



<b>Algemene gegevens</b>	
PPS-nummer	TKI-AF-18094
Titel	Snelle on-site methoden voor voedselveiligheid en authenticiteit
Thema	Voedselveiligheid (BO-46 AF-GV – Gezonde en veilige producten)
Uitvoerende kennisinstelling(en)	WFSR
Projectleider onderzoek (naam + emailadres)	Andries Koops; <a href="mailto:andries.koops@wur.nl">andries.koops@wur.nl</a>
Penvoerder (namens private partijen)	Naktuinbouw
Adres projectwebsite	Marjan van Creij (M.G.M.vanCreij@minez.nl)
Totale projectomvang (k€)	643.6
Adres projectwebsite	<a href="https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksprojecten-LNV/Expertisegebieden/kennisonline/Snelle-on-site-methoden-voor-voedselveiligheid-en-authenticiteit-1.htm">https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksprojecten-LNV/Expertisegebieden/kennisonline/Snelle-on-site-methoden-voor-voedselveiligheid-en-authenticiteit-1.htm</a>
Startdatum	1 april 2019
Einddatum	31 december 2021

<b>Goedkeuring penvoerder/consortium</b>	
De jaarrapportage dient te worden besproken met de penvoerder/het consortium. De TKI's nemen graag kennis van eventuele opmerkingen over de jaarrapportage.	
De penvoerder heeft namens het consortium de jaarrapportage	<input checked="" type="checkbox"/> goedgekeurd <input type="checkbox"/> niet goedgekeurd
Eventuele opmerkingen over de jaarrapportage:	<b>none</b>

<b>Inhoudelijke samenvatting van het project</b>	
Probleemomschrijving	<p>Door globalisatie van voedselproductie is het vaststellen van de herkomst, kwaliteit en veiligheid van voedselgrondstoffen een grote uitdaging. Het is voor bedrijven en overheden noodzaak en verplichting om de veiligheid en kwaliteit van hun grondstoffen en producten te garanderen, door de productieketen heen. Dit vraagt om slimme, betaalbare oplossingen voor het meten van voedselveiligheid en kwaliteit in de handelsketen en op productielocatie. AF18094 is een bundeling van 2 projecten/consortia (WP1 en 2) met elk een eigen doelstelling dat aansluit bij een eerder gestart project met dezelfde doelstelling (AF17038).</p> <p><b>WP1.</b> In plant breeding, gene editing techniques are increasingly used worldwide, with CRISPR-Cas in particular gaining more and more ground. It is expected that these varieties will be offered to Naktuinbouw in the coming years for national and European variety registration. In addition, European registration institutions such as Naktuinbouw regularly receive questions with regard to the possible genetic basis of certain plant material in general or specifically with regard to certain characteristics. Currently, SSR and AFLP profiles are the basis for the identification of varieties and for demonstrating the presence or absence of specific characteristics. These profiles have been brought together in various species-specific databases. However, applicants are increasingly switching to the provision of sequence data. Naktuinbouw is therefore investigating the possibility of converting SSR or AFLP profiles into sequence data. However, this requires the use of lab-related sequence platforms. In order to also carry out analyzes in the trade chain, Naktuinbouw needs a protocol whereby it is possible to pre-screen the genetic background of specific plant material on location.</p> <p><b>WP2.</b> Recent onderzoek heeft aangetoond dat bieren van ambachtelijke brouwers (craft beer) meer deoxynivalenol (DON) en deoxynivalenol-3-glucose (D3G) bevatten dan industriële bieren. In 22 bieren was het</p>

	<p>gehalte boven de toelaatbare dagelijks hoeveelheid (Tolerable Daily Intake, TDI) van 1 µg/kg/lichaamsgewicht zoals gesteld door de EU. Deze hoge DON en D3G contaminaties werden toegeschreven aan het gebruik van donkere moutsoorten. De huidige striptesten voor on-site metingen kunnen geen onderscheid maken tussen DON en D3G (geen EU richtlijnen) waardoor overschatting van DON contaminatie waarschijnlijk is.</p>
Doelen van het project	<p><b>WP1.</b> The first aim is the development of methods that can be used to quickly determine the genetic background of plant material using available knowledge and databases but without the use of specifically equipped lab facilities. The second aim is to develop molecular methods that can be used to specifically identify new breeding products with new properties that have not been adequately tested for food safety aspects.</p> <p><b>WP2.</b> Binnen dit project wordt een snelle on-site differentiële test (Lateral Flow Device, LFD) ontwikkeld die het onderscheid kan maken tussen deoxynivalenol (DON) en de plant geconjugeerde variant deoxynivalenol-3-glucose (D3G). Deze test zal worden geïntroduceerd op de werkvloer van kleine ambachtelijke (craft) brouwerijen. Met deze LFD zullen diverse moutsoorten binnen de craft brouwerijen worden geanalyseerd op de aanwezigheid van DON en D3G.</p>

<b>Resultaten</b>	
<p><b>Beoogde</b> en behaalde resultaten 2019</p>	<p><b>WP1</b></p> <p><b>1. Literature review and inventory of relevant DNA markers and related methods for tracing products from new plant breeding techniques.</b></p> <p>An inventory of available methods, DNA markers, and plant materials has been made:</p> <p>1) Simple Sequence Repeats sequencing (SSR-seq) has been identified as promising method for genotyping plant materials. This method potentially provides higher resolution for genotyping plant varieties than traditional microsatellite genotyping methods. The focus in 2019 was on a series of proof-of-principle experiments for characterizing potato varieties using existing microsatellite markers (results task 2).</p> <p>2) Nanopore Cas9 Targeted-Sequencing (nCATS) has been identified in a literature study as a promising method for characterizing specific genetic regions in new breeding products. These protocols use so-called CRISPR-Cas enzymes for the targeted selection and sequencing of specific DNA targets. It is a new technology and therefore few applications have been reported. This strategy is fast, versatile and offers the potential to comprehensively characterize genetic regions of interest using nanopore sequencing technology. The focus in 2019 was on a series of proof-of-principle experiments using MIR162 maize containing the insect-resistance gene Vip3aA20 variant (see results task 3).</p> <p><b>2. Development of NGS method for the identification and characterization of cultivars based on microsatellite (SSR) profiles.</b></p> <p>A preliminary comparison was made between SSR-seq strategies using Illumina MiSeq and nanopore MinION sequencing technologies for genotyping a series of potato cultivars. A performance comparison was made with the benchmark method, which is the currently-used non-NGS-based SSR method for characterizing potato cultivars. Preliminary data analyses were performed on the NGS data in 2019.</p> <p><b>3. The development of a method to trace new (undesired) properties in plant varieties, which are the result of the application of new gene editing techniques.</b></p> <p>With the knowledge gained through literature research, a promising CRISPR-Cas-NGS method has been selected and a first proof-of-principle experiment has been performed. A GM maize with the built-in VIP3A gene for insect resistance was used as the target. A data analysis protocol has also been developed for a rapid interpretation of the NGS data. On gel, duplex digestion (two sgRNAs specific for VIP3A in one digestion reaction)</p>

	<p>has been demonstrated when an amplicon (VIP3A) is used as a target. First Oxford Nanopore MinION NGS sequencing experiments of the duplex-digested amplicon as well as duplex-digested genomic DNA look promising.</p> <p><b>WP2</b></p> <p><b>1. Om een reëel beeld te krijgen van DON en D3G contaminaties in mout, zal er in 2019 een zo groot mogelijke database van beschikbare mouten worden opgezet.</b></p> <p>Partners zijn begonnen met het inventariseren van meer dan 100 verschillende moutsoorten die worden gebruikt door brouwerijen aangesloten bij branchevereniging CRAFT voor de on-site metingen.</p> <p><b>2. Voor het maken van een LFD die het verschil tussen kan bepalen is een database van verkrijgbare antilichamen (commercieel/wetenschappelijk) die DON en D3G kan onderscheiden.</b></p> <p>In 2019 is er een DON antilichaam database opgezet die behalve antilichamen uit wetenschappelijke publicaties, ook alle commercieel verkrijgbare antilichamen bevat. Behalve de data zoals bedrijf en auteur, focust de database voornamelijk op de techniek waarin het antilichaam is toegepast, gevoeligheid en of er is gekeken naar de kruis reactiviteit voor D3G. Ook zijn er immunoaffiniteits kolommen meegenomen in de database omdat deze ook kunnen worden toegepast voor een differentieel DON/D3G resultaat op de striptest.</p> <p><b>3. Verschillende antilichamen testen met een SPR Biosensor getest worden op hun binding aan geselecteerde antigenen.</b></p> <p>Op basis van deze database zijn er 2 antilichamen van AOKIN AG besteld waarvan er één geen kruis reactiviteit heeft. Ook is er een DON specifiek antilichaam aangevraagd bij de USDA.</p> <p><b>4. Een start worden gemaakt met het instrueren van brouwers voor het on-site meten van DON in mout. Daarna zal dit verder worden uitgerold bij meerdere craft brouwerijen.</b></p> <p>DONQ2 striptesten zijn op de brouwerijvloer gedemonstreerd aan de brouwers die deelnemen aan deze PPS. Tijdens deze eerste bijeenkomst is er een protocol opgezet voor het on-site meten, een mout sampling procedure en over de hoeveelheden mout die gesampled moeten worden. Bij de eerste on-site metingen bij de Gulpener brouwerij zijn 8 moutsoorten doorgemeten. Bij Gulpener werd slechts in enkele gevallen een zeer laag DON gehalte gemeten (50-100 ppb). Na deze eerste on-site screening is er een sterk verbeterd sample protocol opgezet waarin de waargenomen bottlenecks zijn opgelost.</p>
Beoogde resultaten 2020	<p><b>WP1.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Performance comparison of SSR-seq methods with current genotyping method for potato variety identification.</li> <li>2) Development of a multiplex targeted SSR sequencing protocol for potato variety identification</li> <li>3) Development of a bioinformatics protocol for automated SSR-seq data analysis.</li> <li>4) Development of optimized nCATS protocol. Testing of nCATS protocol on other target loci. The focus is on multiplexing the method, which means testing multiple targets simultaneously on one sample. The new, cheaper NGS flow cells will also be used to make the method as cost-efficient as possible.</li> <li>5) Refinement of a bioinformatics protocol for automated nCATS data analysis.</li> </ol> <p><b>WP2</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Een prototype striptest die een onderscheid kan maken tussen DON en D3G en toepasbaar is op de brouwerijvloer</li> <li>2) &gt;100 unieke on-site metingen van verschillende soorten mout</li> </ol>

	3) Complete database met alle mout specificaties, DONQ2 striptest resultaten, DON/D3G striptest resultaten en instrumentele analyse resultaten.
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Opgeleverde producten in 2019</b> (geef de titels en/of omschrijvingen van de producten / deliverables of een link naar de producten op de projectwebsite of andere openbare websites)
<u>Wetenschappelijke artikelen:</u>
<u>Externe rapporten:</u>
<u>Artikelen in vakbladen:</u>
<u>Inleidingen/posters tijdens workshops, congressen en symposia:</u>
<u>TV/ Radio / Social Media / Krant:</u>
<u>Overig (Technieken, apparaten, methodes etc.):</u> – Database met DON/D3G antilichamen