

Bruikbaarheid vacuümtoets bij hyacinten

Voortgezet diagnostisch onderzoek 2012

P.J. van Leeuwen en R. H. L. Dees

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr 32 341021 97, PT nr 13891-16
April 2013

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Projectnummer: 32 341021 97, PT nr 13891-16

De bloembollensector investeert in dit project via het  **Productschap Tuinbouw**

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit**

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : +31 252 462121
Fax : +31 252 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Inhoud

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INLEIDING | 7 |
| 2 | MATERIAAL EN METHODE | 9 |
| 2.1 | Toepassen vacuümtoets..... | 9 |
| 2.2 | Aantonen bacteriën via oude methode en vacuümtoets | 10 |
| 3 | RESULTATEN | 11 |
| 3.1 | Toepassen vacuümtoets..... | 11 |
| 3.1.1 | Zachte bollen..... | 11 |
| 3.1.2 | Toetsen op bacteriën | 12 |
| 3.2 | Aantonen bacteriën via oude methode en vacuümtoets | 12 |
| 4 | DISCUSSIE EN CONCLUSIE | 13 |

Samenvatting

Bij aardappel is door HZPC te Metslawier een nieuwe toets ontwikkeld om nog nauwkeuriger *Erwinia* (*Pectobacterium*, *Dickeya*) in de knollen vast te stellen. Tot op heden werden de navelinden van een knol getoetst. Door de knollen gedurende een week bij hoge temperaturen onder vacuüm te bewaren wordt in de zacht geworden knollen vaker de ziekteverwekker aangetroffen. Het percentage ten onrechte gezond verklaarde partijen wordt daarmee verkleind. Het geplante uitgangsmateriaal wordt beter.

In dit verslag is het onderzoek beschreven waarbij voor het eerst op beperkte schaal is onderzocht of deze methode ook kan worden toegepast bij hyacinten voor het aantonen van *Dickeya* (*Erwinia chrysantemii*, agressief snot).

De proef van beperkte omvang is uitgevoerd bij HZPC te Metslawier en bij PPO te Lisse.

De vacuümtoets is goed toepasbaar bij hyacinten. De bollen werden gedurende de bewaring zacht, waarna ze goed te bemonsteren waren. De resultaten waren op beide instellingen vergelijkbaar. Of de vacuümtoets meer latent besmette knollen aantoonde dan de huidige toets waarbij een monster op een verrijkmingsmedium wordt gezet voordat wordt bemonsterd moet in een groter opgezette proef worden onderzocht.

1 Inleiding

Om vast te stellen of bollen besmet zijn met bacteriën zoals Erwinia (Pectobacterium, Dickeya) zijn in het verleden PCR-toetsen ontwikkeld evenals een stresstoets (Bloembollenvisie, 9 april 2009).

Voor het uitvoeren van toetsen op bacteriën zoals Erwinia bij visueel gezonde bollen worden stukjes bolweefsel genomen en op verrijkmingsmedium gezet. In een dergelijk medium krijgt een eventueel aanwezige bacterie de kans om zich te vermeerderen zodat die daarna bij een PCR-toets aantoonbaar is. De mate waarin een aanwezige bacterie wordt aangetoond hangt dus ook sterk af van de plaatsen op de bol die worden bemonsterd. Er is bij deze methode een kans dat 'de verkeerde plaats' wordt bemonsterd waardoor er geen bacterie wordt aangetoond.

Vanuit onderzoek bij aardappel is bekend dat de naveluiteinden de beste plekken zijn om op Erwinia te bemonsteren. NAK- agro te Emmeloord toetst daarom naveluiteinden om vast te stellen of een partij pootgoed besmet is met Erwinia. Echter, in de praktijk blijken partijen pootgoed die volgens de keuring vrij zijn van Erwinia soms toch besmet te zijn. HZPC te Metslawier heeft daarom een zogenaamde vacuümtoets ontwikkeld die beter werkt dan het bemonsteren van naveluiteinden.

Bij de vacuümtoets worden knollen in plasticzakjes onder vacuüm gebracht gedurende een week. In die tijd worden de knollen zacht en lopen leeg. De zuurstofloze omstandigheden en het zachte knolweefsel zijn ideaal voor eventueel aanwezige bacteriën om in te groeien. Ten opzichte van de toets op naveluiteinden worden met de vacuümtoets meer partijen met Erwinia aangetoond wat beter overeenkomt met de situatie in de praktijk.

Ook voor diverse bolgewassen is de vraag actueel of aan een visueel gezonde bol kan worden vastgesteld of die latent besmet is of niet.

In dit beknopte project binnen voorgezet diagnostisch onderzoek is onderzocht in hoeverre de vacuümtoets ook voor hyacintenbollen toepasbaar is.

2 Materiaal en methode

2.1 Opzet vacuümtoets

- 5 bollen per plasticzak
- 25 ml kraanwater toevoegen
- Vacuüm zuigen met vacumeerapparaat
- Zakjes gedurende 7 dagen bij 25 °C wegzetten
- Na 7 dagen: zak schudden, openen en vloeistof opnemen voor PCR-toets

2.2 Opzet PCR-toets na verrijking

- Van 5 bollen worden stukjes weefsel van de neus en andere delen van de bol gesneden
- Bolweefsel wordt toegevoegd aan verrijkmiddel (vloeistof waarin Erwinia goed groeit)
- Verrijkmiddel met bolmateriaal wordt 2 dagen bij 25 °C weggezet
- Na 2 dagen wordt mengsel geschud waarna op de aanwezigheid van Erwinia wordt getoetst met PCR

2.3 Toepassing vacuümtoets

In eerste instantie is op twee locaties (PPO Lisse en HZPC Metslawier) een proef uitgevoerd om vast te stellen of hyacintebollen zacht worden onder vacuüm.

Twee partijen bollen zijn op deze twee locaties onder vacuüm gebracht en na 7 en 10 dagen beoordeeld. De niet ontsmette bollen zijn per 5 stuks in een plasticzakje met 25 ml kraanwater gedaan, vacuüm gezogen en bij 25 °C weggezet. Bij HZPC is een Henkovac vacumeerapparaat gebruikt terwijl bij PPO een vacumeerapparaat voor huishoudelijk gebruik is gebruikt van het merk Solis met bijbehorende plasticzakken. De zakken worden vacuüm gezogen tot de toegevoegde vloeistof eruit gezogen wordt. Naast hele bollen zijn ook enkele halve bollen beoordeeld, niet in herhalingen.

De proef is 9 november 2012 ingezet en 16 en 19 november beoordeeld.

Tabel 1. Proefschema vacuümtoets.

| Locatie | Cultivar | Aantal herhaling | bollen |
|---------|----------|------------------|--------|
| HZPC | 1 | 3 | Heel |
| HZPC | 1 | 1 | Half |
| HZPC | 2 | 3 | Heel |
| HZPC | 2 | 1 | Half |
| PPO | 1 | 3 | Heel |
| PPO | 1 | 1 | Half |
| PPO | 2 | 3 | Heel |
| PPO | 2 | 1 | Half |

2.4 Aantonen Erwinia via verrijkingstap en vacuümtoets

Voor deze proef zijn bollen gebruikt uit een partij met een lichte besmetting van Erwinia. Omdat de proef laat in het seizoen werd uitgevoerd is het de vraag in hoeverre de bacteriën nog aantoonbaar zijn.

Van de partij bollen zijn 100 bollen getoetst, in porties van vijf bollen. Voor de verrijkingstap werden stukjes uit de bol gesneden en vervolgens gemalen in buffer, waarna 100 µl van het homogenaat aan 900 µl verrijkingmedium werd toegevoegd. Na verrijking voor twee dagen werden de monsters per twee gepooled en het DNA geïsoleerd. Voor de vacuümtoets werden de bollen per vijf stuks verpakt met een kleine hoeveelheid water en vacuüm gezogen. Na acht dagen werd de waterige oplossing die in de zakken was ontstaan per twee zakken gepooled. Dit werd gebruikt voor DNA isolatie. De 20 submonsters van 5 bollen werden voor de PCR per twee opgewerkt zoals hiervoor beschreven en getoetst. Het aantal PCR toetsen per behandeling was dus 10. De proef is gestart op 13 december 2012. De monsters hebben 2 dagen in het verrijkingmedium gestaan of 8 dagen in de vacuümzakjes gezeten.

Tabel 2. Schema bemonstering visueel gezonde bollen.

| Toetsmethode | Aantal bollen | Aantal toetsen |
|----------------------|---------------|----------------|
| Verrijkingmedium/PCR | 100 | 10 |
| Vacuüm/PCR | 100 | 10 |

3 Resultaten

3.1 Toepassing vacuümtoets

3.1.1 Zachte bollen

Ook de meeste hyacintenbollen werden tijdens het bewaren onder vacuüm zacht, vergelijkbaar met aardappelen. In tabel 2 is het aantal zachte bollen aangegeven die 7 en 10 dagen na inzetten zijn aangetroffen.

Tabel 3. Aantal zachte bollen 7 en 10 dagen na aanvang van de proef. Maximaal 5 bollen per behandeling.

| Locatie | Cultivar | Aantal herhaling | bollen | Na 7 dagen | Na 10 dagen |
|---------|----------|------------------|--------|------------|-------------|
| HZPC | 1 | 3 | Heel | 0.67 | 2.33 |
| HZPC | 2 | 3 | Heel | 3.67 | 4.67 |
| PPO | 1 | 3 | Heel | 1.00 | 3.33 |
| PPO | 2 | 3 | Heel | 2.67 | 4.67 |
| LSD = | | | | 1.413 | 2.246 |
| | | | | | |
| HZPC | 1 | 1 | Half | 1 | 2 |
| HZPC | 2 | 1 | Half | 4 | 5 |
| PPO | 1 | 1 | Half | * | 4 |
| PPO | 2 | 1 | Half | * | 5 |

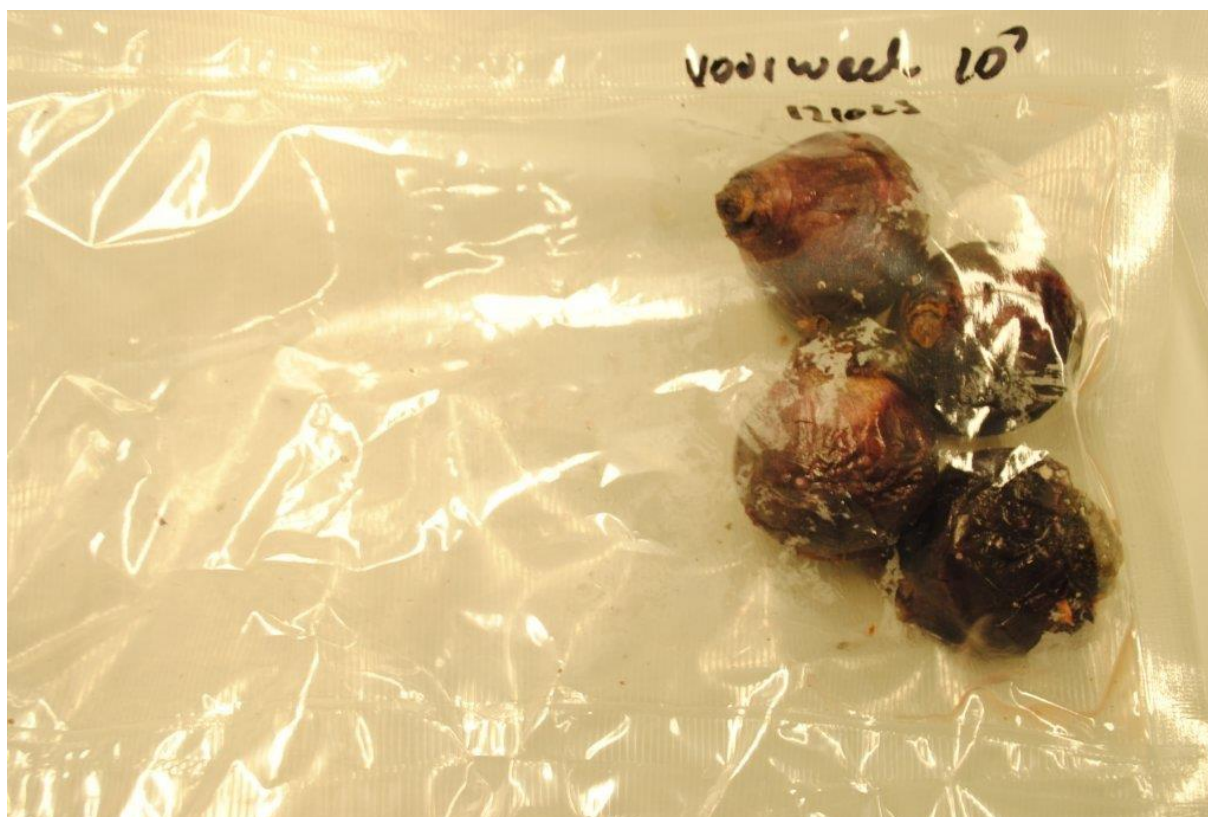


Foto 1. Zachte bollen na een week vacuüm bij 25 °C.

In Tabel 3 is te zien dat er een verschil was tussen de twee partijen hyacinten ten aanzien van de snelheid van zacht worden. Partij 2 werd veel sneller zacht dan partij 1.

Daarnaast lijkt een bewaring van 7 dagen een kantelpunt te zijn ten aanzien van het zacht worden van de bollen. Na vijf dagen (data niet weergegeven) waren de meeste bollen nog hard. Na 7 dagen was 40% van de gehele bollen slap en na 10 dagen was 75% van de bollen zacht.

Er was geen verschil tussen de resultaten van de twee onderzoekinstellingen: de methode lijkt robuust genoeg om op verschillende locaties uitgevoerd te kunnen worden.

Hoewel niet statistisch verwerkt lijkt het halveren van bollen voordat ze de vacuümtoets in gaan niet meer zachte bollen op te leveren. Er was zelfs de algemene indruk dat halveren nadelig werkte voor het zacht worden van de bollen.

3.1.2 Toetsen op bacteriën

Uit alle 8 behandelingen is één monster getrokken om via PCR-toetsing te beoordelen op aanwezigheid van *Pectobacterium carotovorum* (witsnot, voorheen *Erwinia carotovora*) of *Dickeya* sp. (agressief snot, voorheen *Erwinia chrysanthemi*).

In alle 8 monsters is geen *Pectobacterium* of *Dickeya* aangetroffen. Van elke partij zijn dus vier mengmonsters van in totaal 20 bollen getoetst die allen niet besmet bleken te zijn.

3.2 Aantonen *Erwinia* via verrijgingsstap en vacuümtoets

In tabel 4 zijn de toets uitslagen weergegeven.

Tabel 4. Aantal toetsen waarin *Pectobacterium* of *Dickeya* is aangetoond.

| Toetsmethode | Aantal bollen | Aantal toetsen | Aantal <i>Pectobacterium</i> | Aantal <i>Dickeya</i> |
|------------------|---------------|----------------|------------------------------|-----------------------|
| Verrijingsmedium | 100 | 10 | 0 | 0 |
| vacuüm | 100 | 10 | 0 | 2 |

De partij bollen bleek een lichte besmetting met *Dickeya* (agressief snot) te hebben.

Op basis van deze uitslag met erg weinig zieke bollen kan niet met statistische betrouwbaarheid worden gesteld dat door het toepassen van de vacuümmethode meer besmette bollen zijn aangetroffen dan bij de verrijingsmediummethode. Duidelijk is dat deze vacuümmethode ook bij hyacint goed te gebruiken is om een latente infectie aan te tonen.

4 Discussie en conclusie

Door hyacintenbollen met een beetje vloeistof onder vacuüm bij 25 °C te bewaren werden deze na circa 7 dagen zacht. Uit deze leeggelopen bollen is het eenvoudig om vocht te gebruiken voor een DNA isolatie en vervolgens te toetsen met PCR.

Op basis van dit onderzoek blijkt deze vacuümmethode ook bij hyacint goed bruikbaar om latente infectie aan te tonen. Om vast te stellen of deze methode, net als bij aardappel, beter werkt dan de methode via verrijkingsmedium is meer onderzoek nodig. Dit kon in dit onderzoek niet statisch betrouwbaar worden aangetoond. De vacuümmethode is vrij robuust: er zat geen verschil tussen de twee onderzoekinstellingen waar deze werd uitgevoerd.

Het is nog wel de vraag wat de optimale duur is om de bollen onder vacuüm te bewaren. Bij het toetsen van aardappel wordt uitgegaan van 7 dagen maar dat bleek bij hyacint in deze tijd van het jaar (november, december) soms nog harde bollen op te leveren. Mogelijk dat bij toetsing sneller na het rooien de bollen sneller zacht worden. Door de bollen enkele dagen langer tot maximaal 10 dagen te laten liggen werden meer bollen zacht.

Door de bollen langer te laten liggen ontstaat wel het risico dat er plasticzakken gaan knappen. De vacuüm plasticzakken gaan na enkele dagen bol staan vanwege gasproductie door de bollen/micro-organismen. Als een zak knapt loopt de vloeistof waaruit het monster genomen wordt weg waardoor het monster waardeloos is. De vacuümmethode duurt enkele dagen langer dan de methode via het verrijkingsmedium.