

Geelziek in hyacint en in bijzondere bolgewassen: detectie en overdracht van *Xanthomonas hyacinthi*

Joop van Doorn¹, Paul van Leeuwen¹ en Roberto Miglino²

¹ PPO PPO Bloembollen, Boomkwekerijgewassen en Fruit, postbus 85, 2160 AB Lisse

² Bloembollenkeuringsdienst, postbus 300, 2160 AH Lisse

Het is bekend dat de plantpathogene bacterie *Xanthomonas hyacinthi* hyacinten en nauw-verwante bolgewassen kan aantasten en 'geelziek' kan veroorzaken. Veel minder bekend is dat deze geel-gepigmenteerde Gram-negatieve bacterie ook andere bolgewassen kan infecteren en hierin in toenemende mate schade veroorzaakt. Onderzocht wordt of geelziek in bijzondere bolgewassen aantoonbaar is met de detectietechnieken ontwikkeld voor *X. hyacinthi* of dat er mogelijk sprake is van andere *Xanthomonas*-pathovars. Voor de teelt van hyacint is het van groot belang om vast te stellen of hyacinten op het veld gemakkelijk via deze andere bolgewassen geïnfecteerd kunnen raken.

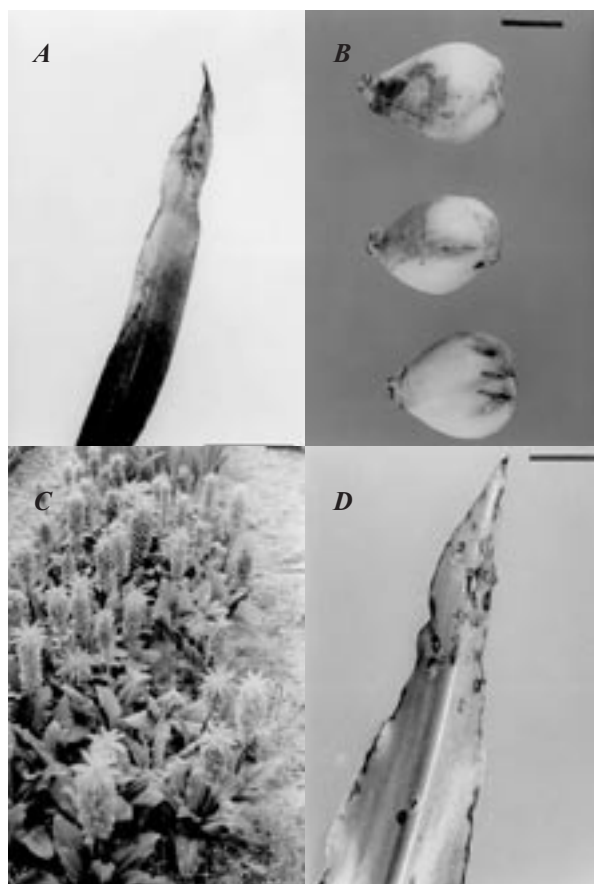
Xanthomonas hyacinthi in bijzondere bolgewassen

Geelziek in hyacint is wellicht de oudst bekende afwijking in planten waarvan bekend werd dat een bacterie (tegenwoordig *Xanthomonas hyacinthi* genaamd) deze ziekte veroorzaakte (Wakker, 1887). Tot niet zo lang geleden gingen er in de bollensector vanuit dat *Xanthomonas hyacinthi* hyacintencultivars en enkele nauw verwante bolgewassen zoals *Galtonia candicans* (Kaapse hyacint), *Scilla*-soorten (sterhyacint) en *Muscari* (blauw druifje) kon aantasten (Janse *et al.*, 1983). De bladsymptomen die *X. hyacinthi* veroorzaakt in deze siergewassen lijken namelijk sterk op die in hyacint. Echter, vanaf 1994 ontving de Diagnostiek Service van PPO bollen van *Puschkinia libanotica* (buisshyacint) en *Chionodoxa gigantea* (sneeuwroem) met een afwijking. Wanneer deze bollen longitudinaal aangesneden werden, bleken deze in en rondom de basale plaat geïnfecteerd met gelige bacteriën. Het weefsel was helder geel tot bruinig okerkleurig. Ook bleken enkele bollen aan de top (neus) geïnfecteerd. Daar deze bacterie het typerende okergele pigment xanthomonadine produceerde, deed dit een infectie met een *Xanthomonas*-soort vermoeden. Deze monsters bleken inderdaad positief voor *X. hyacinthi* na toetsing in ELISA met specifieke poly- en monoclonale antistoffen (van Doorn *et al.*, 1999).

Regelmatig werden ook planten van *Eucomis bicolor* en *E. punctata* (ananasplant) ontvangen met typische bladsymptomen (necrotische bladplekken) die aan geelziekaantasting in hyacint deden denken (Figuur 1). Deze plantensoort, evenals *Puschkinia* en *Chionodoxa* behorende tot de Liliaceae, komt oorspronkelijk uit Zuid-Afrika.

Onderzoeksvragen

Vanwege de relatief nieuwe problemen in deze bijzondere bolgewassen is het belangrijk te weten of de veroorzaker inderdaad *X. hyacinthi* is en niet een andere *Xanthomonas*-soort die deze monocotyle planten kan aantasten. Dit is vast te stellen door verschillen in biochemische en genetische karakteristieken van bacterie-isolaten uit deze bijzondere bolgewassen op te sporen en de bestaande identificatie- en detectietechnieken voor *X. hyacinthi* toe te passen op deze isolaten. Van groot belang is ook om vast te stellen of hyacinten via deze waardplanten geïnfecteerd kunnen raken. Men gaat er van uit dat natuurlijke besmetting vooral via wind en regen optreedt, maar ook mechanisch door het lopen of bewerken van vochtig gewas plaats kan vinden. Ten slotte willen telers een goede methode om verdachte of lichtbesmette partijen bollen te behandelen.



Figuur 1. Symptomen, veroorzaakt door *Xanthomonas hyacinthi* in blad van *Scilla* (A), in bolletjes van *Chionodoxa* (B) en in *Eucomis* (C) met necrotische bladspetters in detail (D). De zwarte balk is 1 cm, behalve in C (10 cm).

Waardplantreeks

Infectieproeven met tien verschillende soorten bijzondere bolgewassen zijn uitgevoerd. Kunstmatige infectie vond plaats via een besmette sorteermachine of door het gewas een aantal maal in het voorjaar op het veld te bespuiten met een bacteriesuspensie van 10^7 CFU/ml. De onderzochte soorten waren: *Scilla mischtschenkoana* (syn. *S. tubergeniana*), *S. siberica*, *S. bifolia*, *Hyacinthoides hispanica* (syn. *Scilla campanulata* en *Endymion hispanicus*), *Puschkinia libanotica* 'Alba', *Chionodoxa luciliae*, *C. forbesii*, *C. sardensis*, *Muscari armeniacum* en *M. azureum* (syn. *Hyacinthella azurea*). Bollen met geelzieksymptomen zijn alleen aangetroffen na bolinfectie bij *S. mischtschenkoana*, *S. siberica* en *M. azureum*. Bij *M. armeniacum* en *Hyacinthoides* zijn alleen bladsymptomen waargenomen en geen bolaantasting. De mechanische infectie leidde bij *S. mischtschenkoana* tot meer dan 10% aantasting en bij *S. siberica* en *M. azureum* tot minder dan 1% aantasting. Een gedeelte van de bollen is handmatig gerooid (om infectie via beschadiging te

voorkomen) en weer geplant om de aantasting door de bacterie het jaar erop waar te nemen. Tijdens de nateelt zijn geen geelzieksymptomen meer waargenomen. Ook bleken alle gerooide bollen daarna vrij te zijn van *X. hyacinthi*. Wel was vooral bij *S. mischtschenkoana* duidelijk te zien dat er een percentage bollen weggevallen was tijdens de teelt welke overeen kwam met het percentage planten met geelzieksymptomen uit de voorgaande teelt. De conclusie was dat de partij bollen is 'uitgeziekt': zieke bollen sterven af in de grond. Vanuit de praktijk is dit verschijnsel ook gemeld.

Detectie en toetsing voor de praktijk

Hoewel de gele, glimmende koloniemorfologie typerend lijkt voor *X. hyacinthi* is dit bedrieglijk. *Pantoea agglomerans* en enkele Gram-positieve bacteriesoorten (o.a. *Rhodococcus* spp.) tonen eenzelfde koloniemorfologie. Daarom zijn *X. hyacinthi*-specifieke toetsen noodzakelijk voor zowel identificatiedoeleinden als voor detectie. Voor *X. hyacinthi* uit hyacint zijn zowel serologische als DNA-toetsen ontwikkeld.

Tevens is er een polyclonaal antiserum en bestaan er monoclonale antistoffen gericht tegen lipopolysaccharide (LPS) -fracties van *X. hyacinthi* en tegen fimbriae-eiwitten. (van Doorn *et al.*, 1999). ELISA met als coating polyclonaal antiserum en monoclonale antistoffen, gericht tegen LPS bleek gevoelig en specifiek. Voor PCR bleek als target het zg. fimbria-gen (*fimA*), coderend voor een polymere oppervlakte eiwitstructuren (type 4-fimbriae) een soortspecifieke target (van Doorn *et al.*, 2001). Deze toetsen zijn geïmplementeerd en in gebruik door de Bloembollenkeuringsdienst.

Real-time PCR voor *Xanthomonas hyacinthi*: scorpion-probe systeem

Bij toepassing van PCR op grotere schaal bestaat het risico van ruimtecontaminatie in het laboratorium. Daar ook tijdsbesparing (o.a. geen analyse via gelelektroforese) een belangrijk item is voor de



Figuur 2. Detectie van *Xanthomonas hyacinthi*-isolaten afkomstig uit andere bolgewassen. Gebruikt zijn de primers JAAN en JARA (amplicon 223 bp). Isolaten uit *Eucomis bicolor* (4-8), *E. punctata* (9-10), *Puschkinia* (11-13), *Chionodoxa* (14-18); positieve controle: isolaten S148 en TV43 uit hyacint (2-3).

routinematige toetsing heeft de Bloembollenkeuringsdienst al jaren geleden gekozen om een real-time PCR op geelziek te ontwikkelen (real-time scorpion-probe systeem). In een standaard PCR amplificeren de primers JAAN en JARA specifiek een 223 bp DNA fragment van het fimbria-subunit-gen *fimA* (van Doorn *et al.*, 2001) van *X. hyacinthi* (Figuur 2). De door de BKD ontwikkelde real-time PCR combineert op primer JAAN een fluorofoor (FAM) en een quencher ('uitdover') -molecuul. Als er geen target is dooft de fluorescentie uit. Deze PCR kan direct op nauwelijks voorbewerkt plantensap worden uitgevoerd. Deze real-time PCR heeft bewezen reproduceerbaar, robuust, snel (1 uur) en zeer gevoelig te zijn en wordt regelmatig gebruikt voor analyse van geelziek-verdachte monsters.

Identificatie: zijn er verschillende pathovars?

Om de vraag te beantwoorden of er soms andere pathovars van *Xanthomonas* in bijzondere bolgewassen voorkomen, zijn *Xanthomonas*-isolaten geïsoleerd uit *Eucomis*, *Puschkinia* en *Chionodoxa*. De geïsoleerde bacteriën zijn op verschillende wijze onderzocht om te zien of deze tot *X. hyacinthi* behoren en of deze de hyacintencultivars 'Anne Marie' en 'Delfts Blauw' kunnen infecteren. Er werden geen verschillen aangetoond in biochemische en genetische karakteristieken (SDS-PAGE fingerprints, reactie met (monoclonale) antisera) en ook niet met real-time PCR (amplificatie van een deel van het *fimA*-gen) en Southern blotting. Tot zover wijst dit op het bestaan van een homogene groep *X. hyacinthi*-stammen die verschillende waardplanten, behorende tot de Liliaceae, kan infecteren (van Doorn, 2002). De *Xanthomonas*-isolaten, verkregen uit diverse bijzondere bolgewassen, reageerden alle positief in de real-time PCR.

Overdracht naar hyacint via bijzondere bolgewassen

In de praktijk wordt regelmatig onverwachts geelziek in een partij hyacinten aangetroffen. Als de hyacinten de gebruikelijke 'heetstookbehandeling' tegen geelziek hebben gehad wordt deze partij bollen verondersteld vrij te zijn van de bacterie. Heetstook is een temperatuurbehandeling van 30°C in juli-augustus gedurende 4-6 weken, gevolgd door 2 weken 38°C en tot slot 3 dagen 44°C hetgeen dodelijk is voor geelziek maar (net) niet voor de hyacintenspruit.

Als op een naburig perceel een bijzonder bolgewas staat waarvan bekend is dat het besmet kan zijn met *X. hyacinthi* ontstaat de vraag of dat de besmettingsbron is. Om vast te stellen of *X. hyacinthi* gemakkelijk vanuit een bijzonder bolgewas hyacinten kan besmetten is een infectieproef uitgevoerd. Daarvoor zijn bollen van *Scilla mischtschenkoana*, *Chiono-*



Figuur 3. Veldproef (in schaakbordpatroon) voor de overdracht van 'geelziek' van bijzondere bolgewassen (*Chionodoxa*, *Scilla*) naar hyacint ('Pink Pearl').

doxa forbesii en *Hyacinthoides hispanica* mechanisch geïnfecteerd. Deze besmette bollen zijn in een schaakbordpatroon tussen hyacinten geplant (Figuur 3) met enkele veldjes met gezonde *Muscari armeniacum* ertussen. Bij de helft van het proefveld is een paar maal een natte doek door een nat gewas gesleept om de verspreiding van *X. hyacinthi* te stimuleren.

Zowel bij *Scilla* als bij *Chionodoxa* zijn duidelijk bladsymptomen waargenomen (Figuur 1A, B). In het blad en bijbehorende bollen is de aanwezigheid van de bacterie ook door middel van toetsing vastgesteld. Bij *Scilla* ontwikkelden de



Figuur 4. *Chionodoxa* besmet met *X. hyacinthi* (links) geeft kleinere plant met kleine bloemen.

planten zich normaal. Bij *Chionodoxa* (Figuur 4) gaven de aangetaste bollen een blad met een korte bloemsteel, zogenaamde noodbloei. Het waren echter vooral de hyacinten die naast de *Scilla* stonden die aangetast werden door de bacterie. De overdracht van *Chionodoxa* naar hyacint verliep moeizaam; de verwachting is daarom dat de kans op besmetting op het veld van hyacint vanuit naburige percelen erg klein zal zijn. In *Muscari* en *Hyacinthoides* zijn alleen bladsymptomen aangetroffen in de veldjes die tijdens de groei met een natte doek zijn behan-

deld. In de bollen van deze gewassen is geen geelziekaantasting aangetroffen. Het slepen van een natte doek door het gewas kon de bacterie blijkbaar wel verspreiden en voor een aantasting van het blad zorgen maar de bacterie was niet in staat om de bol te bereiken.

Blijft een partij bollen besmet met geelziek door spoelen?

Zoals in de vorige analyse is beschreven, is in onderzoek vastgesteld en vanuit de praktijk aangegeven dat een partij *S. mischtschenkoana* aangetast door *X. hyacinthi* kan uitzielen. Vanuit dezelfde praktijk wordt echter sinds enkele jaren aangegeven dat partijen juist niet meer uitzielen. Een belangrijke verandering in de bedrijfsvoering is het tegenwoordig veelvuldig toepassen van spoelen om de bollen schoon te maken. Het is goed denkbaar dat de bollen door verwondingen bij het rooien en het spoelen daarna worden besmet. Op deze wijze kan de bacterie in een partij bollen aanwezig blijven. Om vast te stellen of *X. hyacinthi* via spoelen in een partij aanwezig kan blijven en na hoeveel jaren niet spoelen een partij bollen weer vrij kan zijn van *X. hyacinthi* is in 2006 een onderzoek gestart. Het onderzoek werd uitgevoerd met *S. mischtschenkoana* en *C. luciliae* (Figuur 3). Bij aanvang van het onderzoek zijn bollen niet besmet, mechanisch besmet of via spoelwater besmet. Dezelfde partijen zijn in de twee daarop volgende zomers na het rooien steeds wel of niet gespoeld. Na twee van de drie proefjaren is duidelijk dat spoelen heeft geleid tot meer planten met symptomen in het blad en meer aangetaste bollen ten opzichte van niet spoelen. Meer conclusies kunnen pas worden getrokken na het afronden van het onderzoek.

Verspreiding van geelziek via zaad?

Eucomis bicolor (ananasplant) wordt via zaad vermeerderd. Ondanks vele hygiënische maatregelen blijven partijen *Eucomis* een percentage met geelziek aangetaste planten houden (Figuur 1 C, D). Omdat andere waardplanten zoals hyacinten en bijna alle bijzondere bolgewassen afsterven op het moment dat *Eucomis* wordt geteeld en een bovengronds gewas vormt, lijkt een kruisbesmetting onwaarschijnlijk. Het vermoeden bestaat dat *X. hyacinthi* wellicht via zaad of zaadhuid verspreid kan worden. Dit aspect wordt komend jaar onderzocht. Van andere *Xanthomonas*-soorten die bijvoorbeeld rijst aantasten is bekend dat deze zaadpathogenen zijn.

Conclusies en toekomstig onderzoek.

De toetsing op geelziek, zoals die plaatsvindt bij de Bloembollenkeuringsdienst via PCR blijkt

toepasbaar ook op gewassen anders dan hyacint. In een enkel geval is lichte kruisreactie vastgesteld met één *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*-isolaat. (Van Doorn *et al.*, 2001). Dit aspect moet nog nader onderzocht worden. De geelziekproblemen in de kleine bollen van hyacintachtigen zoals Scilla en Muscari lossen zich in de praktijk letterlijk vanzelf op door het uitzielfenomeen; aangetaste bollen blijken veelal niet levenskrachtig. Wel is nu aangetoond dat gezonde hyacinten via naburige met geelziek besmette hyacintachtigen besmet kunnen worden, al gaat de overdracht moeizaam; reden te meer voor telers om voorzorgsmaatregelen te nemen. Ook via spoelen bestaat het gevaar van besmetting. Het is daarom raadzaam om een besmette partij niet te spoelen maar via een schudzeef (droog) te ontdoen van grond. De komende jaren wordt dit gevaar nader onderzocht; ook zal worden bekeken in hoeverre *Eucomis* via zaad besmet kan zijn met *X. hyacinthi*.

Daarnaast is het niet bekend of de bacterie mogelijk via onkruiden of bembegroeiing (monocotylen zoals grassen) kan overleven en op deze wijze inoculum kan zijn voor herbesmetting. Toch blijft volgens de ervaren hyacintenteler overeind staan, dat besmettingen in het veld met geelziek vooral ontstaan via wind, dieren zoals hazen en mensen (buurmannen die ook hyacinten telen) die door het (vochtige) veld lopen.

Literatuur

- Wakker JH. (1887) Onderzoek der ziekten van hyacinten en andere bol- en knolgewassen gedurende de jaren 1883, 1884 en 1885. Algemeene Vereeniging voor Bloembollencultuur, p.4-13
- Van Doorn J, Ojanen-Reuhs T, Hollinger TC, Reuhs BL, Schots A, Boonekamp PM & Oudega B (1999) Development and application of pathovar-specific monoclonal antibodies that recognize the lipopolysaccharide O antigen and the type IV fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*. Applied and Environmental Microbiology 65: 4171-4180
- Van Doorn J, Hollinger TC & Oudega B (2001) Analysis of the type IV fimbrial subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in hyacinths. Applied and Environmental Microbiology 67: 598-607
- Van Doorn J (2002) Type IV fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*: characterization and application for the detection of yellow disease in hyacinths. Thesis, Vrije Universiteit Amsterdam
- Janse JD Miller HJ (1983) Yellow disease in *Scilla tubergeniana* and related bulbs caused by *Xanthomonas campesytritis* pv. *hyacinthi*. Netherlands Journal of Plant Pathology 89: 203-206