

Thema C (posters)

# Identificatie, signalering en epidemiologie

**P-C1**

**Bodemgezondheids-chip:  
Het meten van de intrinsieke  
weerbaarheid in de bodem als  
hulpmiddel bij duurzaam  
landbouwmanagement**

A.G.C.L. Speksnijder, C.D.Schoen,  
J.D. van Elsas, C. Zijlstra en P.J.M. Bonants

Plant Research International B.V., Postbus 16,  
6700 AA Wageningen

De bodem bevat een groot aantal organismen met pathogene eigenschappen of met stimulerende eigenschappen (beneficials). Moderne DNA-technieken stellen ons in staat een analyse te maken van elke soort bodem. Nieuwe ontwikkelingen binnen PRI op het gebied van multiplex detectie stellen ons in staat om vele targets tegelijkertijd te detecteren door middel van DNA micro-arrays (zie abstract Schoen et al.). Grondsoorten kunnen snel gescreend worden op de aan- of afwezigheid van pathogene organismen en beneficials. Ook functionele eigenschappen zoals de expressie van weerbaarheidgenen die coderen voor antibiotica en chitinases tegen plantpathogene schimmels en bacteriën kunnen worden gemeten.

Ons streven is de ontwikkeling van een bodem-DNA-chip waarmee de expressie van genen wordt gemeten die een functie hebben in bodemgezondheid. Hiermee kunnen we een uitspraak doen over de mate van weerbaarheid (of de afwezigheid daarvan) in een bepaalde bodem en kunnen strategieën uitgezet worden voor duurzaam landbouwmanagement.

**P-C2**

**Ontwikkeling van technieken  
voor detectie van  
plantgerelateerde organismen  
ten dienste van een veilige en  
duurzame land- en tuinbouw**

C. Zijlstra, P.J.M. Bonants, P.H.J.F. van den  
Boogert, C.D. Schoen en A.G.C.L. Speksnijder

Plant Research International B.V., Postbus 16,  
6700 AA Wageningen

In agrosystemen die steeds minder afhankelijk mogen zijn van chemische bestrijding neemt de vraag naar snelle, betrouwbare methoden voor detectie van plantgerelateerde organismen toe. Dergelijke technieken kunnen worden ingezet met het oog op kwaliteitscontrole van teeltsubstraat (bijv. om te garanderen dat compost of potgrond vrij is van plant- (of zelfs mens-!) pathogenen en dat het gewenste gezondheidsbevorderende organismen wel bevat); kwaliteitscontrole product (bijvoorbeeld het monitoren van gewasbelagers die in de naoogstfase problemen kunnen veroorzaken (mycotoxinen!); naleving van exportregels (detectie van quarantaine organismen); preventie (toetsen op afwezigheid van pathogenen in uitgangsmateriaal, grond, recirculatie water, *etcetera*).

De onderzoekscluster 'Karakterisering, Identificatie en Detectie' binnen de business unit 'Biointeracties en Plantgezondheid' ontwikkelt detectietoetsen voor bovengenoemde doeleinden. Ze richten zich op detectie van virussen, viroïden, bacteriën, fytoplasma's, schimmels, nematoden en insecten in grond, water, plantweefsel, inocula, *etcetera*.

Veel van de ontwikkelde technieken worden al routinematig toegepast in de praktijk. Momenteel worden jaarlijks ongeveer tien miljoen ELISA-testen uitgevoerd op de aanwezigheid van bacteriën en virussen in onder meer aardappel, bol- en siergewassen; PCR methoden worden gebruikt voor detectie van talloze gewasbelagers; RT-PCR wordt toegepast voor detectie van RNA-virussen; NASBA en AmpliDet RNA wordt toegepast voor detectie van verschillende pathogenen terwijl het tevens de mogelijkheid biedt om uitsluitend de levende cellen te detecteren.

POSTERS

Toekomstperspectieven zijn faag display (een manier om antilichamen te produceren tegen elk denkbaar organisme zonder de noodzaak van immunisatie); multiplex detectie (waarbij meerdere organismen tegelijkertijd kunnen worden aangetoond in een test, bijvoorbeeld gebruikmakend van DNA chips (zie samenvatting Schoen et al.) of immuno-arrays); kwantitatieve detectie (dat in combinatie met goede bemonsteringstechnieken data oplevert voor risicoanalyses, schaderelaties en systemen voor beslissingsondersteunende maatregelen).

### P-C3

## Een nieuw potyvirus dat bloemkleurbreking veroorzaakt in *Begonia semperflorens*

I. Bouwen

Plant Research International B.V., Postbus 16,  
6700 AA Wageningen

In rode en roze cultivars van *Begonia semperflorens* werd bloemkleurbreking aangetroffen. Tevens was in de bladeren van deze planten soms een vage vlekkerigheid te zien. Na serologische toetsing van plantmateriaal in ELISA op de aanwezigheid van verschillende virussen werd alleen een positieve reactie verkregen met een monoklonaal dat potyvirusen aantoonde. In preparaten van blad en bloem konden in de elektronenmicroscopie echter geen virusdeeltjes aangetoond worden. Tevens was het niet mogelijk een virus mechanisch over te brengen naar toetsplanten. Mogelijk speelt de bijzonder lage pH van het plantsap (i.e. pH 2) hierbij een negatieve rol. Het virus kon wel mechanisch overgedragen worden naar virusvrije *Begonia semperflorens*. Moleculaire karakterisering bood meer perspectief. Totaal RNA uit een zieke plant werd gebruikt in een RT-PCR met gedegenererde potyvirus primers. Hierbij werd een DNA fragment verkregen van het C-terminale deel van het manteleiwit en het 3' niet coderend gebied. Dit fragment is gesequenced en was ongeveer 650 nucleotiden lang. De verkregen sequentie is vergeleken met anderen die in genenbanken zijn opgeslagen. Er werd homologie gevonden met potyvirusen, maar niet meer dan 70%.

Dit nieuwe potyvirus voor *B. semperflorens* krijgt voorlopig de naam *Begonia*-bloemkleurbrekingsvirus (*Begonia flower break virus*).

### P-C4

## Een nieuw rhabdovirus in *Alstroemeria caryophylla*

I. Bouwen

Plant Research International B.V., Postbus 16,  
6700 AA Wageningen

*Alstroemeria* is een veelgebruikte snijbloem. Verschillende virussen kunnen dit gewas infecteren, waaronder *Alstroemeria*-bloemvlekvirus, *Alstroemeria*-mozaïekvirus, *Impatiens*-vlekkenvirus, komkommermozaïekvirus, leliemozaïekvirus, *Ornithogalum*-mozaïekvirus (OrMV), symptoomloos lelievirus, tabaksratelvirus en tomatenbronsvlekkenvirus.

Bij het verzamelen van geïnfecteerd materiaal voor een project betreffende virussen van *Alstroemeria* werd een plant van *Alstroemeria caryophylla* aangetroffen met symptomen die mogelijk door een virus waren veroorzaakt. Deze symptomen omvatten donkergroene nerfbanden, necrotische vlekjes en bloemkleurbreking. In een serologische toets (ELISA) werd een positieve reactie verkregen met een antiserum tegen OrMV. Na mechanische inoculatie verschenen er symptomen op verschillende toetsplanten, waaronder *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana* en *N. occidentalis* P1. Tabaksoorten zijn echter geen waardplant voor OrMV. In de elektronenmicroscopie werden in preparaten van *N. occidentalis* P1 op rhabdovirus gelijkende deeltjes aangetroffen. *A. caryophylla* leek dus geïnfecteerd met zowel OrMV als een rhabdovirus. In ultradunne coupes van geïnfecteerd blad van *N. benthamiana* werden dezelfde op rhabdovirus gelijkende deeltjes gevonden in het cytoplasma. Dit geeft aan dat het waarschijnlijk om een cytorhabdovirus gaat. Er is een antiserum tegen dit virus geproduceerd. Dit antiserum toont in ELISA het virus aan in bladmonsters van *A. caryophylla* en geïnfecteerde toetsplanten. Toetsing van een aantal andere rhabdovirussen in ELISA met dit antiserum toonde geen serologische verwantschappen aan.

### P-C5

## De complete genoom organisatie van het aardbeikrinkelvirus

C.D. Schoen, M.M. Klerks en F. van der Wilk

Plant Research International B.V., Postbus 16,  
6700 AA Wageningen.

De complete nucleotide sequentie van het aardbeikrinkelvirus (Strawberry Crinkle Virus; SCV), behorend tot de *Rhabdoviridae* is opgehelderd. Het genoom heeft 14690 basen en bevat 5 open leesramen die coderen voor het nucleoproteïne N, matrix proteïne M, glycopro-

POSTERS

tein G, nonstructural viral protein NV, en het polymerase L. De genen zijn gerangschikt in de volgorde van 3'-N-M-G-NV-L-5'. De exacte 3' en 5' uiteinden werden bepaald m.b.v. 3' en 5' RACE procedures.

Het 3' uiteinde van het SCV genome werd gekloneerd na polyadenylatie van het virale RNA m.b.v. gist RNA-polymerase, gevolgd door een 'reverse transcriptase' stap met 3' RACE adapters. Het 5' uiteinde werd bepaald na verlenging van het cDNA gevolgd door een PCR met respectievelijk een 'nested virus-specific primer' en een poly (G) primer. Klonering van de fragmenten is uitgevoerd via 'TA cloning' in een pCR2.1-TOPO vector. Zes onafhankelijke klonen zijn gesequenced ter bepaling van de exacte 3' en 5' uiteinden van het genome.

De nucleotide- en de afgeleide aminozuursequenties van het SCV vertonen significante homologie met corresponderende sequenties van het verwante *Rice transitory yellowing virus* (RYSV) en het *Sonchus yellow net virus* (SYNV).

Het grootste gen op het SCV genome codeert voor het virale RNA-afhankelijke RNA polymerase. Dit gen start op positie 7650 en eindigt op positie 13824. Het afgeleide product bevat 2058 aminozuren. Zoals verwacht, vertoont het SCV L-eiwit een grote homologie met andere rhabdovirale L eiwitten. De katalytische subunits, een structurele karakteristiek van RNA-afhankelijke RNA polymerases, kon worden geïdentificeerd via alignment van SCV eiwit sequenties met die van andere rhabdovirale eiwitten. Het conserveerde domein, met de vier duidelijke motieven A, B, C en D, is gelocaliseerd tussen aminozuren 207 en 526 van het SCV polymerase.

This work was part of 'Improved diagnostic tools for the certification of strawberry propagation material' project supported by QLK5-1999-1553 VIRUS DETECTOR of the European Commission

## P-C6 Pratylenchus penetrans, bijna vergeten

E. Brommer, T. G. van Beers en L.P.G. Molendijk

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Postbus 430,  
8200 AK Lelystad

Mede door de verminderde inzet van grondontsmettingsmiddelen wordt de land en tuinbouw met name op de zandgronden hernieuwd geconfronteerd met een aantal aaltjes. Eén van deze aaltjes is het wortellessieaaltje *Pratylenchus penetrans*. De meeste gegevens over dit aaltje stammen nog uit de jaren vijftig en zestig. De land en tuinbouw is sinds die tijd aanzienlijk veranderd. De gegevens uit die tijd zijn gedateerd en moeten geactualiseerd worden om tot een betere advisering

naar de praktijk te komen. Het rassenassortiment en de teeltwijze is de afgelopen dertig jaar aanzienlijk gewijzigd. Een van de belangrijkste wijzigingen is de verlenging van het groeiseizoen door betere rassen, gewasbescherming, bemesting en beregening. Deze verlenging van het groeiseizoen kan van invloed zijn op de waardplantstatus van de belangrijkste landbouwgewassen. PPO is in het kader van LNV programma 303, in 1998 gestart met veldonderzoek aangevuld met potproeven om de waardplantstatus van de belangrijkste gewassen vast te stellen.

Gebleken is dat op tagetes na alle onderzochte gewassen waard zijn voor *P. penetrans*, waarbij slechts een beperkt aantal gewassen de status matige waard hebben gekregen. Alle andere onderzochte gewassen waren een goede tot een zeer goede waard voor *P. penetrans*.

## P-C7 Besparing op bewaarziekte- bestrijding in pootaardappelen mogelijk met een PCR-test op droogrot veroorzakende Fusarium-schimmels

J.G.Lamers<sup>1</sup>, J. Esselink<sup>1</sup> en J. van der Plas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Praktijkonderzoek Plant en Omgeving, Postbus 430,  
8200 AK Lelystad

<sup>2</sup>TNO-Voeding, Postbus 360, 3700 AJ Zeist

De meeste pootgoedpartijen worden tegen bewaarziekten behandeld. Tot nu toe waren er niet voldoende nauwkeurige detectiemethoden voorhanden om te bepalen of zo'n bestrijding nodig was. Een PCR-test zou de noodzaak van bestrijding weg kunnen nemen indien de belangrijkste droogrot veroorzakende *Fusarium* schimmels niet worden gevonden.

Door TNO is een gevoelige multiplex PCR test ontwikkeld waarmee 10-15 sporen of meer per g grond van *Fusarium sulphureum* en *Fusarium coeruleum* kunnen worden aangetoond.

De pootgoedpercelen worden na de oogst bemonsterd voor AardappelMoeheid. Van 25 bedrijven werd deze grond ook getoetst met de PCR-test. In 1999 bleken 4 % van deze grondmonsters een zeer lichte besmetting met *F. sulphureum* te hebben en in 2000 48 %. In beide jaren werd er geen besmetting met *F. coeruleum* gevonden. Grond afkomstig van knollen in de bewaring geeft met de PCR-test hogere uitslagen, terwijl grond verzameld bij het doodspuiten nog geen uitslag geeft. Ieder jaar was er één bedrijf dat (ernstige) problemen kreeg met droogrot in de bewaring. Deze besmetting werd vooraf aangetoond met de PCR-test van AM-grond. Op deze wijze kan de afwezigheid van *F. sulphureum* en *F. coeruleum* boven de detectiegrens relatief

snel worden aangetoond, waardoor een advies gegeven kan worden om bij het sorteren geen bewaarziektebestrijding uit te voeren.

## P-C8

### **Nieuwe mogelijkheden van detectie en fysio-determinatie van *Synchytrium endobioticum*, de veroorzaker van wratziekte**

J.G. Lamers<sup>1</sup>, J.G.N. Wander<sup>1</sup>,

P.H.J.F. van den Boogert<sup>2</sup>,

M.P.E. van Gent-Pelzer en R.P. Baayen<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PPO-AGV, Postbus 430, 8200 AK Lelystad

<sup>2</sup> Plant Research International BV, Postbus 16, 6700 AA Wageningen

<sup>3</sup> Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

Vondsten van wratziekte in aardappelen leiden tot een teeltverbod op het betreffende perceel en verplichte teelt van resistente rassen in omliggende bufferzones. Het besmettingsniveau in de grond en fysio-identiteit zijn bepalend voor beheersmaatregelen en deregule-

ring. De recente ontdekking van fysio 6 in Nederland en risico's voor uitbreiding van bestaande besmettingshaarden maken het noodzakelijk om over betrouwbare, gevoelige en snelle methoden te kunnen beschikken voor het vaststellen van besmettingsniveau en identiteit van het fysio.

Uit vergelijkend onderzoek komt de Hendrickx centrifuge naar voren als een aantrekkelijk alternatief voor de huidige natte zeef- en centrifuge methode; grondmonsters kunnen hiermee in grote aantallen en op een routinematige wijze verwerkt worden op PPO-AGV.

Moleculaire detectie en identificatie kunnen bijdragen aan snelle en gevoelige detectie en een alternatief bieden voor het tijdrovend telwerk van spoelfracties en de langdurige fysio-toetsen. In samenwerking met een Canadees onderzoeksinstituut wordt op PRI gewerkt aan de ontwikkeling van specifieke primers voor ITS-PCR en fysio-specifieke probes voor moleculaire fysio-determinatie. De ontwikkelde PCR-methode is inmiddels getest op (besmet) plantmateriaal en de eerste resultaten zijn veelbelovend. Biotoeetsen evenwel blijven noodzakelijk voor resistentieveredeling en als referentie voor detectie en fysio-determinatie. De verbeterde biotoets is voldoende gevoelig (vanaf 1 sporangium per g grond) en betrouwbaar. In de biotoets blijken meristeemplanten een uitstekend alternatief te vormen voor de huidige knollen.

POSTERS