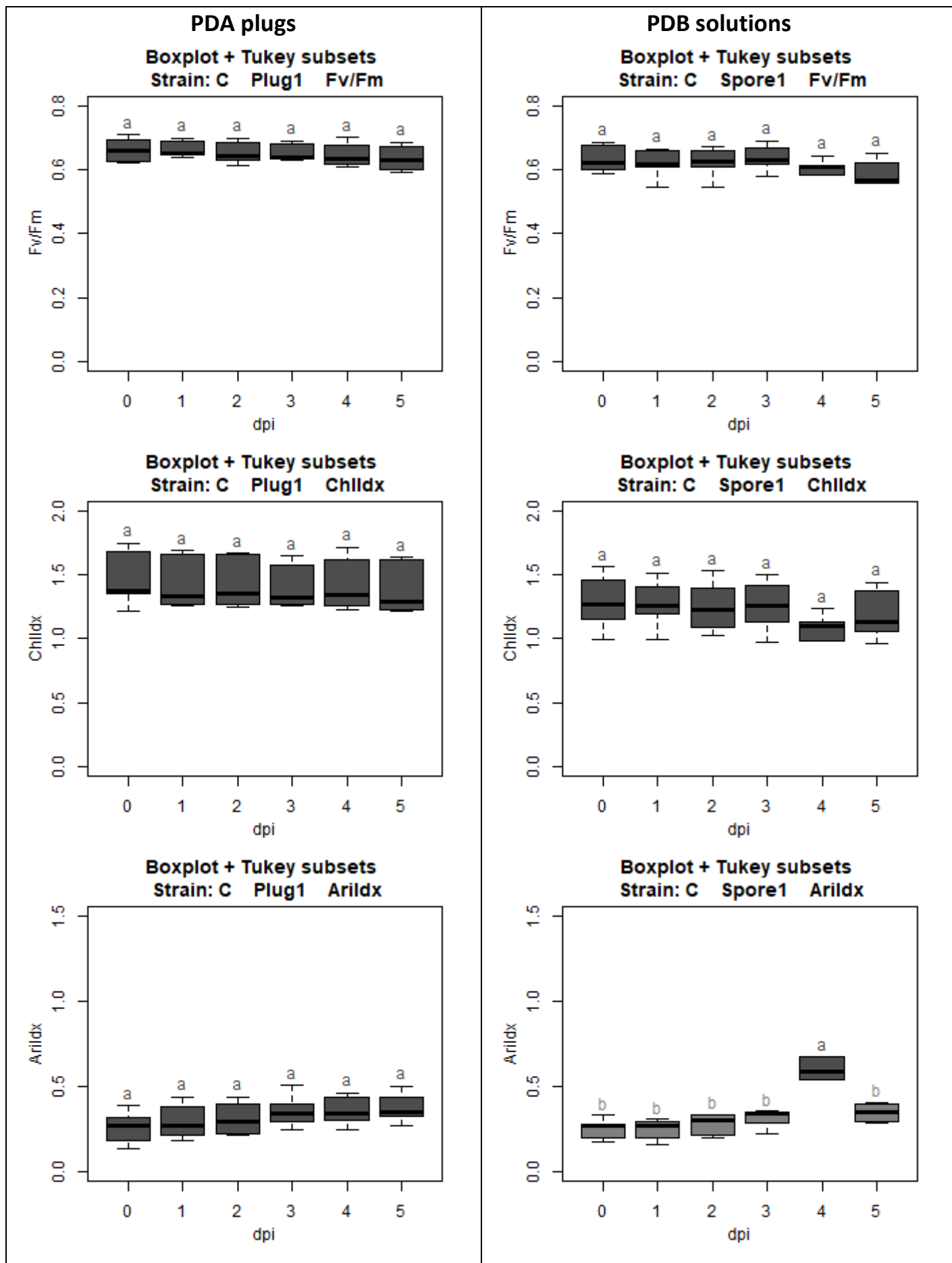
1.15. Isolaat B15



1.16. Isolaat B16

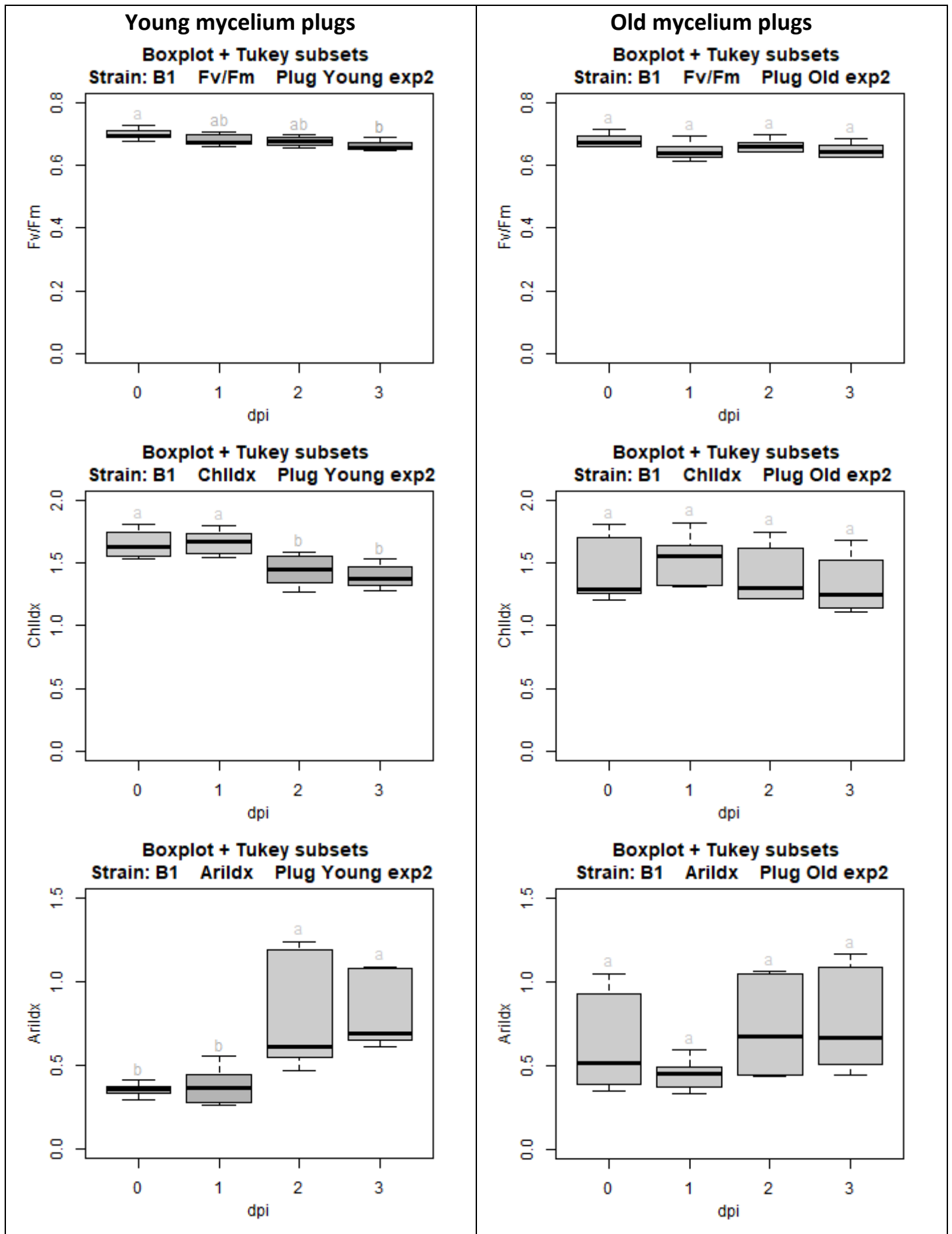


1.17. Controle

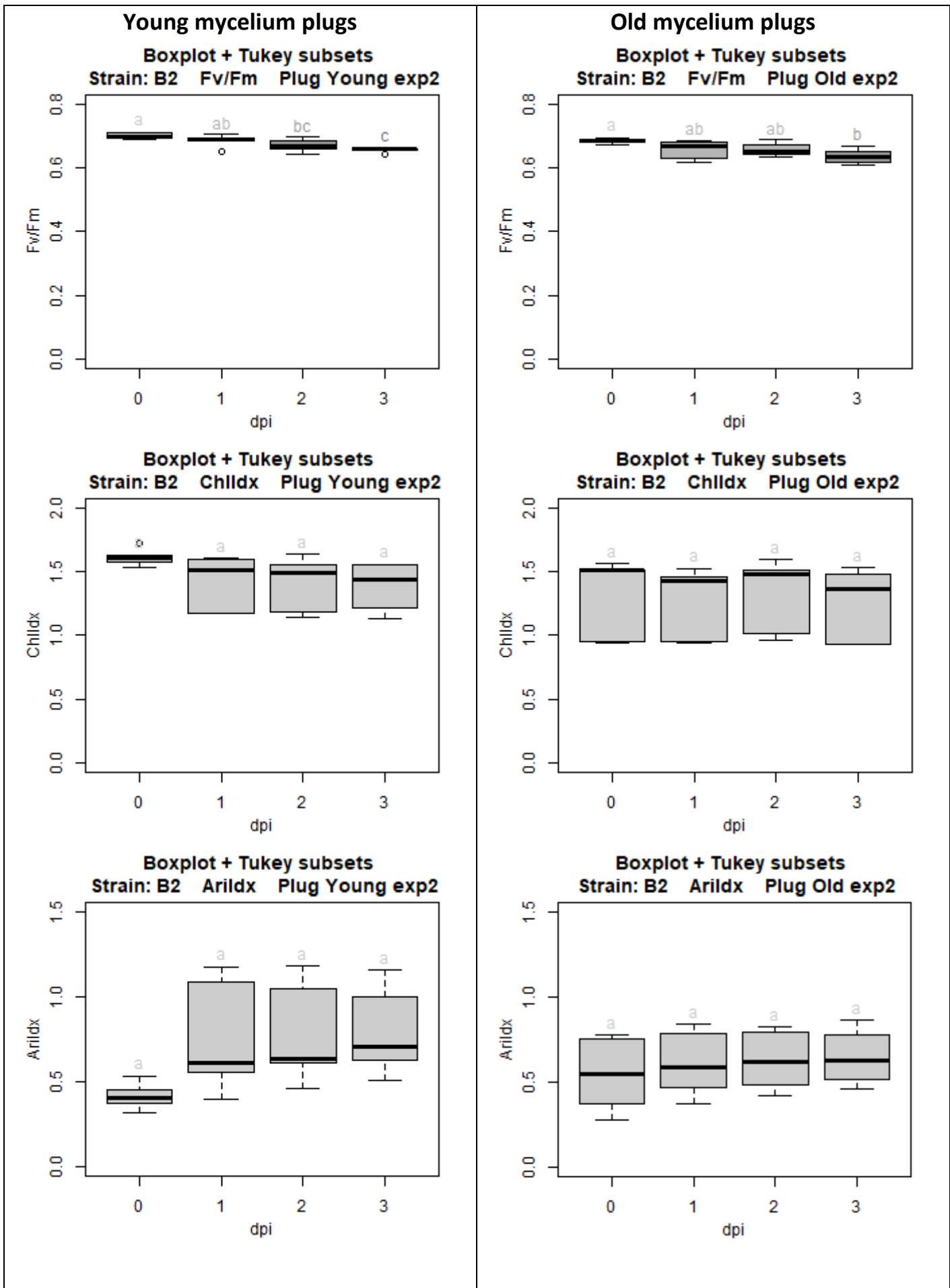


2. Boxplots experiment 2: Jonge plugs (MP5) vs. Oude plugs (MP13) van 0 tot 3dpi

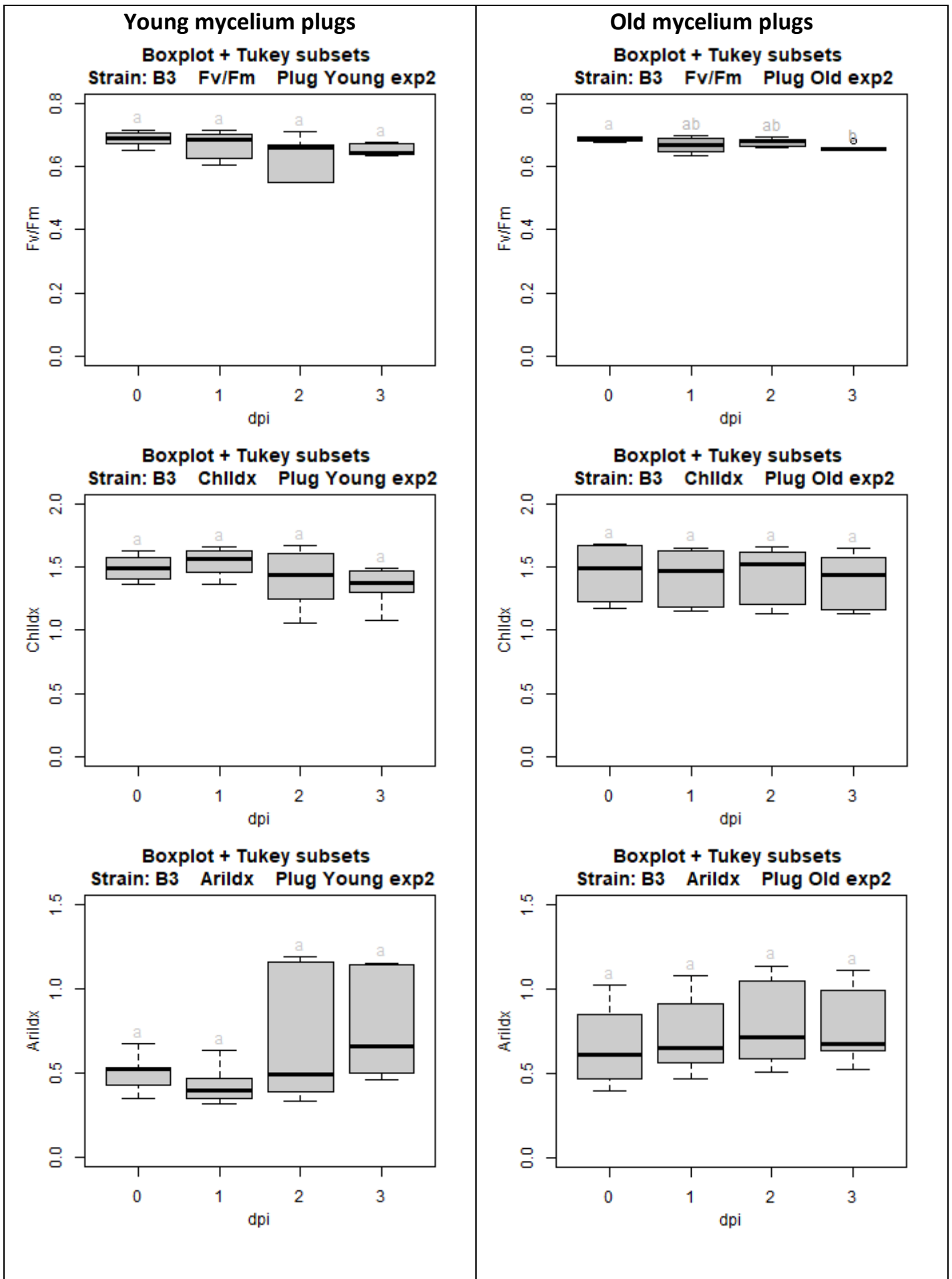
2.1. Isolaat B1



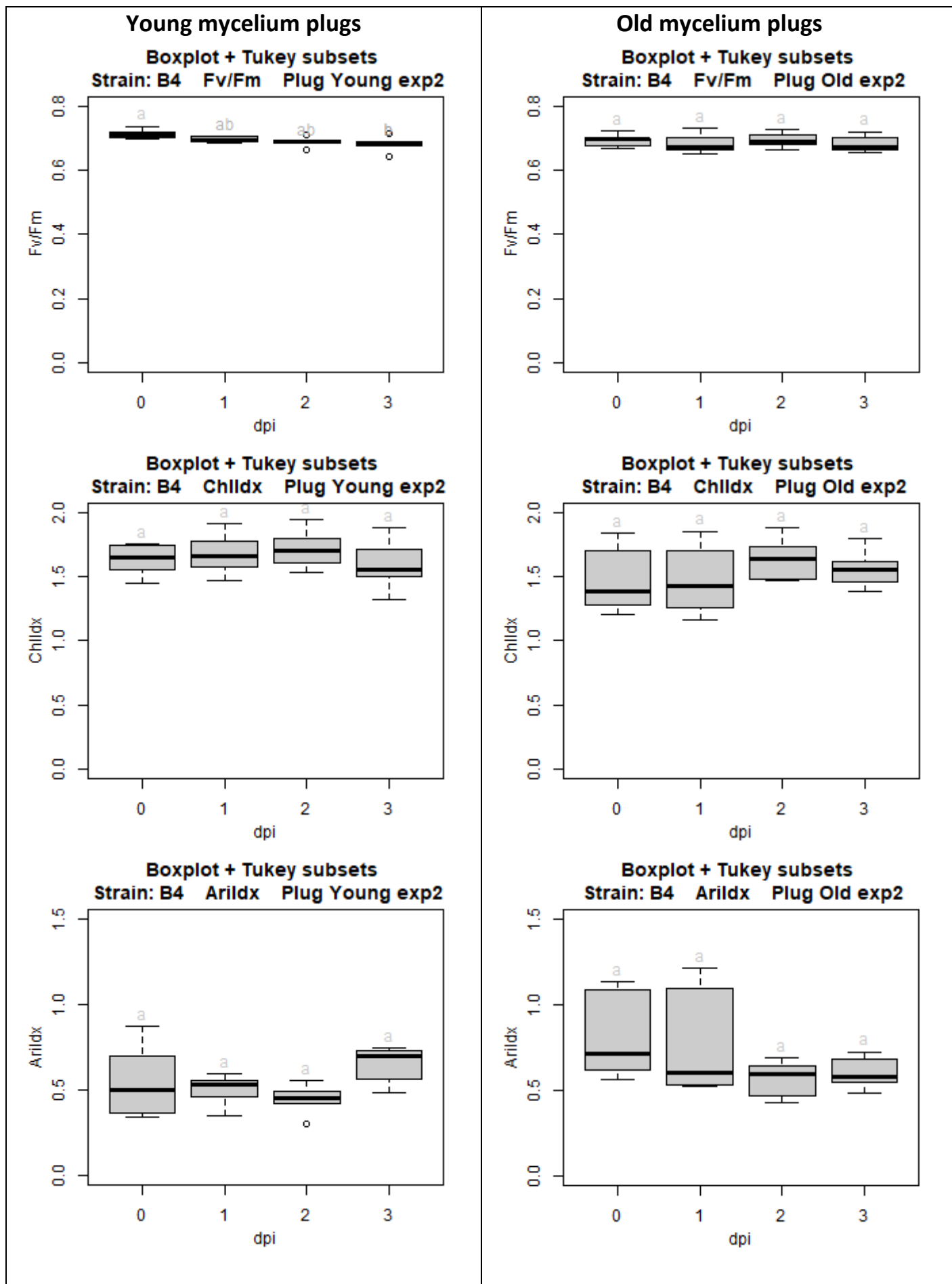
2.2. Isolaat B2



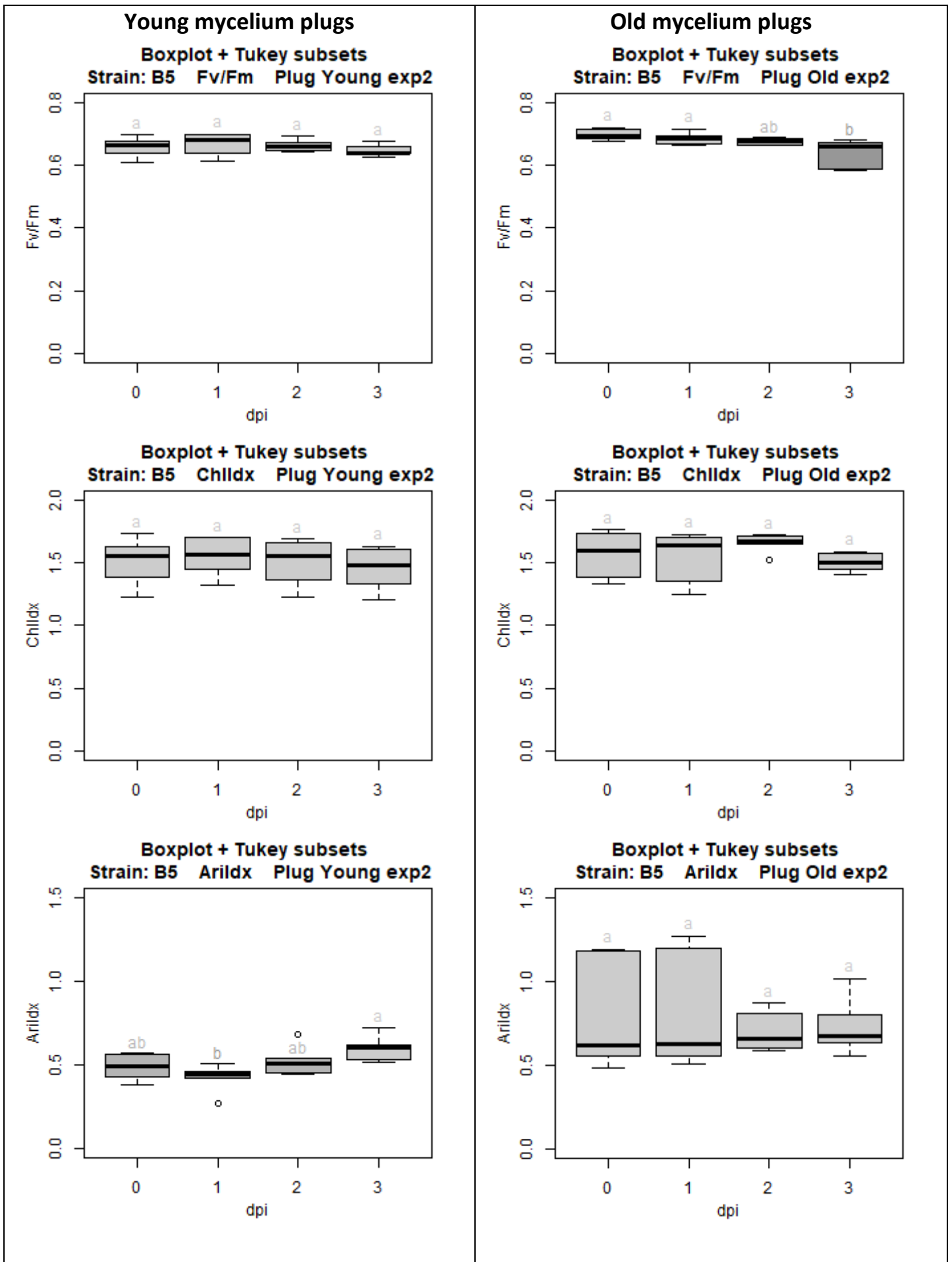
2.3. Isolaat B3



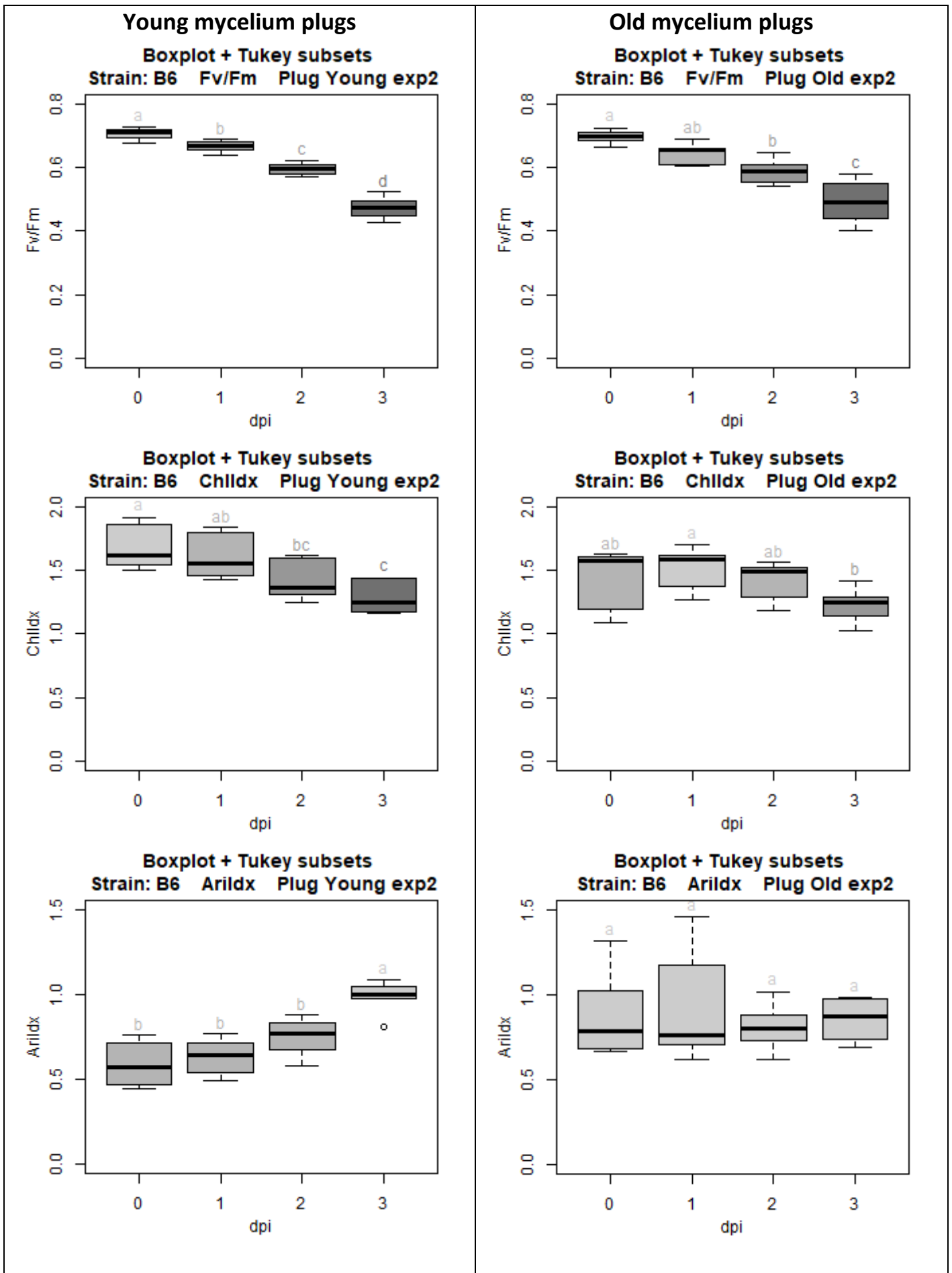
2.4. Isolaat B4



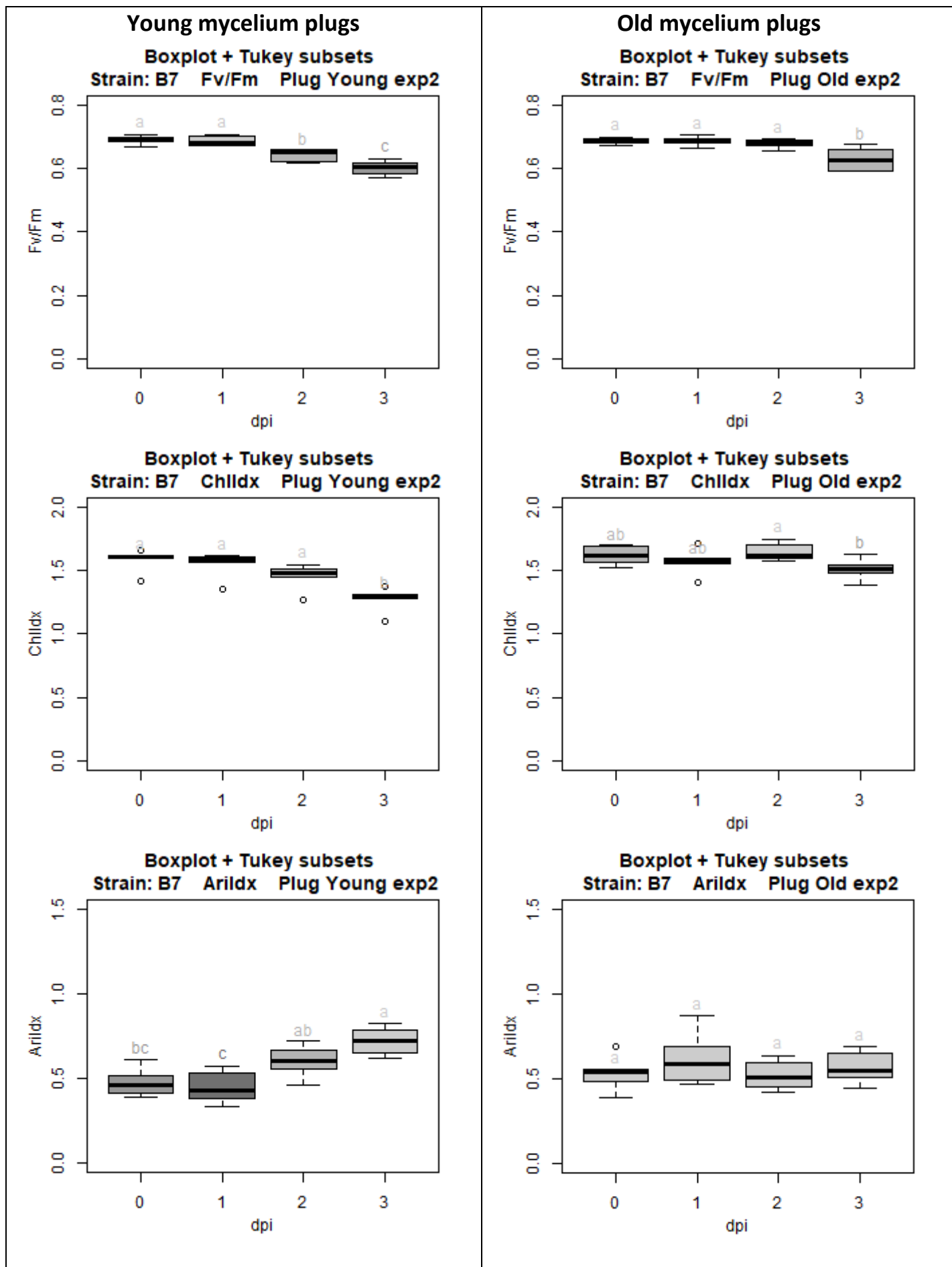
2.5. Isolaat B5



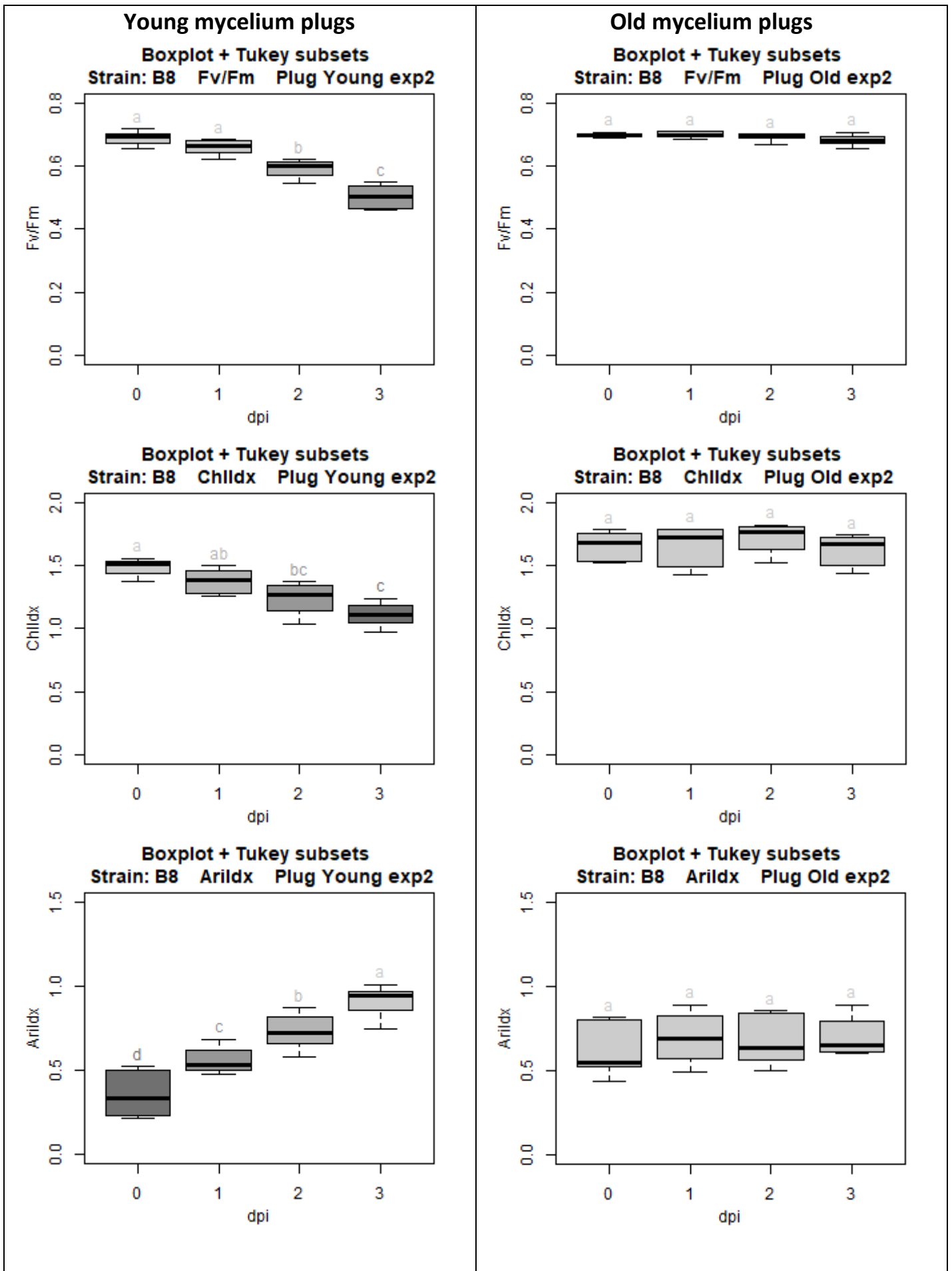
2.6. Isolaat B6



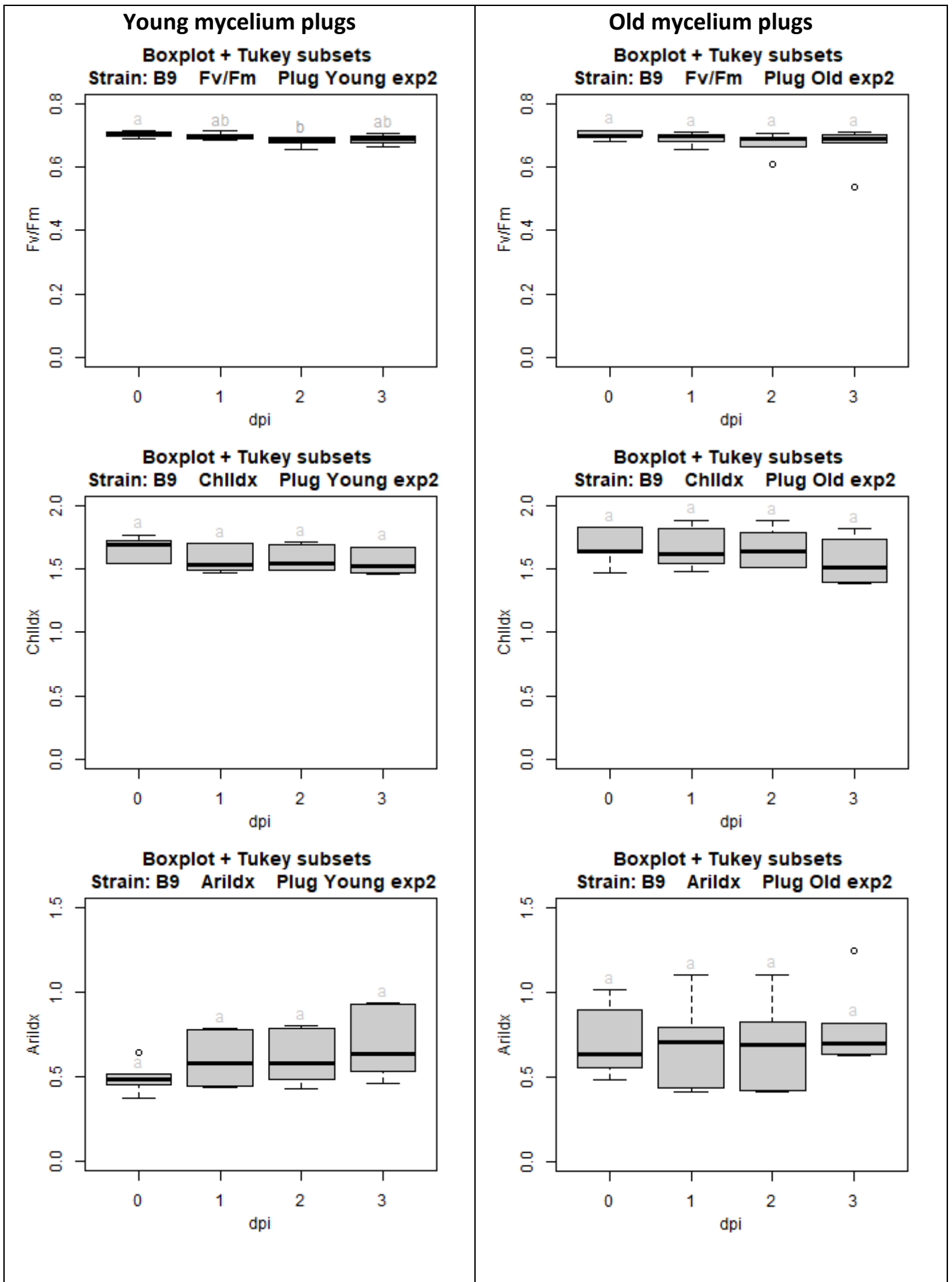
2.7. Isolaat B7



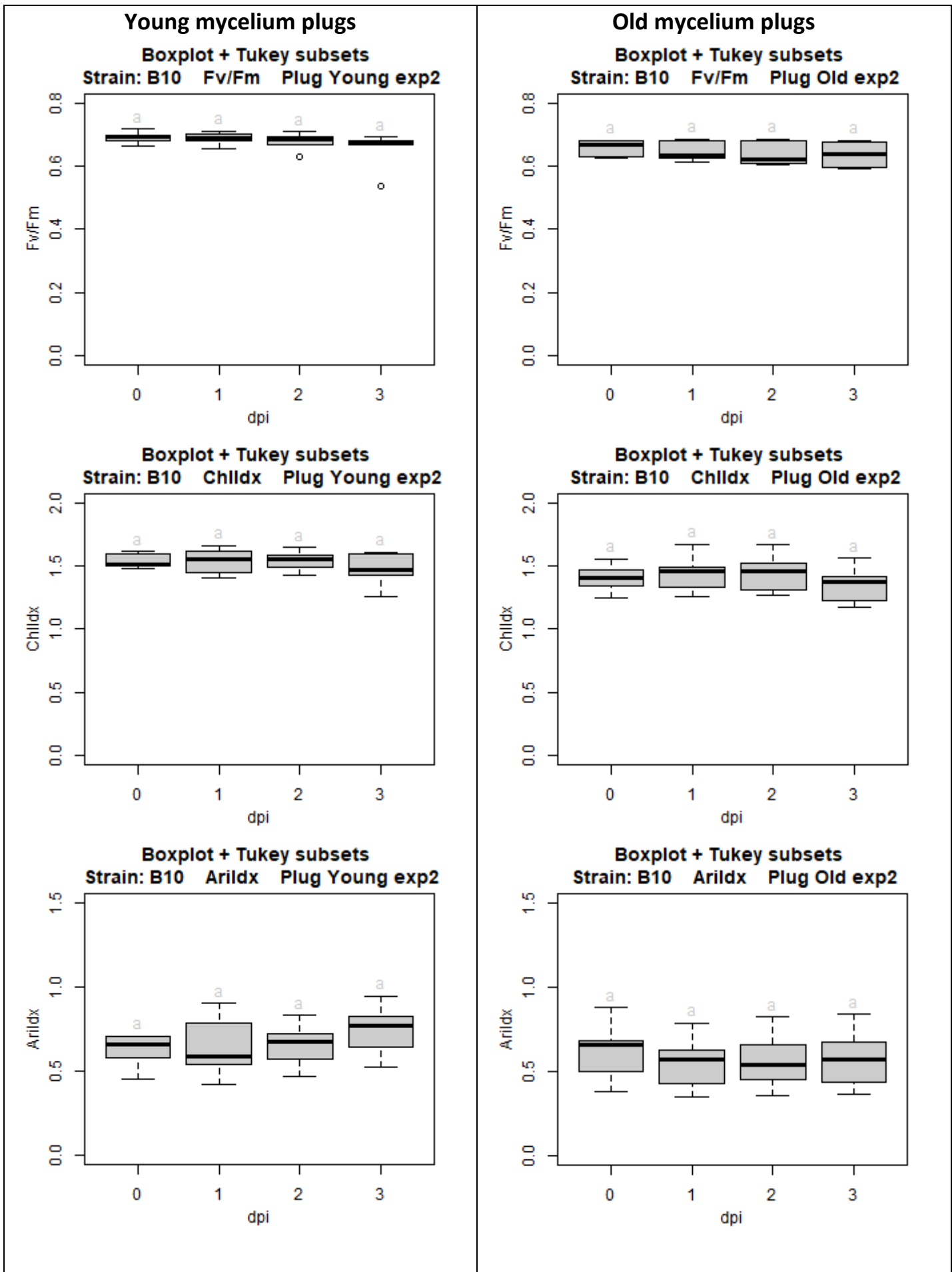
2.8. Isolaat B8



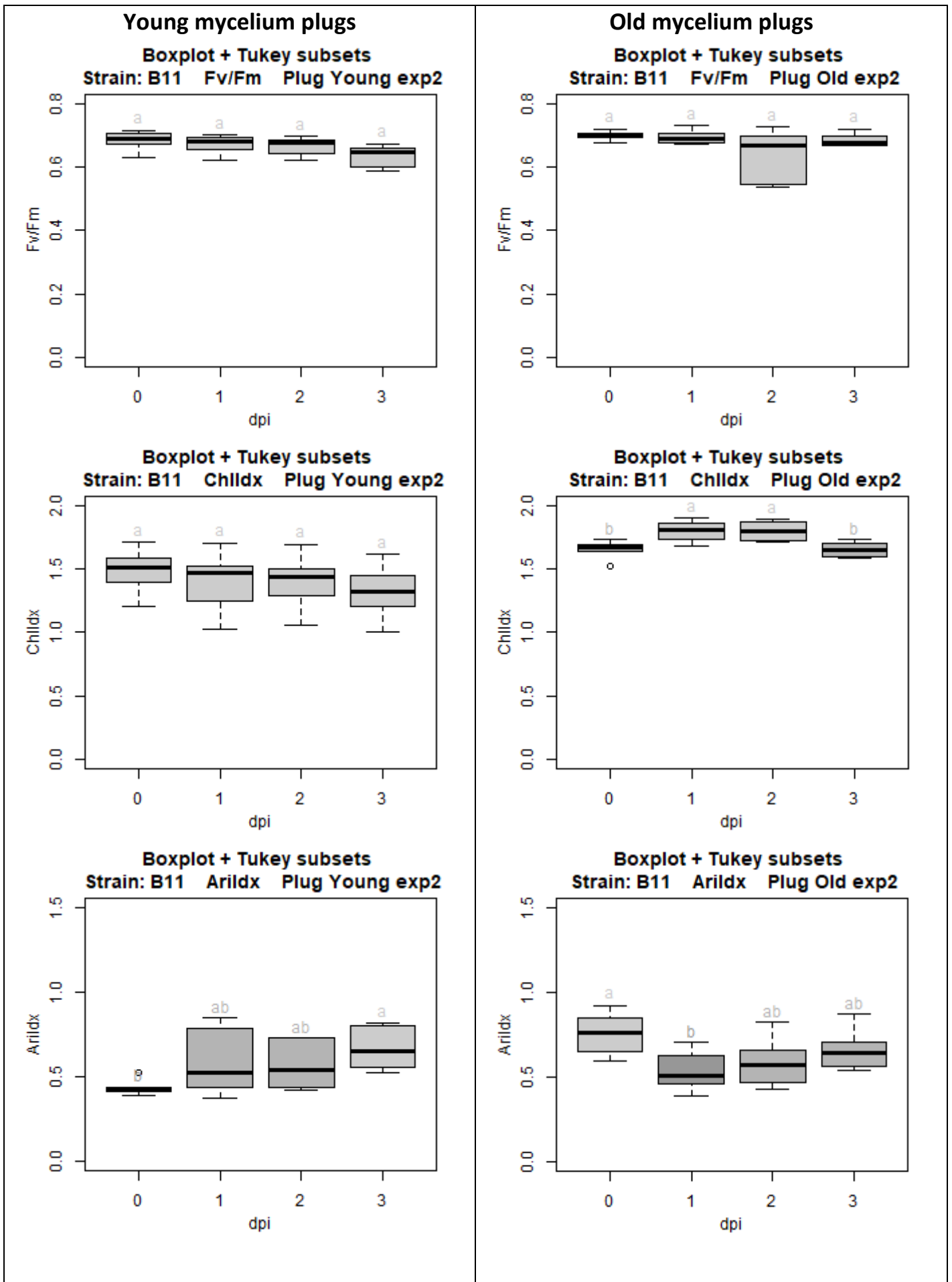
2.9. Isolaat B9



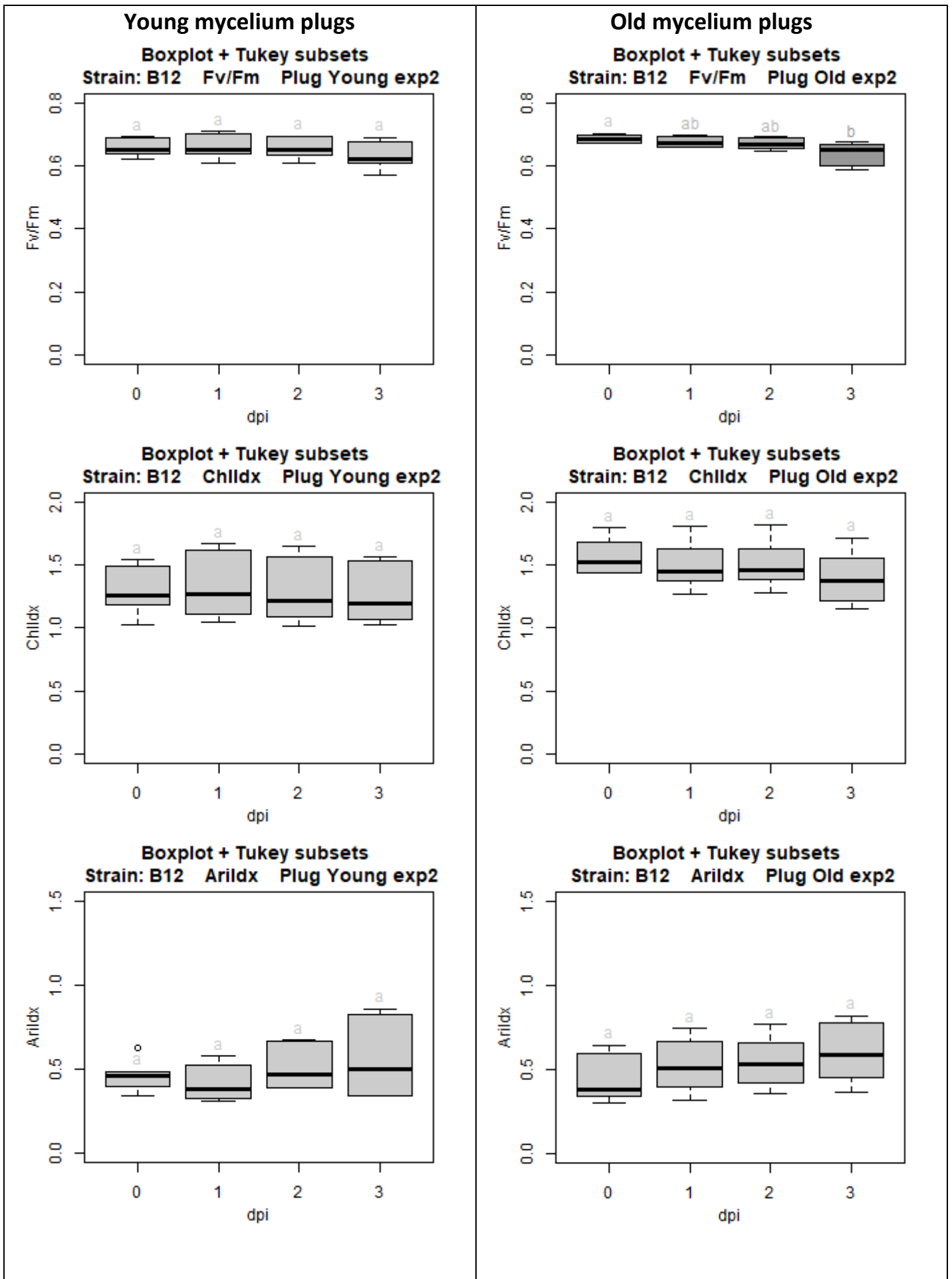
2.10. Isolaat B10



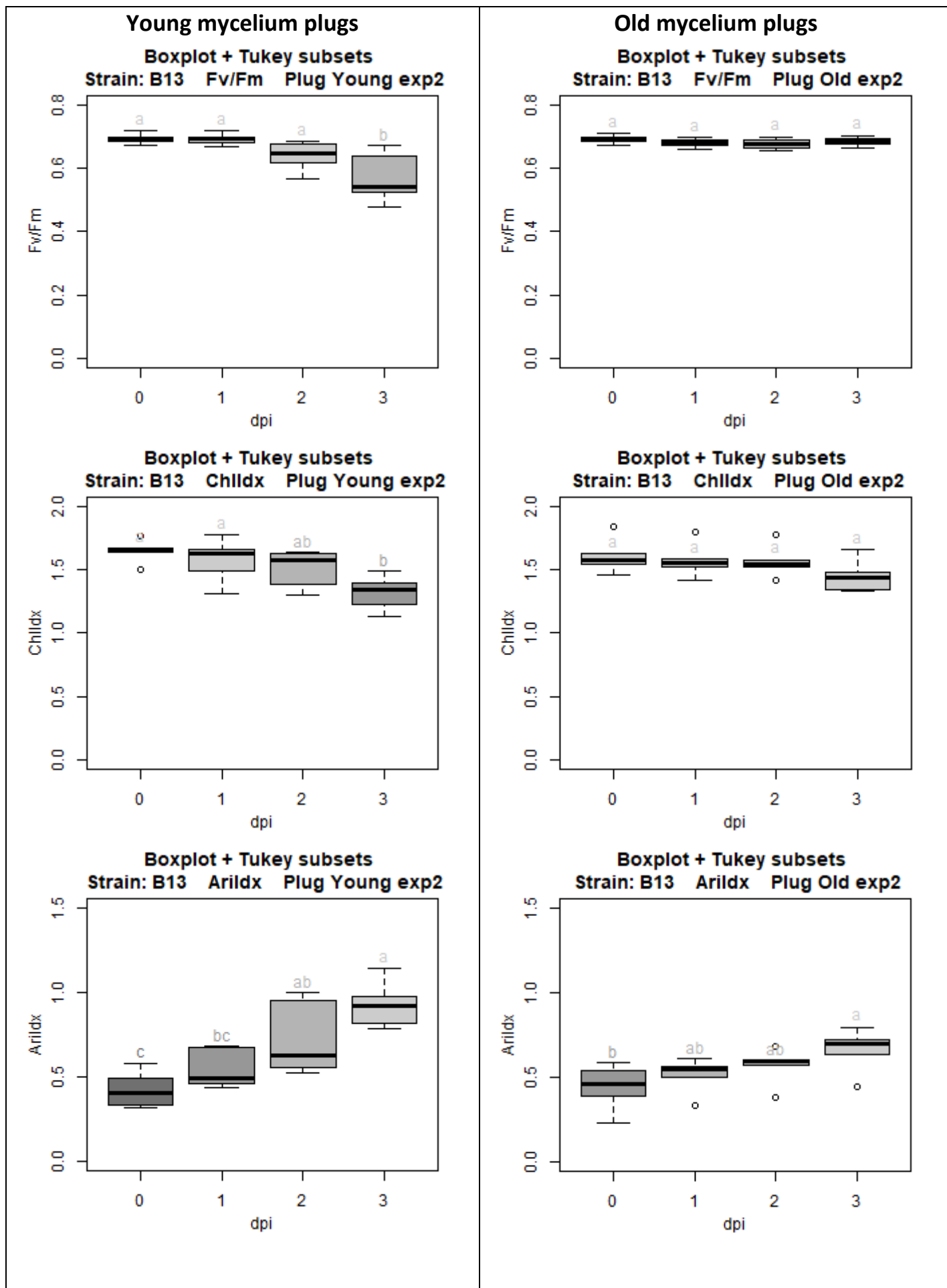
2.11. Isolaat B11



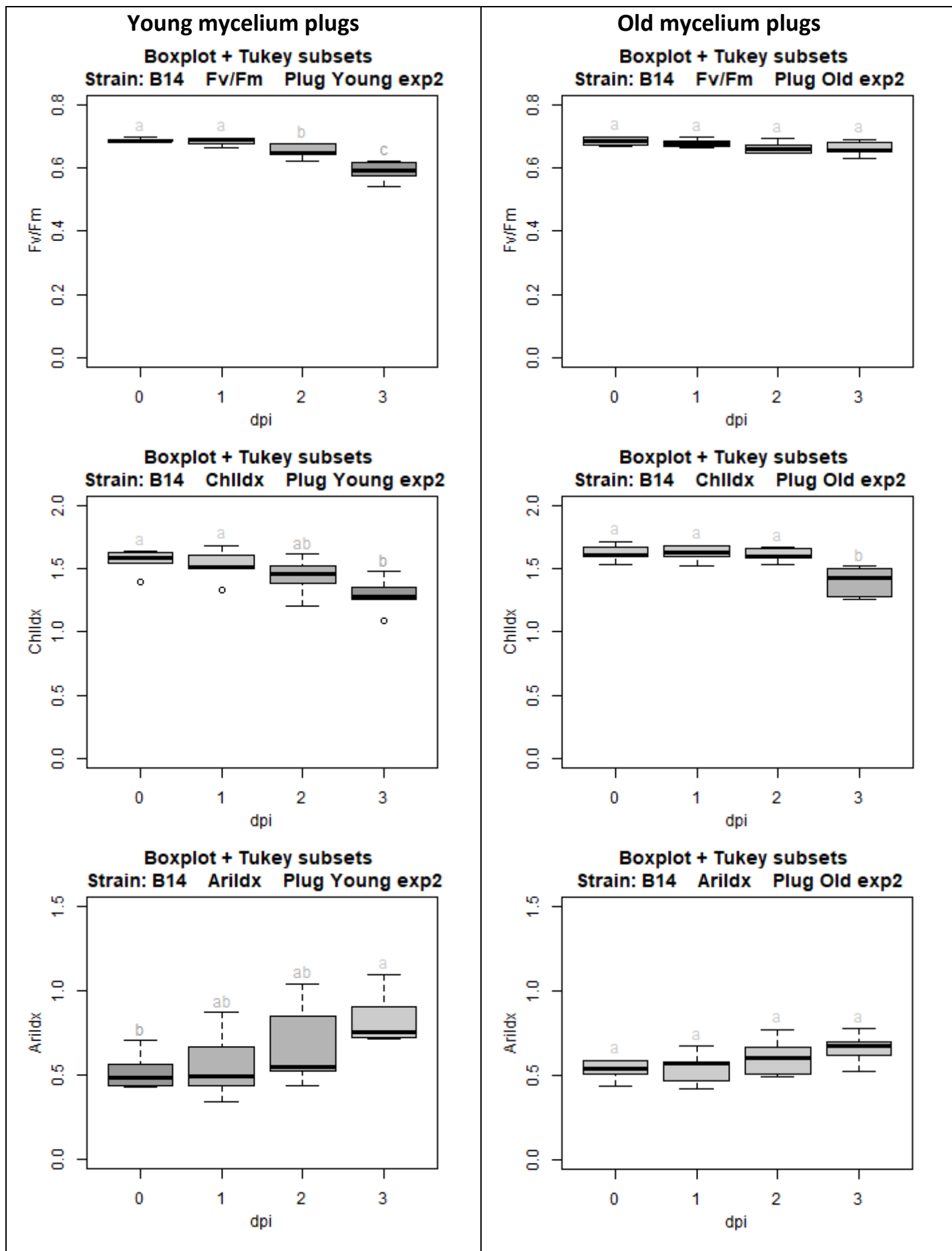
2.12. Isolaat B12



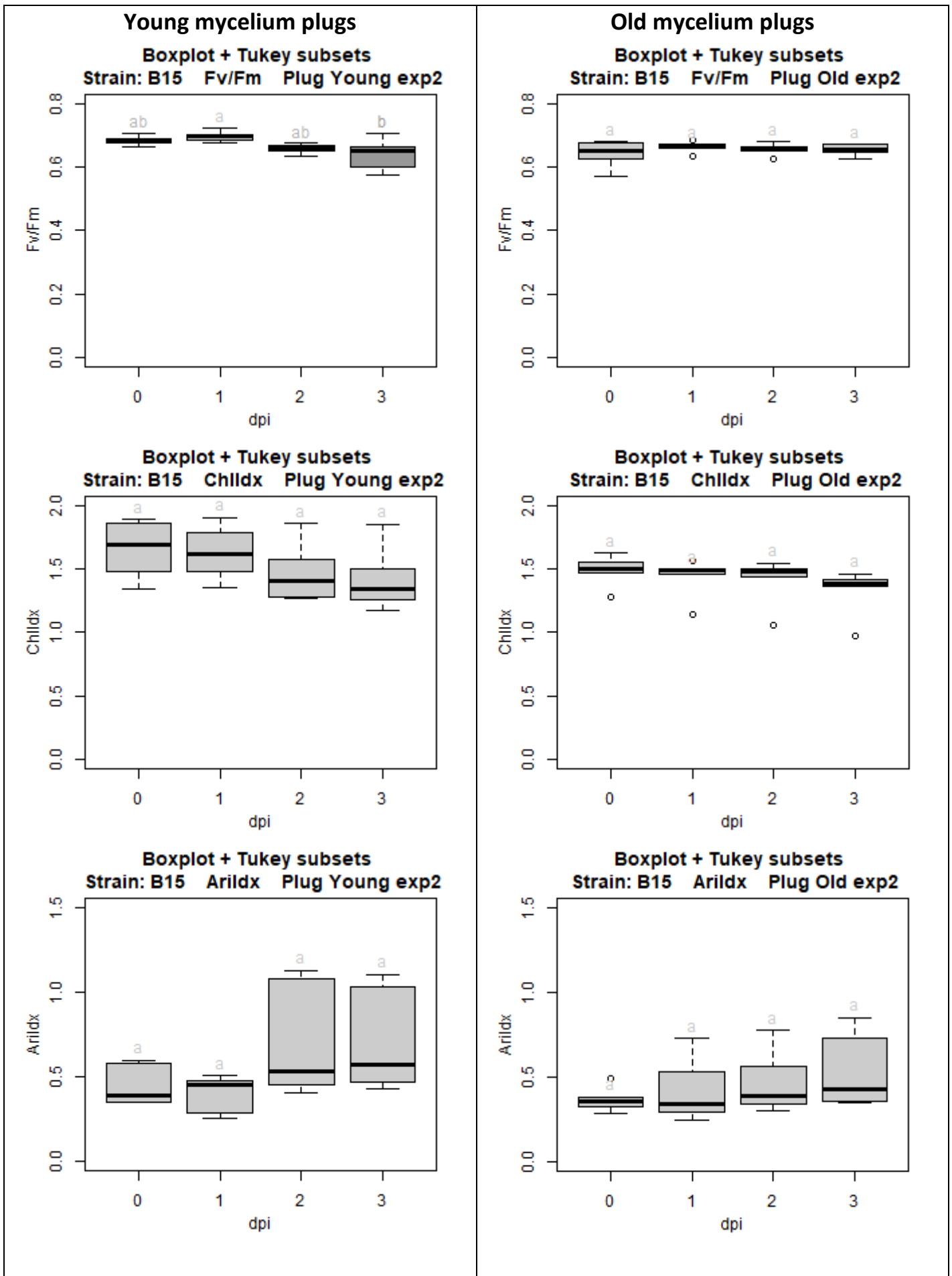
2.13. Isolaat B13



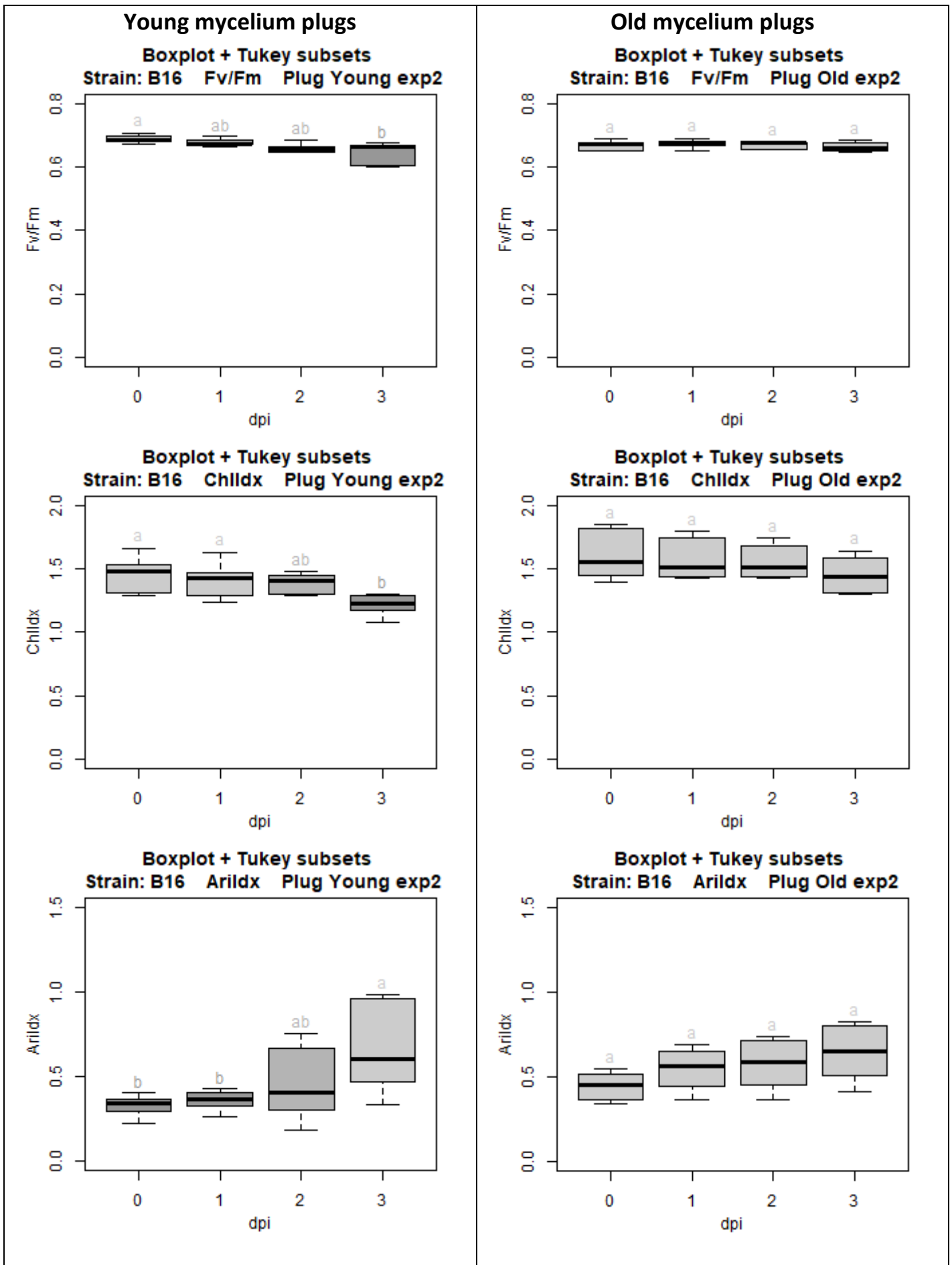
2.14. Isolaat B14



2.15. Isolaat B15



2.16. Isolaat B16



2.17. Controle

