Innovative Robust Reliable

quality assays for fresh

plant products

nsure

Voorspelling optreden zwarte vlekken in bewaarpeen (Tweede fase)

Nathalie Verhoef, Johannes Draaijer, Anneloes Strijker, Peter Balk (NSure)
Hendrik Eerkens (Agrifirm Plant)

Project nummer PT: 14320
Datum: 28-06-2013

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.

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.

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

3 Resultaten en discussie 8

4 Conclusies 11

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 (marktplanning) 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 ontwikkelingsfases. 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.

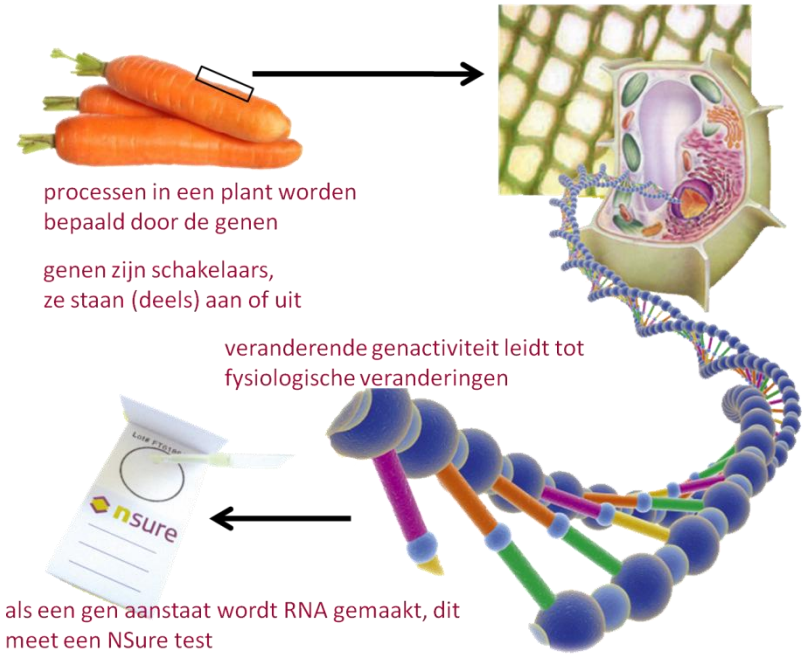
NSure heeft in samenwerking met Agrifirm Plant en andere belanghebbenden gewerkt aan de ontwikkeling van een moleculaire test die het risico op het ontstaan van zwarte vlekken van een bepaalde partij tijdens bewaring kan voorspellen. Een begeleidingscommissie bestaande uit vertegenwoordigers van NSure,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

Aan de hand van penenmonsters die de afgelopen drie jaar zijn verzameld door Agrifirm Plant van een 150 tal percelen tijdens de oogst/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 thielavioides* en *Rhexocercosporidium carotae*, maar ook op infecties die zijn veroorzaakt door *Phytophthora porri*, 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 een monster wordt genomen na 1 maand opslag.

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.

1 Inleiding

De zwarte vlekkenziekte is een verzamelnaam voor 5 schimmels (*Mycocentrospora acerina*, *Alternaria radicina, Chalaropsis thielavioides, Chalara elegans* en *Rhexocercosporidium carotae)* welke tot grote problemen kunnen leiden tijdens de opslag. 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 (marktplanning) van grote waarde zijn.
Algemeen wordt aangenomen dat vruchtwisseling, bodemvruchtbaarheid, bemesting, teelt-omstandigheden, toegepaste gewasbeschermingsmiddelen, rooiomstandigheden, koelregime, 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.



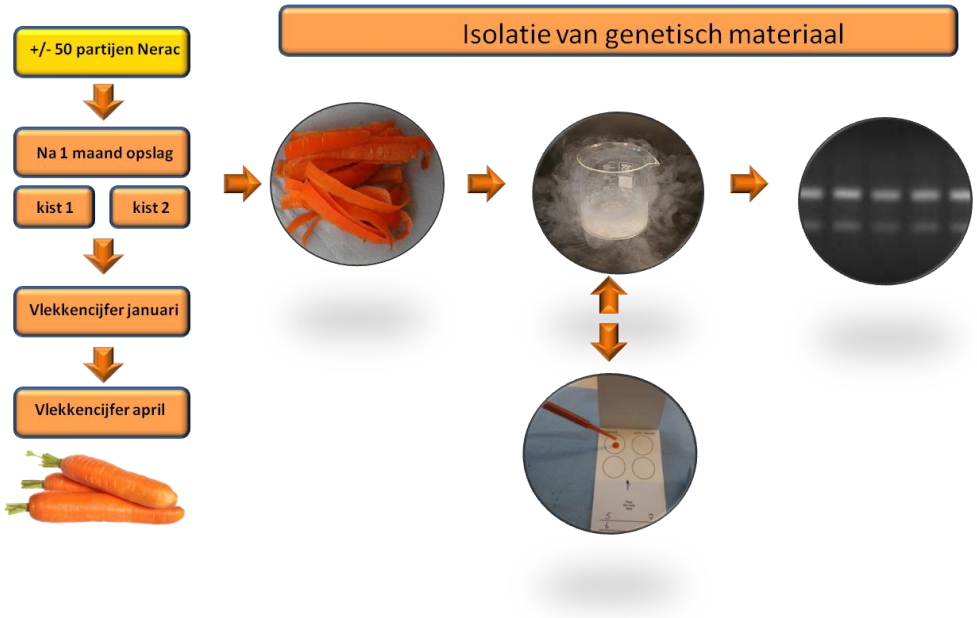
Figuur 1. Genen reguleren de biologische processen in planten. Door de genactiviteit (RNA) van een bepaald gen te meten kan al in een heel vroeg stadium gemeten worden wanneer fysiologische veranderingen in de plant op gaan treden.

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.

In de eerste fase van dit PT project (Project nummer PT:14320, 2012) heeft NSure door middel van een grootschalige genactiviteit profilering in het oogstseizoen van 2010-2011 een aantal peen specifieke indicatoren kunnen identificeren in het ras Nerac waarmee voorspelt kan worden in welke mate partijen te maken krijgen met zwarte vlekken tijdens opslag. 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. 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 bleek het meest betrouwbaar wanneer een monster werd genomen na 1 maand opslag. Oogstomstandigheden, rooien (ontstaan van wondjes) en het samenpakken 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. De set indicatoren bleken sensitief te zijn; 1 zieke peen op 24 gezonde penen gaf al een gemiddeld risico op zwarte vlek. De indicatoren reageerden niet alleen op infecties teweeg gebracht door de schimmels die tot de zwarte vlek gerekend worden, maar ook door *Phytophthora porri*, waardoor de test breder inzetbaar is.
In de tweede fase van dit PT project is een tweede praktijkvalidatie uitgevoerd waarin een 50tal Nerac partijen zijn beoordeeld door NSure en Agrifirm.

2 Materiaal en methoden

In het najaar van 2012 is een praktijkvalidatie uitgevoerd voor seizoen 2012-2013 (Figuur 2). Agrifirm Plant heeft na een maand opslag van een 50tal Nerac partijen aparte monsters verzameld uit twee kisten.



Figuur 2. Monstername tijdens praktijkvalidatie 2012-2013.

Van een monster bestaande uit 25 penen, werd één schilrasp per peen ingevroren in vloeibare stikstof en één schilrasp per peen werd gebruikt voor een Whatman FTA kaart monstername (Figuur 2). De FTA monstername is weergegeven in figuur 3.
Op basis van 5 a 10 monsterkisten per partij heeft Agrifirm Plant in januari en april 2013 de partijen een vlekkencijfer gegeven. Het aantal monsterkisten was afhankelijk van de partijgrootte. 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.
Uit zowel het ingevroren materiaal als de FTA kaarten is RNA geïsoleerd. De genexpressie van de set zwarte vlek indicatoren die in fase 1 zijn geïdentificeerd, zijn gekwantificeerd met behulp van de qPCR methode.

Figuur 3. FTA monstername. Maak 25 penen schoon. 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 extractievloeistof toe. Centrifugeer het monster direct na het toevoegen van de extractievloeistof 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.

3 Resultaten en discussie

Aangezien Nerac op dit moment het meest geteelde bewaarpeen ras is in Nederland, is er in de eerste fase van dit project (Project nummer PT:14320, 2012) voor gekozen om de test te ontwikkelen met behulp van dit ras. Door middel van een grootschalige genactiviteitsprofilering heeft NSure in 2010 een set peen gerelateerde genen kunnen identificeren waarmee voorspelt kan worden of een bepaalde partij zwarte vlek gaat ontwikkelen tijdens de bewaring. De geselecteerde indicatoren, bleken in het tweede seizoen (oogstseizoen 2011) het optreden van zwarte vlekken met een betrouwbaarheid van tenminste 88% te kunnen voorspellen.
In de tweede fase van dit PT project is opnieuw een praktijkvalidatie uitgevoerd met het doel de test verder te kunnen afstemmen. Uit de eerste fase van dit PT onderzoek is gebleken dat de resultaten het meest betrouwbaar zijn als het monster na een maand opslag wordt genomen. Dit heeft ons doen beslissen om de praktijkvalidatie van het oogstseizoen van 2012 alleen uit te voeren op een 50tal percelen die bemonsterd zijn na een maand opslag (Figuur 2). In de eerste praktijkvalidatie (oogstseizoen 2011) is alleen een monster uit 1 kist na een maand opslag verzameld. In de praktijk heeft men geconstateerd dat de kwaliteit met betrekking tot zwarte vlekken tussen kisten kan

verschillen. Om deze variatie tussen kisten te kunnen onderzoeken, zijn dit jaar aparte monsters verzameld uit twee kisten (Figuur 2).
Per monster, bestaande uit 25 penen, zijn twee verschillende bemonsteringsmethoden uitgevoerd. De eerste methode, invriezen in vloeibaar stikstof, is gebruikt voor de ontwikkeling van de test. Aangezien deze bemonstering niet mogelijk is voor de klant, heeft NSure een gebruiksvriendelijke bemonsteringsmethode ontwikkelt door gebruik te maken van een Whatman FTA kaartje (Figuur 3). Dit FTA kaartje stabiliseert het genetische materiaal van het monster waardoor het kaartje per post naar het NSure lab gestuurd kan worden voor analyse. Door voor elke geanalyseerde partij beide monsternames uit te voeren kon worden uitgezocht of beide monstermethoden tot dezelfde resultaten leidden.
Na isolatie van het genetische materiaal is de mate van expressie van de set zwarte vlek gerelateerde indicatoren gekwantificeerd. Op basis van deze resultaten heeft NSure de monsters ingedeeld in 1 van de drie risicoklassen: een laag, gemiddeld of hoog risico op zwarte vlekken. Deze resultaten zijn vervolgens vergeleken met de vlekkencijfers die Agrifirm Plant in januari en begin april van de partijen heeft verzameld. Zeer slechte partijen kregen van Agrifirm Plant een cijfer tussen de 1-4, gemiddelde partijen een cijfer 5-6 en goede partijen een cijfer tussen de 7-10.
De herfst van 2012 was erg nat met het gevolg dat percelen of delen van percelen gedurende korte tijd onder water stonden. Een groot aantal partijen met zwarte vlekken zijn door Bejo Zaden onderzocht om de identiteit van de ziekteverwekker(s) te achterhalen. In een aanzienlijk aantal partijen werden de zwarte vlek veroorzakers *Mycocentrospora acerina*, *Chalaropsis thielavioide* en *Rhexocercosporidium carotae* waargenomen, maar ook andere schimmels zoals *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans* en *Fusarium spp.*. In enkele partijen werd de zwarte vlek veroorzaker *Alternaria radicina* waargenomen, maar ook schimmels zoals *Geotrichum candidum*, *Helicobasidium purpereum*, *Rhizoctonia destructans, Phoma spp., Phytophthora spp*. en *Pythium spp.*. De zwarte vlek veroorzaker *Chalara elegans* werd evenals eerdere jaren niet waargenomen. Opvallend, was het hoge aantal infecties veroorzaakt door *Cylindrocarpon destructans* en *Botrytis cinerea*. Dit is niet eerder waargenomen in de gevolgde partijen uit 2010 en 2011. Beide schimmels worden gerekend tot de zogenaamde zwakte pathogenen in peen en komen tot uiting in verzwakte penen. Penen kunnen verzwakken door bijvoorbeeld te natte groeiomstandigheden of rooibeschadigingen.
In het oogstseizoen van 2011 bleek NSure het optreden tot zwarte vlekken met een betrouwbaarheid van tenminste 88% te kunnen voorspellen na een maand opslag (tabel 1); twee goede partijen kregen een risico op zwarte vlek beoordeeld (5%) en drie gemiddelde partijen werden te goed beoordeeld (7%). In het oogstseizoen van 2012, bleek dit tenminste 72% (tabel 1).

Tabel 1. Vergelijking NSure uitslag met de beoordeling van Agrifirm Plant.

Praktijkvalidatie	2012-2012 (43 partijen)
Komt overeen	88%
Komt niet overeen	12%
Waarvan:	
Te goed beoordeeld	7%
Te slecht beoordeeld	5%

Praktijkvalidatie	2012-2013 (43 partijen)
Komt overeen	72%
Komt niet overeen	28%
Waarvan:	
Te goed beoordeeld	0%
Te slecht beoordeeld	28%

NSure beoordeelde 12 partijen (28%) met een risico wat niet door Agrifirm Plant werd waargenomen tijdens de beoordelingen in januari en begin april. De algehele kwaliteit van de gevolgde partijen in 2012-2013 leek lager in vergelijking tot de vorige twee oogstseizoenen. Dit bleek niet alleen uit de resultaten van NSure, maar ook omdat zogenaamde zwakte pathogenen de kop op staken. Het gemiddelde vlekkencijfer van 2012 was daarentegen vergelijkbaar met het gemiddelde vlekkencijfer uit 2011. Het verschil in beoordeling kan verschillende oorzaken hebben:

1) Bepaalde partijen met een goed vlekkencijfer kunnen later onderuit gaan in de bewaring, omdat schimmels zoals *Mycocentrospora acerina* en *Rhexocercosporidium carotae* pas later tot uiting komen. Dit is bijvoorbeeld duidelijk te zien voor perceel 27 in tabel 2. Na de tweede beoordeling, heeft Agrifirm Plant geconstateerd dat meerdere partijen alsnog in kwaliteit zijn achteruit gegaan.

2) Het vlekkencijfer is een visuele beoordeling op basis van >5 kisten. NSure heeft een beoordeling gegeven op basis van twee kisten die op kistniveau onderzocht zijn. Dit zou mogelijk een vertekend beeld kunnen geven. Daarnaast is het vlekkencijfer niet kwantitatief wat de vergelijking met de kwantitatieve beoordeling van NSure bemoeilijkt.

3) Alle gemeten genen zijn pathogeen gerelateerd. Dat deze genen worden geïnduceerd in partijen die niet zijn geïnfecteerd lijkt vrij onrealistisch. Ook is de kans vrij klein dat bepaalde abiotische factoren ook deze genen reguleren, aangezien in de geanalyseerde partijen uit 2010 en 2011 ook partijen zaten die waren blootgesteld aan slechte abiotische condities.

In vergelijking tot de oogstjaren 2010 en 2011, nam Agrifirm Plant dit jaar wel meer variatie waar op kist niveau met betrekking tot zwarte vlekken. Deze variatie op kist niveau werd ook door NSure vastgesteld (tabel 2). Deze resultaten laten zien dat het van essentieel belang is dat de monstername zich niet moet beperken tot 1 kist, maar dat uitgegaan moet worden van minimaal 5 a 10 kisten.
De risico inschatting door NSure op basis van de twee verschillende bemonsteringsmethoden kwam nagenoeg overeen. De FTA bemonstering kan daarom in de toekomst door de klant gebruikt worden.

Tabel 2. Selectie van een aantal partijen die op kistniveau variatie vertonen.

Perceel	Kist 1	Kist 2	Beoordeling NSure	Vlekkencijfer januari	Vlekkencijfer april
16				8	8,5
25				8	7,5
27				9	6
28				8	7
31				9	9
37				7	6
39				7,5	6,5

Geen risico
Gemiddeld risico
Hoog risico

4 Conclusies

Het oogstseizoen van 2012 was uitzonderlijk nat en opvallend was dat veel partijen waren aangetast door zwakte pathogenen zoals *Cylindrocarpon destructans* en *Botrytis cinerea*. De geselecteerde indicatoren bleken in het oogstseizoen van 2011 het optreden van zwarte vlekken met een betrouwbaarheid van tenminste 88% te kunnen voorspellen na een maand opslag. In 2012 was dit tenminste 72%.

In de door NSure geanalyseerde partijen van de afgelopen 3 oogstjaren werd geen *Chalara elegans* waargenomen. Hierdoor hebben we niet kunnen vaststellen of de set genen ook geïnduceerd worden door *Chalara elegans*. Desalniettemin is de set genen te gebruiken voor partijen die geïnfecteerd zijn met de zeer belangrijke zwarte vlekken schimmels *Mycocentrospora acerina*, *Alternaria radicina, Chalaropsis thielavioide* en *Rhexocercosporidium carotae*. Ook kan de test gebruikt worden voor partijen die geïnfecteerd zijn met *Phytophthora spp*.. De genen werden ook geïnduceerd in de enkele partijen die geïnfecteerd waren met *Fusarium spp.* en *Pythium spp.*, maar dit dient verder onderzocht te worden.

Onderzoek heeft uitgewezen dat de gebruiksvriendelijke bemonsteringsmethode met behulp van een FTA testkaartje (Whatman) geïmplementeerd kan worden.

Onderzoek op kist niveau heeft aangetoond dat er variatie met betrekking tot zwarte vlekken kan zijn tussen de kisten. Om een representatief monster te nemen na één maand opslag is het daarom van belang om een monster te nemen uit meerdere kisten. Om de betrouwbaarheid nog verder te verhogen, wordt geadviseerd om het aantal testen af te stemmen op de perceelsgrootte en de verwachte homogeniteit binnen de partij.