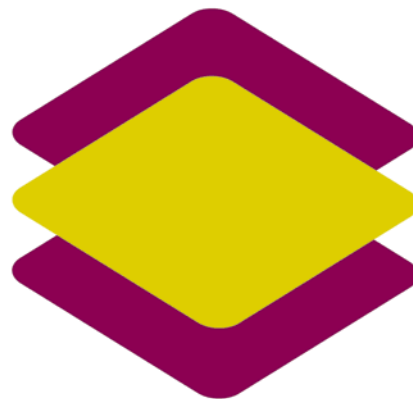


Innovative Robust Reliable
quality assays for fresh
plant products



Voorspelling optreden zwarte vlekken in bewaarpeen



Nathalie Verhoef, Peter Balk, Johannes Draaijer, Monique van Wordragen (NSure)
Hendrik Eerkens (Agrifirm Plant)
Theo van der Horst (Bejo Zaden)

Project nummer PT: 14320
Datum: 16-10-2012

Productschap  Tuinbouw

 **agrifirm**


bejo

Referaat

Zwarte vlekken in bewaarpeen kunnen worden veroorzaakt door verschillende schimmels welke tot grote problemen kunnen leiden. Een partij die er tijdens de oogst nog goed uitziet, kan in maart dusdanig veel schade hebben dat de waarde van de partij nog slechts nihil is. NSure heeft met hulp van Agrifirm Plant en andere belanghebbenden een moleculaire toets ontwikkeld om het risico op zwarte vlek in bewaarpeen te voorspellen. De test is het meest betrouwbaar als een monster wordt genomen na 1 maand koude opslag.

Abstract

Black spot in storable carrots is induced by different fungal pathogens. At harvest symptoms are often barely noticeable, but during storage black spots will appear making the batch unsuitable for commercial sale. NSure has developed in collaboration with Agrifirm Plant and other stakeholders a molecular test that can predict the risk whether a batch of carrots will develop black spots during storage. The test is most reliable when a sample is taken after 1 month of cold storage.

NSure

Adres	:Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen
	:Postbus 14, 6700 AA Wageningen
Tel.	:0317-466666
Fax	:0317-413322
E-mail	:info@nsure.nl
Internet	:www.nsure.nl

Inhoudsopgave

Voorwoord	4
Samenvatting	5
1 Inleiding	6
2 Materiaal en methoden	7
2.1 Fase 1: Verzameling materiaal voor toetsontwikkeling	7
2.2 Fase 1: Grootschalige genactiviteitsprofilering en indicator selectie	7
2.3 Fase 2: Verzameling materiaal voor praktijkvalidatie	8
2.3.1 Verzameling materiaal van commerciële partijen	8
2.3.2 Verzameling materiaal inductieproef Bejo Zaden	9
3 Resultaten	9
3.1 Fase 1: Grootschalige genactiviteitsprofilering en indicator selectie	9
3.2 Fase 2: Vertaling naar praktijktest en praktijkvalidatie	11
3.3.1 Praktijkvalidatie met behulp van commerciële partijen	11
3.3.2 Gevoeligheid indicatoren	13
3.3.3 Correlatie rijpheid en zwarte vlek	13
3.3.4 Praktijkvalidatie met behulp van inductieproef Bejo Zaden	15
4 Conclusies en discussie	17
5 Literatuur	18

Voorwoord

In dit voorwoord willen we graag iedereen bedanken die meegewerkt heeft bij de uitvoering van dit project. De leden van de begeleidingscommissie willen we bedanken voor het meedenken en mee discussiëren tijdens de overleggen. Tot slot willen we alle collega's van Agrifirm Plant, Bejo Zaden en NSure bedanken die meegeholpen hebben bij de uitvoering van dit project en het Productschap Tuinbouw voor het beschikbaar stellen van financiering voor de uitvoering van dit project.

Samenvatting

Zwarte vlekken worden veroorzaakt door verschillende schimmels welke tot grote problemen kunnen leiden. Een partij die in december nog uitstekend vermarkt kan worden, kan in maart dusdanig veel schade hebben dat de waarde van de partij nog slechts nihil is. Het ontwikkelen van een toets waarmee per partij kan worden bepaald wat het risico is op het optreden van zwarte vlekken kan zowel voor de teler (waardeverlies) als voor de afnemer (marktplaning) van grote waarde zijn. Op dit moment ontbreekt het de sector aan een betrouwbare indicator om het risico op zwarte vlekken te voorspellen.

Het bedrijf NSure ontwikkelt testen waarmee met behulp van genexpressie diagnostiek de fysiologische status van een product vastgesteld kan worden. Deze testen zijn gebaseerd op verschillen in genactiviteit in verschillende ontwikkelingsfasen. Door het meten van de genactiviteit kan al in een heel vroeg stadium gemeten worden wanneer fysiologische veranderingen in de plant op gaan treden, ruim voordat dit aan de buitenkant van het gewas zichtbaar wordt.

NSure heeft in samenwerking met Agrifirm Plant en andere belanghebbenden gewerkt aan de ontwikkeling van een moleculaire test die het risico op het ontstaan van zwarte vlekken van een bepaalde partij tijdens bewaring kan voorspellen. Een begeleidingscommissie bestaande uit vertegenwoordigers van NSure, Agrifirm Plant, Bejo Zaden, LTO kerngroep peen en telers, fungeerde als klankbord groep tijdens de twee jaren van onderzoek.

Aan de hand van penenmonsters die de afgelopen twee jaar zijn verzameld door Agrifirm Plant van een 100tal percelen tijdens de oogst en opslag en een inductieproef uitgevoerd door Bejo Zaden, heeft NSure een set genen geïdentificeerd die gebruikt kan worden om het risico op zwarte vlek te voorspellen. De genen zijn gevoelig en reageren niet alleen op infecties die zijn veroorzaakt door schimmels die gerekend worden tot de zwarte vlek veroorzakers *Mycocentrospora acerina*, *Alternaria radicina*, *Chalaropsis thielavioide*, *Rhizoctonia carotae* en *Rhexocercosporidium carotae*, maar ook op infecties die zijn veroorzaakt door *Phytophthora porri* en *Pythium spp.*, waardoor de test breder inzetbaar is. Het testresultaat is een inschatting van een partij in één van de volgende categorieën; laag (1), gemiddeld (2) en hoog risico op zwarte vlekken (3). De test is het meest betrouwbaar als er een monster wordt genomen na 1 maand opslag. Oogstomstandigheden, rooien (ontstaan van wondjes) en het samenvakken van penen in een kist (hogere infectiedruk dan penen in het veld) bevordert de kans op een infectie en deze factoren worden niet meegenomen als een monster tijdens de oogst wordt genomen.

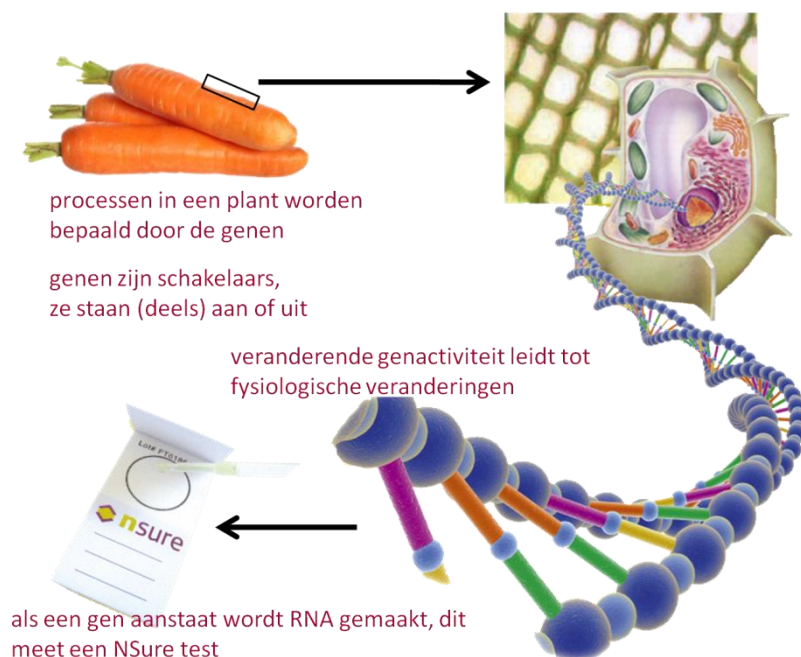
NSure heeft een gebruiksvriendelijke bemonsteringsmethode ontwikkeld door gebruik te maken van een FTA testkaartje (Whatman). Dit testkaartje stabiliseert het monster, zodat het per gewone post opgestuurd kan worden naar het NSure lab. Na ontvangst zal het analyseresultaat binnen 2 werkdagen aan de klant worden geleverd.

1 Inleiding

Zwarte vlekken worden veroorzaakt door verschillende schimmels welke tot grote problemen kunnen leiden. Een partij die in december nog uitstekend vermarkt kan worden, kan in maart dusdanig veel schade hebben dat de waarde van de partij nog slechts nihil is. Het ontwikkelen van een toets waarmee per partij kan worden bepaald wat het risico is op het optreden van zwarte vlekken kan zowel voor de teler (waardeverlies) als voor de afnemer (marktplaning) van grote waarde zijn.

Algemeen wordt aangenomen dat vruchtwisseling, bodemvruchtbaarheid, bemesting, teeltomstandigheden, toegepaste gewasbeschermingsmiddelen, rooiomstandigheden, inkoelregime, en de rijpheid van de peen bij oogst aspecten zijn welke het risico bepalen. Op dit moment ontbreekt het de sector aan een betrouwbare indicator om het risico op zwarte vlekken te voorspellen.

Het bedrijf NSure ontwikkelt testen waarmee met behulp van genexpressie diagnostiek de fysiologische status van een product vastgesteld kan worden. Deze testen zijn gebaseerd op verschillen in genactiviteit in verschillende ontwikkelingsfases. Door het meten van de genactiviteit (Figuur 1) kan al in een heel vroeg stadium gemeten worden wanneer fysiologische veranderingen in de plant op gaan treden, ruim voordat dit aan de buitenkant van het gewas zichtbaar wordt.



Figuur 1. Genen reguleren de biologische processen in planten. Door de genactiviteit (RNA) van een bepaald gen te meten kan al in een heel vroeg stadium gemeten worden wanneer fysiologische veranderingen in de plant op gaan treden.

Het achterliggende idee is dat verschillen in kwaliteit altijd zijn terug te voeren op veranderingen in de activiteit van genen, genen sturen immers alle biologische processen aan. Met dit in gedachten, kan deze testmethode van NSure worden gebruikt om het risico op het ontstaan van zwarte vlekken tijdens de bewaring van peen te voorspellen.

Het ontwikkelen van een toets om het optreden van zwarte vlek in bewaarpeen te kunnen voorspellen is onderverdeeld in 2 fasen.

Fase 1: Grootschalige genactiviteit profilering en indicator selectie

Fase 2: Vertaling naar praktijktest en praktijkvalidatie

2 Materiaal en methoden

2.1 Fase 1: Verzameling materiaal voor toetsontwikkeling

In het najaar van 2010 zijn tijdens de commerciële oogst van 58 percelen door Agrifirm Plant monsters verzameld van het ras Nerac. Van een monster, bestaande uit 25 penen, werden twee schilraspen per peen ingevroren in vloeibare stikstof. Tevens zijn er van 4 percelen op 3, 2, en 1 weken voor de commerciële oogst monsters van het land verzameld om te kunnen onderzoeken of de rijpheid van de peen een rol speelt op het optreden van zwarte vlekken.

In januari (tarreer moment) en april 2011 heeft Agrifirm Plant naast de teelregistratie ook de partijen een vlekkencijfer gegeven. Zeer slechte partijen kregen een cijfer tussen de 1-4, gemiddelde partijen een cijfer 5-6 en goede partijen een cijfer tussen de 7-10.

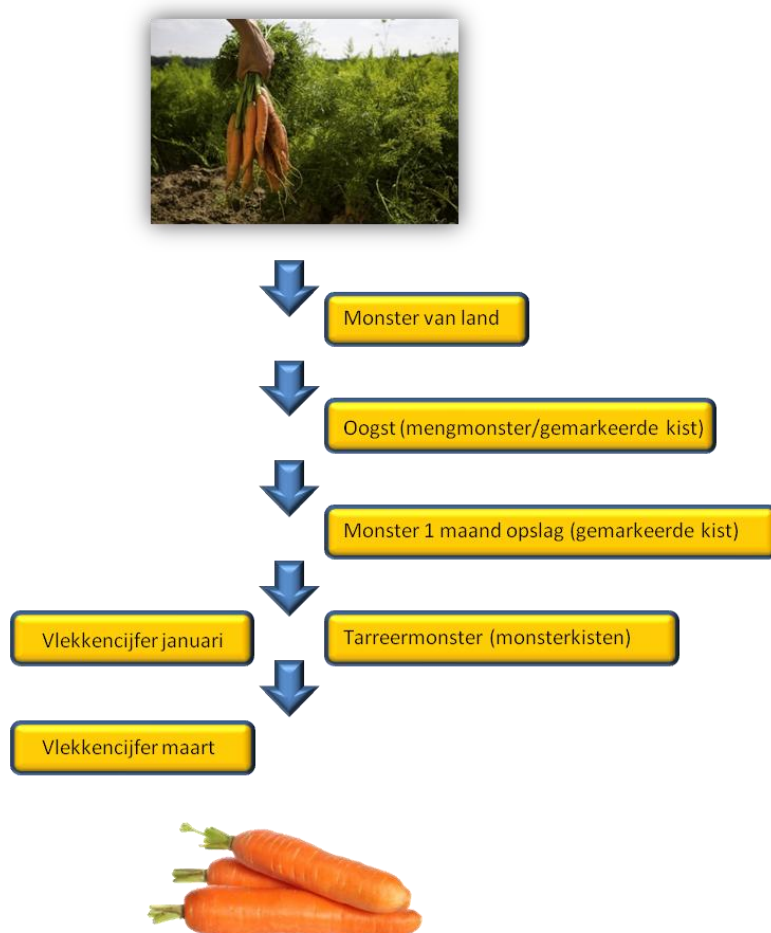
2.2 Fase 1: Grootschalige genactiviteitsprofilering en indicator selectie

Om genen te kunnen identificeren die betrokken zijn bij het optreden van zwarte vlek tijdens bewaring zijn verschillende goede en slechte partijen geanalyseerd met behulp van RNAseq. Naast verscheidene partijen die waren geïnfecteerd door *Chalaropsis thielavioides* en *Mycocentrospora acerina* zijn ook partijen met *Phytophthora porri* meegenomen. Om rijpingsindicatoren te identificeren zijn naast de commerciële oogstmonsters van een goed en slecht perceel ook monsters gesequenced die drie weken voor de commerciële oogst zijn verzameld. De genactiviteitsprofielen zijn vervolgens met elkaar vergeleken om genen te kunnen identificeren die betrokken zijn bij het optreden van zwarte vlek. Voor een 40tal kandidaat genen zijn primers ontworpen en zijn alle ingevroren monsters van de overige percelen met behulp van de qPCR methode doorgemeten. Op grond van de correlatie die gevonden is met het optreden van zwarte vlek en het expressie niveau zijn een tiental indicatoren uitgekozen die zijn gevalideerd in de praktijkvalidatie in 2011 (Fase 2). Tevens is voor deze indicatoren een fasering gemaakt waarmee het risico op zwarte vlek voorspelt kan worden. Om de rijping te bestuderen zijn een tiental indicatoren bestudeerd met behulp van de qPCR methode.

2.3 Fase 2: Verzameling materiaal voor praktijkvalidatie

2.3.1 Verzameling materiaal van commerciële partijen

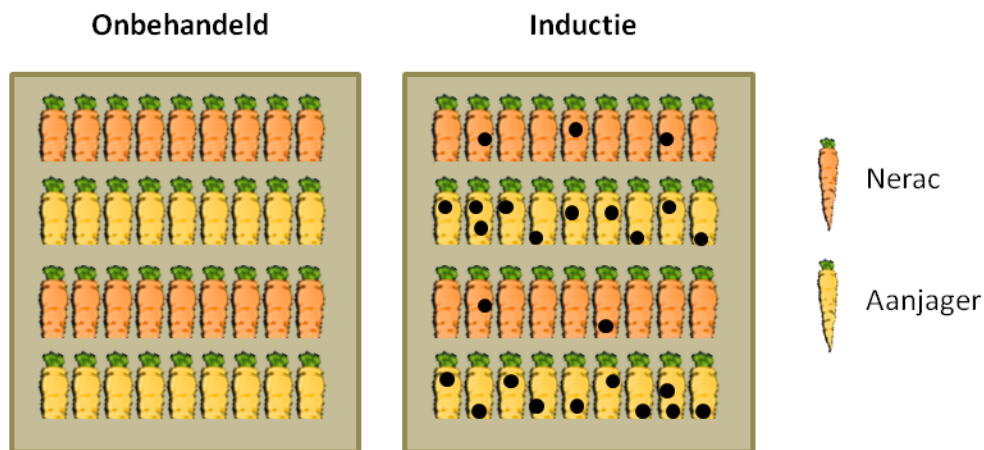
In het najaar van 2011 is een praktijkvalidatie uitgevoerd voor seizoen 2011-2012 (Figuur 2). Naast oogstmonsters, zijn door Agrifirm Plant van dezelfde percelen ook monsters genomen na een maand opslag en tijdens het tarreren (het moment dat de niet biologische partijen het eerste zwarte vlek cijfer kregen toebedeeld). Ook zijn voor een paar percelen monsters van het land verzameld. Tijdens de oogst zijn twee monsters genomen, een mengmonster van penen uit verschillende kisten en een monster uit een gemarkeerde kist. Voor de bemonstering 1 maand na opslag is een monster verzameld uit dezelfde gemarkeerde kist. Het tarreermonster was een mengmonster van alle tarreerkisten. Er zijn een 50tal Nerac partijen gevolgd, waarvan enkele biologisch geteeld. De monsternamen waren nagenoeg compleet, er misten alleen van 8 percelen een maandmonster. Van elk monster, bestaande uit 25 penen, werden twee schilraspen per pen ingevroren in vloeibare stikstof. In de partijen werd voornamelijk *Mycocentrospora acerina* waargenomen, maar ook wat *Chalaropsis thielavioide*, *Rhizoctonia carotae*, *Phytophthora porri* en *Pythium spp.* In 1 partij werd *Alternaria radicina* waargenomen.



Figuur 2. Monsternamen tijdens praktijkvalidatie 2011-2012.

2.3.2 Verzameling materiaal inductieproef Bejo Zaden

In het najaar van 2011 heeft Bejo Zaden een inductieproef uitgevoerd waarbij penen van het ras Nerac door middel van een aanjager zijn geïnduceerd met *Mycocentrospora acerina*, *Alternaria radicina* en *Rhexocercosporidium carotae* (Figuur 3). Monsters van de inducties en onbehandelde partijen zijn verzameld tijdens de oogst in oktober 2011 en tijdens de opslag in januari 2012 (1 maand opslag) en maart 2012 (3 maanden opslag). De oogstmonsters zijn willekeurig geraapt van het veld. De monsters genomen na 1 en 3 maanden opslag, zijn min of meer van bovenaf (wel onder de top laag) verzameld uit verschillende kisten. Per monsternamen zijn er van 25 penen twee schilraspen per pen ingevroren in vloeibare stikstof.



Figuur 3. Opzet inductieproef Bejo Zaden. De aanjager is in rijtjes gezaaid tussen de rijen Nerac. Penen van de aanjager zijn geïnoculeerd met *Mycocentrospora acerina*, *Alternaria radicina* of *Rhexocercosporidium carotae* zodat de schimmels op natuurlijke wijze konden overslaan naar de Nerac penen.

3 Resultaten

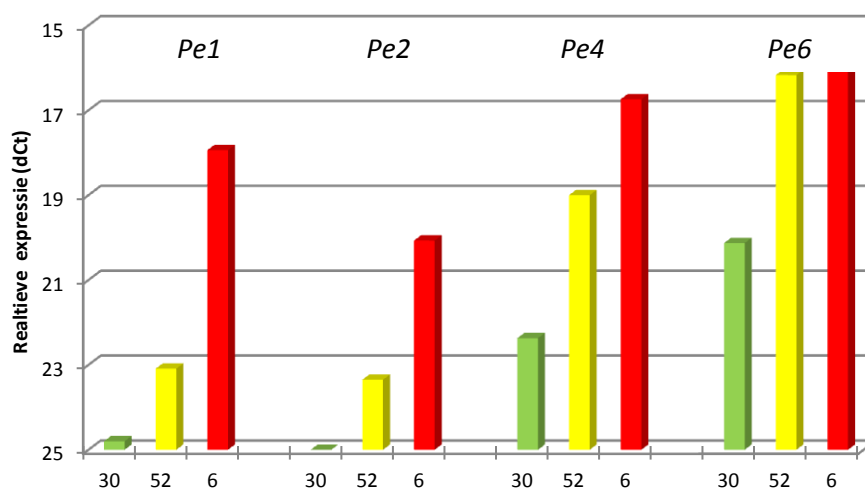
3.1 Fase 1: Grootschalige genactiviteitsprofilering en indicator selectie

Aangezien Nerac het meest geteelde bewaarpeen ras is in Nederland is er voor gekozen om voor de ontwikkeling van de test alleen op Nerac te richten. Om indicatoren te kunnen identificeren die gebruikt kunnen worden om het optreden van zwarte vlek in een partij te kunnen voorspellen, zijn in het najaar van 2010 tijdens de commerciële oogst van 58 percelen schilmonsters verzameld. Tijdens het tarreren zijn de partijen beoordeeld en is een vlekencijfer toegekend door Agrifirm Plant. Zeer slechte partijen kregen een cijfer tussen de 1-4, gemiddelde partijen een cijfer 5-6 en goede partijen een cijfer tussen de 7-10. In de bemonsterde partijen werden *Chalaropsis thielavioides* en *Mycocentrospora acerina* waargenomen, maar geen *Alternaria radicina*, *Rhizoctonia carotae* en *Rhexocercosporidium carotae*. Opmerkelijk veel partijen waren aangetast door *Phytophthora porri*. Voor de grootschalige genactiviteitsprofilering is een selectie gemaakt van goede en slechte partijen. Naast verscheidene partijen die waren geïnfecteerd met *Chalaropsis thielavioides* en

Mycocentrospora acerina, zijn ook partijen meegenomen die waren aangetast door *Phytophthora porri*. Alhoewel deze schimmel niet tot de zwarte vlek veroorzakers wordt gerekend, vond de zwarte vlekken commissie het van belang om dit mee te nemen in de testontwikkeling aangezien het ook voor veel problemen zorgt tijdens de bewaring.

De grootschalige genactiviteitsprofilering is uitgevoerd door middel van RNAseq, een vrij nieuwe techniek wat valt onder Next Generation Sequencing. Met behulp van deze methode kan heel het transcriptoom, dus alle RNA moleculen in een monster, worden geïdentificeerd en kunnen de genactiviteits(expressie)profielen tussen monsters worden vergeleken. Voor deze methode is geen sequentie informatie nodig en dit is een uitkomst voor gewassen waar geen of nauwelijks genetische informatie over bekend is zoals het geval is bij peen. Van de +/- 50.000 contigs (stuk sequentie van het hele gen of een stuk daarvan) die tot expressie komen in peen, zijn voor een 40tal genen die het grootste genactiviteitsverschil tussen goede en slechte partijen lieten zien primers ontworpen zodat de genactiviteitsprofielen van de gekozen genen kon worden bepaald in alle ingevroren schilmonsters met behulp van de qPCR methode.

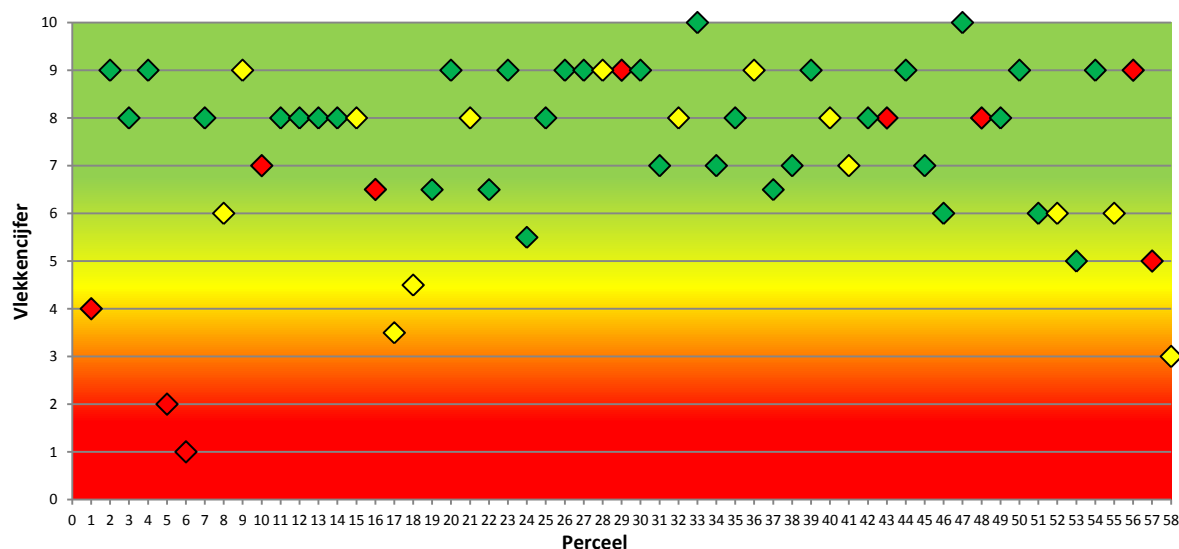
Vergelijking van de expressieprofielen van de 40tal indicatoren met bewaarkwaliteit en type schimmel resulteerde in een eindselectie van 7 indicatoren die allen betrokken zijn in de afweer tegen pathogenen (Figuur 4). Er waren meer indicatoren die gecorreleerd konden worden aan zwarte vlek, maar vanwege de lage expressie zijn deze niet meegenomen in de praktijkvalidatie.



Figuur 4. Expressieprofielen van 4 genen die betrokken zijn bij zwarte vlek. Perceel 30, is beoordeeld door Agrifirm Plant als een goede partij, perceel 52 als een gemiddelde partij en perceel 6 als een slechte partij. RNA is geïsoleerd en de expressieprofielen van indicatoren *Pe1*, *Pe2*, *Pe4* en *Pe6* in verhouding tot de constante indicator *PeCo1* zijn weergegeven.

Op basis van de 7 indicatoren is door NSure een fasering ontwikkeld met drie risicoklassen, een laag, gemiddeld en hoog risico op zwarte vlek. Deze fasering is vervolgens gebruikt om voor elk oogstmonster de risicoklasse te bepalen en te vergelijken met de vlekkencijfers (Figuur 5). Van de 40 percelen die Agrifirm Plant beoordeelde als goed na tarreren, vond NSure voor 27 partijen een laag risico, voor 8 een gemiddeld risico en voor 5 een hoog risico. Een aantal monsters werd door NSure beoordeeld met een gemiddeld/hoog risico. Mogelijk zou dit zijn veroorzaakt doordat de monsternamen van NSure niet altijd op dezelfde dag werd uitgevoerd als dat de penen van het land kwamen. De monsters zaten dus al een paar dagen in een gesloten zak voor ze vervoerd werden. Agrifirm Plant beoordeelde na tarreren 12 partijen als een gemiddelde partij. In 5 van de 12 partijen

werd een risico op zwarte vlek gevonden. Zes partijen bleken na tarreren van slechte kwaliteit te zijn met een vlekencijfer tussen de 1 en 4,5. NSure beoordeelde 3 van deze partijen met een hoog risico en 3 met een gemiddeld risico.



Figuur 5. Risico inschatting op zwarte vlek aan de hand van oogstmonsters 2010-2011. De grafiek geeft het gevonden vlekencijfer van april weer per perceel. Zeer slechte partijen kregen een cijfer tussen de 1-4, gemiddelde partijen een cijfer 5-6 en goede partijen een cijfer tussen de 7-10. De gegevenspunten van percelen die door NSure zijn beoordeeld met een laag risico zijn groen gekleurd, percelen met een gemiddeld risico in het geel en percelen met een hoog risico op zwarte vlek in het rood.

NSure bleek in staat om zowel een Chalaropsis, Mycocentrospora of Phytophthora infectie te meten. Aangezien dit jaar geen Rhexocerosporium en Alternaria werd aangetroffen, kon niet worden nagegaan of de gevonden indicatoren ook te gebruiken zijn bij deze infecties. Om de specificiteit van de indicatoren te onderzoeken is besloten om naast de praktijkvalidatie (3.3.1) een inductieproef bij Bejo uit te voeren (3.3.4).

3.2 Fase 2: Vertaling naar praktijktest en praktijkvalidatie

3.3.1 Praktijkvalidatie met behulp van commerciële partijen

Om de indicatoren en de door NSure aangelegde fasering te kunnen beoordelen, heeft in het najaar van 2011 een validatie plaatsgevonden. Naast oogstmonsters, zijn van dezelfde percelen ook monsters genomen na een maand opslag en tijdens het tarreren (het moment dat de niet biologische partijen het eerste zwarte vlek cijfer kregen toebedeeld). Van een paar percelen zijn ook monsters van het land verzameld. Tijdens de oogst zijn twee monsters genomen, een mengmonster van penen uit verschillende kisten en een monster uit een gemarkeerde kist. Voor de 1 maand bemonstering is een monster verzameld uit dezelfde gemarkeerde kist. Alle monsters zijn gefaseerd en ingedeeld in 1 van de 3 risicoklassen en vergeleken met de vlekencijfers. Uit de data bleek dat de risico inschatting van NSure betrouwbaarder is na 1 maand opslag dan tijdens de oogst (tabel 1). Dit is niet onverwacht, aangezien de vitaliteit van de penen tijdens de opslag achteruit gaat. In tegenstelling tot het jaar daarvoor (herfst was toen erg nat), lijkt het er op dat een groot deel van de partijen in 2011-

2012 pas achteruit zijn gegaan tijdens de opslag en niet al in het veld. Oogstomstandigheden, rooien (ontstaan van wondjes) en het samenvakken van penen in een kist (hogere infectiedruk dan wanneer de penen nog in het veld staan) bevordert de kans op een infectie en deze factoren worden niet meegenomen als een monster tijdens de oogst wordt genomen.

In de gevolgde partijen werd in 2011-2012 voornamelijk *Mycocentrospora acerina* waargenomen, maar ook wat *Chalaropsis thielavioide*, *Rhizoctonia carotae*, *Phytophthora porri* en *Pythium spp.* Slechts in 1 partij werd *Alternaria radicina* waargenomen.

Tabel 1. Risico inschatting op zwarte vlek door NSure van partijen verzameld tijdens de praktijkvalidatie 2011-2012 met een gemiddeld/slecht vlekkencijfer in de tijd. Vlekkencijfers (maat) zijn tussen haakjes weergegeven. De monsters die door NSure beoordeeld zijn met een laag risico zijn groen gekleurd, monsters met een gemiddeld risico in het geel en monsters met een hoog risico op zwarte vlek in het rood.

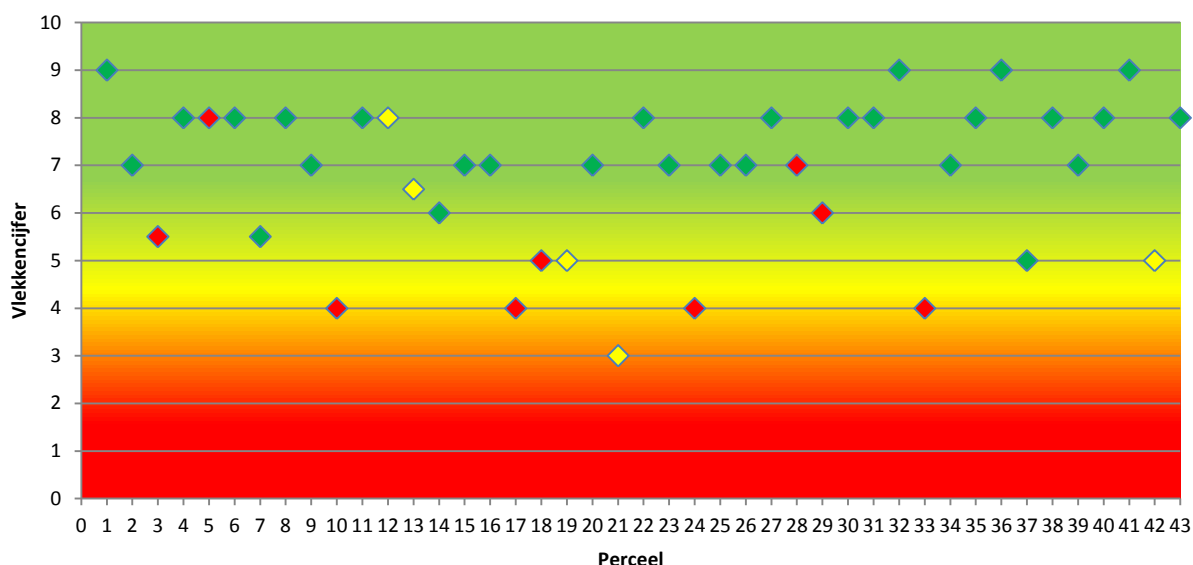
Monster	Perceel						
	3 (5,5)	17 (4)	18 (5)	19 (5)	21(3)	24 (4)	42 (5)
Van het land	X	X			X	X	X
Oogst (gemarkeerde kist)							
Oogst (mengmonster)							
Maand opslag							
Na tarreren							

De risico inschatting op zwarte vlek door NSure op alle maandmonsters van de niet biologische partijen (biologische partijen zijn niet beoordeeld met een vlekkencijfer) zijn weergegeven in figuur 6. Van de 29 percelen die Agrifirm Plant beoordeelde als goed na tarreren, vond NSure voor 26 partijen een laag risico, voor 1 een gemiddeld risico (perceel 12) en voor 2 een hoog risico (perceel 5 en 18). Alhoewel perceel 5 beoordeeld was met een goed vlekkencijfer, heeft Agrifirm Plant naderhand veel klachten gehad over de kwaliteit. Er was veel variatie tussen de kisten en dit zou kunnen verklaren waarom NSure wel een hoog risico vond en Agrifirm Plant niet. Voor perceel 18 werd in het maandmonster een hoog risico gemeten en in twee later genomen tarreermonsters een gemiddeld risico. Ondanks dat er in drie metingen een risico werd gevonden beoordeelde Agrifirm Plant dit naderhand als een goede partij.

Agrifirm Plant beoordeelde na tarreren 9 partijen als een gemiddelde partij. In 6 van de 9 partijen werd een risico op zwarte vlek gevonden. Van perceel 7 die NSure als goed beoordeelde zijn naderhand 2 tarreermonsters verzameld en deze gaven een laag en hoog risico. Mogelijk was er variatie tussen de kisten. Ook bleek er variatie te zijn tussen de kisten van perceel 14, analyse van drie tarreermonsters leverde een laag, gemiddeld en hoog risico op. Het tarreermonster van perceel 37 werd beoordeeld op een hoog risico.

Vijf partijen bleken na tarreren van slechte kwaliteit te zijn en NSure beoordeelde 4 partijen met een hoog risico en perceel 21 met een gemiddeld risico. Uit onderzoek van Bejo Zaden bleek perceel 21 niet te zijn geïnfecteerd door een schimmel dat zwarte vlek veroorzaakt, maar door *Pythium spp.* Slechts in 1 perceel werd *Alternaria radicina* aangetroffen en NSure beoordeelde deze partij met een hoog risico (van dit perceel is alleen na +/- 3 maanden opslag een monster genomen). De

geïdentificeerde indicatorset lijkt niet alleen infecties van schimmels te detecteren die tot de zwarte vlek veroorzakers behoren, maar ook *Phytophthora porri* en *Pythium spp* infecties.



Figuur 6. Risico inschatting op zwarte vlek aan de hand van partijen een maand na koude opslag 2011-2012. De grafiek geeft het gevonden vlekencijfer van maart weer per perceel. Zeer slechte partijen kregen een cijfer tussen de 1-4, gemiddelde partijen een cijfer 5-6 en goede partijen een cijfer tussen de 7-10. De gegevenspunten van partijen die door NSure beoordeeld zijn met een laag risico zijn groen gekleurd, partijen met een gemiddeld risico in het geel en partijen met een hoog risico op zwarte vlek in het rood.

3.3.2 Gevoeligheid indicatoren

Om de gevoeligheid van de indicatoren te onderzoeken is cDNA van zieke en gezonde penen gemengd en zijn de expressie niveaus van de indicatoren bepaald met behulp van qPCR en gefaseerd door NSure in geen, gemiddeld of hoog risico op zwarte vlek (Tabel 2). Eén zieke peen op 24 gezonde penen leidt al tot een gemiddeld risico en 3 zieke penen op de 25 tot een hoog risico.

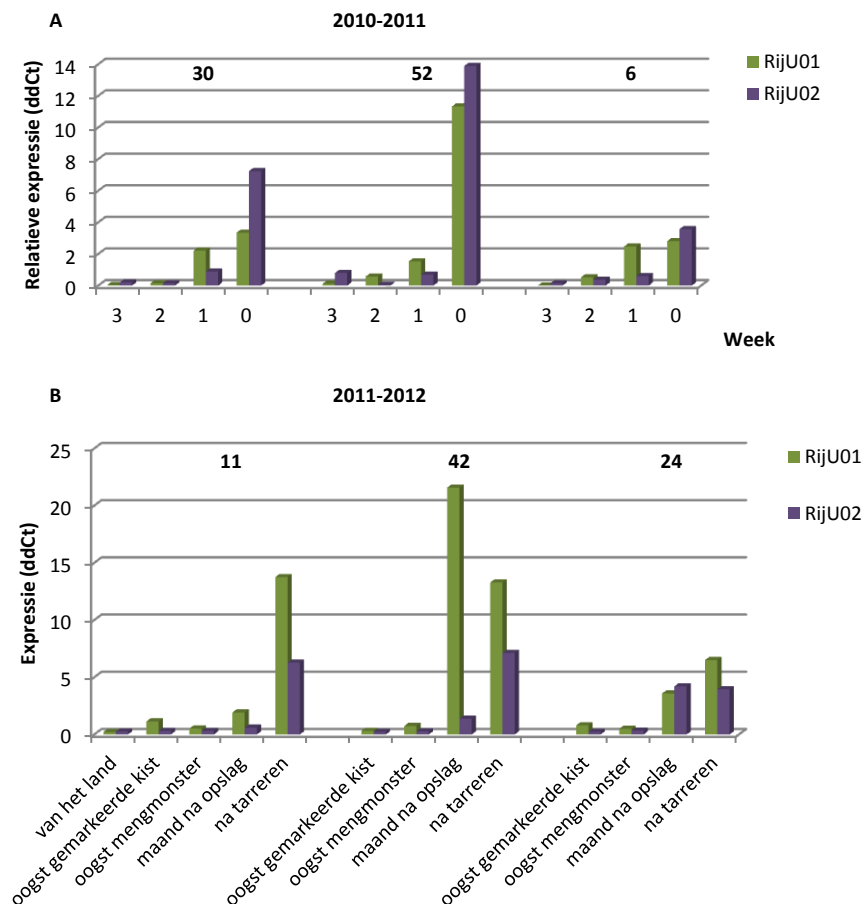
Tabel 2. Gevoeligheid van de indicatoren.

Gezonde partij Aantal penen	Zieke partij Aantal penen	Nsure risico
25	0	Geen risico
24	1	Gemiddeld risico
22	3	Hoog risico
20	5	Hoog risico
0	25	Hoog risico

3.3.3 Correlatie rijpheid en zwarte vlek

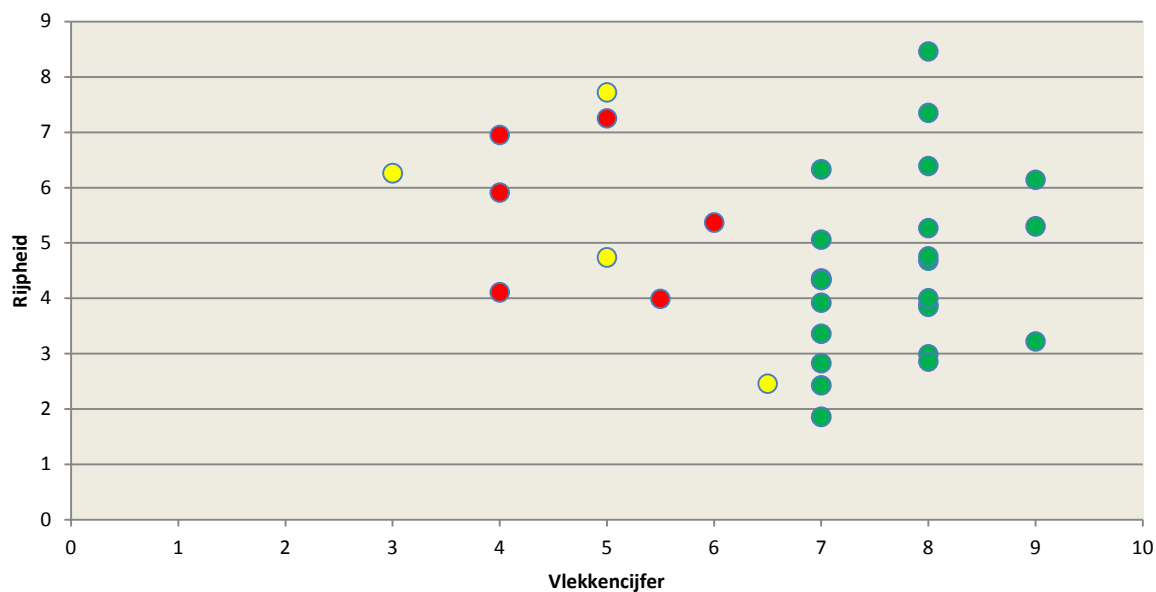
Algemeen wordt aangenomen dat vruchtwisseling, bodemvruchtbaarheid, teeltomstandigheden, bemesting, toegepaste gewasbeschermingsmiddelen, rooiomstandigheden en inkoelregime aspecten zijn welke het risico op het ontstaan van zwarte vlek bepalen. Ook zou mogelijk de rijpheid van de peen van invloed zijn.

Om te kunnen onderzoeken of rijpheid hier een aandeel in heeft, zijn in het jaar 2010-2011 van 4 percelen monsters verzameld op 3, 2, 1 en 0 weken voor de commerciële oogst. Om rijpingsindicatoren te identificeren zijn naast de commerciële oogstmonsters (0 weken) van een goed en slecht perceel ook monsters gesequenced die drie weken voor de commerciële oogst zijn verzameld. Op grond van de correlatie die gevonden is tussen de tijd en het expressie niveau zijn een aantal indicatoren uitgekozen die zijn gevalideerd op monsters uit de praktijkvalidatie in 2011-2012 met behulp van de qPCR methode (Figuur 7a,b). Penen die nog niet volledig zijn afgerijpt rijpen verder af tijdens de opslag (Figuur 7b).



Figuur 7. Expressieprofielen van 2 genen die betrokken zijn bij rijping. **A)** Reeks 2010-2011, monsters verzameld 3, 2, 1 en 0 weken voor de commerciële oogst. Perceel 30, is beoordeeld door Agrifirm Plant en NSure als een goede partij, perceel 52 als een gemiddelde partij en perceel 6 als een slechte partij. RNA is geïsoleerd en de expressieprofielen van indicatoren *RijU01* en *RijU02* in verhouding tot de constante indicator *PeCo1* zijn weergegeven. **B)** Reeks 2011-2012. Perceel 11, is beoordeeld door Agrifirm Plant en NSure als een goede partij, perceel 42 als een gemiddelde partij en perceel 24 als een slechte partij. RNA is geïsoleerd en de expressieprofielen van indicatoren *RijU01* en *RijU02* in verhouding tot de constante indicator *PeCo1* zijn weergegeven. Expressie van *RijU01* en *RijU02* gaat omhoog als penen rijper worden.

Om een beeld te krijgen of rijpheid van invloed is op het ontstaan van zwarte vlek is er onderzocht of er een correlatie was tussen de rijpheid op genexpressieniveau van de oogstmonsters (gemarkeerde kist, alleen niet biologische partijen uit 2011-2012) en de toebedeelde vlekkencijfers/NSure fasering (Figuur 8). Dit bleek niet zo te zijn, onder de rijpste partijen vielen slechte, gemiddelde, maar ook goede partijen. Ook werd er geen correlatie tussen de vlekkencijfers gevonden en de monsters na een maand opslag (data niet bijgesloten).



Figuur 8. Correlatie vlekkencijfer/risico indeling NSure versus rijpheid. De vlekkencijfers van de gevolgde partijen (2011-2012) zijn uitgezet tegen de rijpheid (expressie verhouding tussen twee genen die positief en negatief gecorreleerd zijn met rijping; Hoe hoger de waarde, hoe rijper de partij) gemeten tijdens de oogst (gemarkeerde kist). De gegevenspunten van partijen die door NSure beoordeeld zijn met een laag risico zijn groen gekleurd, partijen met een gemiddeld risico in het geel en partijen met een hoog risico op zwarte vlek in het rood. De oogstmonsters van percelen 5, 7, 12, 14, 28 en 37 zijn niet meegenomen, omdat de risico indeling van NSure op basis van de 1 maand opslag monsters niet overeen kwam met het vlekkencijfer.

3.3.4 Praktijkvalidatie met behulp van inductieproef Bejo Zaden

Naast de validatie op commerciële partijen heeft Bejo Zaden een inductieproef in 2011-2012 uitgevoerd om de indicatoren en de door NSure aangelegde fasering te kunnen beoordelen. Met behulp van een aanjager is een inductie op Nerac penen uitgevoerd met *Mycocentrospora acerina*, *Alternaria radicina* en *Rhexocercosporidium carota*. Schilmonsters van de inducties en onbehandelde partijen zijn verzameld tijdens de oogst en na 1 en 3 maanden opslag. Tijdens de oogst zijn op de penen geen infecties waargenomen, alleen was het loof aangetast van de aanjager en Nerac penen waar de *Alternaria* inductie had plaatsgevonden. Bejo Zaden heeft na 3 maanden opslag het infectie percentage visueel bepaald door voor elke behandeling 1 willekeurige kist uit te kiezen.

In de onbehandelde partij op locatie A waar de inducties met *Alternaria* en *Mycocentrospora* plaats vonden, werd in het oogstmonster en na 3 maanden opslag een laag risico gevonden op zwarte vlek en een hoog risico in het monster na 1 maand opslag (Tabel 3). Bejo Zaden constateerde na 3 maanden opslag dat meer dan een derde van de onderzochte penen ongewild geïnfecteerd waren geraakt met *Phytophthora*. In de batch penen die NSure na 3 maanden heeft bemonsterd werden echter geen plekken aangetroffen (Figuur 9). In tegenstelling tot de analyse van Bejo Zaden die 1 kist hebben beoordeeld, zijn voor de 3 maanden bemonstering van NSure min of meer van bovenaf (wel onder de toplaag) penen verzameld uit verschillende kisten. Bejo Zaden heeft de ervaring dat slechtere exemplaren als gevolg van het trommelspoelen doorgaans dieper in de kist belanden. Mogelijk zijn daardoor geen slechte penen meegenomen en dit zou kunnen verklaren waarom er na drie maanden geen risico op zwarte vlek werd gevonden. Ook zou het kunnen zijn dat de infectie pleksgewijs in het veld zat waardoor mogelijk de infectiegraad in de ene kist hoger was dan in de andere.

Op locatie B werd ook in een derde van de beoordeelde onbehandelde partij *Phytophthora* waargenomen. Een gemiddeld risico op infectie werd door NSure al gemeten tijdens de oogst (Tabel 3).

Tabel 3. Resultaten inductieproef op Nerac

Behandeling	Locatie	Oogst ¹	Opslag		% Infectie	Infectie
			1 maand ¹	3 maanden ¹		
1) Onbehandeld	A				38,6	Uitsluitend Phyt ²
2) <i>Alternaria</i> (Alt)	A				90,9	Alt + Phyt ²
3) <i>Mycocentrospora</i> (Myc)	A				20	Myc
4) Onbehandeld	B				34,4	Uitsluitend Phyt ²
5) <i>Rhoxocerosporidium</i> (Rhex)	B				100	Rhex + Phyt ²

¹Groen (laag risico), geel (gemiddeld risico), rood (hoog risico)

²*Phytophthora*

Ook in het perceel waar de inductie met *Alternaria* heeft plaatsgevonden werd *Phytophthora* gevonden. In het oogstmonster werd geen risico op zwarte vlek gemeten, maar tijdens de opslag werd tweemaal een hoog risico gemeten (Tabel 3).

In het geval van de inductie met *Mycocentrospora* werd deze schimmel uitsluitend aangetroffen op de beoordeelde penen. Tijdens zowel de oogst als in het maandmonster werd geen risico gemeten. Na drie maanden werd wel een hoog risico gemeten (Tabel 3). In het algemeen komt een *Mycocentrospora* aantasting pas laat in de bewaring naar voren. Mogelijk zou dat kunnen verklaren waarom er eerder geen risico werd gevonden. Desalniettemin lijkt dat onwaarschijnlijk aangezien commerciële partijen die waren aangetast door *Mycocentrospora* wel na een maand opslag een risico op zwarte vlek kregen toebedeeld. Voor een aantal partijen zelfs al tijdens de oogst.

Het perceel dat is gebruikt voor de *Rhoxocerosporidium* inductie bleek ook zwaar te zijn geïnfecteerd met *Phytophthora*. NSure meette al een hoog risico tijdens de oogst (Tabel 3).



Figuur 9. Aantasting Nerac partijen na 3 maanden opslag. Representatie van de batches waar monsters van zijn verzameld.

1) Onbehandeld locatie A, geen plekken gevonden; 2a,b) *Alternaria* locatie A, kleine plekkjes; 3) *Mycocentrospora* locatie A, paar grote plekken; 4) Onbehandeld locatie B, paar grote plekken; 5) *Rhoxocerosporidium* locatie B, grote plekken

3.3.5 Vertaling naar praktijktest

Voor de ontwikkeling van de test is gebruik gemaakt van ingevroren materiaal. Aangezien dit niet mogelijk is voor de teler, ontwikkelt NSure voor al haar testen een gebruiksvriendelijke bemonsteringsmethode door gebruik te maken van een testkaartje (Whatman). Dit testkaartje stabiliseert het genetische materiaal in het monster. Het kaartje kan per post naar het NSure lab worden opgestuurd en na ontvangst zal het analyseresultaat binnen 2 werkdagen aan de klant worden geleverd. NSure heeft onderzocht hoe dat voor peen in de toekomst uitgevoerd dient te worden. Het platpersen van schilmonsters bleek moeilijk op basis van de standaard monsternames die NSure hanteert voor andere ontwikkelde testen. Monstername met behulp van een sapcentrifuge daarentegen verliep goed (Figuur 10).



Figuur 10. FTA monstername. Boen 25 penen schoon met een tissue. Verzamel van elke peen een schil van circa 10 cm met behulp van een dunschiller. Doe de schillen in de sapcentrifuge en voeg onmiddellijk de buffer toe. Centrifugeer het monster direct na het toevoegen van de buffer en vang het sap op. Giet het sap over in 1 van de compartimenten van het extractiezakje. Neem wat sap op met behulp van een pipet via het andere compartiment en pipetteer 1 druppel op het FTA kaartje. Laat het FTA kaartje minstens 2 uur drogen voor verzenden.

4 Conclusies en discussie

Het oogstseizoen van 2010-2011 was uitzonderlijk nat en opvallend was dat veel partijen waren aangetast door *Phytophthora porri*. Vanwege de late start van het project is de bemonstering niet voldoende gecontroleerd verlopen. Zo werden penen die van het land kwamen niet direct verstuurd naar NSure waardoor ze soms een paar dagen in een gesloten zak zaten. Desondanks heeft NSure een aantal peen specifieke indicatoren kunnen identificeren waarmee voorspeld zou kunnen worden in welke mate de partijen te maken krijgen met zwarte vlekken. Deze peen specifieke indicatoren zijn allen betrokken in de afweer tegen pathogenen. De geselecteerde indicatoren bleken in het tweede seizoen (2011-2012) het optreden van zwarte vlekken met een betrouwbaarheid van tenminste 88% te kunnen voorspellen na een maand opslag (tabel 4); twee goede partijen kregen een risico op

zwarte vlek toebedeeld (4,65%) en drie gemiddelde partijen werden te goed beoordeeld (6,97%). Goede en slechte partijen zijn prima te onderscheiden, maar in de middencategorie is het voorspellen af en toe lastig. Dit lijkt met name op de steekproefgrootte vast te zitten en hier dient in de toekomst aandacht aan besteed te worden. Echter moet men ook realiseren dat de vlekkencijfers slechts een visuele maat zijn.

Tabel 4. Risico inschatting van NSure op zwarte vlek aan de hand van partijen een maand na koude opslag 2011-2012.

	Vlekkencijfer				
NSure risico	Goed (29)	Gemiddeld (9)	Slecht (5)	Te goed beoordeeld	Te slecht beoordeeld
Laag	26	3	0	6.97%	4.65%
Gemiddeld	1	3	1		
Hoog	2*	3	4		

*1 van de partijen werd destijds door Agrifirm Plant als goed beoordeeld, maar naderhand heeft Agrifirm Plant veel klachten gehad. Er bleek variatie tussen de kisten. NSure gaf deze partij wel een hoog risico.

Het meest betrouwbare bemonsteringsmoment bleek na 1 maand bewaring in plaats van gelijk na de oogst. Dit was op zich te verwachten, omdat er na de oogst ook een aantal factoren zijn die invloed kunnen hebben op het ontstaan van zwarte vlek. Zo zijn er aanwijzingen dat de schimmels die zwarte vlekken veroorzaken makkelijker binnendringen als de peen tijdens de oogst beschadigingen heeft opgelopen (Groenten & Fruit, 2007). Daarnaast lijkt de rooiomstandigheid ook een rol te spelen, bij nat en warm weer lijken er meer problemen in en na de bewaring te ontstaan. Ook heeft het bewaarregime invloed op het optreden van zwarte vlek. Het lastige is dat de schimmels onder verschillende temperaturen gedijen en er dus geen ideaal bewaarregime bestaat. Ook het samenvakken van de penen in een kist verhoogde de infectiedruk.

De set genen die door NSure zijn uitgekozen om zwarte vlek te voorspellen bleken gevoelig van aard te zijn; 1 zieke peen op 24 gezonde penen gaf al een gemiddeld risico op zwarte vlek. Daarnaast worden niet alleen infecties waargenomen die zijn veroorzaakt door schimmels die gerekend worden tot de zwarte vlek veroorzakers, maar ook *Phytophthora porri* en *Pythium spp.* infecties, waardoor de test breder inzetbaar is.

NSure heeft indicatoren geïdentificeerd waarmee de rijpheid van de penen gevolgd kan worden. Uit eerder onderzoek zou zijn gebleken dat rijpheid een rol speelt met het ontstaan van zwarte vlek. NSure nam geen duidelijke correlatie waar tussen het rijpheidstadium van commerciële oogstmonsters en hun zwarte vlek beoordeling. Ook niet wanneer de rijpheid van de monsters na een maand opslag werden vergeleken met hun zwarte vlek beoordeling (data niet bijgesloten). Desalniettemin, zijn er meer gegevens nodig om vast te stellen of er wel of geen relatie is.

NSure heeft uitgezocht wat de beste methode is om een monster te nemen met behulp van de FTA technologie. Voor de FTA monsternamen van penen is een sap centrifuge nodig. Dit zou mogelijk een beperking kunnen vormen voor de gebruikers en daarom is het van belang dat bij het introduceren van de test nagedacht moet worden over de organisatie van de bemonstering.

5 Literatuur

Groot, S. en Köhl J. 2007. Aanpak zwarte vlekken in peen nog blinde vlek. Groenten & Fruit week 35: pag. 42-43