

# Pilot toetsing op Erwinia in hyacint

Evaluatie van toetsing op agressief snot bij de NAK

Joop van Doorn, Peter Vreeburg en Wendy Martin

© 2010 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving / Plant Research International, Business Unit BBF

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

Dit is een vertrouwelijk document, uitsluitend bedoeld voor intern gebruik binnen PPO dan wel met toestemming door derden. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermenigvuldigd of verspreid voor extern gebruik.



PPO - Projectnummer: 32 340960 00

PT - Projectnummer: PT 13771

#### Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252-462121

Fax : 0252-462100

E-mail : [infobollen.ppo@wur.nl](mailto:infobollen.ppo@wur.nl)

Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING .....	7
1.1 Doelstelling en plan van aanpak .....	8
2 MATERIALEN EN METHODEN.....	11
Gang van zaken .....	11
2.1 Lokalisatie-onderzoek.....	11
2.2 Stresstoets PPO .....	12
2.3 Laboratoriumtoetsen van de NAK: ELISA en BioPlex .....	13
2.4 PCR-toetsen op <i>Erwinia</i> bij PPO .....	14
3 RESULTATEN .....	15
3.1 Eigenschappen van de geleverde partijen hyacinten.....	15
3.2 Lokalisatie van <i>Dickeya</i> in de bol.....	15
3.3 Resultaten van de stresstoets.....	17
3.4 Resultaten van de laboratoriumtoetsen van de NAK .....	18
4 CONCLUSIES EN DISCUSSIE .....	23
5 COMMUNICATIE.....	27
6 LITERATUUR.....	29
7 BIJLAGEN.....	31



# Samenvatting

De handel in hyacint loopt de laatste jaren ernstige schade op door leeglopende partijen door vooral agressief snot. Dit wordt veroorzaakt door de bacterie *Erwinia chrysanthemi*, tegenwoordig opnieuw geclassificeerd tot een 6-tal *Dickeya*-soorten. Er zijn verschillende typen toetsen bekend om agressief snot aan te tonen, maar een snelle, betrouwbare en specifieke laboratoriumtoets voor analyse van grotere aantallen partijen hyacintenbollen is nog niet beschikbaar. Vooral bij werkbollen kan door intensieve controle op speciaal *Dickeya* de kans op snotverspreiding via vermeerdering sterk worden verminderd. Ook de export kan profiteren door met gevalideerde toetsen op *Dickeya* te zorgen voor borging van de kwaliteit van partijen hyacinten.

Witsnot (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, tegenwoordig *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) wordt ook aangetroffen in partijen hyacinten, maar is bijna altijd veel minder schadelijk. De NAK te Emmeloord heeft ervaring met het op grote schaal toetsen van partijen pootaardappelen via laboratoriumtoetsen op *Dickeya*-soorten en schadelijke *Pectobacterium*-stammen. Dit wordt routinematig uitgevoerd met behulp van antiserum (ELISA), maar nu vooral met DNA-technieken (een zgn. multiplex real-time PCR (BioPlex)). Deze DNA-toets wordt uitgevoerd op het te toetsen aardappelmateriaal na drie dagen verrijking in een voor *Dickeya* en *Pectobacterium* gunstig groeimedium. Deze toetsen zijn gevalideerd en betrouwbaar.

Om de hyacintentelers- en export van dienst te kunnen zijn, is PPO om de tafel gegaan met de NAK (Nederlandse Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van Landbouwgewassen) om te zien wat mogelijk is op het gebied van grootschalige toetsing op *Dickeya* in hyacint.

Het doel van dit project was om vast te stellen, of de toetsen op *Dickeya* van de NAK, en vooral de DNA-toets, toepasbaar zijn op *Dickeya* in hyacint. In samenwerking met BKD, CNB en HOBAHO zijn werkplannen gemaakt om partijen hyacinten op verschillende wijzen te toetsen op agressief snot.

Steekproeven van 200 hyacintenbollen uit 21 verschillende partijen hyacintenbollen uit Frankrijk en Nederland (leverbaar, juni-juli 2009) en 23 partijen bestaande uit voornamelijk werkbollen (september 2009) zijn getoetst met de NAK laboratoriumtoets (ELISA en real-time PCR). Als aanvulling hierop is door PPO een stresstoets uitgevoerd op 50 of 100 bollen van dezelfde partij om ook de mate van besmetting vast te stellen. Daarnaast zijn voor verdere toetsingsoptimalisatie lokalisatie-experimenten aan hyacintenbollen uitgevoerd door de BKD om te zien waar en met welke hoeveelheden bolmateriaal een toets optimaal uitgevoerd kan worden. Ten slotte zijn de achtergrondgegevens van de verschillende partijen hyacinten (herkomst, kwaliteitsinschatting op agressief snot) verstrekt door de HOBAHO en de CNB, en naast de toetsgegevens gelegd als referentiekader.

Bevestigd is dat de bemonstering van hyacintenbollen het beste kan worden uitgevoerd door ongeveer 300 milligram bolmateriaal van zowel neus als bolbodem te nemen, deze te poolen en te gebruiken voor toetsing na verrijking in een speciaal groeimedium. In hyacint zijn de soorten *D. solani* en *D. dadantii* aangetoond via aanvullende real-time PCRs.

De resultaten van de laboratoriumtoetsing van de NAK en de achtergrondgegevens van de verschillende partijen kwamen voor 95 tot 100% overeen. De correlatie tussen de gegevens betreffende partijhistorie en stresstoets was redelijk (75%) wanneer de hyacintenbollen na stressbehandeling bij 30°C werd geïncubeerd, maar veel slechter (47%) in het geval dat bij 38°C werd bewaard. De stresstoets bij 38°C gaf meestal te veel rottende bollen, mogelijk als gevolg van de hoge temperatuur en daardoor andere rotveroorzakende bacteriën. In de eerste 20 monsters werd meestal te weinig aangetoond, wat een gevolg geweest kan zijn van het geringere aantal bollen wat voor de stresstoets is gebruikt. In een enkel geval werd door beide toetsen geen besmetting gevonden terwijl die op grond van informatie over de partij er wel zou moeten zijn. Het nemen van een representatief monster uit een partij is belangrijk gezien de ervaring dat delen van partijen hyacinten vrij kunnen zijn van besmetting.

In de experimenten zijn ook partijen gevonden (vooral werkbollen) die vrij waren van *Dickeya*, wat de hoop geeft dat door toetsing en uitgaan van gezonde bollen een gezonde start gemaakt kan worden van de hyacintenteelt. De toets door de NAK lijkt voor dit doel zeer geschikt te zijn.

Door de NAK wordt in 2010 een toets op *Dickeya* aangeboden. De benodigde tijd voor uitvoering van de laboratoriumtoetsing vanaf het moment van aanlevering tot toetsuitslag is 7 dagen.

De kosten zijn 360€ per 200 hyacintenbollen. Bij een besmette partij van 1% levert dit een betrouwbaarheid op van het aantonen van *Dickeya* van ongeveer 87%; bij een minder besmette partij moeten meer bollen getoetst worden voor een vergelijkbare betrouwbaarheid. Gezien de gunstige resultaten bij hyacint liggen hier mogelijk ook perspectieven voor andere bolgewassen met snotproblemen.

# 1 Inleiding

Agressief snot en (in mindere mate) witsnot vormen een belangrijk kwaliteitsprobleem in vooral hyacint. Vooral het zonder symptomen in de bol aanwezig zijn (latent), en het explosief leeglopen in de keten (bewaring, verpakking) maakt het probleem erg lastig aanpakbaar. Agressief snot wordt veroorzaakt door *Erwinia chrysanthemi*, tegenwoordig *Dickeya* genoemd; het oude witsnot (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) is gereclassificeerd tot *Pectobacterium carotovorum* susp. *carotovorum* (Tabel 1). In dit verslag spreken we van *Dickeya* als agressief snot/*Erwinia chrysanthemi* wordt bedoeld; witsnot/*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* wordt nu aangeduid met *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Tabel 1. De verschillende benamingen van de *Erwinia*-soorten, aangetroffen in bloembollen en aardappel

<b>Erwinia-soort</b>	<b>In hyacint</b>	<b>In poot-) aardappel</b>
<b><i>Pectobacterium atrosepticum</i></b> (voorheen <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atrosepticum</i> )	nee	ja
<b><i>Dickeya</i>-soorten (agressief snot)</b> (voorheen <i>E. chrysanthemi</i> ):	- <i>D. dianthicola</i> - <i>D. solani</i> - <i>D. dadantii</i> *	- <i>D. dianthicola</i> - <i>D. solani</i> nee
<b><i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i></b> ( witsnot) (voorheen <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> )	Ja, maar andere pathogene stammen dan in aardappel	Ja, maar andere pathogene stammen dan in hyacint

\* *Slawiak et al. 2009.*

Momenteel is de gangbare theorie, dat *Dickeya* enerzijds via versmering tijdens de keten, maar anderzijds via het uitgangsmateriaal (partijgebonden en latent) aanwezig is in partijen hyacinten. Versmering is door hygiënische maatregelen en verwerkingsadviezen vrij goed te voorkomen. Gezond uitgangsmateriaal (*Dickeya*-vrije werkbollen) is daarnaast van zeer groot belang om te kunnen vermeerderen zonder *Dickeya* mee te nemen. Hiervoor zijn goede toetsen nodig. Hier is een start gemaakt binnen het project Protocollering toetsen (PT 13061, Van Doorn et al. 2009). Binnen dit project is getest in hoeverre PCR en ELISA toepasbaar zijn op bolgewassen als hyacint, Zantedeschia, Muscari, Dahlia en iris. Voor deze gewassen is een toetsprotocol ontwikkeld. Dit bestaat uit een bemonsteringstap (schoonmaken, selectief een stukje uit neus en bolbodem nemen, poolen van deze monsters, fijnmaken), een voorkweekstap (kweken van eventuele *Erwinia*'s in een medium met pectine) en een toetsingstap (geconcentreerd voorkweekmonster in ELISA of, na DNA-zuivering, in PCR). Van toepassing voor grootschalige toetsing was nog geen sprake; hiervoor zou ook een andere infrastructuur nodig zijn. Er resteerden dus nog een aantal vragen.

Het bloembollenvak (vooral de deelsector hyacint) was sterk geïnteresseerd in de mogelijkheid tot routinematige toetsing van bollen op *Erwinia*'s voor het verkrijgen van informatie over de kwaliteit (*Erwinia*-vrij) van partijen bollen of werkbollen. In de enquête van PPO (Deltaplan C, PT project 13374) gaven de respondenten (hyacintentelers) aan zeker gebruik te willen maken van toetsen voor in het bijzonder werkbollen en uitgangsmateriaal, maar ook voor aankooppartijen.

Voor toepassing van een toets in de praktijk door hyacintentelers en exporteurs moest voldoende capaciteit en high throughput zijn om binnen een korte tijd (bv. een week) een uitslag over de aanwezigheid van *Dickeya* in een aantal monsters (hyacintenbollen) te kunnen geven. Verder zou het valideren van de toets en het voorkomen van vals negatieven/vals positieven door het toetsen van nieuwe praktijkmonsters en onderzoek naar en het gebruik van een interne controle in de PCR en verwerking gestalte moeten krijgen. Dit zou binnen deze routinetoets moeten liggen.

Lokalisatie van *Erwinia* in de bol/knol was van groot belang voor routinematige toetsen. Gevonden is dat dit meestal in de neus of in de bolbodem zit. Een verfijning van de lokalisatie is wenselijk voor een betrouwbare routinematige toetsing. Dit is van belang om via gerichte bemonstering de hoeveelheid te testen

bolmateriaal te kunnen verminderen.

Onderzoek naar alternatieven voor verwerking van het bolsap zou welkom zijn. Door verdunning is dit maar deels "oplosbaar" zoals gebleken is uit eerder onderzoek. Hier zal onderzoek naar uitgevoerd worden binnen een FES-project per ceel "extractie moeilijke substraten". Vereenvoudigen van het DNA-isolatie-protocol en gebruik van de Kingfisher (een apparaat voor semi-geautomatiseerde nucleïnezuurisolatie) voor standaardisering en opschaling van de DNA-isolatie zullen enkele van de te onderzoeken mogelijkheden zijn. Het opsporen van bacteriesoorten en identificatie van bacteriesoorten die ook rot kunnen veroorzaken en mogelijk vergelijkbare symptomen veroorzaken zal binnen het Deltaplan C-project (PPO 3234071100) liggen. Tot op heden werden enkele *Pseudomonas*-soorten en een *Bacillus*-soort gevonden die ook pectinolytische activiteit (en dus mogelijkheden tot veroorzaken van snot) gevonden.

De overdracht en ombouw naar een routinematige, grootschalige en betrouwbare toets is een volgende stap. Daar de BKD momenteel over onvoldoende laboratoriumcapaciteit beschikt en mogelijkheden om zich uitgebreid met bacterieziekten bezig te houden, is, in overleg met PPO, samenwerking gezocht met de NAK te Emmeloord. In de pootaardappelsector speelt een vergelijkbaar probleem; hier keurt de NAK op verzoek (poot-) aardappelen o.a. op *Dickeya* en *Pectobacterium carotovorum*/*Pectobacterium atrosepticum* welke stengelnatrot en zwartbenigheid veroorzaken.

Deze keuringsdienst beschikt niet alleen over een aanzienlijke capaciteit om routinematig zowel ELISA- als DNA-toetsen uit te voeren, maar ook over een jarenlange kennis en ervaring met *Dickeya* en *Pectobacterium*.

Uitgezocht moet nu worden in een experimentele pilot of *Dickeya* goed aantoonbaar is in de door de NAK toegepaste procedures. Hiertoe zullen een (groot) aantal partijen hyacinten moeten worden getoetst. Bij succes krijgt de hyacintenbranche (en misschien later ook andere bolgewassen) een goede mogelijkheid tot het inperken van het agressief snotprobleem.

In verband met capaciteitsproblemen en de aanwezige kennis van toetsing op bacteriemonsters in aardappel is, in goed overleg tussen PPO, BKD en NAK voorgesteld om de toets te laten uitvoeren bij de NAK te Emmeloord. Een aanpassing zal mogelijk zijn dat de NAK een zelfontwikkelde (real-time) multiplex PCR zal gebruiken: de BioPlex toets (De Haan *et al.* 2009) naast een standaard ELISA met antiserum dat *E. chrysanthemi* (*Dickeya* spp.) herkent: beide gevalideerde en betrouwbare toetsen.

## 1.1 Doelstelling en plan van aanpak

Het doel van dit eenjarige project was om te testen, of een door de NAK ontwikkelde laboratoriumtoets op *Dickeya* spp. (een zgn. BioPlex DNA-toets, ondersteund door een ELISA, zie hoofdstuk 2) geschikt is om in hyacintenbollen, verdacht van agressief snot, *Dickeya* aan te tonen.

Plan van aanpak:

A. PPO-protocol voor bewerking hyacint verder uitwerken en omzetten naar NAK-protocol (mei-juni 2009). Dit gebeurt in nauw overleg tussen onderzoekers van PPO en NAK. Hieruit komt een voor de NAK werkbaar voorschrift in combinatie met hun eigen protocollen; hieruit is voortgekomen de bemonsteringsmethode op bolneus en bolbodem.

B. Aanlevering 20 partijen van 300 hyacintenbollen van verschillende herkomst, verschillende cultivars en verschillende mate van gezondheid (zowel verwachte gezonde partijen als partijen met verwacht *Erwinia*) aan PPO en NAK (juni 2009); dit wordt herhaald (september 2009) met werkbollen: eveneens 20 partijen. De grootte van een partij is minimaal 300 bollen. Uiteindelijk zijn in totaal 63 partijen hyacinten getoetst; meestal zijn 300 bollen als partij aangeleverd door de handelshuizen.

C. Per partij wordt een deel gebruikt voor toetsing door de NAK (200 stuks); een deel wordt gebruikt worden in zgn. stresstoetsing op PPO (volgens protocol uit PT project 13373, Praktijkttoets snot in hyacint) en een deel wordt gebruikt voor lokalisatieonderzoek door de BKD. Een deel wordt ten slotte bewaard ter controle en eventuele extra toetsing (PPO).

Indien mogelijk worden partijen bollen gebruikt waarmee bijvoorbeeld ook in andere projecten ervaring wordt opgebouwd tav. de besmetting met *Dickeya* (praktijkttoetsing, Deltaplan *Erwinia* en door bedrijven betaald onderzoek (bv. via vouchers). Hierdoor is het beeld van de partij betrouwbaarder en kan de uitslag



van de toets beter worden beoordeeld.

D. Levering van en informatie over de kwaliteit van de geleverde partijen hyacintenbollen. Uitvoerders en tevens leveranciers zijn de handelshuizen CNB en HOBACH.

Verder worden zo veel mogelijk *Dickeya*isolaten verzameld (PPO) uit de hyacintenpartijen als referentiemateriaal en controles op de efficiëntie van de toetsing.



## 2 Materialen en Methoden

### Gang van zaken

Na de startbijeenkomst in april 2009 met de betrokken partijen (NAK, BKD, CNB, HOBAHO en PPO) werd afgesproken, dat de handelsbedrijven HOBAHO en CNB gezonde en verdachte/zieke partijen hyacinten, besmet met hoogstwaarschijnlijk *Dickeya*, zullen afleveren bij PPO. De handelshuizen HOBAHO en CNB hebben elk 5 gezonde en 5 zieke partijen van 350-400 hyacintenbollen uit Frankrijk in juli 2009 afgeleverd. Verder zijn nog eens 10 Nederlandse partijen hyacinten geleverd van 350-400 stuks waaronder zeker 3 tot 4 van agressief rot verdachte partijen. CNB en HOBAHO hebben onderling geregeld dat niet dezelfde partijen worden aangeleverd.

Dit zou plaatsvinden na het rooien (juni-juli). Gestart zal worden met 10 partijen leverbaar van Nederlandse herkomst, maar een jaar in Frankrijk geteeld omdat deze eerder gerooid kunnen worden dan de Nederlandse bollen. Daarna zouden 10 partijen leverbaar uit Nederland volgen.

Voor 15 september zijn ruim 20 partijen werkbollen, elk van 400 stuks geleverd door CNB en HOBAHO. Deze derde leverantie betrof hyacintenbollen van na de heetstook; dit waren voornamelijk werkbollen (eveneens ongeveer 20 partijen bollen van verschillende herkomst en cultivar).

PPO heeft deze partijen bollen verdeeld:

- a. Een deel ging naar de BKD (25 bollen per partij) voor uitvoering van lokalisatie-experimenten op boldelen om de vraag te beantwoorden waar *Dickeya* zich bevindt in de bol (zie 2.1).
- b. De NAK ontving voor laboratoriumtoetsing 200 bollen van elke partij voor laboratoriumtoetsen (BioPlex en ELISA) (zie 2.3).
- c. Het restant (100 bollen) wordt gebruikt door PPO voor een stresstoets (zie 2.2) en (steekproefsgewijs) een standaard PCR-toets en isolatie van *Erwinia*-bacteriën.

### 2.1 Lokalisatie-onderzoek

Het doel van dit projectonderdeel was om te lokaliseren waar *Dickeya* zich het meest in besmette bollen bevindt. Via bemonstering van bolneus, bolbodan en bolrokken uit een aantal partijen die ook in de stresstoets en laboratoriumtoets zijn getest, is dan vast te stellen of optimalisatie (betere trefkans) op detectie van *Dickeya* mogelijk is.

Hiertoe zijn 10 partijen van 25 bollen van diverse herkomsten onderzocht door de BKD; daarnaast zijn enkele partijnummers die de meeste kans gaven op het aantreffen van (latent met *Dickeya*) besmette bollen onderzocht op lokalisatie van *Dickeya*. Dit betrof partij 6 en 12 (zie Tabel 3). In detail:

- 8 bollen zijn per stuk getoetst
- per bol is zowel de neus als de bodan bemonsterd (Fig.1).
- per bemonsteringsplaats is ca. 8-10 gram bolmateriaal uitgesneden voor onderzoek

Bij 2 partijen (nr. 8 en 12, zie Tabel 3) van 25 bollen van diverse herkomsten:

- 18 bollen zijn per stuk getoetst
- per bol is zowel de neus als de bodan bemonsterd
- ook zijn de rokken (van buiten naar binnen) uitgesneden en apart behandeld.
- per bol zijn van deze twee partijen de diverse rokken van de neus en de bodan apart getoetst. In totaal zijn 8 PCR reacties per bol uitgevoerd.

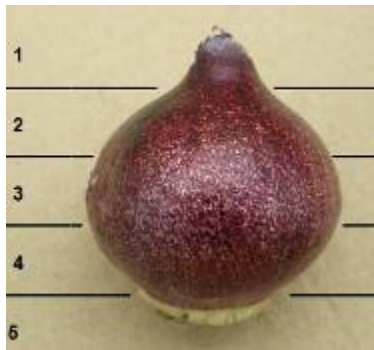


Fig. 1. Voorbeeld van een hyacintenbol waarvan de neus (1) en de bolbodem (5) voor routinematige toetsing zijn bemonsterd.

Gebruikte methoden voor detectie van *Dickeya*:

- DNA extractie: Qiagen DNeasy Plant Mini Kit
- PCR: de primers voor toetsing op *Dickeya* en generieke (algemene) toetsing op *Erwinia* spp., naast toetsing op *Pseudomonas* spp. zijn vermeld in Tabel 2. Per bol is de neus en de bodem apart getoetst. In totaal zijn 16 PCR reacties per monster uitgevoerd. 8 bollen ( 1 neus+1 bodem). PCR na voorkweek: volgens voorschrift (Van Doorn et al. 2009).
- Elisa: *Dickeya* spp. (PRI antiserum) volgens standaard protocol (Van Doorn et al. 2009).

## 2.2 Stresstoets PPO

Door hyacintenbollen stress te geven via mechanische en fysische methodieken is gevonden dat hyacintenbollen versneld snotsymptomen (veroorzaakt door *Erwinia*) laten zien (Van Doorn et al. 2009). Binnen het PT-project Praktijktuetsen rot, snot en bolrot (PT project 13373) gaven de onderzoeksresultaten uit 2008/2009 aan, dat driemaal sorteren van in plastic ingepakte hyacintenbollen, (Fig.2A) gevolgd door incubatie bij 30°C binnen 5-10 dagen na het sorteren symptomen zoals leeglopen zichtbaar worden. Voor de hyacintenbolmonsters in september 2009 is het stressprotocol aangepast door de bewaartemperatuur te verhogen naar 38°C, omdat dit in ander onderzoek (Praktijktuetsen rot, snot en bolrot) meer snot zichtbaar maakte. Echter, in deze tweede serie stresstoetsen bleek 38°C mogelijk (veel) te hoge percentages snot op te leveren (zie 3.3).

Het gebruikte protocol:

- individuele bollen worden in een plastic zakje verpakt (Fig. 2A); op het oog gezonde bollen werden hiervoor gebruikt
- mechanische stress: 3 x sorteren van de ingepakte bollen over de sorteermachine met 8 sorteerplaten (Fig. 2B) gevolgd door opvangen in een gaasbak
- bij de testen in juni en juli 2009 zijn 50 bollen gebruikt; bij de test in september 2009 zijn 100 bollen gebruikt
- bewaring na sorteren: - in juni/juli 2009 12 dagen bij 30°C en beoordeling na 6 en 12 dagen  
- in september is bij 5 dagen 38°C en daarna bij 30°C; beoordeling na 7 en 14 dagen
- beoordelen op versnotting/zachtworden: visueel
- materiaal van bollen werd apart verzameld voor PCR-controle op *Pectobacterium/Dickeya* via PCR (zie 2.4).



## 2.3 Laboratoriumtoetsen van de NAK: ELISA en BioPlex

De NAK heeft enkele gevalideerde toetsen op *Erwinia*'s in de pootaardappelen ontwikkeld (De Haan 2009). Normaliter wordt navelmateriaal van (poot-) aardappelen getoetst. De toets bestaat uit een ELISA op *Dickeya* spp. en een DNA-toets die meerdere soorten en groepen *Erwinia* kan aantonen na een voorkweekstap van 3 dagen: de BioPlex. Later is gebleken dat de NAK is afgestapt van de ELISA, daar in enkele gevallen kruisreactie met het antiserum met andere bacteriën kan optreden (persoonlijke mededeling NAK). Verdere gegevens zijn vertrouwelijk en in handen van de NAK.

### Materiaal:

- 33 partijen van 200 bollen van diverse herkomsten (zie Tabel 4 en 5).
- bollen zijn per 10 stuks samengevoegd voor onderzoek (poolen van monsters)
- per bol is zowel de top (eindknop) als de bodem (bolschijf) bemonsterd
- per bemonsteringsplaats is ca. 300 mg. bolmateriaal uitgesneden voor onderzoek (totaal 600mg. per bol); per 10 bollen is dus ca. 6 gram materiaal onderzocht
- dit materiaal is 3 dagen in zgn. verrijkingsmedium geïncubeerd om aanwezige *Dickeya* te laten groeien voor DNA-extractie.

### Methoden:

- DNA extractie van bacteriën: geautomatiseerd via een apparaat (KingFisher 96)
- BioPlex PCR: multiplex real-time PCR specifiek voor respectievelijk *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Dickeya* spp., virulente (aardappel-) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* en een generieke detectie (GEN) op de *Erwinia*-groep (spp.) (De Haan 2009).
- ELISA: *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Dickeya* spp. Volgens voorschrift van de NAK (vertrouwelijk).

## 2.4 PCR-toetsen op *Erwinia* bij PPO

Er zijn 10-20 monsters uit de stresstoets (zie 2.2) getoetst op de aanwezigheid van *Pectobacterium* of *Dickeya*. Dit is uitgevoerd middels standaard PCR met primers, specifiek voor de *Pectobacterium*-groep (= *P. atrosepticum* en *carotovorum* subsp. *carotovorum*) resp. voor de *Dickeya*-groep (*E. chrysanthemi*) (Tabel 2). Dit betrof controlemonsters (bevestiging op aanwezigheid of afwezigheid van *Dickeya* of *Pectobacterium* in monsters van hyacintenbollen).

Methode: de primers hiervoor zijn beschreven in Tabel 2; de uitvoering ging zoals beschreven in "Protocollering van toetsen op *Erwinia*, PT rapport 13061" (Van Doorn et al. 2009).

Extra is getoetst op *Pseudomonas* spp., daar deze ook pectinolytische activiteit vertonen, en in principe ook rot kunnen veroorzaken. Deze primers zijn gebaseerd op het *Pel*-gen van *Pseudomonas*; de BKD heeft deze primers ook gebruikt.

Isolatie van bacteriën uit monsters: in een aantal gevallen dat de PCRs negatief waren voor *Dickeya* of *Pectobacterium*, maar er wel rotsymptomen waren, zijn isolaties uitgevoerd, bacteriën reingestroken en geïsoleerd.

Tabel 2. Gebruikte primers voor PCR op *Dickeya* spp en *Pectobacterium carotovorum* subspp.

<b><i>Erwinia</i>-soort</b>	<b>primerset</b>	<b>Amplicon-grootte</b>	<b>Referentie literatuur</b>
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Y1/Y2	434 bp	Nasser <i>et al.</i> 1996
<i>Dickeya</i> spp.	ADE1/ADE2	420 bp	Darasse <i>et al.</i> 1994
<i>Pseudomonas</i> spp.	PsPelFor/PsPelRev	584 bp	Van Leeuwen <i>et al.</i> 2009)

## 3 Resultaten

### 3.1 Eigenschappen van de geleverde partijen hyacinten

Door de HOBAGO en CNB werden begin juni 2009 partijen hyacinten uit Frankrijk aangeleverd; daarna volgde hyacintenpartijen uit Nederland. Eind september is vooral plantgoed voor werkbollenteelt aangeleverd. Er zijn in totaal 43 partijen aangeleverd waarvan twee extra (nr. 61 en 62). Aan de partijen 58 t/m 62 (Tabel 5) zijn geen stresstoetsen uitgevoerd; de partijen 55 t/m 57 waren van dezelfde oorsprong als nr. 58. De historie van deze partijen werd omschreven als goed (geen uitval door agressief snot bekend), matig (beperkt aantasting wat betreft snot gezien) of slecht (veel aantasting in de partij dit jaar of vorig jaar gezien). In een enkel geval (partij 9, cv. Purple Sensation, Tabel 3) was de status van de partij onbekend. Deze gegevens betreffende de eigenschappen betreffende gezondheid zijn terug te vinden in Tabel 4 en 5. De beoordeling van de partijen op grond van hun eigenschappen is als standaard genomen voor de beoordeling van de stress- en laboratoriumtoetsen van de NAK.

Opvallend was, dat de gegevens over de historie en kwaliteit van de partijen in slechts 1 geval niet overeenstemde met de laboratoriumtoetsen van de NAK: partij 37 (White Pearl) werd aangemerkt door het handelshuis als een slechte partij. Echter, noch met de stresstoets, noch met de laboratoriumtoetsen van de NAK werd *Dickeya* of *Pectobacterium* vastgesteld. Ook bij natoetsen werd geen snot vastgesteld. Mogelijk ging het hier om een andere afwijking dan agressief snot. De gegevens van de partijen hyacinten, zoals aangeleverd door HOBAGO en CNB, zijn gebruikt als referentiekader om te zien of de toetsen in overeenstemming waren met de ingeschatte kwaliteit.

### 3.2 Lokalisatie van *Dickeya* in de bol

Van 7 verschillende partijen hyacintenbollen (nr. 5-10, plus partij 12) zijn monsters genomen van zowel de neus als de bolbodem. Hier werd ongeveer 8-10 gram van zowel de neus als de bodem gesneden. In totaal zijn 16 PCR-reacties per bol uitgevoerd; per partij 8 bollen van de 25 door PPO aangeleverde hyacintenbollen. Als extra controle is een ELISA uitgevoerd met antiserum afkomstig van PRIME Diagnostics (Wageningen).

In Tabel 3 is in de geelgemerkte kolom weergegeven of er *Dickeya* is aangetroffen. In een aantal gevallen (monsters van hyacintenpartij 12) zijn ook van de vier buitenste rokken monsters getoetst. Hier werd met PCR geen positief signaal gevonden wat op *Dickeya* zou kunnen duiden. Echter, dit is niet uitputtend uitgezocht; niet alle aangeleverde partijen hyacint zijn uitgebreid onderzocht. Indien positief voor *Dickeya* werd in zowel de bolneus als bolbodem *Dickeya* aangetroffen (Tabel 3). De gegevens omtrent de lokalisatie en dus aanwezigheid van *Dickeya* kwamen goed overeen met de scores van de stresstoets en de lab-toets van de NAK (Tabel 3: partij-nrs. 5-8, 10 en 12). De analyses werden gedaan via PCR. In een aantal gevallen waren er problemen met de PCR; aan de tweede serie hyacintenbollen (Tabel 5) zijn door de BKD geen lokalisatie-experimenten meer uitgevoerd.

In de uitgevoerde analyses kwam naar voren, dat zowel de neus als de bolbodem de plekken zijn waarin *Dickeya* is aangetroffen. In de rokken werd feitelijk geen *Dickeya* aangetroffen. Het ontwikkelde protocol van PPO (van Doorn et al. 2009) lijkt hiermee bevestigd. De NAK heeft voor zijn laboratoriumtoetsen eveneens van 10 monsters gepoolde stukjes van zowel neus als bolbodem gebruikt om voorkweekmedium mee te enten om selectief *Dickeya* te kweken.

Aan partij 12 (Carnegie) is specifiek naar de lokalisatie van *Dickeya* gekeken vanwege het hoge percentage *Dickeya*; zowel de handelshuizen als PPO en NAK vonden hoge percentages besmetting met *Dickeya*. Echter, in 24 van de 25 getoetste hyacintenbollen werd geen *Dickeya* aangetoond. In de PCR-reacties werd wel een DNA-band van ongeveer 558 bp aangetroffen bij analyse via gelelektroforese terwijl *Dickeya* een

amplicon heeft van ongeveer 420 bp. Nader onderzoek wees uit, dat dit het gevolg is van kruisreactie met *Pseudomonas*.

Er kan kruisreactie optreden met de Y1/Y2-primers (ervaring PPO, persoonlijke mededeling NAK). Met primers, specifiek voor *Pseudomonas*, werden ook veel positieve reacties gevonden in de verschillende onderdelen van de hyacintenbol. Het amplicon is waarschijnlijk geamplificeerd door kruisreactie van de ADE1-primer met een gen van *Pseudomonas*. Ter bevestiging van deze hypothese is dit DNA-fragment geïsoleerd en door de firma BaseClear de basevolgorde bepaald. Na analyse van de DNA-sequentie door PPO bleek, dat het DNA-fragment 86% homologie op nucleïnezuurvolgorde en zelfs 90% homologie op aminozuurvolgorde vertoont met het helicase van *Pseudomonas fluorescens*. Dit fragment is geamplificeerd met 2 forwardprimers (ADE1), waarmee de kruisreactie is vastgesteld. Door de PCR-condities te variëren is dit fenomeen te verminderen of te voorkomen. Overigens geeft dit aan, dat *Pseudomonas*-soorten mogelijk ook rot kunnen veroorzaken.

Tabel 3. Correlatie tussen visuele controle vooraf, stresstoets, NAK-toets, partijachtergrond en lokalisatie van *Dickeya*

Partijn:	leverbaar/ preparatie cultivar	visuele controle %	PPO stress toets 30°C	NAK % <i>Dickeya</i> PCR per 200 stuks	partij oordeel vooraf	lokalisatie
			% snot per 50 stuks			BKD
<b>teelt Frankrijk</b>						
1	Jan Bos	0.4	0	0	gezond	-
2	Delft Blue	0	0	0	gezond	-
3	Splendid Cornelia	0.4	0	0	gezond	-
4	Delft Blue	0	2	1.5	ziek	-
5	Jan Bos	0	0	0.5	matig	1
6	Top White	0.7	2	1	ziek	1
7	Pink Pearl	2.5	0	1.5	ziek	1
8	Delft Blue	2.5	4	2	ziek	2
9	Purple Sensation	0	2	0	onbekend	0
10	White Pearl	2.5	2	1.5	ziek	1
<b>teelt Nederland</b>						
11	Splendid Cornelia	0	0	0	gezond	-
12	Carnegie	0.4	26	17	ziek	1
13	Delft Blue	0	0	0	gezond	-
14	Pink Pearl	0	0	0	gezond	-
15	Carnegie	0	0	5	matig	-
16	Aiolos	0	0	0	gezond	-
17	Pink Pearl	0	0	0	gezond	-
18	White Pearl	1.8	0	0	gezond	-
19	Delft Blue	0	0	0	gezond	-
20	Fondant	0	0	0.5	ziek	-
21	Pink Pearl	0	2	0	gezond	-

- Visuele controle: het uitzoeken van de partij vooraf op zieke bollen
- Stresstoets: zoals beschreven
- Partijoordeel: matig = matig zieke partij
- Lokalisatie: - = niet uitgevoerd, cijfers = aantal zieke bollen gevonden in 25 stuks (*Dickeya* in neus of bolbodem)



### 3.3 Resultaten van de stresstoets

De stresstoets is voor de eerste 21 partijen hyacinten volgens het stressprotocol met incubatietemperatuur 30°C uitgevoerd; voor de partijen werkbollen (partij-nrs. 31-62) is de temperatuur aangepast en verhoogd tot 38°C. Dit is veranderd op grond van bevindingen uit het onderzoek "Praktijktoetsen op snot, rot en bolrot" (PT 13373). Vooraf is er bij 25°C een visuele controle uitgevoerd om de eventueel aanwezige snotbollen uit te zoeken (kolom 3; Tabel 3). In veel gevallen correspondeerde een positieve uitslag (snotbollen aanwezig) met een zieke partij (stresstoets, laboratoriumtoets en achtergrond partij positief voor *Dickeya*), maar in een aantal gevallen (partij 1, 3 en 18) niet. Opgemerkt moet worden dat bij de eerste serie stresstoetsen 50 bollen en voor de tweede serie 100 bollen zijn gebruikt. Bij de eerste serie was de kans dan ook geringer om een lage besmetting te kunnen vinden. Bij de werkbollen (partij-nrs. 31-63) is in de visuele voorcontrole niet één snotbol gevonden (niet weergegeven).

In Tabel 4 is te zien, dat de correlatie van de stresstoets met de gegevens van HOBAGO en CNB (partijoordeel) wat betreft de partijen uit Frankrijk en Nederland (1-21) met de partijhistorie in 5 gevallen duidelijk niet overeenstemt. De stresstoets correspondeert in ongeveer 75% van de partijen met de partijhistorie van de hyacintenbollen, zoals aangeleverd door de handelshuizen.

Bij de partijen 5, 7, 15 en 20 gaf de stresstoets geen snot aan, terwijl er volgens zowel het partijoordeel (CNB, HOBAGO) en de NAK-toets er wel een besmetting was. Bij partij 21 werd wel een snotbol gevonden terwijl de NAK niets vond en ook volgens het partijoordeel gezond was. Bij toetsing door PPO bleek er geen *Dickeya* noch *Pectobacterium* aanwezig te zijn in de bollen.

In de partijen van september 2009 (Tabel 5) gaf de stresstoets eveneens in een aantal gevallen een aantasting terwijl dit negatief was in de uitslag van de handelshuizen (partijhistorie) en de NAK-toets. Dit betrof de partijen 32, 33, 35, 38 en 54. Zeer waarschijnlijk werd door de hogere incubatietemperatuur in de stresstoets (38°C in plaats van 30°C) een op snot gelijkende aantasting teweeggebracht waar geen *Dickeya* of mogelijk ook geen *Pectobacterium* aanwezig was.

Bij partij 37 werd geen snot gevonden, zowel in de stresstoets als in de NAK-toets. Daar volgens de partijhistorie deze partij twijfelachtig was, is mogelijk hier een niet-representatief monster uit de partij getrokken. Bij de partijen 40 en 41 (Tabel 5) werd niets gevonden in de stresstoets. Partij 40 zou een matige aantasting door snot hebben (partijhistorie); de NAK vond 1 % snot. In partij 41 vond de NAK-toets veel snot, maar de stresstoets liet geen aantasting zien.

In een aantal gevallen zijn controle-PCRs uitgevoerd met primers die *Pectobacterium* resp. *Dickeya* kunnen aantonen. In Fig. 3 is dit weergegeven voor 2 partijen die volgens de stresstoets en de laboratoriumtoets van de NAK positief scoorden op *Dickeya*.

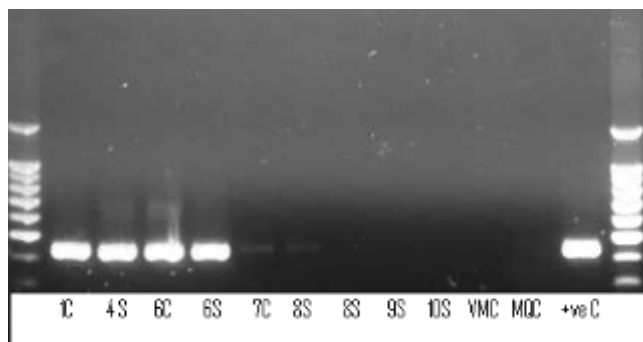


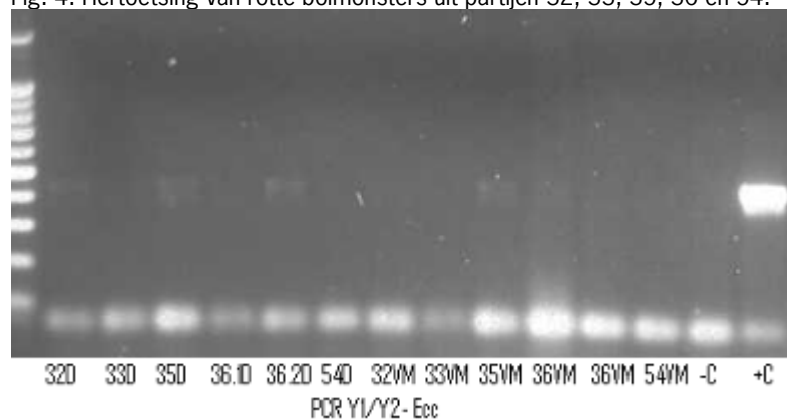
Fig. 3. Amplicons, specifiek voor *P. carotovorum*, zoals aangetroffen in de zieke partijen 4 en 6. C = controle-isolaat van *Pectobacterium carotovorum*. Bandgrootte = 420 bp. Eerste en laatste kolom: referentieladder.

In de partijen 31 tot en met 62 (werkbollen, Tabel 5) is een incubatietemperatuur van 38°C gebruikt, daar dit veel meer snot liet zien in experimenten binnen het project "Praktijktoetsen snot, rot en bolrot" (PT

13373). In 8 partijen kwam de stresstoets niet overeen met de uitslagen uit de partijhistorie en de laboratoriumtoetsen. Het bleek, dat de stresstoets vals positieve uitslagen gaf. Dit is waarschijnlijk te wijten aan een fysiologische respons van de bol waardoor andere bacteriën rotverschijnselen kunnen geven. Dit is nog duidelijker aangetoond in de experimenten van de praktijktoetsen. De partijen 32, 33, 35, 36 en 39 zijn nader onderzocht door uitplaten van bolmateriaal. In deze partijen werd geen *Pectobacterium* of *Dickeya* gevonden (Fig.4), maar wel aanwijzingen voor de aanwezigheid van andere pectinolytische bacteriën.

In een aantal gevallen is getracht uit monsters, negatief voor *Dickeya* en *Pectobacterium*, maar positief wat betreft snotsymptomen, bacteriën te isoleren. In twee gevallen is hier de bacterie *Paenobacillus* (vroeger geclassificeerd als *Bacillus*) geïsoleerd; deze heeft net als *Dickeya* en *Pectobacterium* pectinolytische activiteit. In partij 39 werd *Paenobacillus* aangetoond. Dit geeft aan dat in bepaalde gevallen andere bacteriën, waaronder ook *Pseudomonas fluorescens* (die in eerder onderzoek al eens is geïsoleerd, snotverschijnselen in hyacint kunnen geven. *Paenobacillus* kan onder laboratoriumomstandigheden op stukjes hyacintebol pectinolytische activiteit vertonen, zij het minder dan *Dickeya* spp.

Fig. 4. Hertoetsing van rotte bolmonsters uit partijen 32, 33, 35, 36 en 54.



### 3.4 Resultaten van de laboratoriumtoetsen van de NAK

Per partij zijn 200 hyacintebollen afgeteld en zijn naar de NAK verstuurd, waar volgens voorschrift van de NAK 10 monsters van ongeveer 600 mgr. zijn gepoold en toegevoegd aan een voorkweekmedium. Na drie dagen zijn de BioPlex na DNA-zuivering, en ELISA volgens standaard voorschrift uitgevoerd.

De BioPlex toets is uitgevoerd op *Pectobacterium atrosepticum*, op een subgroep van *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (pathogeen voor aardappel) en op *Dickeya* spp. (de vroegere *Erwinia chrysanthemi*). De ELISA toets op *Dickeya* spp.

De uitslagen van de laboratoriumtoetsen van de NAK bleken goed overeen te komen met de gegevens van de handelshuizen qua partijhistorie (Tabel 4 en Tabel 5).

In de eerste 21 partijen kwam de NAK-toets (kolom 3) in alle gevallen goed overeen (kolom 6) met de beoordeling van de partij door de handelshuizen (kolom 4). In partij 9 was mogelijk *Pectobacterium* verantwoordelijk voor snotverschijnselen in de stresstoets. De beoordeling van de handelshuizen was voor partij 9 onduidelijk. De NAK toetsing scoorde beter dan de stresstoets (echter maar 50 bollen gebruikt), die in vijf gevallen niet overeenkomstig was met de partijhistorie.

Zowel de BKD als de NAK trof in de eerste 6 partijen veel andere *Erwinia*'s aan, die echter niet kruisreageerden in ELISA. Dit is een situatie die overeenkomt met wat de NAK in aardappel heeft aangetroffen. In partij 7-10 leek een andere *Erwinia* voor te komen, nauw verwant (positief in ELISA) maar

gaf geen reactie met de generieke primers. Dit gaf aan dat er nader onderzoek naar de *Pectobacterium*-isolaten noodzakelijk is om mogelijke kruisreactie te voorkomen. De ELISA is minder betrouwbaar als de BioPlex. Het blijkt dat het antiserum niet specifiek is voor *Dickeya* spp. en ook met andere bacteriesoorten (*Pseudomonas* spp.) kan kruisreageren (mededeling NAK).

Bevestigd werd, dat er geen *P. atrosepticum* voorkomt in hyacinten; de BioPlex primers voor *P. atrosepticum* gaven in geen van de getoetste monsters een signaal. Ook reageerden de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* subgroepprimers niet met de monsters; deze voor aardappel pathogene groep was dus niet aanwezig in deze monsters hyacint (tot zover getest).

Er zijn aanwijzingen dat *Dickeya* niet homogeen door de partijen verspreid kan zijn. Partij 12 bleek zwaar besmet; een ander deel is getoetst als partij 61; hier werd niets gevonden.

Van de tweede serie monsters in september kwam alleen partij 37 niet overeen met de gegevens van deze partij: deze werd als ziek aangemerkt door de handelshuizen. Ook bij natoetsen bleek deze geen *Pectobacterium* of *Dickeya* te bevatten en ook de stresstoets gaf geen aantasting te zien. Wat hier speelde was onduidelijk. Oorzaak kan zijn dat dit deel van de partij afweek van de rest van de partij waarop het oordeel van de handelshuizen was gevormd. Dit bleek ook bij partij 12 aan de hand waarbij een deel van de partij zwaar werd aangetast (zie Tabel 4) en een deel gezond bleek te zijn (zie Tabel 5, partij 61.).

Partij 41 is geanalyseerd aan 126 bollen door een te kort aan bollen.

De NAK toetsen scoorden over de hele linie beter dan de stresstoetsen. De steekproef van 200 bollen leek misschien niet veel; statistisch gezien betekent dit wel, dat bij een relatief zwaar besmette partij (1 % ziek) de kans op aantonen van snot ongeveer 88% is (Figuur 5). Bij een lichtbesmette partij (0.1% ziek) is met een steekproef van 200 bollen deze kans een stuk lager: 18%. Dit betekent, dat in bepaalde gevallen een steekproef van 200 bollen te weinig kan zijn.

Tabel 4. Toetsing van 10 partijen hyacinten uit Frankrijk en 11 uit Nederland met de stresstoets bij 30°C (50 bollen) en de NAK toets (200 bollen). Als referentie diende de partijhistorie, gegeven door de handelshuizen.

Partijnummer en cultivar	% snot na stresstoets bij 30°C	% <i>Dickeya</i> in NAK toets	partij - oordeel vooraf	overeenkomst stresstoets en oordeel vooraf	overeenkomst NAK toets en oordeel vooraf	conclusie kwaliteit van de partij
<b>teelt Frankrijk</b>						
1. Jan Bos	0.0	0	gezond	++	++	gezond
2. Delft Blue	0.0	0	gezond	++	++	gezond
3. Splendid Cornelia	0.0	0	gezond	++	++	gezond
4. Delft Blue	2.0	1.5	ziek	++	++	Dickeya
5. Jan Bos	0.0	0.5	matig	-	++	Dickeya
6. Top White	2.0	1	ziek	++	++	Dickeya
7. Pink Pearl	0.0	1.5	ziek	-	++	Dickeya
8. Delft Blue	4.0	2	ziek	++	++	Dickeya
9. Purple Sensation	2.0	0	onbekend	nd	nd	Pectobacterium?
10. White Pearl	2.0	1.5	ziek	++	++	Dickeya
<b>teelt Nederland</b>						
11. Splendid Cornelia	0.0	0	gezond	++	++	gezond
12. Carnegie	26.0	17	ziek	++	++	Dickeya
13. Delft Blue	0.0	0	gezond	++	++	gezond
14. Pink Pearl	0.0	0	gezond	++	++	gezond
15. Carnegie	0.0	5	matig	-	++	Dickeya
16. Aiolos	0.0	0	gezond	++	++	gezond
17. Pink Pearl	0.0	0	gezond	++	++	gezond
18. White Pearl	0.0	0	gezond	++	++	gezond
19. Delft Blue	0.0	0	gezond	++	++	gezond
20. Fondant	0.0	0.5	ziek	-	++	Dickeya
21. Pink Pearl	2.0	0	gezond	-	++	Pectobacterium?

++ = klopt met partijhistorie; +/- = onduidelijk; - = klopt niet met partijhistorie; ? = twijfel of rotting door *Dickeya* of *Pectobacterium* veroorzaakt werd

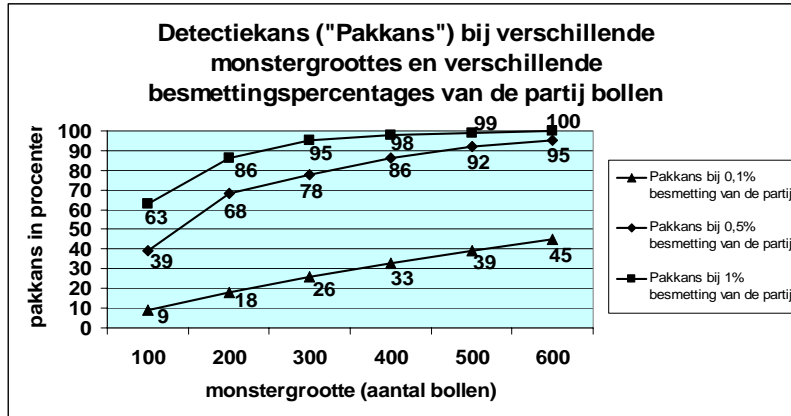
Tabel 5. Toetsing van 23 partijen (vooral) werkbollen met de stresstoets bij 38°C (100 bollen) en de NAK toets (200 bollen). Als referentie diende de partijhistorie, gegeven door de handelshuizen.

Partijnummer en cultivar	% snot na stresstoets bij 38° C	% <i>Dickeya</i> NAK toets	partij oordeel vooraf	overeenkomst stresstoets en partijoordeel	overeenkomst NAK toets en partijoordeel	conclusie kwaliteit van de partij
31. Atlantic	16	95	ziek	++	++	Dickeya
32. Delft Blue	3+1?	0	gezond	-	++	gezond*
33. White Pearl	2	0	gezond	-	++	gezond*
34. Pink Pearl	0	0	gezond	++	++	gezond
35. Minos	11+1?	0	gezond	-	++	gezond*
36. Aiolos	13	1	matig	++	++	Dickeya
37. White Pearl	0	0	ziek	-	-	ziek
38. Pink Pearl	1	0	gezond	-	++	gezond*
39. Pink Pearl	0	0	gezond	++	++	gezond
40. Purple Sensation	0	0.5	matig	-	++	Dickeya
41. Purple Sensation	0	95	ziek	-	++	Dickeya
51. White Pearl	2?	0	gezond	+/-	++	gezond*
52. Jan Bos	2?	0	gezond	+/-	++	gezond*
53. Pink Pearl	0	0	gezond	++	++	gezond
54. Carnegie	2	0	gezond	-	++	gezond*
55. Blue Star	0	0	gezond	++	++	gezond
56. Aiolos	0	0	gezond	++	++	gezond
57. Delft Blue	0	0	gezond	++	++	gezond
58. Blue Star	nd	0	gezond	nd	++	gezond
59. Aiolos	nd	0	gezond	nd	++	gezond
60. Delft Blue	nd	0	gezond	nd	++	gezond
61. Carnegie	0	0	matig	++	++	gezond
62. Fondant	nd	1	matig	nd	++	Dickeya

++ = klopt met partijhistorie; +/- = onduidelijk; - = klopt niet met partijhistorie; ? = twijfel of rotting door *Dickeya* of *Pectobacterium* veroorzaakt werd; nd = niet uitgevoerd

\* = getoetst op *Erwinia*'s door PPO

Fig. 5. Detectiekans in partijen bij en variabele steekproefgrootte (gegevens NAK, Emmeloord).



## 4 Conclusies en discussie

### *Proefverloop, stresstoets*

De logistiek van de experimenten met de vele verschillende partijen verliep goed, dankzij de goede samenwerking en samenspraak met CNB, HOBAHO (handelshuizen, leveranciers van de partijen met gegevens hierover), BKD (lokalisatie-experimenten) en NAK (laboratoriumtoetsen). PPO voerde stresstoetsen uit die nog deels in ontwikkeling zijn. Op grond van lopend onderzoek aan de stresstoetsen werd in de tweede serie de incubatietemperatuur van 38°C toegepast. Dit bleek achteraf te hoog en valse "snot"-reacties te geven. De beste temperatuur lijkt voorlopig 30°C te zijn; hier zal verder aan geoptimaliseerd worden. Mogelijk kan deze incubatietemperatuur in combinatie met andere stressopwekkende behandelingen verbeterd worden binnen het project Praktijktoetsen.

De stresstoets, een zgn. thuistoets, is feitelijk een tegenhanger van de laboratoriumtoetsen van de NAK en een goedkope manier om zelf de kwaliteit van partijen hyacinten vast te stellen. Deze toets maakt echter geen onderscheid tussen snot door *Dickeya*, *Pectobacterium* en eventuele andere, rot veroorzakende bacteriën. Dit onderscheid zal moeilijk, zo niet onmogelijk te maken zijn. Een steekproef van 200 bollen aan de stresstoets onderwerpen kost een aantal uren vanwege het inpakken van de bollen in plastic zakjes, het sorteren, en nadien het controleren van de bollen. In sommige gevallen wil een teler of exporteur een laboratoriumtoets: een onafhankelijk uitgevoerde test voor certificering van een partij of een extra controle of een partij werkbollen gebruikt kan worden voor vermeerdering. Dan is de NAK-toets hier geschikt voor. In Tabel 5 is kort weergegeven de correlatie tussen de stresstoets en de laboratoriumtoets van de NAK. Dat de stresstoets (thuistoets) minder goed overeenkwam met de partijkwalificatie door de HOBAHO en CNB en de NAK-toets kan een gevolg zijn geweest van het kleinere aantal bollen (50 en 100 t.o.v. 200) dat is getest. Verder zal ook door de (achteraf gebleken) te hoge temperatuur in de tweede serie een slechter resultaat verkregen zijn waardoor ook andersoortig rot werd veroorzaakt. In Tabel 6 is dit samengevat als de vergelijking van de stresstoets met de NAK-toets.

Tabel 6. Vergelijking van de stresstoets met de NAK-toets

aantal partijen	stress toets	% overeenkomst met verwachting partij					
		stress toets			NAK		
		goed	twijfel	niet	goed	twijfel	niet
20	30°C	75	0	25 *	100	0	0
19 resp 23	38°C	47	11	42 **	96	0	4 *

\* veelal te weinig

\*\* veelal te veel

### *Partijhistorie en lokalisatie-experimenten*

Bij de beoordeling van de toetsen is het oordeel van de partijen door de vertegenwoordigers van HOBAHO en CNB de referentie geweest. De vraag is of dit oordeel altijd juist is. Als dat zo was, dan zou een toets niet nodig zijn: immers men weet wel welke partij goed en slecht is! In deze vergelijkingen zijn echter ook voorbeelden geweest waarin dat oordeel niet overeenkwam met de toetsen. Mogelijk bestaat een partij uit meerdere deelpartijen met een verschillende mate van besmetting. In de praktijk is dit ook gangbaar om dat toch vaak een bepaalde bolmaat uit meerdere jaargangen kan bestaan en dus de bollen een verschillende voorgeschiedenis hebben. Door een deel van een partij anders te verwerken (rooien, drogen, sorteren etc.) kan ook een verschil in besmetting ontstaan. Het nemen van een representatief monster uit de hele partij is dus van zeer groot belang om een goed representatief beeld te krijgen. Het zou ook kunnen dat een partij om die reden bewust in delen wordt opgesplitst alvorens deze te bemonsteren.

Uit de lokalisatie-experimenten is gebleken, dat de neus en bolbodem beide plekken zijn waar *Dickeya* zich bevindt. Op zich lijkt dit niet verwonderlijk. Via verwerking kan zowel de bolbodem als de neus beschadigd

worden waardoor de bacterie de bol kan besmetten. Daarnaast is het mogelijk dat de bolbodem bij het doorbreken van de wortels een route van binnenkomst is voor *Dickeya* en *Pectobacterium*. Het nemen van 300 mgr. monster van zowel bodem als neus, en deze poolen voor 10 bollen lijkt voorlopig een goede bemonsteringsmethode.

Binnen een FES-perceel "moeilijke substraten" wordt gewerkt aan de verbetering van DNA-extractie na voorkweek van geïnfecteerd hyacintenbolmateriaal. Ondanks toevoegen van commerciële cocktails om zetmeel en slijm af te breken (cellulases, amylases, proteinase K) is er geen duidelijke verbetering gevonden. Mogelijk ligt er nog een opening in het gebruik van specifieke antibiotica in de voorkweekstap om *Dickeya* (en *Pectobacterium*) selectief te vermeerderen. Een storende werking van andere bacteriën zou hiermee voorkomen moeten worden.

#### *Bestaande toetsen*

Binnen het project "Protocollering van toetsen op Erwinia"; PT rapport 13061) zijn de bestaande toetsmethoden getest: PCRs op *Dickeya* spp., op *Pectobacterium carotovorum* en ELISA met antiserum tegen *Dickeya* spp. Recent zijn op basis van het *gyrB*-gen van *Dickeya* 6 species-specifieke real time PCRs ontwikkeld (Slawiak *et al.* 2009; Van der Wolf *et al.* 2009, persoonlijke communicatie). De specificiteit moet nog gevalideerd worden. Op isolaten, verkregen uit een aantal partijen hyacinten zijn met deze TaqMan PCRs onderzocht (NAK, PPO).

Gebleken is, ook uit real-time PCRs van de NAK dat er drie verschillende soorten *Dickeya* voorkomen in hyacint. Zo bleek in de partijen 31, 40 en 41 *D. dadantii* aanwezig te zijn, terwijl in partijen 4, 7, 8, 10, 15 en 36 *D. solani* werd aangetroffen. In partij 62 werden beide *Dickeya*-soorten aangetroffen.

#### *Aanvullend onderzoek voor hyacint*

In een aantal gevallen is bij het lokalisatieonderzoek met de ADE1/2 PCR een kruisreactie gevonden met *Pseudomonas*. Ook is in een paar gevallen de pectinolytische bacterie *Paenobacillus* aangetoond. De ADE1 primer kan een kruisreactie geven op een gen dat codeert voor pectinolytische activiteit. Ook andere bacteriën hebben dit gen en mogelijk ook homologe DNA-sequenties die hiervoor coderen. Bacteriën uit de groep *Pseudomonas* komen veel voor in grond, water en op planten en dieren. Naast dat een aantal *Pseudomonas*-soorten planten ziek kunnen maken, is van een aantal soorten juist bekend dat ze een antimicrobiële werking hebben tegen ziekteverwekkende bacteriën bij planten zoals bepaalde stammen van *Pseudomonas fluorescens*. Het is mogelijk, dat de 558 bp band op gel na PCR afkomstig is van bacteriën die zich niet in de bol ophouden, maar in de grond die met de bol is meegekomen. Hoewel het materiaal vooraf wordt gewassen blijkt het soms lastig de bollen geheel vrij te maken van grond.

De hoge temperatuur van 38°C kan mogelijk "heetstookschade" hebben veroorzaakt aan de bol waardoor andere bacteriën het door de temperatuur aangetaste weefsel hebben laten verrotten. In het verleden is er door Kamerling op het LBO een "glazigheidsbacterie" gevonden. Deze bacterie is destijds echter niet verder gekarakteriseerd. Daarnaast komt *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* voor. Bij aardappel is bekend dat er een subgroep van *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* voorkomt die pathogeen is. De BioPlex toets van de NAK wees uit dat deze niet overeenkomt met de *Pectobacterium carotovorum* in hyacint. Om de laboratoriumtoetsen van de NAK op hyacint sluitend te maken zal hier onderzoek naar moeten worden uitgevoerd: welke groep pathogene *P. carotovorum* komt voor in hyacint? Op deze wijze kan de BioPlex toets verder worden geoptimaliseerd specifiek voor de toepassing op snot in hyacint.

#### *Andere bolgewassen*

Er zal mogelijk ook een toepassing zijn voor de NAK toetsen op andere bolgewassen met snotproblemen, zoals Iris, Dahlia, Scilla, Muscari en Fesia. Hierbij zal een vergelijkbare proefopzet zoals in dit onderzoek voor hyacint gehanteerd moeten worden. Mogelijk komen in deze gewassen andere *Dickeya*-soorten voor. Er zijn eerste aanwijzingen uit ander onderzoek dat in Dahlia voornamelijk *D. dianthicola* voorkomt.

#### *Logistiek, prijs*

De logistiek van steekproef tot uitslag neemt ongeveer een week (laboratoriumtoets) tot 10 dagen (wat betreft de stresstoets) in beslag. De NAK heeft een hand-out opgesteld welke aangeeft hoe telers of exporteurs die partijen of individuele monsters willen laten toetsen, te werk moeten gaan. Deze zaken zullen



ook in een vakbladartikel in BloembollenVisie kenbaar gemaakt worden en zijn tijdens de jaarvergadering Hyacint (22 maart 2010) toegelicht. Meer gegevens staan op de website in een flyer: <http://www.nakagro.nl/documents/NAK%20AGRO-%20Agressief%20Snot%20hyacinten.pdf>: onderzoek op agressief snot in hyacint.

De prijs voor de toetsing van 200 bollen bedraagt in 2010 360 €.

Naar verwachting zal de laboratoriumtoets van de NAK vooral toegepast worden op werkbollen die in de handel worden gebracht. Ook werkbollen die op eigen bedrijf worden gebruikt en leverbaar bestemd voor de handel zullen deels worden getoetst worden.

Door bollen te toetsten die voor werkbollen worden opgeplant, kan vroegtijdig worden besloten om partijen wel of niet te op te planten als werkbollen en die voor de vermeerdering te gaan gebruiken. Hiermee wordt de kans op een gezondere start van de meerjarige hyacintenteelt bereikt.

Naast een toets blijft het van belang om alle bekende maatregelen te blijven treffen om een herinfectie te voorkomen via vermenging van partijen en via versmering tijdens de verwerking. Door de juiste maatregelen kan ook voorkomen worden dat een niet gevonden zeer lichte latente besmetting alsnog tot uitbraak komt.



## 5 Communicatie

### Projectoverleg

- Overleg protocollering toetsing op Erwinia in bloembollengewassen bij de NAK, Emmeloord: 29 jan.2009. Aanwezig: PPO, BKD, NAK.
- Overleg pilot toetsing Erwinia: opzet lokalisatie-experimenten. 19 maart 2009, Lisse. Aanwezig: PPO, BKD
- Overleg pilot toetsing Erwinia in hyacint, 18 mei 2009, Lisse. Aanwezig: CNB, HOBAHO, BKD, NAK, PPO.
- Bijeenkomst proeftoetsing Erwinia in hyacint, Leliezaal PPO Lisse, 2 juli 2009, 12.00-13.00: NAK, BKD, CNB, HOBAHO, PPO.
- Bijeenkomst pilot toetsing Erwinia te Lisse bij PPO, 30 augustus 2009, Leliezaal, 12.00-13.30: BKD, NAK, CNB, HOBAHO, PPO.
- Bijeenkomst pilot toetsing eindevaluatie 26 oktober 2009 bij PPO, Lisse: NAK, BKD, PPO
- Bijeenkomst overleg over eisen aan een praktijktoets Erwinia bij de NAK, Lisse bij PPO op 4 februari 2010: CNB, HOBAHO, BKD, NAK, PPO.

### Lezingen

- Jaarvergadering Produktgroep Hyacint, Lisse, Keukenhof, 22 maart 2010: lezing Peter Vreeburg en Gé van den Bovenkamp (NAK).
- Erwinia telersgroep in De Noord, 25 mei 2009.
- Studiegroep hyacint De Zuid, 25 maart 2010.

### Vakbladartikelen, posters

- Mededeling in BBV 23 okt. 2008 p. 51: "problemen met Erwinia bij bron aanpakken" (Bas Scholten CNB)
- Vakbladartikel in BloembollenVisie, april 2010, in voorbereiding.
- Kennismiddag PPO, 15 mei 2009 (poster, zie bijlage 1).
- Kennismiddag PPO, 11 september 2009.
- Kennismiddag PPO, 12 februari 2010 (poster, zie bijlage 2).



## 6 Literatuur

1. Darasse A *et al.* 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Appl. Environm. Microbiol.* 60: 1437-1443.
2. Haan EG de en G van den Bovenkamp 2009. Toetsontwikkeling op *Erwinia* bij de NAK: BioPlex real-time PCR. *Gewasbescherming* 40 (4): 172-175).
3. Nasser A *et al.* 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Appl. Environm. Microbiol.* 62: 2228-2235.
4. Slawiak M, JRC van Beckhoven, AGCL Speksnijder, R Czajkowski, G Grabe and JM van der wolf 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J Plant Pathol* 125: 245-261.
5. Van Doorn J, R Dees en W Martin 2009. Protocollering van toetsen op *Erwinia*. PT rapport 13061.
6. Van Leeuwen, Paul van *et al.* 2009. Slijmstelen bij *Zantedeschia*. PT rapportage 12804-02.



## 7 Bijlagen

Kennismiddag 11 september 2009



**PRAKTIJKONDERZOEK  
PLANT & OMGEVING**  
WAGENINGEN UR

### Toetsen op *Erwinia*: praktijk en laboratorium

Joop van Doorn, Paul van Leeuwen, Peter Vreeburg, Wendy Martin, André Korsuize en Robert Dees  
e-mail: Joop.vandoorn@wur.nl

Gevoeligheid voor *Erwinia* bij Dahlia in het seizoen 2008-2009 zijn 8 cultivars opgelegd en wel of niet besmet met *Erwinia chrysanthemi* (Tabel 1).

Tabel 1. Percentage plofters per cultivar

cultivar	Controle	besmet	Toename
1	1	18	17
2	2	16	14
3	2	28	26
4	25	64	39
5	0	18	18
6	21	66	45
7	56	73	17
8	0	62	62

Sommige cultivars blijken veel gevoeliger voor *Erwinia* dan anderen. Via veredeling is hier mogelijk winst te behalen.

#### Praktische toets bij Dahlia

Om op het bedrijf zelf na het rooien vrij eenvoudig te kunnen bepalen of een partij goed is om op te leggen of niet zijn knollen vochtig ingepakt in plastic zakken en warm (25°C) weggezet. Na twee weken is het percentage knollen met rotting vastgesteld.

Deze toets bleek in deze opzet niet betrouwbaar te werken. In het eerste jaar waren de resultaten vrij goed hoewel het percentage plofters tijdens de opleg altijd groter was dan het percentage rot tijdens de toets.

Het tweede jaar vertoonde de toets echter te veel

- afwijkingen: - rot in toets maar geen plofters  
- weinig rot in toets maar veel plofters  
- rot in toets soms geen *E. chrysanthemi*

Deze toets moet dus worden verbeterd.

#### Praktische toets bij hyacint

Om op het bedrijf partijen bollen op latent *Erwinia* te controleren kan aan een monster bollen stress worden gegeven via sorteren en/of temperatuurschock (30-38 °C). Volgens de laatste gegevens wordt latent *Erwinia* na 6 dagen 38 °C nog meer zichtbaar (leeglopers) dan na 6 dagen 30°C. De toets moet nog verder worden geoptimaliseerd.



Fig. 1. Stress bij verpakte hyacintebollen via sorteren

#### Laboratoriumtoets op *Erwinia* in hyacintebollen

In samenwerking met BKD en PPO en met medewerking van HOBANO en CNB, worden partijen hyacinten bij de NAK te Emmeloord getest met een DNA-toets op *Erwinia*. Het doel is, om voor de bloembollensector de mogelijkheid te onderzoeken om partijen te laten testen op *Erwinia*, met name op het agressieve snot (*Erwinia chrysanthemi*). Eind dit jaar wordt duidelijk of dit succesvol is; de eerste resultaten zijn bemoedigend; er lijkt een goede overeenkomst tussen historie van de geteste partijen, laboratoriumtoets NAK en de stresstoets van PPO.

#### Onderscheid tussen isolaten van *Erwinia*

Er bestaan verschillende typen binnen *Erwinia chrysanthemi* (tegenwoordig *Dickeya*). Via een streepjescode kunnen de mogelijk uit elkaar gehaald worden. Dit is van belang om agressieve isolaten te kunnen onderscheiden, te zien of er bv. in hyacint andere *Erwinia*-isolaten voorkomen dan in Dahlia en voor onderzoek naar de verspreiding. Verder zijn er meer aanwijzingen dat andere soorten bacteriën (mogelijk *Bacillus*) soms rot kunnen veroorzaken.

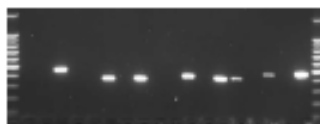


Fig.2. Verschillen tussen isolaten van *Erwinia chrysanthemi*

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving  
Prof. van Sigarenweg 2, 2161 DM Lisse  
Postbus 85, 2160 AB Lisse  
Tel: 0252 - 462121  
Fax: 0252 - 462100  
E-mail: info@ppo.wur.nl  
Internet: www.ppo.wur.nl

Productschap  Tuinbouw

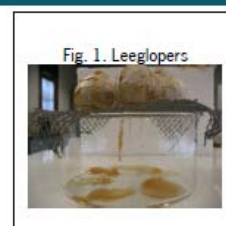


## Toetsen op agressief snot (*Dickeya*) bij de NAK?

Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Wendy Martin, Andre Korsuize;  
Ton van Schadewijk, Roberto Miglino (BKD, Lisse)  
Gé van den Bovenkamp, Eisse de Haan (NAK, Emmeloord)  
e-mail: [joop.vandoorn@wur.nl](mailto:joop.vandoorn@wur.nl)

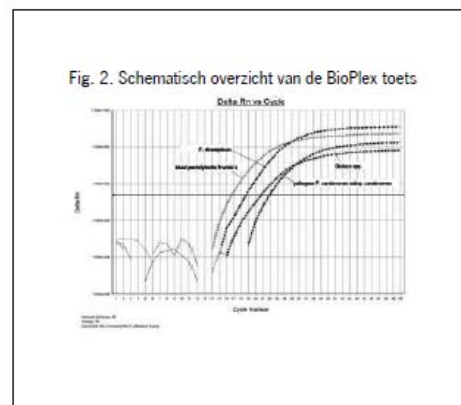
### Agressief snot

- Vooral hyacint heeft vaak problemen met agressief zachtrot. Meestal wordt dit veroorzaakt door *Erwinia chrysanthemi*, tegenwoordig herbenoemd tot *Dickeya*. (Fig. 1).
- De praktijk heeft behoefte aan een snelle toets om te zien of partijen hyacintebollen, vooral werkbollen, vrij zijn van *Dickeya*-soorten.



### Toetsen op *Erwinia*'s

- Er zijn verschillende toetsmethodieken om *Dickeya* vast te stellen. Voor de praktijk moet een toetsmethode snel, en aan relatief grote hoeveelheden monsters (bollen) kunnen worden uitgevoerd.
- De NAK heeft sinds kort een DNA-toets op *Dickeya*, de BioPlex DNA toets (Fig. 2)..



### Stresstoets en laboratoriumtoets

- Vorig jaar zijn ruim 40 partijen hyacinten via een steekproef van 200 bollen door de NAK getoetst met de Bioplex toets, ondersteund met een ELISA op *Dickeya*.
- Daarnaast heeft PPO de stresstoets toegepast op 50-100 bollen: sorteren -wegleggen bij 30 of 38° C.
- De BKD voerde een studie uit naar optimalisatie van monsternamen uit hyacintebollen;
- HOBAGO en CNB zorgde voor de partijen hyacintebollen en achtergrondinformatie over de kwaliteit.

### Resultaten

- De resultaten van een deel van deze experimenten staan in Tabel 1 vermeld. In vrijwel alle gevallen kwamen de gegevens omtrent de partijen goed overeen. In een aantal gevallen waren er wel wat hyacintebollen verdacht, maar hoogstwaarschijnlijk was dit het "oude witsnot" (*Pectobacterium*).
- De stresstoets wordt nog verder geoptimaliseerd, maar is in principe al bruikbaar voor de teler of exporteur van partijen hyacinten.

### Wanneer beschikbaar?

- Er vindt momenteel overleg plaats om te zien hoe, wanneer en met welke prijsstelling deze toets beschikbaar komt.

Tabel 1. Toetsresultaten op agressief snot bij hyacint

partij	stresstoets (% ziek)	partijnaam/ vooraf	toets van de NAK (% ziek)	conclusie	overeenkomst met andere toetsen
1. Jan Roo	0%	goed	0%	gezond	++
2. Delft Blue	0%	goed	0%	gezond	++
3. Splendid	0%	goed	0%	gezond	++
4. Delft Blue	2%	slecht	1,5%	ziek	++
5. Jan Roo	0%	matig	0,5%	ziek	+-
6. Top White	2%	slecht	1%	ziek	++
7. Pink Pearl	0%	slecht	1,5%	ziek	+
8. Delft Blue	4%	slecht	2%	ziek	++
9. Purple Remo	2%*	onbekend	0%	gezond	+
10. White Pearl	2%	slecht	1,5%	ziek	++
11. Splendid Com.	0%	goed	0%	gezond	+++
12. Carnegie	26%	slecht	17%	ziek	++
13. Delft Blue	0%	goed	0%	gezond	+++
14. Pink Pearl	0%	goed	0%	gezond	+++
15. Carnegie	0%	matig	5%	ziek	+-
16. Astoria	0%	goed	0%	gezond	+++
17. Pink Pearl	0%	goed	0%	gezond	+++
18. White Pearl	0%	goed	0%	gezond	+++
19. Delft Blue	0%	goed	0%	gezond	++
20. Friesland	0%	slecht	0,5%	ziek	+
21. Pink pearl	2%*	goed	0%	gezond	+

\* = aangetoond oud witsnot (*P. carotovora*/Pectobacterium)  
\*\* = afwijking tussen stresstoets en de andere toetsen

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving  
Prof. van Slogterenweg 2  
Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel.: 0252462100  
E-mail: [info.bollen.ppo@wur.nl](mailto:info.bollen.ppo@wur.nl)  
Internet: [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

