

## Consultancy

# Karakteriseren isolaten *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* van toen en nu



November 2010

Hedwich Teunissen  
Jan Westerhof  
Daniël Deinum  
Menno Hoekstra  
Irma Lukassen  
Naktuinbouw

## Consultancy

# Karakteriseren isolaten Xanthomonas hortorum pv. pelargonii van toen en nu

**Opdrachtgever:** Telers van Pelargonium i.s.m. Landelijke Potplantencommissie van LTO Groeiservice

**Gefinancierd door:** Productschap Tuinbouw

**Uitgevoerd door:** Naktuinbouw

**Looptijd:** Augustus 2010 tot november 2010

### COLOFON

**Auteurs:** Hedwich Teunissen  
Jan Westerhof  
Daniël Deinum  
Menno Hoekstra  
Irma Lukassen

**Adres:** Naktuinbouw  
Sotaweg 22  
2371 GD Roelofarendsveen  
TEL: 071-2236262  
FAX: 071-3326363  
[h.teunissen@naktuinbouw.nl](mailto:h.teunissen@naktuinbouw.nl)  
[info@naktuinbouw.nl](mailto:info@naktuinbouw.nl)  
[www.naktuinbouw.nl](http://www.naktuinbouw.nl)

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgevers.

# INHOUDSOPGAVE

Samenvatting.....	4
1. Inleiding.....	5
1.1 Achtergrond informatie.....	5
1.2 Onderzoeksplannen.....	5
2. Plan van aanpak.....	6
2.1 Doelstelling(en) en afbakening.....	6
2.2 Te bereiken resultaten.....	6
2.3 Plan van aanpak gespecificeerd per fase:.....	6
3. Resultaten.....	6
3.1 Selectie isolaten.....	6
3.2 DNA analyse - Genereren van een merker data set.....	7
3.3 DNA analyse - vergelijken van DNA profielen.....	8
4. Conclusies.....	10
5. Aanbevelingen.....	11
Bijlage 1 Gebruikte isolaten.....	

## Samenvatting

In het teeltseizoen 2010 zijn Pelargonium-telers getroffen door *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*. Op meerdere bedrijven is de ziekte laat ontdekt, mogelijk omdat de bacterie vooral aanvankelijk afwijkende symptomen gaf en zich trager in de vaatbundels ontwikkelde. Naktuinbouw vergeleek *Xanthomonas*-isolaten uit het teeltseizoen 2009-2010 met isolaten uit voorgaande jaren. Vastgesteld is dat zich in Europa drie verschillende infecties hebben voorgedaan. Isolaten die terug te voeren waren naar infecties die laat zijn ontdekt hadden hetzelfde DNA-patroon.

### AFLP-techniek

Uit de omvangrijke *Xanthomonas h. pv. pelargonii* collectie van Naktuinbouw zijn 31 isolaten geselecteerd waarvan met behulp van AFLP® (Amplified Fragment Length Polymorphism) het DNA-patroon is geanalyseerd. Met deze techniek wordt bepaald of isolaten genetisch aan elkaar verwant zijn of niet.

### Indeling naar symptomen

Isolaten die verkregen zijn uit monsters die in het seizoen 2009-2010 zijn ingezonden, zijn in te delen in drie groepen. Er hebben zich drie verschillende soorten besmettingen voorgedaan. Door deze verwantschap te combineren met de ontwikkeling van de ziekte in de praktijk, is het beeld ontstaan dat twee groepen isolaten de klassieke symptomen ontwikkelen: door verstopping van de vaatbundels verwelken de bladeren en sterven de planten. De derde groep isolaten liet een ander ziektebeeld zien: het blad vertoont necrotische vlekken. Hier lijkt de bacterie veel langzamer dan gebruikelijk door te groeien naar de vaatbundels, waardoor de ziekte bij deze variant veel langer latent aanwezig kan zijn. Opvallend was dat deze groep van isolaten identiek is aan een isolaat dat al in 2004 in de collectie van Naktuinbouw is opgenomen. Er is dus geen sprake van een 'nieuw' type.

### Besmettingsproef

Naktuinbouw is naar aanleiding van de resultaten uit deze consultancy al een besmettingsproef gestart. Onderzocht wordt of de afwijkende symptomen die in het afgelopen seizoen zijn gezien opnieuw kunnen worden opgeroepen met behulp van de toen geïsoleerde isolaten. In de proef wordt de ontwikkeling van drie isolaten van *Xanthomonas* in *Pelargonium zonale* en *Pelargonium peltatum* vergeleken. Dit is van groot belang om te bepalen of er bij één van de isolaten werkelijk sprake is van een andere symptoomontwikkeling. Als dat het geval is, moet worden vastgesteld of het bemonsteringsprotocol voor routinematig genomen monsters ook voldoet voor het vaststellen van het isolaat dat mogelijk afwijkende symptomen geeft. Het beeld dat de praktijk in 2009-2010 heeft gezien moet met dit onderzoek bevestigd of ontkracht kunnen worden.

### Aanbevelingen

Voor de praktijk is het van groot belang nader onderzoek te doen naar de symptomen die de verschillende groepen van isolaten veroorzaken. In het huidige onderzoek zijn met name isolaten geanalyseerd uit de Naktuinbouwcollectie. Het is zeker interessant om dit mondiaal te onderzoeken omdat bedrijven zich steeds vaker bevinden in alle uithoeken van de hele wereld. Met dit onderzoek kan dan een 'tracking en tracing' systeem worden opgezet. Tot slot wordt nog aanbevolen een analyse van het hele genoom op te zetten. Wanneer bekend is welk stukje van het totale DNA verantwoordelijk is voor de afwijkende symptomen kan die kennis bijdragen aan het ontwikkelen van een brede, robuuste en gevoelige detectietoets voor *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*.

## 1. Inleiding

### 1.1 Achtergrond informatie

De bacterie *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (voorheen *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*) is een zeer lastige ziekte in *Pelargonium* en in mindere mate in *Geranium*. De ziekte wordt heel gemakkelijk verspreid. X.h.p. is een vaatziekte. De bacteriën infecteren planten via wortels of direct via het blad. Van daaruit groeien ze snel naar de vaatbundels en komen dan via het vaatstelsel door de hele plant. Door een verstoord watertransport ontstaat eerst groeiachterstand en snel daarna verwelking als de planten veel verdampen. Bij lage temperaturen vermeerderen de bacteriën zich langzaam en duurt het lang voordat ziekteverschijnselen zichtbaar worden. Tijdens deze latente periode vindt echter wel verspreiding tussen planten plaats. Op het moment dat gewassymptomen zichtbaar worden is het vaak al te laat om nog in te grijpen. Ruimen van het gewas is dan de enige optie. In meerdere *Pelargonium*-soorten en -rassen is de ziekte moeilijk te herkennen. Bemonstering van symptoomloos materiaal is dé methode om de ziekte tijdig in de kraag te grijpen.

In het teeltseizoen 2010 zijn meerdere Nederlandse telers getroffen door *Xanthomonas*. Vanwege een koud voorjaar leek er in eerste instantie niets aan de hand. Ook na de eerste zonnestralen (en dus temperatuursverhoging) in maart ontstonden geen symptomen. Pas in de tweede helft van april tot ver in mei gingen reeds lang aangetaste planten hard onderuit. Het leek net of de ziekte er in één keer invloeg. Waarom is de *Pelargonium*teelt ineens zo laat verrast?

Een oude ziekte die weer eens op duikt. Dat zou niets bijzonders moeten zijn. Echter het leek erop dat de symptoomexpressie van *Xanthomonas* dit jaar anders is verlopen? Het eerste wat zichtbaar was, waren kleine necrotische vlekjes op het blad. De plant leek voor de rest nog volledig vitaal. Bij een teeltbedrijf is er wel eens vaker een necrotisch blaadje dus stelde men niet direct de vraag bij zichzelf of er iets aan de hand was. Toch bleek na determinatie dat in de necrotische vlekjes *Xanthomonas* (X.h.p.) aanwezig was. In meerdere gevallen kon de bacterie langere tijd niet in de vaatbundels worden aangetoond.

De vraag is hoe kon dit nu? Waarom waren een deel van de symptomen in het teeltseizoen 2009/2010 zo anders? Had dat te maken met het koude voorjaar waardoor de ziekte lang onopgemerkt bleef? Of heeft het pathogeen X.h.p. een verandering ondergaan? Zijn er in de loop van de jaren verschillende stammen ontstaan die verschillen in agressiviteit?

Het is van belang om te analyseren wat er is gebeurd in de praktijk. Omdat voor de aanpak van de zeer besmettelijk bacterieziekte *Xanthomonas* geen bestrijdingsmiddelen beschikbaar zijn, is 'systeemdenken' van belang. Hygiëne, gezonde stekken, het weren van hobbyplanten en bezoekers in de kas vormen de basis voor de preventie. Op het moment dat een ziekte zich ineens heel anders gaat gedragen, willen we weten hoe dat komt en hoe de praktijk zich daar in de toekomst tegen kan wapenen.

### 1.2 Onderzoeksplannen

Om de hypothese: "Heeft het pathogeen *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonium* een verandering ondergaan?" te onderzoeken, zal een genetisch onderzoek aan zowel oude als nieuwe isolaten van dit pathogeen worden uitgevoerd. De eerste stap in dit proces is het karakteriseren van de bacteriestammen met behulp van AFLP<sup>®</sup>. (Amplified fragment length polymorphism). De techniek is ontwikkeld en gepatenteerd door Keygene N.V. AFLP<sup>®</sup> is een identificatie techniek die voor elk individueel genotype een unieke DNA fingerprint (streepjescode) kan genereren. Omdat het voor deze techniek niet noodzakelijk is enige voorkennis over de DNA sequentie te hebben, is de techniek toe te passen op elk organisme. Wanneer isolaten van *Xanthomonas* voldoende genetisch stabiel zijn en wanneer er binnen de soort voldoende genetische diversiteit gevonden wordt (tussen isolaten uit verschillende soorten besmettingen) kan de AFLP worden ingezet bij tracking en tracing van infectie haarden en eventueel kan de bron van een infectie worden achterhaald. Voor andere bacterie ziektes zoals *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* in tomaat en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in kool zijn bij Naktuinbouw al uitgebreide AFLP databases aanwezig waarin de DNA profielen van honderden isolaten worden bewaard en die steeds aangevuld kunnen worden met nieuwe vondsten.

## 2. Plan van aanpak

### 2.1 Doelstelling(en) en afbakening

- Karakteriseren oude (< 2009) en nieuwe isolaten (teeltseizoen 2009/2010) van X.h.p. Oude isolaten zijn de ongeveer 100 isolaten die in de Naktuinbouw collectie aanwezig zijn. Alleen wanneer voldoende genetische diversiteit gevonden wordt tussen de isolaten, kan dit systeem worden aangewend voor track en trace doeleinden. Ook is het interessant te onderzoeken of de recente isolaten een gezamenlijke herkomst hebben of dat deze grote genetische diversiteit te zien geven.
- Onderzoeken of de herkomst van de verschillende isolaten mogelijk aan elkaar gelieerd is. In totaal zullen 32 geselecteerde isolaten worden onderzocht met 4 verschillende primer combinaties.

### 2.2 Te bereiken resultaten

- 32 Isolaten gekarakteriseerd.
- Eerste aanzet DNA-database *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*
- DNA profielen analyseren
- Statistische analyse van de DNA profielen
- Rapportage.

### 2.3 Plan van aanpak gespecificeerd per fase:

1. Vast stellen welke isolaten representatief zijn voor een goede proefopzet.
2. Maken reïnculturen van deze isolaten
3. AFLP<sup>®</sup> toepassen
4. Verslaglegging van resultaten

## 3. Resultaten

### 3.1 Selectie isolaten

Selectie van 32 oude en nieuwe isolaten uit de Naktuinbouw isolaten collectie:

Bij de selectie van isolaten is rekening gehouden met:

- jaartal van de vondst van het isolaat
- herkomst van het isolaat (land en/of bedrijf)
- soort en/of ras
- BOX-ERIC patronen (een simpele fingerprint methode) die destijds zijn gemaakt en die al een voorproefje geven van de te verwachte genetische verscheidenheid tussen de isolaten.

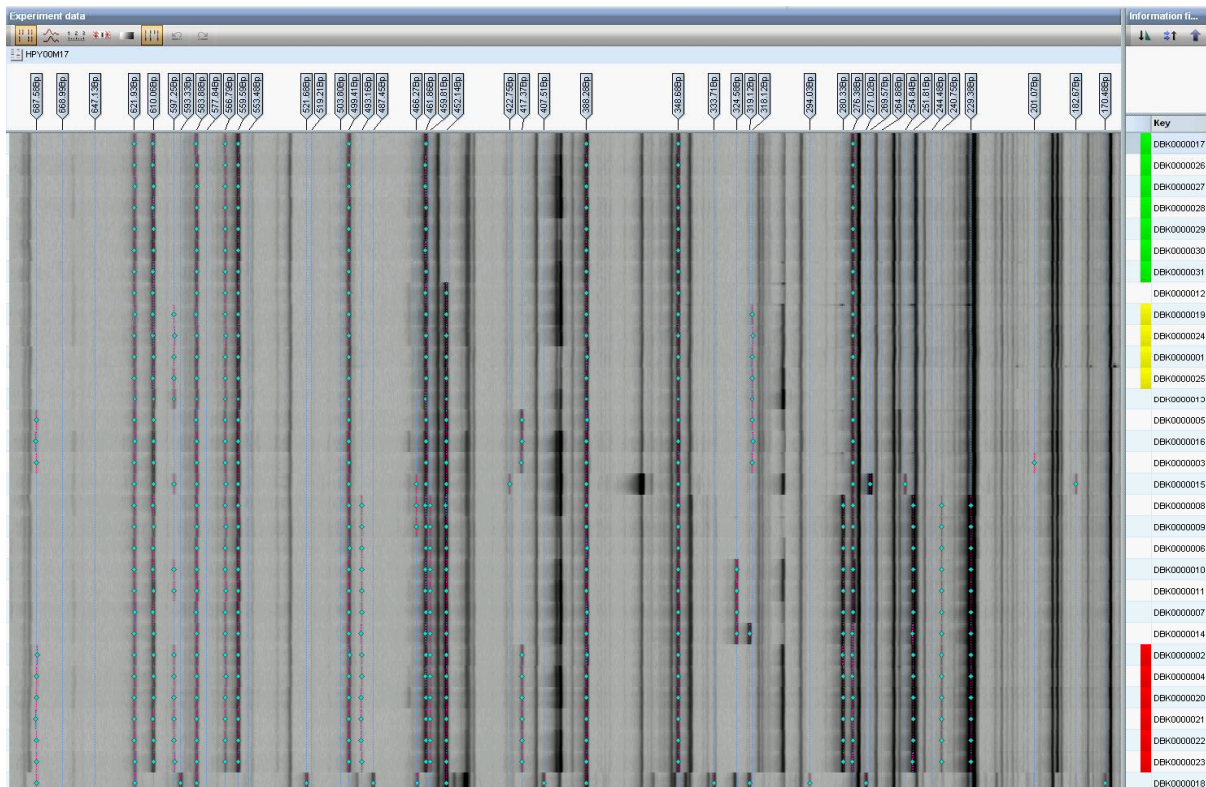
Er is geprobeerd de isolaten te kiezen die zoveel mogelijk variatie in bovengenoemde sectiecriteria vertonen. In verband met de vertrouwelijkheid van de onderzochte isolaten, zullen in deze rapportage alleen de soort en het jaartal van isolatie uit de plant worden weergegeven. Deze informatie voldoet echter om alle vragen over het verschil tussen de oude isolaten en de nieuwe isolaten met de nieuwe symptomen te beantwoorden. In bijlage 1 zijn alle te onderzoeken isolaten weergegeven.

Alle isolaten zijn vanuit de -80°C vriezer uitgeplaat. Een losliggende kolonie is aangeprikt en opgegroeid in vloeibaar medium zodat de cellen zich konden vermenigvuldigen. 2 milliliter bacteriekweek is gebruikt voor de DNA isolatie.

### 3.2 DNA analyse - Genereren van een merker data set

DNA is geëxtraheerd m.b.v. de Qiagen DNeasy blood and tissue kit. De kwaliteit van het DNA is gecontroleerd op een 1% agarose gel en de kwantiteit is gemeten aan de hand van een ijklijn. Een AFLP analyse is uitgevoerd met 2 enzym combinaties en 6 primer combinaties. Met deze 6 primercombinaties zijn fingerprints gegenereerd voor alle monsters. In Figuur 1 is een voorbeeld weergegeven van een gel met fingerprints voor alle isolaten. Een fingerprint bestaan uit zo'n 80-100 banden per gel voor elk isolaat. Sommige banden zijn in alle isolaten aanwezig. Het zijn juist de banden die in sommige isolaten aanwezig en in andere afwezig zijn die informatief zijn en die van belang zijn voor het bepalen van de genetische diversiteit. De fingerprints zijn geanalyseerd door die informatieve banden (merkers) te scoren op aan- en afwezigheid (dominante scoring). Eventuele twijfelgevallen zijn gescoord als onzeker en worden verder buiten beschouwing gelaten in de genetische afstandsanalyse. De scoring voor alle merkers is door een tweede persoon geverifieerd. In totaal zijn 266 merkers (polymorfe banden) gescoord. De analyses van de DNA fingerprints zijn uitgevoerd m.b.v. Bionumerics software van Applied Maths.

**Figuur 1:** Voorbeeld van een gel met AFLP fingerprints. De polymorfe DNA banden (=merkers) worden gescoord: aanwezig dan wel afwezig.



Het aantal merkers dat is gescoord per primer combinatie is te zien in Tabel 1.

**Tabel 1:** De gebruikte primer combinaties en de hoeveelheid merkers per PC.

PC	aantal merkers
HPY00M17	54
HPY00M18	44
HPY03M16	41
P00M01	37
P00M03	52
P00M04	38
<b>totaal</b>	<b>266</b>

### 3.3 DNA analyse - vergelijken van DNA profielen

Alle merker scores (op basis van aan- of afwezigheid van een bandje) voor alle monsters zijn verzameld in een data tabel. Om deze resultaten inzichtelijk te maken, is het gebruikelijk om deze te vertalen in een genetische afstandsanalyse door een clustering uit te voeren. De eerste stap in dit proces is het vervaardigen van een "similariteitsmatrix". De genetische similariteit (gelijkenis) is het percentage van de merkers dat overeenkomt tussen de 2 monsters die met elkaar worden vergeleken. Om een matrix te maken worden alle monsters met alle monsters vergeleken volgens een bepaald algoritme. De similariteit wordt uitgedrukt in een getal tussen 0 en 1. Er zijn verschillende algoritmes bekend maar voor de analyse van binaire data zoals de aan- en/of afwezigheid van merkers zijn de "Simple Matching", de "Jaccard" en de "Dice" coëfficiënten de meeste bekende en meest gebruikte. Omdat tijdens een clusteranalyse de oorspronkelijke data altijd worden gecomprimeerd, gebruiken we alle drie de bovengenoemde coëfficiënten. Verschillen in het eindresultaat als gevolg van het gebruikte algoritme worden hierdoor inzichtelijk. Voor het berekenen van de drie similariteitsmatrices wordt gebruik gemaakt van "Bionumerics" software van Applied Maths.

De tweede stap in het inzichtelijk maken van de data is het genereren van een dendrogram door een clusteranalyse uit te voeren m.b.v. UPGMA parameters (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic average). De individuen die het meest op elkaar lijken worden geclusterd en daarna wordt het individu erbij gezocht dat het meest lijkt op de *gemiddelde* waarde van de individuen in het cluster etc.

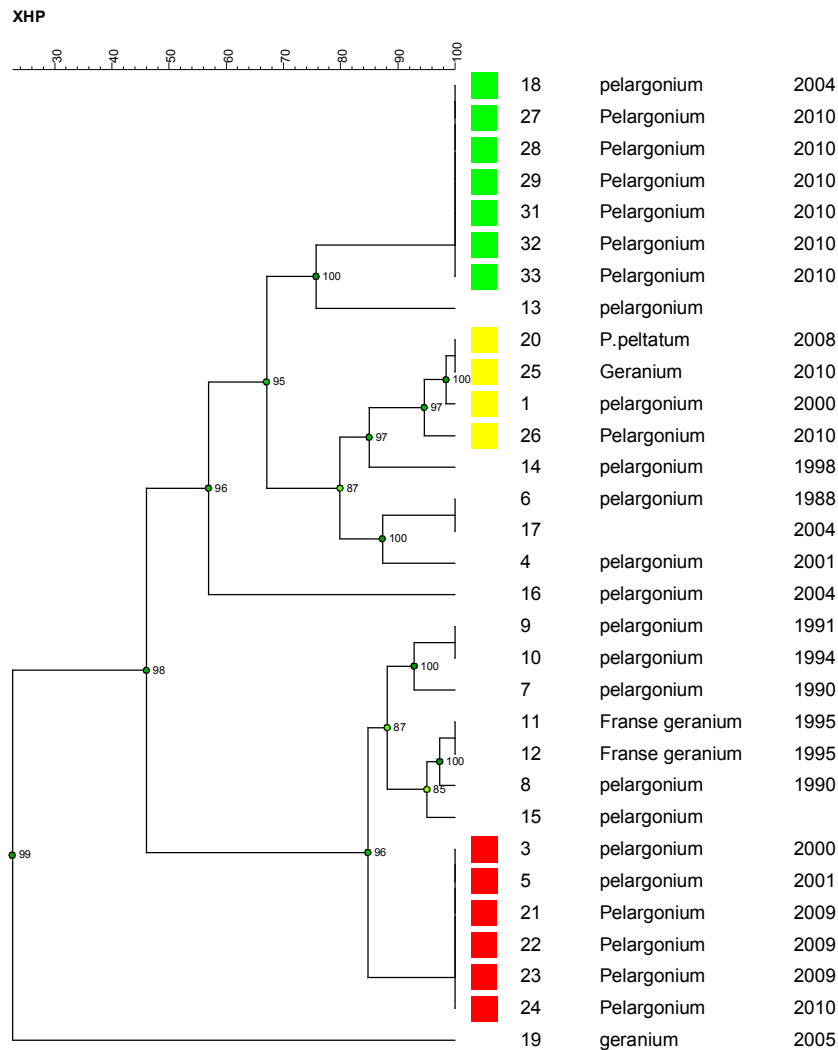
Er zijn drie clusteranalyses uitgevoerd, namelijk de "Dice", "Jaccard" en "Simple Matching" analyse. Het dendrogrammen gebaseerd op de "Jaccard" cluster analyse is gepresenteerd in Figuur 1. De dendrogrammen gebaseerd op de "Dice" en de "Simple Matching" clusteranalyse zijn vergelijkbaar en worden verder niet weergegeven in dit rapport.

Om te onderzoeken of de dendrogrammen goede representaties zijn van de similariteitsmatrices, zijn de zogenoemde "cophenetic value matrices" berekend. Een 'cophenetic value' matrix is opgebouwd uit waarden van similariteit die direct uit het dendrogram zijn afgeleid. Elke 'cophenetic value' matrix wordt vergeleken met de oorspronkelijke similariteitsmatrix die gebruikt is om het dendrogram te maken. Dit gebeurt door elke waarde, één voor één met elkaar te vergelijken. De zogenoemde "cophenetic correlatie" tussen de beide matrices wordt berekend. Deze 'cophenetic correlatie' is een indicatie voor hoe goed een dendrogram, of een vertakking in het dendrogram, de oorspronkelijke similariteit representeert. In het ideale geval zal deze 'cophenetic correlatie' de waarde 1 (of 100%) hebben. Omdat een dendrogram de oorspronkelijke dataset vereenvoudigd weergeeft, is het niet waarschijnlijk dat alle informatie juist wordt weergegeven. Er zijn soms meerdere equivalente oplossingen mogelijk. De computer kiest dan willekeurig één van de juiste oplossingen. Deze keuze heeft geen biologische relevantie. Dit resulteert in een lage 'cophenetic value'.

De 'cophenetic correlatie' voor elke vertakking in het dendrogram is in Figuur 2 weergegeven.



**Figuur 2:** Dendrogram (gebaseerd op 266 merkers) dat de genetische verwantschap/diversiteit tussen de isolaten schematisch weergeeft. Voor de berekening is er gebruik gemaakt van de 'Jaccard' similariteitscoëfficiënt en clusteranalyse m.b.v. UPGMA parameters.



Isolaat 34 is niet in het dendrogram te zien. De DNA profielen van dit isolaat waren zo afwijkend van alle andere isolaten dat het niet relevant was dit weer te geven in het dendrogram en daarom is het achterwege gelaten. Deze resultaten ondersteunen de gedachte die is ontstaan bij eerder onderzoek dat dit *Xanthomonas* isolaat geen *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* is.

Er zijn drie duidelijke clusters te zien van isolaten die identieke of zeer verwante DNA profielen hebben (zie kleurtjes).

## 4. Conclusies

- *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* is een belangrijke ziekte in met name *Pelargonium*
- In het teeltseizoen 2009/2010 waren de symptomen veel milder dan voorheen en is de ziekte pas veel later in het seizoen echt doorgebroken.
- Het is niet bekend of dit met de lang aanhoudende winter te maken had of verklaard kan worden door aanpassingen van de bacterie.
- 32 isolaten uit de collectie van Naktuinbouw zijn geanalyseerd m.b.v. de AFLP techniek.
- Deze isolaten hadden verschillende herkomst, verschillende waardplanten, waren afkomstig uit verschillende jaren. Daarom is de verwachting dat het hier om een heterogene selectie gaat.
- De AFLP analyses met 2 verschillende enzym combinaties en 6 primer combinaties leverde 266 merkers op. Dit zijn banden die in sommige isolaten aanwezig en in andere afwezig zijn.
- Deze 266 merkers waren de basis voor een genetische verwantschapsanalyse op basis van Jaccard clustering die is weergegeven in Figuur 1.
- Isolaat 34 is niet in het dendrogram te zien. De DNA profielen van dit isolaat waren zo afwijkend van alle andere isolaten dat het niet relevant was dit weer te geven in het dendrogram en daarom is het achterwege gelaten.
- Isolaat 19 is nu als een 'outgroup' te beschouwen. Dit isolaat is het meest genetisch divers ten opzichte van alle andere isolaten.
- Er zijn 3 clusters van isolaten te zien die identieke of zeer verwante isolaten bevatten. Deze clusters zijn weergegeven met rood, geel en groen.
- De isolaten die in teeltseizoen 2009-2010 voor veel problemen hebben gezorgd kunnen worden terugherleid naar 3 onafhankelijke infecties.
- Van alle 3 deze infectie waren er isolaten van eerdere datum in de Naktuinbouw database die identieke DNA profielen te zien gaven.
- Alleen het groene cluster correleert met de isolaten die de nieuwe, milde symptomen lieten zien en die verantwoordelijk waren voor de problemen in april van het teeltseizoen.
- Er is een isolaat uit 2004 dat identiek is aan de isolaten met de nieuwe symptomen. Er is van deze infectie uit 2004 niets bekend over de symptomen destijds.
- Het is duidelijk geworden alle isolaten die verantwoordelijk zijn voor de nieuwe symptomen, allemaal identiek zijn. Het gaat hier 1 en dezelfde stam van X.h.p.
- De algehele genetische diversiteit tussen de onderzochte isolaten was groot.
- Ook is gebleken dat de DNA profielen stabiel zijn in de tijd.
- Het voldoen aan de twee bovengenoemde voorwaarden maakt de AFLP een krachtig instrument voor tracking en tracing van infectiehaarden voor X.h.p.
- Er is een begin gemaakt met een DNA database voor deze bacterie.

## 5. Aanbevelingen

- Opzetten van een besmettingsproef met verschillende clusters om diverse vragen te beantwoorden die nu naar boven komen:
  - Hoe verspreiden de verschillende 'clusters' zich in de plant?
  - Welk ziekteverwekkend gedrag vertonen in de plant en welke symptomen horen daar bij?
  - Voldoet het huidige bemonsteringsprotocol? Of moet deze worden aangepast om alle clusters te ondervangen?
- Verder mondiaal uitbouwen van de DNA data base:
  - Bedrijven met Pelargonium telen wereldwijd plantmateriaal.
  - Voor 'track and trace' doeleinden
- Het analyseren van het hele genoom. Wanneer bekend is welk stukje van het totale DNA verantwoordelijk is voor de afwijkende symptomen kan die kennis bijdragen aan het ontwikkelen van een brede, robuuste en gevoelige detectietoets voor *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*.

## Bijlage 1 Gebruikte isolaten

AFLP nummer	soort	jaar	symptomen
1	Pelargonium	2000	oud
3	Pelargonium	2000	oud
4	Pelargonium	2001	oud
5	Pelargonium	2001	oud
6	Pelargonium	1988	oud
7	Pelargonium	1990	oud
8	Pelargonium	1990	oud
9	Pelargonium	1991	oud
10	Pelargonium	1994	oud
11	Pelargonium grandiflorum	1995	oud
12	Pelargonium grandiflorum	1995	oud
13	Pelargonium		oud
14	Pelargonium	1998	oud
15	Pelargonium		oud
16	Pelargonium	2004	oud
17	Pelargonium	2004	oud
18	Pelargonium	2004	oud
19	Geranium	2005	oud
20	Pelargonium peltatum	2008	oud
21	Pelargonium	2009	oud
22	Pelargonium	2009	oud
23	Pelargonium	2009	oud
24	Pelargonium	2010	oud
25	Geranium	2010	oud
26	Pelargonium	2010	oud
27	Pelargonium	2010	nieuw
28	Pelargonium	2010	nieuw
29	Pelargonium	2010	nieuw
31	Pelargonium	2010	nieuw
32	Pelargonium	2010	nieuw
33	Pelargonium	2010	nieuw
34	Geranium	2010	Afwijkend