

# Gezond entmateriaal nodig voor kankervrije vruchtbomen

Wil je vruchtbomen kankervrij produceren, dan moet het entmateriaal al kankervrij zijn. PPO onderzoekt momenteel in hoeverre bestaande detectiemethoden voor een- en tweejarige vruchtbomen, perspectief bieden voor entmateriaal.

Entmateriaal van de Vermeerderingstuinen is onder andere gegarandeerd vrij van vruchtboomkanker, maar dit materiaal is niet altijd van ieder ras voorhanden. Bij nieuwe rassen kiezen kwekers bijvoorbeeld voor entmateriaal uit fruitpercelen. Nadeel hiervan is dat dit materiaal soms kan leiden tot 10% uitval. Daarom is een goede detectiemethode voor enthout van groot belang. Die is er echter nog niet.

Er bestaan wel detectiemethoden voor vruchtboomkanker in een- en tweejarige bomen. PPO heeft bijvoorbeeld enkele jaren geleden een detectietoets ontwikkeld waarmee vóór het planten te testen valt of de schimmel aanwezig is in een partij. Deze toets heeft echter nadelen. Er zijn namelijk 300 bomen voor nodig, de toets is destructief en de resultaten laten minimaal acht weken op zich wachten. Hierdoor is de toets alleen geschikt bij voorjaarsplanting.

Vruchtboomkanker in bomen is inmiddels ook te detecteren met een twijgentoets en een DNA-toets. Bij de twijgentoets worden afgeknipte twijgen versneld tot symptoom-expressie gebracht, een proces dat weken duurt. Een DNA-toets geeft echter al na een week resultaat. PPO heeft beide methoden getest in twijgen van vruchtbomen.

Als het enthout van deze boom was getest op vruchtboomkanker, was duidelijk geworden dat vermeerdering en opkweek niet nodig waren geweest.



Fotos: PPO Fruit, Randwijk

## Resultaten twijgentoets

In het najaar van 2009 zijn eenjarige twijgen van een matig kankergevoelig ras met drie verschillende concentraties sporen (0,

## Vermalen voor DNA-extractie

Voor een goede DNA-toets is een DNA-extract nodig uit het betreffende materiaal (bladeren of hout). Om DNA te extraheren moet het materiaal worden fijn gemaakt. De bladeren (of het hout) worden hiervoor vermalen, waarna er DNA kan worden uitgehaald. Blad is makkelijk te vermalen. Bij hout is dat lastiger, omdat het vezels bevat. Daarnaast is het aantal levende cellen minder. Na het vermalen, kan het fijne poeder vervolgens worden gebruikt voor de DNA-isolatie.

10<sup>4</sup> en 10<sup>5</sup> sporen/ml) van *Nectria galligena*, de veroorzaker van vruchtboomkanker, in de boomgaard geïnoculeerd. De twijgen zijn na de bladval op twee verschillende tijdstippen geknipt: in december en in januari. Vervolgens zijn de twijgen op zand of in water weggezet, onder omstandigheden die optimaal zijn voor de ontwikkeling van vruchtboomkanker.

Na vier, acht en 12 weken is het aantal kankers op de twijgen geteld. Pas na 12 weken was de meeste aantasting zichtbaar bij het matig gevoelige ras (figuur). Voor de praktijk is deze periode echter te lang om op de uitslag te wachten: kwekers willen namelijk op tijd enten.

In de controlebehandeling waren geen vruchtboomkankersporen geïnoculeerd, hierbij stonden de twijgen alleen maar in water. Toch was hier enige kankerontwikkeling zichtbaar. Mogelijk zaten in de

boomgaard al vruchtboomkankersporen in het hout voordat de proef werd ingezet.

Ten slotte kan worden geconcludeerd dat het tijdstip van twijgen knippen in de boomgaard (december of januari) geen verschil in symptomen geeft. Praktisch gezien betekent dit dat kort na de bladval al 'testtwijgen' zijn te knippen, om zo snel mogelijk een indruk te krijgen van de mate van kankeraantasting. Wachten met knippen tot januari is dus niet nodig.

## Snelle DNA-toets

Omdat de twijgentoets voor de praktijk te laat inzicht in aantasting geeft, is momenteel een DNA-toets in ontwikkeling. Deze werkt sneller en kan met een week resultaat geven. De DNA-toets maakt gebruik van zogenoemde PCR-techniek, waarbij een specifiek stukje DNA van de ziekteverwekker wordt vermeerderd.

Om dit stukje te kunnen vermeerderen, zijn

zogenoeten primers nodig (kader: Wat is een primerset?). Voor de PCR-techniek is een primerset uit de literatuur gebruikt. Er zijn eveneens twee primers van Plant Research International (PRI) getest.

De eerste testen zijn gedaan op een zuiver isolaat van de schimmel. Vervolgens is ziek twijgmateriaal gebruikt om te zien of *N. galligena* ook daarin kan worden aangetoond. Deze resultaten waren positief. Omdat de isolatie van de schimmel uit het hout (nog) niet voldoende was, is gezocht naar andere mogelijkheden van vermalen (kader: Vermalen voor DNA-extractie).

Voor het testen van de gevoeligheid van de DNA-toets is in het najaar van 2009 een proef ingezet. In deze proef zijn een matig kankergevoelig ras en een gevoelig ras geïnoculeerd met drie verschillende concentraties (0, 10<sup>4</sup> en 10<sup>5</sup> sporen/ml) *N. galligena*.

Op twee tijdstippen, in december en in januari, is hiervan enthout geknipt. Elke behandeling bestond uit vier twijgen met elk tien wonden.

Na DNA-extractie is met de PCR-methode gekeken of *N. galligena* in het twijgmateriaal was aan te tonen. Dat was inderdaad mogelijk, in zowel het matig gevoelige als gevoelige ras.

Ook werd een positief resultaat behaald bij twijgen die waren geïnoculeerd met zowel 10<sup>4</sup> als 10<sup>5</sup> sporen/ml. Slechts één twijg van de in totaal 32 geteste monsters bleek negatief. Op het moment van testen was er aan de buitenkant van deze twijgen (nog) geen vruchtboomkanker zichtbaar.

In enthout dat alleen met water was geïnoculeerd, werd geen *N. galligena* aangetoond. Met uitzondering van drie monsters van het kankergevoelige ras; mogelijk zat er in deze twijgen al schimmel in het hout bij de start van het onderzoek.

Al deze resultaten betekenen dat latente vruchtboomkanker aantoonbaar is met de DNA-toets. Tussen enthout dat in december en januari was geknipt en geïnoculeerd bleek bovendien geen verschil in aantasting.

## Vervolgonderzoek met DNA-toets

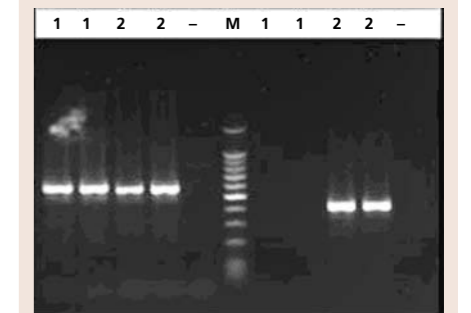
De twijgentest blijkt te langzaam om in te passen in de praktijk. Daarom is de snellere DNA-toets het best toepasbaar. Bovendien is het dan theoretisch mogelijk om op meerdere ziekten tegelijk te toetsen, bijvoorbeeld vruchtboomkanker en bacterievuur.

Om deze redenen focust PPO verder op de DNA-toets. Er is vervolgonderzoek nodig

## Wat is een primerset?

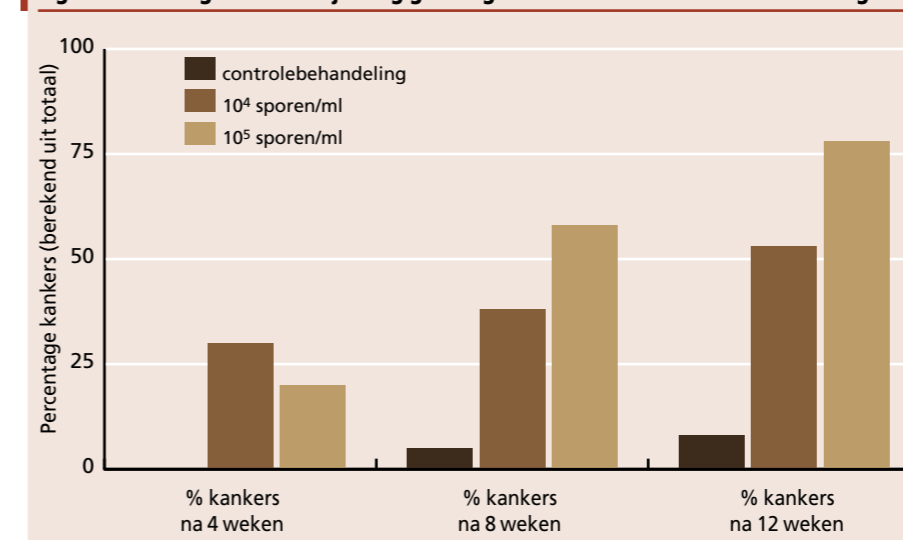
Een primerset is een bekende DNA-code die wordt gebruikt om een specifiek stukje DNA van een bepaalde ziekteverwekker te vermeerderen. Dit vermeerderde DNA is vervolgens zichtbaar te maken. Doordat er van een stukje DNA veel kopieën worden gemaakt, is de PCR-methode een gevoelige methode om lage hoeveelheden ziekteverwekkers (bijvoorbeeld latente infecties) te kunnen aantonen. Hiervoor moet het stukje te vermeerderen DNA wel specifiek zijn voor deze ziekteverwekker.

De figuur hieronder toont de specificiteit van een primerset. Links in beeld een generieke primer voor het aantonen van schimmels. Rechts de specifieke primer waarbij alleen een bandje te zien is bij *N. galligena*. Hiervoor is DNA gebruikt van zowel *N. galligena* als *N. cinnabarina*.



1=*Nectria cinnabarina*; 2=*Nectria galligena*; M=marker; -=negatieve controle.

Figuur. Percentage kankers bij matig gevoelig ras in drie verschillende behandelingen.



om de toets verder te ontwikkelen en om de gevoeligheid ervan te bepalen. Ook is het interessant om de DNA-toets te gebruiken om verschillende herkomsten van enthout met elkaar te vergelijken op de hoeveelheid aantasting.

Momenteel bekijkt PPO of er nog meer ziekten zijn voor het ontwikkelen van een (multiplex) DNA-toets. Omdat het budget beperkt is, zoekt PPO voor 2011 nog wel financiering.

In de toekomst kunnen vruchtboomkwekers wellicht entmateriaal op sturen en laten testen op vruchtboomkanker. Op die manier kan voorafgaand aan de vermeerdering een uitspraak worden gedaan over de aanwezigheid van (latente) vruchtboomkanker. Zodoende zijn slechte partijen entmateriaal te scheiden van goede partijen. Dit zal resulteren in minder aantasting verderop in de keten.

Peter Frans de Jong, Robert Dees en Arjan de Bruine

De Jong, Dees en De Bruine zijn onderzoekers bij PPO Fruit in Randwijk, (0488) 47 37 44/peterfrans.dejong@wur.nl.

Dit onderzoek is gefinancierd door het ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie.