

A 198

## VOORTGANGSRAPPORTAGE

Ontwikkeling praktijktoets ter  
voorspelling van roodverkleuring van  
asperges

**VERTROUWELIJK**

Stichting Kwaliteit van Nederlandse Asperges  
i.s.m. ATO-DLO

ato-dlo





ATO-DLO

## Voortgangsverslag

Ontwikkeling praktijktoets ter voorspelling van roodverkleuring van Asperges

**VERTROUWELIJK**

**Agrotechnologisch  
Onderzoek Instituut  
(ATO-DLO)**  
Bornsesteeg 59  
Postbus 17  
6700 AA Wageningen  
tel. 0317 - 475000  
fax. 0317 - 412260

Stichting Kwaliteit van Nederlandse Asperges i.s.m. ATO-DLO

Eigendom van ATO-DLO. Niets uit dit voorstel mag worden gebruikt, vermeerderd of gedistribueerd zonder schriftelijke toestemming van ATO-DLO.

225 16341



<b>Inhoudsopgave</b>	<b>Pagina</b>
1. Inhoudelijke vorderingen . . . . .	3
1.1 Inductie roodverkleuring (taak 1) . . . . .	3
1.2 Anthocyanine in asperge (taak 2) . . . . .	4
1.3 Klonering van genen, betrokken bij anthocyanine-synthese (taak 3) . . . . .	4
1.4 Inductie van anthocyanine-synthese-genen (taak 4) . . . . .	5
1.5 Analyse van roodverkleuringsfactoren bij telers en veiling . . . . .	5
2. Vordering t.o.v. planning en doelstelling . . . . .	7
3. Projectmanagementinzet . . . . .	7
4. Kostenoverzicht . . . . .	7
5. Realisatie van mijlpalen . . . . .	7
6. Wijzigingen in onderzoek . . . . .	7
7. Knelpunten . . . . .	7
8. Verdere ontwikkelingen . . . . .	8
9. Conclusie . . . . .	8
Bijlage . . . . .	9



## 1. Inhoudelijke vorderingen

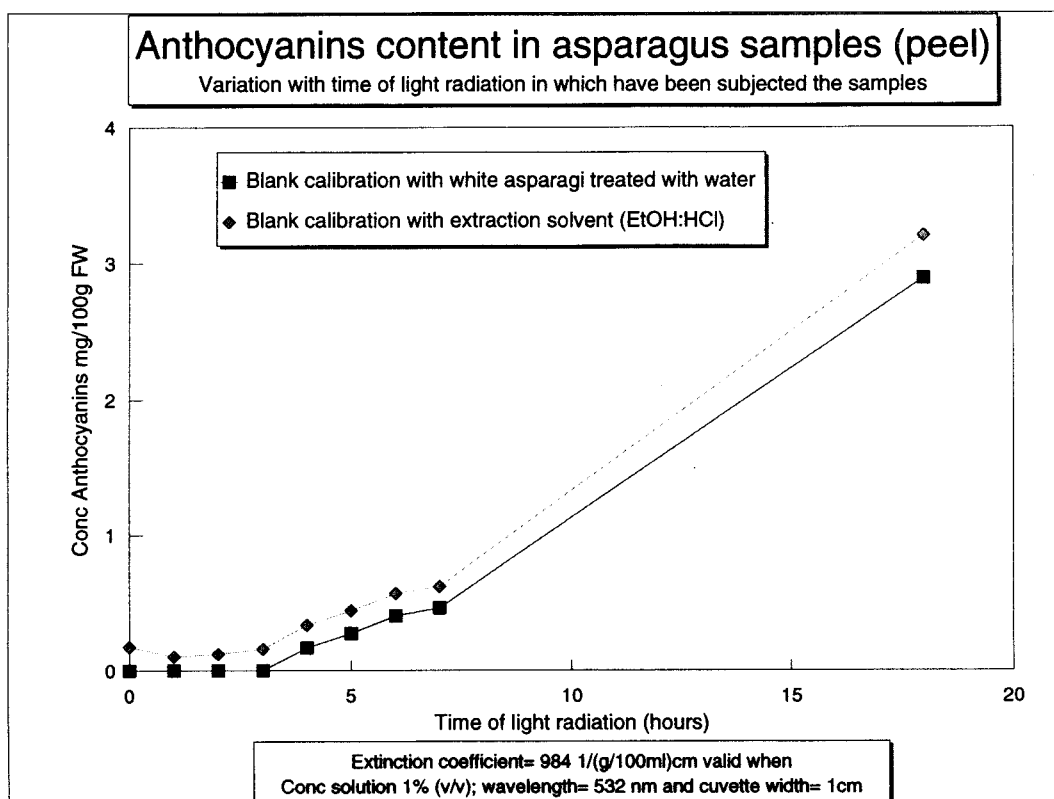
### 1.1 Inductie roodverkleuring (taak 1)

Er is een systeem opgezet om de roodverkleuring van asperges te induceren. Het systeem bestaat uit 2 mixed metal vapour-lampen (400 W) die op 25 cm hoogte boven witte, direct geoogste, asperges worden geplaatst. Overig licht bestaat uit normale TL-lampen. Het inductie-systeem staat in een koelcel en de inductie vindt plaats bij 12°C.

Figuur 1 toont de resultaten van een typisch roodverkleuringsexperiment, waarbij gebruik is gemaakt van Backlim asperges, geleverd door één van de betrokken telers van de stichting. Het blijkt dat inductie van roodverkleuring uitstekend met licht kan worden uitgevoerd. Het systeem is voor meerdere rassen getest en werkt uitstekend.

De roodverkleuring is geobjectiveerd middels computerbeeld analyse en Minolta kleur metingen. Dit is nog in ontwikkeling.

*Hiermee is dus een modelsysteem voorhanden waarmee ten allen tijde eenvoudig proeven mee gedaan kunnen worden om het effect van behandelingen te bestuderen.*



*Figuur 1. Accumulatie van anthocyanine in aspergeschillen als gevolg van inductie met licht.*



### 1.2 Anthocyanine in asperge (taak 2)

Met behulp van spectrofotometrische methoden is aangetoond dat de gevormde rode kleur afkomstig is van anthocyanines (zie figuur 2). De methode is specifiek voor anthocyanen. De ontwikkelde methode kan reeds in een vroeg stadium anthocyanines detecteren, nog voordat er op het oog rozeverkleuring zichtbaar is. Dit biedt wellicht mogelijkheden om er een alternatieve toetsmethode voor rozeverkleuring op te baseren.

### 1.3 Klonering van genen, betrokken bij anthocyanine-synthese (taak 3)

#### *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)*

De isolatie van DNA en RNA vanuit asperge is geoptimaliseerd. Er zijn primers gesynthetiseerd op basis van homologe fragmenten van reeds gekloneerde PAL-genen (uit sojaboon, rijst (monocotylen, evenals asperge) en thee). Met behulp van PCR, op geïsoleerde asperge-DNA, is een fragment opgepikt. Dit is gekloneerd en gesequenced. Op basis van nucleotide-sequentie-analyse is geconcludeerd dat het fragment inderdaad afkomstig moet zijn van PAL. De homologie

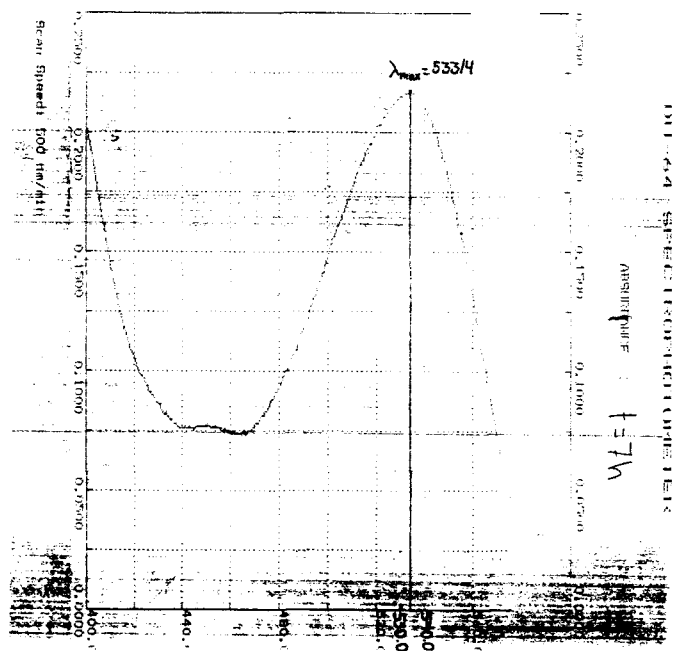
bedraagt op aminozuurvolgorde nivo: 99%. Er is een radio-actief-gelabelde probe van gesynthetiseerd die gebruikt kan worden in de screening van PAL-mRNA (na inductie).

#### *Chalcone synthase (CHS)*

Geselecteerde primers gaven in een PCR-reactie echter geen positief signaal: dit moet worden herhaald.

#### *Chalcone isomerase (CHI)*

Primers zijn ontworpen, maar bij positief resultaat met CHS zal hier niet verder aan gewerkt worden.



Figuur 2. Spectrum van anthocyanine-extract van geïnduceerde asperges.



#### *Dihydroflavonol-4-reductase (DFR)*

Er zijn primers ontworpen en analoog aan de voor PAL beschreven procedure is het genfragment gekloneerd.

#### *Flavonoid 3' hydroxylase (F-3-H)*

Er zijn primers ontworpen en analoog aan de voor PAL beschreven procedure is ook voor F-3-H het genfragment gekloneerd en een probe ontwikkeld.

#### *Flavonoid synthase (FLS)*

Er zijn primers ontworpen; het PCR-fragment bleek homologie te bezitten voor het verwante F-3-H dat eveneens betrokken is bij de anthocyaanbiosynthese.

*Van 3 van de 5 genen die een directe rol spelen bij de anthocyanine synthese is een genfragment gekloneerd en reeds een probe ontwikkeld. Van de resterende 2 genen wordt er binnen twee maanden een probe ontwikkeld. Hiermee kan het roodverkleuringsproces op moleculair nivo worden gevolgd en mogelijk worden voorspeld.*

### **1.4 Inductie van anthocyanine-synthese-genen (taak 4)**

Er zijn asperges betrokken van telers die zeer goed gedefinieerd uitgangsmateriaal kunnen leveren, dat voldoet aan de eisen van onderzoek. De asperges zijn verzameld en op het ATO onderworpen aan inductie middels licht (zie 1.1). Vanaf tijdstip nul (start van het experiment) tot en met 3 dagen nadien, zijn monsters verzameld van de schil vlak onder het topje, en in stikstof bewaard. Het RNA is geëxtraheerd en dit is het uitgangsmateriaal voor een Northern analyse die binnen een maand resultaten oplevert.

### **1.5 Analyse van roodverkleuringsfactoren bij telers en veiling**

Er zijn verschillende series monsters asperges genomen (in totaal 3 maal, waarbij asperges zijn gebruikt van elke teler) welke door medewerkers van ATO-DLO zijn geanalyseerd op rozeverkleuring. De telers hebben daartoe asperges geteeld en behandeld volgens hun eigen standaard bedrijfsvoering en de kritische processtappen ingevuld op speciaal daartoe ontworpen formulieren. Tevens is een serie monsters van elke teler afkomstig vers materiaal volledig door ATO-DLO behandeld inclusief wateren en inductie door licht.

Het is gebleken dat de handling en de water-procedure tussen telers nogal verschilt. In een eerste experiment bleek dat alle op het ATO gewaterde asperges wit bleven, terwijl bij asperges van 2 telers toch rozeverkleuring optrad. Dit impliceert dat de handling bij telers beter kan. Een tweede experiment liet zien er al rozeverkleuring kan optreden nog voordat ze boven de grond zijn. Deze vorm van rozeverkleuring is wel enigszins te remmen middels wateren, maar niet volledig.

Alle telers gebruiken, om de asperges te wateren, water uit een bron. Het proceswater is onderzocht door een analyseburo. Er is veel verschil in de samenstelling van het water (zie tabel 1). De relatie met verschil in rozeverkleuring van asperges tussen de telers is



nog niet gelegd maar zal in een het volgend jaar nader worden onderzocht.

Tabel 1. *Analyseresultaten van bronwater, gebruikt voor het wateren van asperges door de zes telers.*

<i>inhoudsstof</i>	<i>teler 1</i>	<i>teler 2</i>	<i>teler 3</i>	<i>teler 4</i>	<i>teler 5</i>	<i>teler 6</i>
<i>pH</i>	5.4	7.0	-	7.6	6.4	6.10
<i>ammonium</i>	< 0.02	< 0.15	< 0.02	< 0.02	< 0.02	<0.02
<i>nitriet</i>	0.03	0.02	0.03	< 0.01	< 0.01	0.06
<i>nitraat</i>	230	1.0	13.0	< 1.0	95.0	124
<i>oxydeerbaarheid</i>	7	16	8	< 3	< 3	4
<i>ijzer</i>	0.3	3.7	1.9	< 0.1	< 0.1	< 0.1
<i>mangaan</i>	1.0	0.6	0.8	< 0.1	< 0.1	0.1
<i>zout</i>	62	72	69	19	54	54
<i>chloride</i>	50	40	47	11	36	38
<i>sulfaat</i>	104	63	288	2	61	89
<i>hardheid</i>	17.7	12.7	16.0	7.8	11	13

*De invloed van procescondities op de rozeverkleuring van asperges is, van de 6 betrokken telers, geïnventariseerd. Van alle materiaal zijn monsters genomen die in de komende periode worden gekarakteriseerd naar inductie van rozeverkleuring.*

De veiling heeft een inventarisatie gedaan naar de aanvoer van asperges en de snelheid waarmee deze roze verkleurt.

Het aspergeseizoen loopt bijna ten einde en de eindevaluatie van dit seizoen laat nog op zich wachten. In een volgende rapportage zal hier meer aandacht aan besteed worden.



## **2. Vordering t.o.v. planning en doelstelling**

De werkzaamheden lopen iets vooruit op de planning (zie schema bijlage). Met name de klonering van genen van de anthocyaanbiosynthese loopt drie maanden voor op schema. De Northern-analyse loopt een maand achter op schema, maar kan eenvoudig worden ingehaald in de periode waarin weinig asperge-experimenten gedaan kunnen worden (aspergeseizoen loopt van april-juli). Dit geeft armslag om de Northern analyses uit te voeren met alle beschikbare probes.

## **3. Projectmanagementinzet**

De inzet van Veiling ZON blijft gehandhaafd op het nivo zoals het in de projectbeschrijving beschreven is. De inzet van exporteurs zal in het volgende aspergeseizoen meer benadrukt worden: analyse van aspergeverkleuring tijdens transport, afhankelijk van temperatuur en vocht.

De inzet van telers zal iets worden opgevoerd: analyse van variabiliteit van het materiaal als functie van teelt, handling, etc. en de reactie op het aanschakelen van de anthocyaanbiosynthese-genen.

## **4. Kostenoverzicht**

Zie bijlage 2.

## **5. Realisatie van mijlpalen**

a) er is een werkzame inductieopstelling gebouwd waarmee de rozeverkleuring op laboratoriumnivo kan worden gesimuleerd.

b) enkele genen van de anthocyaanbiosynthese zijn deels gekloneerd vanuit asperge en kunnen als probe worden gebruikt in de Northern analyses.

## **6. Wijzigingen in onderzoek**

Er zijn geen wijzigingen

## **7. Knelpunten**

Er zijn geen knelpunten





## 8. Verdere ontwikkelingen

Het projectplan verloopt verder volgens schema. Northern analyses moeten uitwijzen hoe snel de rozeverkleuring volgt op het aanschakelen van de anthocyaanbiosynthese genen (PAL, DFR, CHS, etc.).

## 9. Conclusie

De voortgang van het project is voorspoedig. Alle mijlpalen voor het eerste halfjaar zijn bereikt en binnen een half jaar moet duidelijk worden of er signalen te detecteren zijn die de rozeverkleuring voorspellen en **hoe ver voor** de visuele rozeverkleuring die signalen detecteerbaar zijn.



Bijlage: Schematische fasering taken

Go/No go punten zijn met een dikke lijn aangegeven.

Taak <sup>1</sup>	jaar 1				jaar 2				jaar 3			
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												

<sup>1</sup> de nummers corresponderen met de taken zoals die in § 4.4 van de integrale projectbeschrijving zijn genoemd