

Toetsen om *Erwinia* in bloembollen aan te tonen

• TEKST : JOOP VAN DOORN, TREES HOLLINGER, DANIELLE VAN KAMPEN, PETER VREEBURG, PAUL VAN LEEUWEN, PPO BLOEMBOLLEN EN JAN VAN DER WOLF, PRI
 • FOTO'S: PPO BLOEMBOLLEN

Binnen het Erwiniaproject is een aantal toetsen ontwikkeld en zijn andere nog in ontwikkeling. Deze toetsen moeten liefst ook latent aanwezige *Erwinia*-stammen kunnen aantonen. Dit lukt door monsters in een voedingsbodem voor *Erwinia* te brengen en na kweek deze bacteriën aan te tonen met serologische of DNA-toetsen. Voor het schatten van percentages *Erwiniabesmetting* in partijen kunnen zogenaamde stresstoetsen gebruikt worden. Deze zijn wel minder gevoelig en duren langer. Met de BKD wordt overlegd hoe deze toetsen zijn te valideren om aan de telers te kunnen worden aangeboden.

Op 8 mei 2007 is een informatieavond gehouden bij PPO in Lisse voor hyacintentelers en andere geïnteresseerden. Daarbij waren ook vertegenwoordigers van de aardappelsector uitgenodigd, omdat er al veel onderzoek naar *Erwinia* in aardappel is gedaan en men al langer ervaring heeft met het toetsen op *Erwinia*. Na de voordrachten bleken bijna alle aanwezigen voorstander van het toetsen van werkbollen om te zorgen voor ziekte-vrij uitgangsmateriaal. In overleg met de BKD wordt bekeken welke toetsen uitgevoerd kunnen worden. Het is echter niet aannemelijk dat op korte termijn een toets beschikbaar is die op praktisch schaal toegepast kan worden.



Exicator met hyacintebollen met onderdruk



Hyacintebol met schuim als gevolg van een bewaring van 4 uur bij -20°C

ERWINIATOETSEN

In de meeste bloembollen speelt vooral *Erwinia chrysanthemi* (heet nu *Dickeya* sp.) een belangrijke rol als rotbacterie. Uitzondering is het gewas *Zantedeschia* waar vooral *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) (heet nu *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*) voor schade zorgt. Een probleem kan zijn, dat in een bol slechts enkele honderden *Erwinia*bacteriën aanwezig zijn. Door nu bolextracten (een fijn gemalen halve hyacintebol) te mengen met een speciaal groeimedium kunnen deze *Erwinia*-soorten zich vermeerderen. Door deze zogenaamde verrijkingstap zijn met deze toetsen zeer lage aantallen bacteriën aantoonbaar en dus ook de latente infecties op te sporen! *Erwinia chrysanthemi* (Ech) kan vervolgens aangetoond worden met behulp van antisera in ELISA (verrijking-ELISA), of Luminex

(verrijking-Luminex) of met een DNA-toets (verrijking-PCR). Met verrijking-ELISA en verrijking-PCR heeft NAK-Agro voor het aantonen van *Erwinia* in aardappelen al veel ervaring. De Luminex-toets is sneller dan ELISA, en nog iets gevoeliger, maar vraagt wel een speciaal apparaat. Voor *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Ecc) ligt de zaak ingewikkelder. Heel veel plantmateriaal is met Ecc besmet. Maar uit onderzoek in de aardappelteelt blijkt dat niet alle Ecc-stammen in staat zijn rot te veroorzaken. Toepassing van gevoelige toetsmethoden die alle stammen detecteren kan dus lei-

den tot afkeuring van veel plantmateriaal dat nooit ziek zou worden. Aanvullend onderzoek naar het ziekteverwekkende vermogen van Ecc-stammen is dus noodzakelijk. Verder moet er nog een specifieke DNA-toets ontwikkeld worden (PCR), want er kunnen voor Ecc geen goede antisera gemaakt worden. Toetsen op *Erwinia* op grote schaal voor werkbollen en op te planten bollen voor werkbollen kan een goede indruk geven van wat er aan besmetting op de bedrijven aanwezig is in het uitgangsmateriaal. Door partijen hiermee te selecteren kan de start van de teelt schoner beginnen.

STRESSTOETSEN

Een andere aanpak om in een partij bollen vast te stellen hoeveel latente besmettingen met *Erwinia* (dus zonder uitwendige symptomen) voorkomen is door de bollen aan stress bloot te stellen. Deze stress veroorzaakt beschadigingen in of aan de bol. Hierdoor gaat *Erwinia* groeien en worden symptomen zichtbaar. Dit kan door deze te laten vallen (van 70 cm in gaasbakken, zie kader), door de bollen onder lichte onderdruk te brengen in een glazen bak, of door de bollen gedurende een aantal uren in te vriezen. Het onderzoek naar de val- en invriestoetsen wordt nog vervolgd en vergeleken met andere toetsen. Voor onderdruk zijn speciale voorzieningen nodig en waarschijnlijk niet handig voor praktijktoepassing. Het invriezen geeft schuimvorming, vooral aan de neus van de hyacintebol; vaak is in dit schuim via kweek of PCR *Erwinia chrysanthemi* aantoonbaar.

Toets	Erwinia-soort	gewas	gevoeligheid	arbeid bij uitvoering van de toets	toepasbaarheid
Kweek	Ech, Ecc	alle	hoog	+	ja
ELISA 1)	Ech, Eca	hyacint, iris, Muscari	gemiddeld/hoog	+	ja
Luminex 1)	Ech, Eca	hyacint *	gemiddeld/hoog	+	ja, mits apparaat beschikbaar
PCR 1)	Ech, Ecc	alle	hoog	++	ja
(DNA-toetsen)					
Valproef	Ech, Ecc	hyacint	laag	+/-	toepasbaar
Invriesproef	Ech, Ecc	hyacint	?	+/-	in ontwikkeling

Tabel 1. Mate van toepassing van ontwikkelde toetsen op *Erwinia*-soorten en hun gevoeligheid. Voor routinematige toepassing is een zogenaamd validatietraject noodzakelijk. 1) na verrijkingstap * Luminex is alleen uitgevoerd bij hyacint.

Behandeling	Plantgoed			Leverbaar	
	partij en het % <i>Erwinia</i> voor aanvang van de proef verwijderd				
	Anna Marie	Carnegie	Carnegie	Carnegie	Carnegie
	0.4%	0.2%	5.0%	2.0%	0.3%
niet behandeld	1.5	1.5	1.1	4.0	0.0
beh. datum	20 juli	26 juli	16 aug.	13 juli	20 juli
sorteren	6.7	1.5	11.5	11.3	0.0
val 70 cm	1.9	1.1	4.4	4.3	0.0
2x storten	4.4	0.0	7.8	13.5	0.0
beh. datum	na heetstook op 17 okt.			27 juli	4 én 17 aug.
val 70 cm	0.4	0.4	1.9	7.7	0.0
2x storten	0.0	0.0	1.5	6.0	0.0

Invloed van beschadigingen (vallen, sorteren, storten) bij partijen hyacintenplantgoed (Carnegie en Anna Marie) en leverbaar (Carnegie) op het percentage *Erwinia* in de partijen, vergeleken met niet-beschadigde monsters van deze partijen.

GEWASSPECIFIEKE TOETSEN

Het meeste onderzoek naar detectiemethoden voor *Erwinia*'s is uitgevoerd aan

hyacint als modelgewas. Toetsing van iris, Muscari en Freesia met verrijkingstappen op *Erwinia*'s gaat op vergelijkba-

re wijze als bij hyacint, maar hier is nog weinig ervaring mee. Bij dahlia kan ELISA problemen geven vanwege zwartkleuring van het plantensap; voor dit gewas is kweek van *Erwinia*, PCR of mogelijk Luminex een betere methode. In *Zantedeschia* komt *Erwinia chrysanthemi* nauwelijks voor; hier kan men alleen gebruikmaken van (verrijking-) PCR (Tabel 1). De stresstoetsen zijn hoofdzakelijk gebruikt bij hyacint. Een nadeel van deze stresstoetsen is, dat men niet weet waar de *Erwinia*'s nu in de bollen zitten.

VERVOLGONDERZOEK

Er liggen nog heel wat vragen en ook verzoeken betreffende toetsing van *Erwinia* in bolgewassen. Allereerst moeten de toetsen routinematig uitgevoerd kunnen worden bij de keuringsdienst voor grootschalige toetsingen. Daarnaast moet er voor *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* een specifieke toets ontwikkeld worden om sneller en gevoeliger een uitslag te kunnen geven. Hier doet PRI onderzoek naar en kijkt tevens naar mogelijke verschillende typen binnen deze *Erwinia*soorten. Ook moet worden gekeken welke type(n) *Erwinia chrysanthemi* nu voorkomt of voorkomen in de bollen. Binnen deze soort komen namelijk verschillende typen voor. Voorlopig zijn er nog genoeg vragen; mogelijk kunnen we in de toekomst gezamenlijk optrekken met het onderzoek naar *Erwinia*'s in de aardappelteelt.

Het onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw.

Voorlopig protocol valtoetsen

Bij de valtoets vallen de bollen van 70 cm hoogte in een gaasbak (minimaal 3 x 100 bollen). De gaasbak wordt vervolgens in een plastic zak gedaan, waardoor de droging van de bollen minder snel gaat. Bewaren vindt plaats bij 30°C. Na 5 dagen wordt de zak verwijderd en worden de bollen beoordeeld en eventueel verder bewaard bij 25°C (leverbaar) of 30°C (plantgoed). Door langer te bewaren zal er afhankelijk van de partij nog meer of minder aantasting bijkomen. De toets is tot nu toe nog alleen uitgevoerd met reeds goed droge bollen uit de 25 of 30°C behandeling. De indruk is dat hoe later na het rooien deze valtoets wordt uitgevoerd, hoe droger de bol is en hoe minder de aantasting is. Varianten hierop zijn: bollen over 8 platen (kleiner dan de bolmaat) sorteren of bollen twee keer overstorten van 70 cm in een gaasbak. Bij deze twee methoden wordt meestal een hoger percentage aantasting door *Erwinia* gevonden omdat hierbij waarschijnlijk ook nieuwe besmettingen veroorzaakt worden. Deze toetsen geven een goede indruk van de mogelijke latente besmetting. Uit tot nu toe (beperkte) vergelijking tussen de valtoetsen en Luminex (een snelle serologische toetsmethode, ontwikkeld door PRI) bleek dat 0% ziek in de valtoets ook 0% was in Luminex, maar dat partijen met 1 tot 10% leeglopers in de valtoetsen volgens de Luminex zwaarder besmet bleken te zijn. Deze toets toont natuurlijk ook nog latent geïnfecteerde bollen aan.