

## Onderzoeksprogramma Naktuinbouw R&D 2012

### **L09-201 Virustoetsingen in blauwe bes (*Vaccinium*)**

Doel van het project is het opzetten van virustoetsingen voor blauwe bes. Deze toetsingen zullen de basis vormen voor een Elite-systeem voor *Vaccinium*.

### **L09-210 Eik haplotypering**

Het vaststellen van de genetische identiteit van eikels ten behoeve van vaststellen van de oorsprong van partijen. Tevens het vereenvoudigen van de huidige toets.

### **L09-220 Ontwikkeling methoden voor productie van plantpathogeen referentiemateriaal**

Het voorhanden zijn van betrouwbaar referentiemateriaal voor het uitvoeren van analyses op de aanwezigheid van plant pathogenen in uitgangsmateriaal wordt steeds belangrijker voor zowel onderzoeks- als routinematige toepassingen op laboratoria. De eisen die aan routinematige laboratoria worden opgelegd met betrekking tot borging en kwaliteit van de toetsmethoden worden steeds hoger. Bovendien vraagt de steeds meer toenemende gevoeligheid van de toetsmethoden om goed gedefinieerd positief en negatief controlemateriaal. Op onderzoeksgebied is beschikbaarheid van referentiemateriaal een vereiste omdat zonder dit materiaal geen methode (of toets) - ontwikkeling en validatie hiervan plaats kan vinden. In de huidige situatie wordt referentiemateriaal verkregen als er een positieve partij wordt gevonden. Daardoor is er regelmatig een te kort aan de beschikbaarheid van referentiematerialen. Toetsing op plantmateriaal is meestal gericht op specifieke delen van een plant. Doel van dit project is voor nematoden in grond en bacteriën in/op zaad een methode te ontwikkelen om referentie materiaal te produceren.

### **L09-221 Detectie van *Cymbidium*-mozaïekvirus en *Odontoglossum*-kringvlekkenvirus m.b.v. qPCR**

*Cymbidium*-mozaïekvirus en *Odontoglossum*-kringvlekkenvirus zijn belangrijke virussen in orchidee. De virussen kunnen worden gedetecteerd m.b.v. ELISA of met een klassieke PCR. Een kwantitatieve PCR is gevoeliger en sneller en geeft informatie over de (relatieve) hoeveelheid van een virus aanwezig in de plant. Door de relatieve hoeveelheden virus in een plant te bepalen in verschillende delen van de plant, ontstaat inzicht over welk gedeelte van de plant het best bemonsterd kan worden. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat in sommige kunstmatige orchideeëngeslachten de virusconcentraties dusdanig laag zijn dat het virus gemist kan worden. Of dat inderdaad zo is kan met deze methode gecontroleerd worden. Uit dit onderzoek zal ook moeten blijken of voor sommige geslachten het wenselijk is om over te gaan naar een andere manier van toetsen. De informatie kan gebruikt worden voor het opzetten van een Naktuinbouw Elite<sup>®</sup> systeem

### **L09-222 Spiking van zaadmonsters als interne controle**

Steeds vaker worden zaadpartijen behandeld waardoor de recovery van doelpathogenen sterk beïnvloed kan worden. Ook kunnen microflora en m.n. antagonistische saprophyten de betrouwbaarheid van toetsen sterk negatief beïnvloeden. Nagegaan zal worden of spiking (kunstmatig besmetting van monsters met herkenbare bacteriën) regimes kunnen worden ontwikkeld waardoor het effect van zaadbehandelingen en saprophytische antagonisten op de betrouwbaarheid van de toets veel beter kunnen worden ingeschat. Op basis van de recovery van de spike kan uiteindelijk aangegeven worden of een toets betrouwbaar is of niet. Cmm en Xcc dien als modelorganismen in deze studie maar uiteindelijk zullen praktische formats geïmplementeerd moeten worden voor alle bacteriële pathogenen

### **L09-223 Virus vaste planten**

Doel van het project is het opzetten van een viruscollectie in vaste planten voor validatie van toetsen en kennisoverdracht naar keurmeesters. Samen met PPO-BBF wordt verder gewerkt om de fotocollectie van virusbeelden in vaste planten zo volledig mogelijk te krijgen, hiervoor wordt fotomateriaal uitgewisseld

**L09-232 Authenticiteit van teeltmateriaal met behulp van stabiele isotopen**

Stabiele isotopen (=atomen van eenzelfde element die verschillen in aantal neutronen in kern. Isotopen verschillen alleen in massa niet in chemische eigenschappen) ratio's van de lichte biogene stoffen zoals waterstof, koolstof, stikstof en zuurstof kunnen informatie verschaffen over de authenticiteit en herkomst van producten. Met name in de voedsel en etenswaren branche zijn tal van voorbeelden bekend waarbij deze techniek succesvol is toegepast.

In samenwerking met IsoLife heeft Naktuinbouw een pilotstudie uitgevoerd om te bekijken of het mogelijk is om aan de hand van stabiele isotopen ratio's de authenticiteit van uitgangsmateriaal (in de tuinbouwsector) te bepalen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van wortelmateriaal van *Convallaria majalis*, afkomstig van verschillende locaties uit Nederland, België, Duitsland en Frankrijk. Van elke locatie werd een monster samengesteld en geanalyseerd op stabiele isotoop ratio's van  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  en  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . De resultaten van deze zeer beperkte dataset lieten zien dat het voor een aantal gevallen mogelijk was om onderscheid te maken op locatieniveau m.b.v. stabiele isotopen ratio's, met  $^{15}\text{N}$  als meest gevoelige indicator. Op basis van deze resultaten zal Naktuinbouw de toepassing van deze methode voor authenticiteit van uitgangsmateriaal verder onderzoeken aan de hand van twee praktijksituaties.

**L10-202 Moleculaire detectie/identificatie plantparasitaire nematoden**

Naktuinbouw verwacht een grote toename in uienmonsters die geanalyseerd moeten worden op aanwezigheid van stengelaaftjes. Door het grotere volume aan monsters dreigt er een capaciteitsprobleem te ontstaan (met name op het gebied van doorloop tijd per monster). Om deze reden wordt er gekeken naar de mogelijkheid om over te schakelen op moleculaire detectie van nematoden.

Doel is het ontwikkelen, valideren en implementeren van een moleculaire detectiemethode voor stengelaaftjes in consumptie uien. Men moet in staat zijn om met de methode een grote hoeveelheid monsters te gelijk te kunnen analyseren binnen een beperkte tijd (~24 uur).

**L10-204 Detectie nepovirussen in aardbei**

Nepovirussen zoals Arabis-mozaïekvirus (ArMV), tomatenzwartkringvirus (TBRV), latent aardbeikringvlekkenvirus van aardbei (SLRSV) en frambozenkringvlekkenvirus (RpRSV) kunnen worden overgebracht door nematoden (*Xiphinema/Longidorus*). Deze virussen hebben in aardbei en *Rubus* een quarantaine status. Al deze virussen hebben echter een veel bredere waardplantreeks, ook in sierteeltgewassen kunnen deze virussen voorkomen en kunnen voor problemen veroorzaken bij export. Door FERA (UK) zijn TaqMan RT-PCR's ontwikkeld en Naktuinbouw zal deze toetsen verder valideren

**L10-209 Sequencing of Sequencing of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Op basis van de genomsequentie van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en verwante soorten zullen specifieke sequenties worden geïdentificeerd.

**Internationale harmonisering van toets voor detectie van PSTVd/TCDVd in tomatenzaad**

Ontwikkeling van een geharmoniseerde internationaal geaccepteerde PSTVd/TCDVd toets voor tomatenzaad. Voorstel is uitwisselen van technieken en PSTVd besmette monsters waardoor er een inzicht gekregen kan worden van de verschillende technieken.

**Karakterisering *Acidovorax* isolaten m.b.v. AFLP**

Ontwikkeling van AFLP voor karakterisering *Acidovorax avenae* subsp. *citrullii*  
*Acidovorax avenae* subsp. *citrullii* is een belangrijk zaadoverdraagbaar pathogeen van meloen, watermeloen en verschillende andere komkommerachtigen. Onderscheid van isolaten binnen de soort is nu nog onmogelijk omdat er geen stamboom gemaakt is. Deze zal in dit project worden ontwikkeld.

#### **Moleculaire identificatie van formae speciales voor groenten schadelijke *Fusarium oxysporum***

*Fusarium oxysporum* is een van de meest belangrijke zaadoverdraagbare schimmels en een belangrijk bodempathogeen. Er zijn erg veel verschillende *formae speciales* maar er wordt bij gezondheidstoetsen nauwelijks (alleen asperge en cycloam) op dit niveau onderscheid gemaakt tussen pathogene en niet pathogene *formae speciales*. Aanwezigheid van *Fusarium oxysporum* maakt een zaadmonster dus al positief terwijl dit mogelijk een niet pathogene vorm is. Hierdoor wordt er ten onrechte veel zaad weggegooid of er worden klachten onterecht toegewezen aan *Fusarium* besmet zaad terwijl er sprake was van een bodembesmetting. Voor tomaat bestaat er een *formae speciales* specifieke PCR en er zijn generieke primers gemaakt om dit belangrijke stuk DNA te karakteriseren voor verschillende voor ons belangrijke *formae speciales*. Doel is om van een groot aantal belangrijke isolaten van groentegewassen het DNA te amplificeren en te karakteriseren en vervolgens na te gaan of er goede primers gemaakt kunnen worden voor snelle identificatie van *F. oxysporum* op *formae speciales* niveau. Er zijn verschillende directe toepassingen voor zaad en grondtoetsen alsmede voor een betere karakterisering van referentie isolaten die gebruikt worden in resistentieveredeling.

#### **Infectieproeven *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii***

Identificatie *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* isolaten (AFLP) en optimaliseren monsternamen  
Na een AFLP analyse van verschillende isolaten van *X.h. pelargonii* blijkt dat er verschillende clusters zijn die aan elkaar verwant zijn. Per cluster is er een isolaat genomen en is in een pilot een oriënterende besmettingsproef opgezet. Uit deze oriënterende besmettingsproef is naar voren gekomen dat er grote gedragsverschillen bestaan tussen isolaten uit verschillende clusters van *X.h. pelargonii* (*X.h.pel.*). In dit project zal gekeken zal worden of eerder behaalde resultaten in de winterperiode overeenkomen met resultaten gedurende de zomer. Verder wordt gekeken of isolaten binnen één AFLP cluster dezelfde pathogeniteitseigenschappen hebben.

#### **Identificatie en bemonstering *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola***

Identificatie *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* isolaten (AFLP) en optimaliseren monsternamen  
In 2003 is voor het eerst *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* (*X.ax.poi.*) aangetroffen in Europa poinsettia materiaal. In de jaren erna is *X.ax.poi.* regelmatig aangetroffen. In een Pest Risk Analysis opgesteld door DEFRA/CSL in 2006 werd aangegeven dat dit pathogeen door zelfregulering van de sector aangepakt zou moeten worden. In 2007 – na een grote uitbraak in Europa, met veel verlies als gevolg – heeft Naktuinbouw in samenwerking met de sector verschillende vragen op dit gebied beantwoord.  
Er zijn echter nog hiaten in kennis en deze kunnen worden opgevuld enerzijds door AFLP en sequencing van belangrijke genen, in combinatie met infectie-experimenten. Aan de hand van geïnfecteerd materiaal zal ook de overleving van *X.ax.poi.* beter in kaart gebracht moeten worden. Op basis van deze gegevens kan een specifieke toets ontwikkeld worden voor grootschalig toetsen van zowel plantmateriaal als de omgeving. Combineren van deze kennis met het vermeerderingsproces van *Poinsettia* moet handvatten geven aan de sector voor het produceren van gezond uitgangsmateriaal.

#### **APK detectie *Agrobacterium tumefaciens* (I)**

De huidige toetsing op *Agrobacterium tumefaciens* lijkt niet meer aan de verwachtingen te voldoen. Monsters moeten nu regelmatig worden nagetoetst, maximale samenvoegfactor is onduidelijk e.d., terwijl *A. tumefaciens* wel een steeds groter probleem wordt. Binnen dit project worden de verschillende fases van de toets (vermalen, kweek, PCR) onderzocht op verbeteringen, zonder dat de toetsprijs veel mag stijgen

#### **Efficiëntere blaadjestoets tomaat voor het aantonen van PepMV en viroïden**

Ontwikkeling van een combinatietoets waar zowel PepMV als een aantal viroïden met behulp van PCR kunnen worden aangetoond.

### **Detectie *Agrobacterium tumefaciens* in grond (II)**

*Agrobacterium tumefaciens* is een bacterie dat vaak een plasmide bij zich draagt. Wanneer *A. tumefaciens* een plant infecteert, wordt een deel van het plasmide ingebouwd in het plantgenoom en wordt de plant aangezet tot knobbelvorming. Alleen bacteriën met plasmide zullen dus knobbelvorming veroorzaken. Het plasmide is de ziekteverwekkende factor en kan alleen m.b.v. PCR worden aangetoond.

*A. tumefaciens* kan lange tijd in grond overleven. Percelen waar ooit een besmetting heeft plaatsgevonden kunnen na jaren nog steeds bacteriën bevatten die symptomen kunnen veroorzaken in gevoelige gewassen. Onder warme omstandigheden – bijv. in Afrika, waar veel vermeerderingsbedrijven zitten – kan *Agrobacterium* zich goed handhaven en vermeerderen, zelfs zo dat het stof in de lucht *Agrobacterium* kan bevatten. Om problemen voor te blijven is een gevoelige detectiemethode essentieel. Om dit te bereiken zal het proces van monstername en toetsuitvoering worden geoptimaliseerd.

### **Verbeterde bemonstering en detectie van appelheksenbezem**

Appelheksenbezem, *appel proliferatie phytoplasma* (APP) staat op de quarantainelijst van de EU. Phytoplasma's in fruitgewassen zorgen voor grote problemen in Zuid Europese landen, maar ook in Nederland en omliggende landen duikt APP vaker op, getuige het verloren gaan van waardevol genetisch materiaal in Duitsland door APP.

Uit de huidige gegevens komt al naar voren dat er verschillen zijn tussen APP isolaten en tussen appelrassen. De bemonsteringsmethode kan nu proefondervindelijk verder aangescherpt worden: wat is het ideale monster en tijdstip voor detectie van APP. Optimalisatie van APP detectie is nu mogelijk.

### **Vitaliteitsbepaling *Acidovorax citrulli* (Ac) op zaden van komkommerachtigen**

Er wordt in toenemende mate gebruik gemaakt van directe PCR analyse voor het aantonen van bacteriën in zaadextract. PCR is een erg gevoelige techniek maar kan geen onderscheid maken tussen dode en levende cellen. De relatief arbeidsintensieve grow out methode maakt wel onderscheid tussen levende en dode cellen en dit is een groot voordeel t.o.v. de directe PCR. Vraag is of er een vitaliteittoets op basis van PCR kan worden ontwikkeld waardoor de bewerkelijke grow out toets niet langer nodig is. Hiervoor zijn er twee benaderingen mogelijk. Nagegaan zal worden of d.m.v. vloeibare verrijking aangetoond kan worden of cellen in leven zijn door op twee tijdstippen een PCR uit te voeren. Een tweede mogelijkheid is m.b.v. een vitaliteits PCR die onderscheid kan maken tussen levende en dode cellen.

### **Detectie Alfalfa Mosaic Virus (AMV) in tomatenzaad**

Er is een toenemende belangstelling voor AMV te kunnen detecteren in tomatenzaad.. In 2012 zal deze toets worden ontwikkeld, en zal aansluiten op reeds bestaande ELISA's voor detectie van PepMV, ToMV, TMV en PZSV.

### **Detectie virussen en viroïden in tomatenzaad m.b.v. geautomatiseerde extractie en RT-PCR.**

Ontwikkeling van een combitoets voor tomatenzaad, waarmee tegelijkertijd verschillende virussen en viroïden kunnen worden aangetoond (combitoets PSTVd/TCDVd/PepMV).

Voor de detectie van viroïden is het nu noodzakelijk om RNA te extraheren uit tomatenzaadextract.. Zodra RNA geëxtraheerd is, kan datzelfde RNA ook voor detectie van een aantal andere virussen gebruikt worden zoals bijv. PepMV. Hierdoor kan een gunstigere prijsstelling verkregen worden voor moleculaire toetsen vanwege een intrinsiek grotere gevoeligheid van RT-PCR. Aan de hand van variabele submonstergrootte wordt nagegaan of de moleculaire toets een bruikbaar alternatief is voor ELISA. Een bijkomend voordeel van de moleculaire toets is dat door een interne borging de kwaliteit van toets beter gemonitord kan worden t.o.v. ELISA.

Dit systeem wordt gebruikt als modelsysteem voor detectie van virussen/viroïden en kan later uitgebreid worden naar andere zaadoverdraagbare virussen zoals: ToMV, TMV, TRSV, ToRSV en AMV en andere pospiviroiden van tomaat.