

Slijmstelen bij Zantedeschia

Auteurs: Paul van Leeuwen, Khanh Pham, Robert Dees en Joop van Doorn

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
Maart 2009
PPO nr. 32 340357 00

© 2009 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, 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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: 12804-02
Projectnummer PPO 32 340357 00

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DE Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 – 46 21 21
Fax : 0252 – 46 21 00
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODEN	9
2.1 Kweek en analyse van slijmsteelbacteriën	9
2.2 Simulatie- en uitbloeiproeven van stelen	10
3 IDENTIFICATIE EN LOKALISATIE VAN SLIJMSTEELBACTERIËN	11
4 VERSLIJMING VAN STELEN	15
4.1 Bepalen van de mate van verslijming	15
4.2 Aantallen bacteriën in het onderste steeldeel en de invloed van de afzetsimulatie hierop	18
5 INFECTIE-EXPERIMENTEN EN MIDDELEN TEGEN SLIJMSTELLEN	21
5.1 Relatie tussen aantallen bacteriën in water en de mate van verslijming	21
5.2 <i>In vitro</i> test op verslijming door bacteriën	23
5.3 Correlatie aantallen bacteriën met ontstaan van slijmstelen	24
5.4 Analyse van stelen uit zieke partijen	26
5.5 Invloed trekken van stelen en afzetsimulatie op slijmstelen	27
5.6 Effect van voorbehandelingsmiddelen	29
5.7 Toepassing van middelen	31
5.8 Doding van bacteriën door voorbehandelingmiddelen	31
6 INVLOED TEELTOMSTANDIGHEDEN EN BEDRIJFSVOERING OP SLIJMSTELLEN	35
6.1 Invloed knollenteelt op slijmstelen	35
6.2 Overleving van bacteriën op materialen	36
7 ALGEMENE CONCLUSIES EN DISCUSSIE	41
8 OVERLEG EN OUTPUT	45
9 LITERATUUR	47
10 BIJLAGE (POSTER OPEN MIDDAG 2008-2009)	49

Samenvatting

Slijmstelen zijn bloemstengels van *Zantedeschia* die op de vaas vooral aan de onderkant verslijmen als gevolg van bacterieaantasting. Deze afwijking vormt een van de grootste problemen in de afzet van de bloemen.

Hoewel vermoed werd dat *Erwinia (carotovora* subsp. *carotovora*) de veroorzaker is, blijken ook *Pseudomonas*-soorten die pectinasen (celwandafbrekende enzymen) produceren, slijmstelen te kunnen veroorzaken. Op grond van de DNA-sequentie van deze pectinase (pel-) genen zijn in PCR deze bacteriën te identificeren; het pel-gen blijkt noodzakelijk om slijmstelen te kunnen veroorzaken. Bij lokalisatie-experimenten bleek soms bij de oogst ook hoog in de steel veel bacteriën aanwezig te zijn; het trekken van de stelen lijkt geen knikstelen te kunnen veroorzaken. Injectie van stelen met *Erwinia* of *Pseudomonas* veroorzaakte slijmstelen. Ook kunnen bacteriën overleven op (veiling-) fust, rekjes en in water. Het is aannemelijk, dat er gezonde en zieke partijen stelen zijn; in sommige partijen zit al een percentage pseudomonaden, mogelijk latent. Als beheersingsmaatregelen kan dienen het afsnijden van de onderste 2-5 cm van de steel; dit levert significant minder slijmstelen op.

Middelen zoals de chloorpil en Florissant werken goed mits er niet te hoge aantallen bacteriën in het vaaswater zitten; deze middelen kunnen echter niet via passieve diffusie hoog in de stelen komen. Er bleek geen goede correlatie tussen aantallen bacteriën in de bloemstelen enerzijds en het ontstaan van slijmstelen; niet alle bacteriën die hierin groeien geven namelijk slijmstelen.

1 Inleiding

Achtergrond

Op de bloemenveilingen worden *Zantedeschia*-bloemen ("stelen") aangevoerd en verhandeld. De economische waarde is groot; zo stond deze bloem in 2007 in de top 13 van de snijbloemomzet, met 6 % groei en werd een omzet van € 36 miljoen in 2007 op de veiling behaald. Geschat wordt, dat de waarde aan het einde van de keten grofweg op € 87.5 miljoen bedraagt. Er doen zich soms kwaliteitsproblemen voor: knikkende stelen en zgn. slijmstelen. Slijmstelen vervuilen snel het vaaswater waardoor de houdbaarheid van de gehele bos (*Zantedeschia* of mengboeket) snel afneemt. Door de bloemveiling en de bloemenhandel wordt dit als een serieus probleem gezien die de groei van dit product in de weg kan staan. Naast economische schade dreigt het imago van dit gewas schade op te lopen. De huidige maatregel van de bloemenveilingen om een chloorpil aan het water toe te voegen werkt mogelijk onvoldoende. Er bestaan wellicht meerdere micro-organismen die rot kunnen veroorzaken.

Erwinia of *Pseudomonas*?

Bij *Zantedeschia* worden de slijmstelen waarschijnlijk door de bacterie *Erwinia* veroorzaakt. Deze bacterie veroorzaakt rot in een groot aantal gewassen, waaronder hyacint, iris, aardappel en dus ook *Zantedeschia*. Bekend is, dat *Zantedeschia* vrijwel uitsluitend aangetast wordt door *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), dit in tegenstelling wat bv. bij hyacinten wordt gevonden. Hier vindt men doorgaans *Erwinia chrysanthemi* (het agressieve snot) als veroorzaker van rot. Om Ecc aan te tonen zijn geen serologische technieken (bv. ELISA) mogelijk. Bestaande technieken berusten op selectieve kweek op groeiplaten, en DNA-technieken. Uit waarnemingen is gebleken dat 15% van de vaasleventesten van *Zantedeschia* (Testcentrum Aalsmeer) *Erwinia* liet zien: een schadepost van ongeveer € 13 miljoen! Verder zijn er aanwijzingen dat ook andere bacteriesoorten, zoals *Pseudomonas*, rot kunnen veroorzaken. Er is een gebrek aan kennis betreffende het gedrag van *Erwinia* in (vaas-) water, en strategieën om besmetting te kunnen voorkomen en te behandelen.

Verder zijn er aanwijzingen voor meer of minder gevoelige cultivars voor slijmstelen bij *Zantedeschia*.

Doelstelling van dit onderzoek

1. Testen en aanpassen van bestaande detectietechnieken om (kwantitatief) een uitslag te kunnen geven over de mate van aantasting door *Pseudomonas* en/of *Erwinia*. Verzamelen van monsters (stelen) en analyseren op *Pseudomonas* om de toets te evalueren op bruikbaarheid (zit *Pseudomonas* al in de steel? Lokalisatie-experimenten om vast te stellen waar bacteriën in de steel zitten. Hoofdstuk 2 en 3.
2. Norm ontwikkelen voor kwaliteit (laag-middel-hoog besmet) i.s.m. de veiling: is er een correlatie tussen aantallen/soort bacterie onderste 2-3 cm steel en het verslijmen hiervan? Zie hoofdstuk 4 en 5.
3. Hoe goed kunnen vaasmiddelen *Pseudomonas* in vaaswater afdoden, en hoe lang overleven *Pseudomonas*-bacteriën in de vaas? Werkt de chloorpil hiertegen? Zie hoofdstuk 5.
4. De invloed van teeltomstandigheden en bedrijfsvoering bij de teler op slijmstelen. Testen van fust van veiling en particulieren op aanwezigheid van *Pseudomonas* en *Erwinia*. (hoofdstuk 6)
5. Introductie van de resultaten in breder verband (lezing, vakbladartikel: na overleg met de begeleidingscommissie). Zie hoofdstuk 7 en 8.

2 Materiaal en methoden

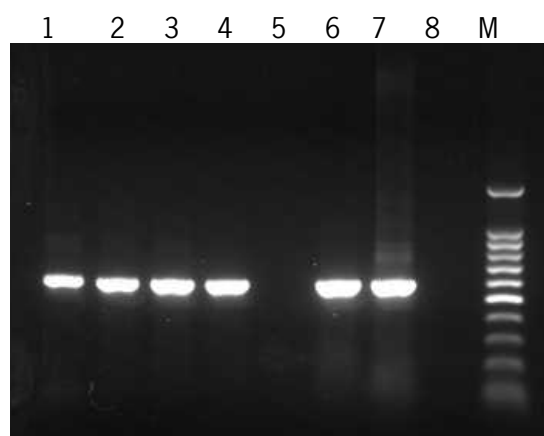
In dit hoofdstuk worden de gebruikte kweeksimulatie- en moleculaire technieken kort belicht. Ook worden de testen en de aanpassingen van bestaande detectietechnieken om (kwantitatief) beschreven om een uitslag te kunnen geven over de mate van aantasting door *Pseudomonas*. Deze zijn van belang voor de standaard uitvoering van de identificatie van de slijmsteelbacteriën. De overige methodieken staan bij de desbetreffende hoofdstukken beschreven vanwege de variatie in opzet.

2.1 Kweek en analyse van slijmsteelbacteriën

Kweek, DNA-analyse van *Erwinia* en *Pseudomonas*

De kweek van *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) is uitgevoerd zoals beschreven in een eerdere rapportage naar PT (beheersing van *Erwinia* PT 11863; van Doorn *et al.* 2008a). Voor *Pseudomonas* is eveneens een standaard groeimedium (NYA) gebruikt; optimum incubatietemperatuur was 28°C. Onbekende bacteriën werden onderzocht op hun identiteit via 16 S rDNA analyse, zoals eerder beschreven (van Doorn *et al.* 2008a).

Primers om virulente pseudomonaden aan te kunnen tonen zijn ontworpen, gebaseerd op sequenties van pectaatlyase-genen van bacteriën die zachtrot kunnen veroorzaken (PsPelFor/PsPelRev, Fig.1). Deze herkennen o.a. *Pseudomonas viridiflava*, *P. marginalis*, *P. fluorescens* en *P. syringae*; ook de verwante *Xanthomonas axonopodis*, *X. campestris*, *X. oryzae* en andere xanthomonaden (die niet op Zantedeschia voorkomen) bezitten deze genen.



Figuur 1. PCR producten (584bp) specifiek voor pectaatlyase-producerende bacteriën.

Lokalisatie-experimenten in stelen

Stelen worden uitwendig ontsmet met 70% alcohol en in stukjes van ca. 10 cm gesneden (5 fragmenten per steel, de bloem niet meegenomen, Fig.2). De stengelstukjes worden gehomogeniseerd met een rollerpers en verdunningen (1/10 en 1/100 van de extracties in steriele buffer, PBS) van deze stukjes werden op kweekplaten (Nutrient Yeast Agar) uitgeplaat en geïncubeerd bij 28 °C. In sommige experimenten werd "gestempeld": het afdrukken van een stengeldoorsnede op een groeiplaat om zo de aanwezige bacteriën te laten groeien.

Uitplaten van gehomogeniseerde steelstukjes

Ongeveer 2 cm van (onderste gedeelte) van de steel wordt gehomogeniseerd met een rollerpers.

Het homogenaat wordt van de pers gespoeld met 3 ml fysiologisch zout (0,7% NaCl).

1 ml van het homogenaat wordt opgevangen in een 1 ml cuvet.

De rollerpers wordt tussen monsters van dezelfde cultivar gespoeld met water en afgeborsteld; tussen cultivars is gespoeld met 70% ethanol en water.

Het aldus verkregen steelsap wordt verdund tot 10^{-3} en 10^{-5} in fysiologisch zoutoplossing; 100 microliter van de verdunningen wordt uitgeplaat op NA of CVP medium.

Infectie-experimenten

In een aantal experimenten zijn stelen van *Zantedeschia* geïnjecteerd met een oplossing van *Pseudomonas* of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* middels een kleine injectiespuit. Hiertoe is 0.1 ml ingespoten.

Voor de eventuele aanwezigheid van bacteriën op materialen (o.a. fust, rekjes enz.) is met een wattenstaafje tweemaal 2 cm² afgeveegd en uitgespoeld in 2 ml PBS, waar dan 0.2 ml van is uitgeplaat op een agarmediumplaat.

2.2 Simulatie- en uitbloeioproeven van stelen

Stelen worden één dag op water bij 9 °C (simulatie van kweker naar veiling), 4 dagen op water bij 9 °C (transportsimulatie) en 2 dagen op water bij 20 °C (simulatie bloemenwinkel) gezet. Vanaf ontvangst bij PPO tot het in de vaas zetten hebben de bloemen in een veilingcontainer met leidingwater gestaan. Voor het in de vaas zetten is van elke steel een stukje van circa 2 cm afgesneden tenzij anders vermeld.

De vazen zijn gevuld met leidingwater, 250 ml per vaas. De vazen zijn in een houdbaarheidsruimte geplaatst bij 20 °C, 60% relatieve luchtvochtigheid en 12 uur TL-verlichting.

Er zijn in de meeste experimenten twee stelen per vaas en 10 stelen per behandeling gebruikt.

De bloemen zijn beoordeeld en afgeschreven op het verslijmen van de steel en niet op verkleuring of begin van uitbloeien.

3 Identificatie en lokalisatie van slijmsteelbacteriën

Doel

Vaststellen in een aantal stelen welke bacteriën daarin voorkomen die slijmstelen zouden kunnen veroorzaken en waar in de steel deze bacteriën zijn gelokaliseerd. Hiertoe worden monsters (stelen) verzameld en geanalyseerd op *Pseudomonas* om de toets te evalueren op bruikbaarheid (zit *Pseudomonas* al in de steel?).

Proefopzet

In een eerste oriënterende proef werden twee stelen afkomstig van een teler (cultivars Hot Chocolate en Passion Fruit) gebruikt voor een eerste analyse. Deze stelen werden ontsmet met 70% alcohol, in stukjes van ca. 10 cm gesneden (5 fragmenten per steel; de bloem werd niet meegenomen, Fig.2). Verdunningen (1/10 en 1/100) van de extracties (met steriel water) van deze stukjes werden op NYA platen uitgeplaat (zie hoofdstuk 2. Stempelen van een stukje doorgesneden weefsel om zo op directe wijze eventuele bacteriën over te zetten op groeiplaten werd ook toegepast.



Figuur 2. Fragmenteren van Zantedeschia-stelen om de verdeling van de bacteriën in een steel te bepalen.

Resultaten

Bij beide cultivars groeiden na een dag heel veel (witte) bacteriekolonies op de NYA platen. Na een aantal dagen kwamen ook enkele andere (gekleurde) kolonies op. Het aantal kolonies varieerde van enkele duizenden bij fragment 5 (onderste stukje, met slijmsteelverschijnselen) tot enkele honderden bij fragment 1 (onder de bloem). Bij platen die gestempeld waren met een steelfragment groeiden ook (witte) bacteriekolonies; dit gaf aan dat bacteriën werkelijk in de steel aanwezig zijn.

Identificatie via PCR met primers voor *Erwinia carotovora* en *Erwinia chrysanthemi* op verschillende bacteriesuspensies leverde maar één positieve reactie met *Erwinia chrysanthemi* op bij fragment 5 (cultivar. Passion Fruit). Alle andere (witte) kolonies bleken geen *Erwinia*'s zijn.

Uit de 16S sequentieanalyses bleek dat in de steelfragmenten 1, 2 en 5 van beide cultivars de witte bacteriekolonies van *Pseudomonas*-bacteriën zijn. De andere (gekleurde) kolonies zijn waarschijnlijk Grampositieve bacteriën.

De proef werd herhaald met 2 stelen (cultivar Captain Romance en Crystal Blush) afkomstig van het proefveld van PPO in Lisse (Fig. 3). Deze keer werden ook 4 bladeren van Zantedeschia's met rotsymptomen meegenomen.



Figuur 3. Rot-symptoom (verslijmde bladeren) bij Zantedeschia..

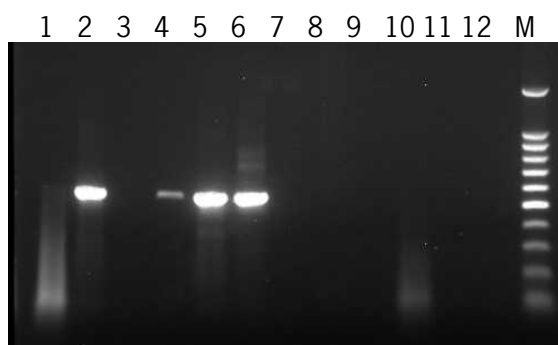
Er groeiden na een dag ook veel (witte) bacteriekolonie op de kweekplaten. Opmerkelijk bij deze keer is de verdeling van bacteriën in een steel; bij fragment 3 (middelste stukje) is de concentratie van bacterie het hoogst (Tabel 1).

Tabel 1. Verdeling van aantallen bacteriën in verschillende fragmenten van een steel

Cultivar	Fragment	Aantal kolonie Bij verdunning 1/10	Aantal kolonie Bij verdunning 1/100
Romance	1 (boven)	5	0
	2	5	0
	3	>1000	>600
	4	10	0
	5 (onder)	10	0
Crystal Blush	1 (boven)	2	0
	2	3	0
	3	>500	>100
	4	20	0
	5 (onder)	20	0
Romance	Blad1	Dichtgegroeide plaat	>1000
Crystal Blush	Blad1	Dichtgegroeide plaat	>1000

Met primers, specifiek voor *Pseudomonas*, werd aangetoond dat in alle steelfragmenten *Pseudomonas* aanwezig is. De vraag is nu of deze *Pseudomonas* isolaten daadwerkelijk pectaatlyase-genen bevatten, noodzakelijk om stelen af te breken via enzymactiviteit. Dit lijkt zo te zijn vanwege de aantasting van de stelen (verslijming door enzymactiviteit).

Daarom zijn primers ontworpen gebaseerd op sequenties van pectaatlyase-genen van bacteriën die zachtrot kunnen veroorzaken (zie 2.1).



Figuur 4. PCR producten (584bp) geamplificeerd met primers PsPelFor/PsPelRev. Positieve reacties (laan 2, 4, 5, en 6) zijn monsters uit blad, steel en geïsoleerde bacteriën (Pa2, Ro2) uit geïnfecteerde steelfragmenten. Geen reactie in PCR: (lanen 7-12) met o.a. *Erwinia chrysanthemi*, Ecc, *Agrobacterium* en water. M = merker

PCR's met primers om het pectaatlyase (Pel)- gen van *Pseudomonas* te detecteren op verschillende koloniesuspensies leverde de volgende resultaten op (Figuur 4, Tabel 2).

Uit sequentie-analyses van de PCR producten nr. 2, 5 en 6 blijkt, dat deze pectaatlyase genen van *Pseudomonas viridiflava* (kolom 2), en *Pseudomonas fluorescens* (kolom 5, 6) zijn met een homologiepercentage van meer dan 98%. Waarschijnlijk zijn dit de rotveroorzakende bacteriën in deze steelfragmenten.

Conclusie en discussie

De verdeling van bacteriën in de steel is niet homogeen. In bepaalde steelfragmenten zitten veel meer bacteriën; soms ook in het midden maar veelal in de onderste delen.

De veroorzaker(s) van slijmstelen bij *Zantedeschia* zijn zeer waarschijnlijk ook *Pseudomonas*-soorten. Dit is eigenlijk niet nieuw; bij andere gewassen is dit ook bekend (Cottyn *et al*). Bij *Zantedeschia* is hier ook onderzoek naar gedaan (Krezjar *et al* 2008); *Pseudomonas marginalis* en *P. veronii* veroorzaken ook zachtrot in *Zantedeschia*-stelen. De *Pseudomonas*-isolaten die rotsymptomen veroorzaken hebben altijd het pectaat lyase-gen; dit kan aangetoond worden via moleculaire technieken (Liao *et al* 2006). De aard en werking van pectaatlyase van *Pseudomonas* is waarschijnlijk anders dan bij *Erwinia*'s; er is namelijk geen kruisreactie met de Pel-genen van *Erwinia* in de PCRs met pel-primers, specifiek voor *Pseudomonas*-achtigen.

Een PCR-toets is ontwikkeld om *Pseudomonas*-bacteriën die zacht rot veroorzaken in *Zantedeschia* aan te tonen; gebaseerd op deze pectaatlyase-genen.

4 Verslijming van stelen

4.1 Bepalen van de mate van verslijming

Doel

Het doel van deze proef is om vast te stellen hoeveel verslijming voorkomt in op de veiling aangevoerde bloemen en hoe de bacteriële toestand van de stelen is voordat deze de vaas in gaan. Ook wordt uitgezocht of de onderste 2 cm van de stelen een indicatie voor verslijmen geeft door de aantallen bacteriën te bepalen. Door vast te stellen hoe hoog de sapstroom in stelen na 1 of 2 weken komt kan nagegaan worden of zo bacteriën hoog in de steel kunnen komen.

Proefopzet

Er zijn van 10 cultivars bloemen bij de VBA en 10 cultivars bij FloraHolland vestiging Rijnsburg uit de aanvoer gehaald. De bloemen zijn nog dezelfde dag in de vaas met schoon leidingwater zonder toevoegingen in de uitbloeiruimte van PPO gezet. De bloemen zijn per twee stelen apart in een vaas gezet. Van de 10 stelen zijn 2 stelen onderzocht op aanwezigheid van bacteriën in de steel (van onder tot boven; zie 2.1 en fig.2). Van elke steel is de onderste 2 cm afgesneden om op aanwezigheid van bacteriën te controleren. De onderzochte cultivars en herkomst zijn in de Tabel 2 weergegeven.

Om vast te stellen in hoeverre bacteriën vanuit het vaaswater passief (dus zonder eigen beweging, via zweefpharen (flagellen of fimbriae) het midden van de steel kunnen bereiken is een experiment uitgevoerd met een witte cultivar van *Zantedeschia*.

Stelen zijn op tijdstip 0 in een blauwe inktoplossing (ecoline) gezet; analyse van steelcoupes na enkele dagen/weken op kleuring zijn uitgevoerd via microscopische analyse.

Resultaten

In Tabel 2 is de houdbaarheid in dagen aangegeven. De proef is op één dag beëindigd waardoor de bloemen uit Rijnsburg twee dagen korter op de vaas stonden dan de bloemen uit Aalsmeer. De bloemen zijn alleen afgeschreven op het wel of niet verslijmen van de steel, ongeacht de plaats waar de verslijming plaatsvond.

In de Tabel 2 is te zien dat bij slechts vier van de 20 cultivars er één tot maximaal vier stelen verslijmde. Bij drie van de vier cultivars leidde dit tot een kortere houdbaarheid, bij Pot of Gold was het verschil ten opzichte van de andere stelen (20 dagen) uit Rijnsburg niet betrouwbaar. De meeste stelen verslijmde van onder vanuit de vaas, enkele stelen verslijmde niet van onderuit.

Opvallend is dat er bijna geen verslijming voor kwam in de proef terwijl kort hiervoor bij de VBA een proef is uitgevoerd waarbij veel slijmstelen voorkwamen.

Onderzoek naar de aantallen bacteriën in de stelen gaf aan dat in 'Black Eyed Beauty' veel bacteriën in de steel aanwezig waren in alle segmenten behalve het bovenste. Juist deze cultivar had een aantal verslijmende stelen. De cultivar 'Eleganza' bevatte een zeer beperkt aantal bacteriën in het onderste of een na onderste stukje van de steel. In deze cultivar kwamen geen slijmstelen voor.

Bij het op de vaas zetten van de bloemen is 2 cm van de steel afgesneden. Dit stukje is bewaard in de koelkast. Na het ontstaan van slijmstelen in de cultivars 'Black Eyed Beauty', 'Picasso' zijn de stengelstukjes van deze cultivars onderzocht op aanwezigheid van bacteriën (Tabel 3). Bij beide cultivars bleken de stengelstukjes zeer veel bacteriën te bevatten. Daarnaast zijn ook de stengelstukjes van de cultivar 'Overig roze', die geen slijmstelen had, onderzocht. Ook deze stengelstukjes bleken veel bacteriën te bevatten, vergelijkbaar met de andere twee cultivars.

Tabel 2. Houdbaarheid in dagen, gemiddeld per 8 stelen van verschillende cv's Zantedeschia.

Cultivar	herkomst	houdbaarheid	Opmerking
Colombe de la Paix	VBA	22.0	
Eleganza	VBA	22.0	
Crystal Blush	VBA	22.0	
Black Eyed Beauty? *	VBA	15.9	1 halverwege, 2 onderaan verslijmd
Black Eyed Beauty	VBA	22.0	
Dominique	VBA	22.0	
Schwarzwalder	VBA	22.0	
Red Sox	VBA	22.0	
Picasso	VBA	18.5	2 onderaan verslijmd
Garnet Glow	VBA	22.0	
Overig paars	FloraHolland	15.4	1 bijna onderaan, 3 onderaan verslijmd
Naomi	FloraHolland	20.0	
Purple Haze	FloraHolland	20.0	
Majestic Red	FloraHolland	20.0	
Mango	FloraHolland	20.0	
Pot of Gold	FloraHolland	18.5	1 halverwege verslijmd
Overig roze	FloraHolland	20.0	
Red Sox	FloraHolland	20.0	
Captain Rosette	FloraHolland	20.0	
Captain Romance	FloraHolland	20.0	
LSD =		2,822	

* cultivar is niet zeker

Het verschil tussen 2 cultivars is duidelijk te zien. Bij cultivar 4 (Black Eyed Beauty) zijn nog bacteriën te vinden bij fragment 2 zowel bij steel 4-9 als steel 4-10. Bij cultivar 2 (Eleganza) zijn alleen bacteriën te vinden bij fragment 5 en 4 (weinig). Bij de uitbloei proef zijn slijmstelen te vinden bij 3 stelen van cultivar 4 (4-2, 4-4 en 4-7) terwijl geen enkel te vinden is bij cultivar 2. De stelen van cultivar 4 horen bij een 'zieke' partij.

Bij fragment 1 van steel 2-9 zijn ook wat kolonies (ander dan *Pseudomonas*) te vinden, dit komt waarschijnlijk door de bloem (niet schoongemaakt met alcohol).

Bij fragment 4 van steel 2-10 zijn geen bacteriën meer te vinden, terwijl bij fragment 5 nog redelijk veel.

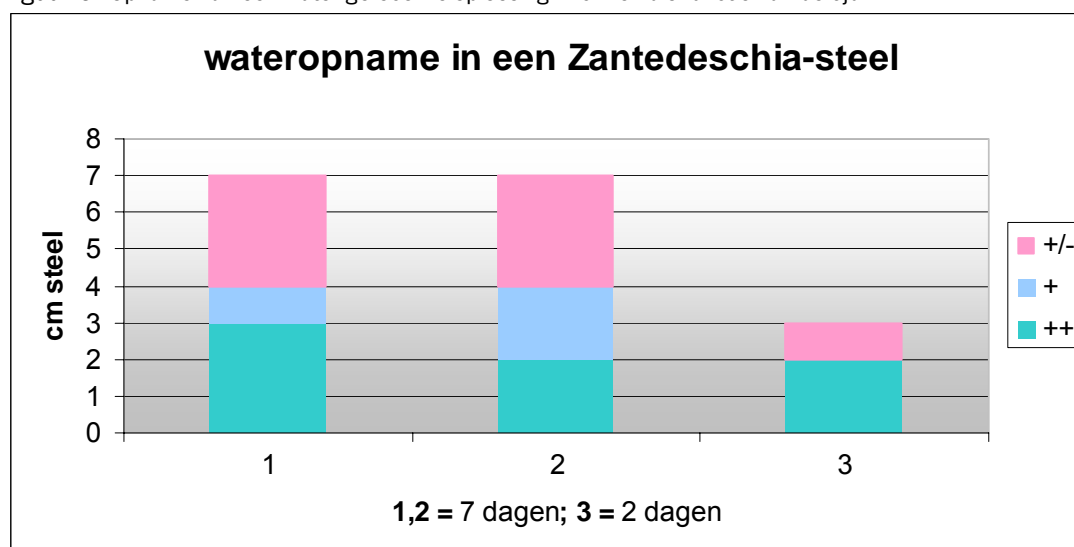
Bij fragment 2 van steel 4-10 zijn meer bacteriën te vinden dan bij fragment 3, dit geeft aan dat de verdeling in een steel niet altijd 'homogeen' is, de aantallen zijn niet altijd aflopend naar boven. Bij steel 4-2 was bij de uitbloei proef de verslijming te vinden midden in de steel, dit is ook karakteristiek voor deze partij.

Tabel 3. Verdeling van bacteriën in verschillende fragmenten in een steel

Cultivar	Steelnr.	Fragment	Aantal kolonies	
			10 ⁰	10 ⁻¹
VBA				
Eleganza	2-9	1+bloem	8	0
		2	0	0
		3	0	0
		4	4	0
		5	9	2
	2-10	1	0	0
		2	0	0
		3	0	0
		4	0	0
		5	>1000	>200
Black Eyed Beauty	4-9	1	0	0
		2	140	12
		3	>500	85
		4	>1000	>500
		5	volgroeï	volgroeï
	4-10	1	0	0
		2	>600	108
		3	>200	21
		4	>1000	>300
		5	volgroeï	volgroeï

Het experiment met waterige ecoline leerde, dat na twee weken maximaal op 7 cm hoogte nog ecoline werd aangetroffen (Fig. 5). Na enkele dagen (+/++ in de figuur) is dit nog maar 2-3 cm. Blijkbaar respireert een bloem en steel maar weinig, en zal er geen water vanuit het vaaswater tot aan het midden of zelfs tot aan de bloem komen.

Figuur 5. Opname van een waterige ecoline-oplossing in cm en als functie van de tijd.



Conclusie en discussie

In de proef kwamen in vier van de 20 cultivars (20%) slijmstelen voor. Het percentage slijmstelen in die cultivars varieerde van 12.5 tot 50%.

Bij één van de verslijmende cultivars bleken de bacteriën in grote aantallen aanwezig te zijn in bijna alle stengelsegmenten van onder tot bijna bovenaan de bloem. In de gezonde cultivars waren bijna geen bacteriën, alleen in het onderste stukje.

De onderste twee cm van drie cultivars bleken zeer veel bacteriën te bevatten. Twee cultivars hadden slijmstelen, een derde cultivar niet. Hoewel de bacterietellingen aan de stengelstukjes niet direct na het snijden zijn gedaan maar ruim een week later waarbij de stengelstukjes in de koelkast zijn bewaard lijkt het waarschijnlijk dat bij aanvang van de proef de stengels al grote aantallen bacteriën bevatten.

Dit is een allereerste indruk dat een bacterietelling aan de onderste 2 cm van een steel geen voorspellende waarde lijkt te hebben voor het gaan verslijmen van de steel. Een herhaling in veelvoud is nodig om dit gegeven te bevestigen of te weerleggen.

Via de passieve sapstroom die in stelen van *Zantedeschia* op de vaas plaatsvindt, zouden bacteriën (mits niet beweeglijk van zichzelf) maximaal 5 tot 7 cm hoog kunnen komen. Het fenomeen knikstelen kan niet verklaard worden door opname van pathogene bacteriën; dit verschijnsel zou dan door al aanwezige bacteriën veroorzaakt moeten worden. Ook blijkt, dat het afknippen/snijden van 2 tot 3 cm steel juist dat deel van de steel is waar vaaswater (met verontreiniging) kan komen.

4.2 Aantallen bacteriën in het onderste steeldeel en de invloed van de afzetsimulatie hierop

Doel

Onderzoeken of de afzetsimulatie van stelen (dus: de aantal dagen dat de logistiek van de "handling" vanaf de veiling via transport naar de winkel kost) van invloed is op het verslijmen bij vijf cultivars uit de aanvoer van de veiling en bepalen of het bacterieaantal in het onderende van de stengel een voorspelling geeft voor het verslijmen van de steel.

Proefopzet

Op dinsdag 6 november 2007 zijn uit de veilingaanvoer van de VBA van 5 cultivars twee bossen bloemen gehaald. Van elke cultivar is één bos direct op de vaas met leidingwater gezet en heeft de andere bos eerst een afzetsimulatie gehad.

Voor de afzetsimulatie worden de stelen niet op gelijke lengte gesneden. Deze stonden één dag op water bij 9 °C (simulatie van kweker naar veiling), 4 dagen op water bij 9 °C (transportsimulatie) en 2 dagen op water bij 20 °C (simulatie bloemenwinkel). Vanaf ontvangst bij PPO tot het in de vaas zetten hebben de bloemen in een veilingcontainer met leidingwater gestaan. Voor het in de vaas zetten werd van elke steel een stukje van enkele cm afgesneden. De vazen zijn gevuld met leidingwater, 250 ml per vaas. Er zijn 2 stelen per vaas en 10 stelen per behandeling gebruikt.

De bloemen zonder afzetsimulatie zijn 2 november op de vaas gezet en de bloemen met afzetsimulatie op 13 november.

De bloemen zijn alleen afgeschreven op slijmstelen en niet op andere uitbloeienmerken.

Van elke steel is voor het in de vaas zetten een stukje van circa 2 cm afgesneden. Dit stukje is onderzocht (zie 2.1) met PCR's om *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* en *Pseudomonas* sp. aan te tonen om een indruk te krijgen van de besmettingsgraad van de stelen en het eventueel verslijmen daarna.

Resultaten

In deze proef ontstonden vele slijmstelen. In Tabel 4 is de houdbaarheid in dagen en het percentage slijmstelen weergegeven.

Omdat de bloemen ongeacht of ze wel of geen afzetsimulatie hebben gehad min of meer op hetzelfde moment uitgebloeid raakten is de proef in één keer beëindigd. Daardoor hebben de bloemen die een afzetsimulatie hebben gehad een kortere houdbaarheid; deze hebben minder dagen op de vaas gestaan. Bij de bloemen die geen afzetsimulatie hebben gehad was de houdbaarheid van Captain Volante het

kleinste. Black Eyed Beauty had een langere houdbaarheid dan Captain Volante maar een kortere houdbaarheid dan Mozart en Hot Chocolate. Bij de bloemen die wel een afzetsimulatie hebben ondergaan was de houdbaarheid van Black Eyed Beauty korter dan van de andere cultivars. Er was geen verschil tussen de andere cultivars.

Tabel 4. Houdbaarheid (dagen), percentage slijmstelen en bacteriecijfer gemiddeld per behandeling. De bacteriële besmettingsgraad is in cijfers gegeven: 0-geen, 1-weinig, 2-veel, 3-heel veel.

behandeling	cultivar	Afzetsimulatie	Houdbaarheid	% slijmstelen	Bacteriecijfer
1	Captain Volante	Geen	12.7	70	2.9
2	Captain Volante	Wel afzetsimulatie	11.1	40	2.6
3	Black Eyed Beauty	Geen	16.1	40	2.9
4	Black Eyed Beauty	Wel afzetsimulatie	3.8	100	2.3
5	Black Magic	Geen	17.4	20	1.3
6	Black Magic	Wel afzetsimulatie	11.7	40	2.2
7	Mozart	Geen	20.0	0	1.3
8	Mozart	Wel afzetsimulatie	13.0	0	1.1
9	Hot Chocolate	Geen	20.0	0	1.3
10	Hot Chocolate	Wel afzetsimulatie	13.0	0	2.2
LSD			2.880	29.35	0.405

Bij het percentage slijmstelen is te zien dat de meeste slijmstelen zijn ontstaan bij Black Eyed Beauty die een afzetsimulatie heeft gehad. Captain Volante en Black Magic met een afzetsimulatie hadden een kortere houdbaarheid dan Mozart en Hot Chocolate met afzetsimulatie. Binnen de groep bloemen die geen afzetsimulatie hebben gehad had Captain Volante het hoogste percentage slijmstelen. Black Eyed Beauty zonder afzetsimulatie had een hoger percentage slijmstelen dan Mozart en Hot Chocolate.

Er was duidelijk een verschil in percentage slijmstelen tussen de cultivars. Mozart en Hot Chocolate hadden geen slijmstelen, de andere cultivars wel.

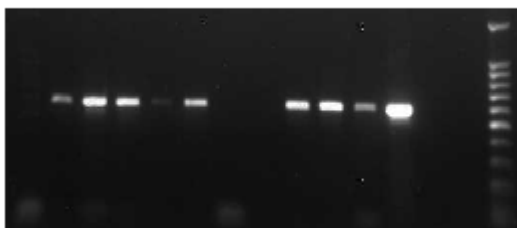
Het effect van de afzetsimulatie is niet duidelijk. Bij Captain Volante leidde een afzetsimulatie tot minder slijmstelen, bij Black Eyed Beauty tot meer slijmstelen. Bij de andere drie cultivars was de afzetsimulatie niet van invloed op het ontstaan van slijmstelen.

Bij het verslijmen is gekeken waar de verslijming ontstond. Meestal begon het verslijmen van de steel onderaan. In 19.3% van de gevallen begon het verslijmen halverwege de steel. Opmerkelijk is dat in alle gevallen het verslijmen halverwege de steel plaatsvond in behandelingen die een afzetsimulatie hebben gehad (Captain Volante 2x, Black Eyed Beauty 3x en Black Magic 1x).

Van de behandelingen 1 t/m 10 werden de stelen ook individueel geanalyseerd om de besmettingsgraad te bepalen. De hoeveelheden bacteriën bij deze behandelingen zijn aanzienlijk hoger dan bij een vorige houdbaarheidsproef. Bij de verdunning 1/100 groeiden nog heel veel bacteriën (meer dan 2000; in totaal ong. 2×10^5) op een groeiplaat. Het verschil tussen de eerste 4 behandelingen en de rest is te zien. De besmettingsgraad werd in cijfers gegeven: 0-geen, 1-weinig, 2-veel, 3-heel veel. In Tabel 4 is te zien dat zonder afzetsimulatie het bacteriecijfer van Captain Volante en Black Eyed Beauty 2.9 was, bijna maximaal. De andere drie cultivars hadden zonder afzetsimulatie een bacteriecijfer van 1.3 wat staat voor vrij weinig bacteriën. Deze getallen komen redelijk overeen met het percentage slijmstelen dat is gevonden. De bacteriecijfers na de afzetsimulatie vertonen daarop enige afwijkingen. Bij Black Eyed Beauty nam het bacteriecijfer door de afzetsimulatie af terwijl het bij Black Magic en Hot Chocolate juist toenam. Bij vergelijking per steel met het bacteriecijfer en het wel of niet gaan verslijmen is te zien dat bij 60 stelen veel of heel veel bacteriën overeenkwam met een slijmsteel, in 34 gevallen niet. Er waren 6 twijfelgevallen (2 = veel bacteriën en geen slijmsteel).

PCR's om *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* en *Pseudomonas* sp. aan te tonen werden uitgevoerd op de gemaakte bacteriesuspensies van de steeldelen. Ook deze keer is alleen *Pseudomonas* aangetoond (zie Figuur 6).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M



Figuur 6. PCR met *Pseudomonas*-specifieke primers op de steelsuspensies. **1-10**: behandeling 1-10, **11-12**: Positieve controles (*Pseudomonas*-isolaat), **13-14**: Neg. Controles (water, *Xanthomonas*), **M**: 100bp ladder

Conclusie en discussie

In drie van de vijf cultivars ontstonden slijmstelen. Er was geen duidelijk effect van de afzetsimulatie op het ontstaan van slijmstelen. Een afzetsimulatie leidde eenmaal tot meer slijmstelen, eenmaal tot minder slijmstelen en had driemaal geen effect.

In bijna 20% van de gevallen verslijmt de stengel halverwege de stengel en niet onderaan. In alle gevallen ontstond verslijming halverwege de stengel bij bloemen die een afzetsimulatie hebben ondergaan. Mogelijk is de afzetperiode verantwoordelijk voor het verslijmen halverwege de stengel.

Ook in deze proef werd steeds *Pseudomonas* aangetoond en geen *Erwinia carotovora* of *E. chrysanthemi*. De ruwe bacterie-indicatie van geen, weinig, veel en heel veel bacteriën uitgevoerd op de onderste twee bloemstelen bij aanvoer op de veiling leek een aardige overeenkomst te vertonen met het later gaan verslijmen van de stelen. Dat was niet het geval indien de monsters na de afzetsimulatie werden getrokken. Mogelijk kan deze toets een voorspelling doen met betrekking tot het wel of niet gaan verslijmen van de stelen.

Bacteriën (schadelijk en niet-schadelijk) zijn altijd aanwezig in verschillende hoeveelheden (afhankelijk van partijen); hierdoor is een verband tussen bacterietellingen enerzijds en het ontstaan van slijmstelen anderzijds niet gemakkelijk te maken. Het verband tussen de aanwezigheid (en hoeveelheid/dichtheid) van *Pseudomonas* en het percentage slijmstelen is daardoor moeilijk te leggen.

5 Infectie-experimenten en middelen tegen slijmstelen

5.1 Relatie tussen aantallen bacteriën in water en de mate van verslijming

Doel

Vaststellen welke bacteriën en in welke aantallen slijmstelen kunnen veroorzaken. Norm ontwikkelen voor kwaliteit (laag-middel-hoog besmet) i.s.m. de veiling: is er een correlatie tussen aantallen/soort bacterie onderste 2-3 cm steel en het verslijmen hiervan?

Hoe goed kunnen vaasmiddelen *Pseudomonas* in vaaswater afdoden, en hoe lang overleven *Pseudomonas* bacteriën in de vaas? Werkt de chloorpil hiertegen?

Proefopzet experiment 1

Versgeogoste bloemen zijn bij een kweker gehaald. Na de oogst zijn de bloemen niet op water gezet. Alle bloemen hebben gedurende 24 uur op schoon leidingwater gestaan voordat de proef werd ingezet. Voor deze proef is de cultivar 'Pot of Gold' gebruikt.

Voor het onderzoek zijn drie verschillende soorten bacteriën gebruikt: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) en *Erwinia chrysanthemi* (Echr). Bacteriën zijn op vloeibaar medium gekweekt en afgedraaid. De bacteriën zijn vervolgens in concentraties van 10^1 , 10^2 , 10^3 , ...- 10^8 bacteriën per ml water in de vazen toegevoegd.

Voor het in de vaas zetten is 1 à 2 cm van de steel afgesneden; per behandeling zijn 5 vazen met elk één bloem gebruikt.

De vazen zijn in een houdbaarheidsruimte geplaatst bij 20° C , 60% rv en 12 uur TL-verlichting.

Resultaten experiment 1

De proef is na 14 dagen gestopt. In totaal zijn slechts 4 bloemstelen verslijmd (Tabel 5) op 9, 10 en 12 dagen na inzetten. Slechts een behandeling had een statistisch betrouwbaar kortere houdbaarheid dan de andere behandelingen. Op basis van de behandelingen zoals deze zijn ingezet moet het verschil echter toch aan toeval worden toegeschreven. De verwachting was dat de stelen in de hogere concentraties Ecc binnen enkele dagen geheel zouden verslijmen. Toen dit niet het geval bleek te zijn, is het vaaswater onderzocht. De bacterieconcentratie in het vaaswater bleek zeer laag te zijn hoewel er wel de aangegeven hoeveelheden in het water zijn gedaan.

Tabel 5. Houdbaarheid in dagen gemiddeld per behandeling. Proef is na 14 dagen beëindigd.

Bacterie	Water	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
controle	14.0								
Eca	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0
Ecc	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	11.4	14.0	14.0
Ech	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	13.6

LSD = 0.65

Conclusie en discussie experiment 1

In de proef kwamen nauwelijks enige slijmstelen voor. De grote aantallen bacteriën die in het vaaswater

waren aangebracht bleken na een aantal dagen niet meer aanwezig te zijn. Het is niet bekend wat verantwoordelijk is voor de sterke afname van het aantal bacteriën in het vaaswater. We gingen er vanuit dat de stelen voldoende bufferende extracten zouden afgeven om Ecc in leidingwater te laten overleven. Uit eerdere experimenten is wel bekend, dat Ecc sterk afneemt in aantallen in schoon leidingwater, waarschijnlijk door osmotische shock (Van Doorn *et al.* 2008). Daarom is de proef herhaald, nu ook in buffer (PBS).

Proefopzet experiment 2

Voor deze proef zijn bloemen van cultivar Flame geoogst en zonder afzetsimulatie direct in een vaasje gezet met bacteriën volgens schema uit Tabel 6. Elke steel stond apart in een vaasje. Er waren 10 stelen per behandeling. Een vaasje is gevuld met 40 ml water aangevuld met 4 ml bacteriesuspensie. Startconcentratie bacteriën in vaaswater (colony forming units/ml): isolaten *Erwinia*: $1,6 \times 10^7$ cfu/ml; isolaten *Pseudomonas*: 4×10^6 cfu/ml.

Resultaten experiment 2

Er zijn in de proef volop slijmstelen waargenomen. In Tabel 6 is de houdbaarheid in dagen en het percentage slijmstelen weergegeven. Beide isolaten van *Erwinia* leidde tot meer slijmstelen en daardoor tot een kortere houdbaarheid dan de controle en *Pseudomonas*.

Tabel 6. Houdbaarheid (dagen) en % slijmstelen gemiddeld per behandeling. *Pseudomonas* 1 en 2 zijn geïsoleerd uit slijmstelen; *Erwinia*-isolaat f(eigen) = Ecc 2408, ander Ecc isolaat komt uit slijmsteel.

Behandeling	bacteriën	bacteriën in	Houdbaarheid	% slijmstelen
1	Geen (controle)	leidingwater	22.4	30
2	Ecc (eigen)	leidingwater	7.4	100
3	Ecc (uit slijmsteel)	leidingwater	4.6	100
4	<i>Pseudomonas</i> 1	leidingwater	23.6	20
5	<i>Pseudomonas</i> 2	leidingwater	23.0	30
6	Geen (controle)	PBS	23.2	40
7	Ecc (eigen)	PBS	10.3	90
8	Ecc (uit slijmsteel)	PBS	6.9	90
9	<i>Pseudomonas</i> 1	PBS	26.8	10
10	<i>Pseudomonas</i> 2	PBS	24.6	30

Conclusie en discussie experiment 2

De partij bloemen was niet vrij van slijmstelen want 30 tot 40% van de stelen verslijmde. Het toevoegen van *Erwinia* aan het vaaswater vergrootte het percentage slijmstelen tot 90-100%. *Pseudomonas* had niet meer verslijming tot gevolg dan de controle waardoor die bacterie in dit onderzoek geen slijmstelen leek te veroorzaken. Het is de vraag of deze bacterie op deze wijze toegepast geen verslijming veroorzaakt of dat de kritische concentratie te laag is geweest.

Er was geen betrouwbaar verschil tussen het toedienen van de bacteriën aan water of PBS.

Erwinia in leidingwater kan wel voor slijmstelen zorgen.

Het is de vraag of *Pseudomonas* in de stengel aanwezig moet zijn om voor verslijming te kunnen zorgen of dat de concentratie in het water hoger moet zijn.

Deze proef is daarom herhaald: wat is de oorzaak van de sterke afname van het aantal bacteriën in de vaas?

Proefopzet experiment 3

De bloemen zijn direct na de oogst bij PPO in de vaas gezet nadat eerst 1 à 2 cm van de steel afgesneden (zie bij Materiaal en Methoden (2.1)).

De gebruikte cultivars waren Hot Chocolate (bloem en blad) en Passion Fruit. De bacterie Ecc is gebruikt in de concentraties 10^5 , 10^7 en 10^9 bacteriën/ml water. De bacteriën zijn op vast plaat of op vloeibaar medium gekweekt. Naast bloemstelen zijn ook bladeren gebruikt om te zien of dit verschil uitmaakte in mate van verslijmingsgevoeligheid.

Per behandeling zijn 5 bloemen of bladeren gebruikt die individueel in een vaasje hebben gestaan.

Na 15 dagen is de proef afgesloten.

Resultaten experiment 3

Een aantal dagen na inzetten van de proef begonnen stelen te verslijmen. In Tabel 7 is de houdbaarheid in dagen weergegeven. De bloemen en bladeren zijn alleen afgeschreven op verslijmen.

Tabel 7. Houdbaarheid van stelen en bladeren in dagen (gemiddeld per behandeling).

Cultivar	bacteriekweek	controle	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹
Hot Chocolate bloem	Plaat	12.6	14.0	13.6	8.4
Hot Chocolate bloem	Vloeibaar		13.6	12.2	7.0
Passion Fruit	Plaat	12.2	14.2	12.0	12.2
Passion Fruit	Vloeibaar		11.8	13.2	9.0
Hot Chocolate blad	Plaat	13.8	10.4	13.4	7.6
Hot Chocolate blad	Vloeibaar		9.8	8.4	10.2

LSD = 5.15

In Tabel 7 is de gemiddelde houdbaarheid van elke behandeling weergegeven. Bij de statistische verwerking bleek alleen de bacterieconcentratie van invloed te zijn op de verslijming.

Een concentratie van 10⁹ bacteriën/ml (de hoogste concentratie) in het vaaswater resulteerde in een kortere houdbaarheid dan de controle en de lagere concentraties. Bij de hoogste concentratie *Ecc* gingen de bloemstelen en bladeren het eerst verslijmen; ook in de lagere bacterieconcentraties ontstonden in de loop van de proef wel slijmstelen.

De kweek van de bacteriën (op plaat of vloeibaar medium) was niet van invloed, evenals de gebruikte cultivar en de bloem of het blad.

Conclusie en discussie experiment 3

De hoogste concentratie *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gaf een kortere houdbaarheid (meer slijmstelen) dan een lagere concentratie of de controle. De cultivars, de bloem of het blad was niet van invloed op het verslijmen evenals de kweekwijze van de bacteriën.

5.2 *In vitro* test op verslijming door bacteriën

Doel

Aantonen of er verslijming optreedt in stengelstukjes van *Zantedeschia* na toediening van een uit *Zantedeschia* geïsoleerd *Erwinia*-isolaat (*Ecc*) en een *Pseudomonas*-isolaat (een *in vitro* test).

Proefopzet

In vervolg op het hierboven beschreven experiment, waarin gekeken werd naar hoe snel stelen op de vaas verslijmen na toevoegen van *Erwinia* en *Pseudomonas* in het vaaswater zijn stengelstukjes van *Zantedeschia* *in vitro* geïnoculeerd met *Pseudomonas* en *Erwinia* en getest op verslijming. Tien stengelstukjes van *Zantedeschia* cultivar Florex Gold werden geïnoculeerd met 10 µl bacterie oplossing en voor 6 dagen weggezet bij kamertemperatuur. Stengelstukjes zijn beoordeeld op het zachter worden van het weefsel.

Resultaten

Toevoeging van *Erwinia* en het uit slijmstelen geïsoleerde isolaat van *Pseudomonas* aan de stengelstukjes resulteerde in het zacht worden ("verslijming") van de stengelstukjes. De ondergrens voor het optreden van het zacht worden van het weefsel lag bij 1000 bacteriën (Tabel 8).

Tabel 8. Verslijming veroorzaakt door Ecc en *Pseudomonas* bij verschillende inoculum-concentraties.

bacterie	Aantal bacteriën geinoculeerd	Aantallen stengelstukjes	
		zacht	hard
Ecc 1 *	1x10 ³	9	1
	1	1	9
	0	1	9
Ecc LMG 2408	1x10 ⁷	10	0
	1x10 ⁴	7	3
	1x10 ²	0	10
<i>Pseudomonas</i> 1 *	1x10 ⁴	10	0
	10	1	9
	0	0	10
P. fluorescens LMG 5830	1x10 ⁶	1	9
	1x10 ³	0	10
	10	0	10
Water controle	1x10 ⁶	1	9

* geïsoleerd uit een slijmsteel; Ecc = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Conclusie en discussie

Zowel het uit *Zantedeschia* geïsoleerd isolaat van Ecc als *Pseudomonas* geeft verslijming, afhankelijk van de aanwezige hoeveelheden bacteriën. Uit eerdere experimenten (6.1) blijkt dat voor de gebruikte *Erwinia*-isolaten dit ook tot verslijming aan de onderkant van de steel kan leiden. Verslijming werd niet waargenomen als *P. fluorescens* LMG 5830 oorspronkelijk geïsoleerd uit gladiool, werd toegevoegd. Deze ontbeert namelijk het pel-gen, dat wel aanwezig is in het uit slijmstelen geïsoleerde *Pseudomonas*-isolaat.

5.3 Correlatie aantallen bacteriën met ontstaan van slijmstelen

Doel

Onderzoeken of er een relatie is tussen het kiemgetal van de onderste twee cm van de stengel en het ontstaan van slijmstelen tijdens de uitbloei.

Proefopzet experiment 1

Voor dit onderzoek zijn 4 cultivars uit de aanvoer van FloraHolland vestiging Rijnsburg gehaald. Van elke cultivar zijn twee bossen genomen. Een bos is zonder dat een stukje van de stengel is afgesneden op de vaas gezet (2 stelen/vaas). Bij de andere bos is van elke stengel 2 cm afgesneden om het aantal bacteriën te bepalen. Na het afsnijden van de 2 cm zijn de stelen ook zonder afzetsimulatie op de vaas gezet met 2 stelen/vaas.

De bloemen zijn 29 juli 2008 uit de aanvoer gehaald en 30 juli in de vaas gezet.

Het 2 cm-stukje stengel is gehomogeniseerd en op groeiplaten aangebracht volgens protocol (2.1) op twee verschillende soorten media in twee concentraties. Deze experimenten zijn tweemaal uitgevoerd.

Resultaten experiment 2

In Tabel 9 is het percentage slijmstelen weergegeven en de houdbaarheid in dagen.

Bij twee cultivars ontstonden slijmstelen, alleen bij de stengels waar geen 2 cm vanaf was gesneden. Deze twee behandelingen gaven meer slijmstelen dan de andere behandelingen en ook de houdbaarheid in dagen was korter dan van de andere behandelingen.

Tabel 9. Houdbaarheid (dagen) en percentage slijmstelen gemiddeld per behandeling.

behandeling	cultivar	afsnijden steel	houdbaarheid	% slijmstelen	Aantal bacteriën
1	Cultivar 1 Cameleon	Niet	19.9	40	
2	Cultivar 1 Cameleon	2 cm	22.0	0	1×10^8
3	Cultivar 2 Rosa	Niet	22.0	0	
4	Cultivar 2 Rosa	2 cm	22.0	0	4×10^7
5	Cultivar 3 Pretty Woman	Niet	16.6	50	
6	Cultivar 3 Pretty Woman	2 cm	22.0	0	4×10^5
7	Cultivar 4 Hot Shot	Niet	22.0	0	
8	Cultivar 4 Hot Shot	2 cm	22.0	0	5×10^5
LSD			2.1	23	

De grootste aantallen bacteriën zijn gevonden bij cultivar 1 Cameleon en cultivar 2 Rosa (Tabel 10). De stelen van deze twee cultivars waren gemiddeld ook dikker dan de stelen van Pretty Woman en Hot Shot. Het totaal aantal bacteriën in Cameleon en Rosa was een factor 100 tot 200 maal groter dan het aantal bacteriën in Pretty Woman en Hot Shot. Het geschatte percentage bacteriën met pectolytische activiteit verschilde weinig tussen de verschillende cultivars en lag gemiddeld tussen de 25-40%

Tabel 10. Bacteriegetallen in de onderste 2 cm van de steel per cultivar en percentages aan bacteriën met cellulase-activiteit.

cultivar	Bacteriegetal*)	Bacteriën met pectinase-activiteit voor individuele stelen
Cultivar 1 Cameleon	3	10-50%
Cultivar 2 Rosa	3	10-80%
Cultivar 3 Pretty Woman	2	20-60%
Cultivar 4 Hot Shot	2	20-60%

*Verklaring bacteriegetallen: 0= geen bacteriën; 1 = 10^3 verdunning 0-30 bacteriën; 2 = 10^3 verdunning 30-300 bacteriën; 3 = 10^3 verdunning (niet te tellen); 4 = 10^3 en 10^5 verdunning (niet te tellen).

Conclusie en discussie experiment 1

In twee van de vier cultivars kwamen 40 tot 50% slijmstelen voor maar alleen bij de bloemen waar geen stukje van de stengel is afgesneden.

Er leek geen verband te bestaan tussen het aantal bacteriën in de stengel en het later wel of niet gaan verslijmen van de stengel. Bij de stelen die gingen verslijmen zijn ook geen bacteriën met een verhoogde pectinase-activiteit gevonden.

Proefopzet experiment 2

Dit tweede experiment is hetzelfde uitgevoerd als het eerste experiment dat hiervoor is beschreven.

De bloemen zijn 10 september 2008 uit de aanvoer gehaald en in de vaas gezet.

De 2 cm stengel is gehomogeniseerd en uitgeplaat (zie 2.1.3) op twee verschillende soorten media in twee concentraties.

Resultaten experiment 2

Ook in deze tweede proef kwamen slijmstelen voor. De slijmstelen ontstonden pas laat tijdens de uitbloei. Vooral de cultivars Passion en Sunshine hadden last van slijmstelen maar ook in Gabrielle kwamen slijmstelen voor (Tabel 11). Alleen Captain Romance was vrij van slijmstelen. Het niet afsnijden van 2 cm van de steel had meer slijmstelen tot gevolg dan het wel afsnijden van de stengel.

Tabel 11. Houdbaarheid in dagen en percentage slijmstelen gemiddeld per behandeling.

beh	cultivar	Stukje van de steel	houdbaarheid	% slijmstelen
1	Cultivar 1 Passion	Niet	25.7	50
2	Cultivar 1 Passion	2 cm	26.8	40
3	Cultivar 2 Sunshine	Niet	26.2	40
4	Cultivar 2 Sunshine	2 cm	29.0	0
5	Cultivar 3 Gabrielle	Niet	28.2	10
6	Cultivar 3 Gabrielle	2 cm	29.0	0
7	Cultivar 4 Captain Romance	Niet	29.0	0
8	Cultivar 4 Captain Romance	2 cm	29.0	0

In Passion en Sunshine werden hoge bacteriegetallen gevonden. Het aantal bacteriën in de onderste 2 cm van de steel bij de twee cultivars varieerde tussen 1×10^6 - 1×10^8 cfu/ml. Bovendien werd een hoog percentage (30-70%) aan bacteriën met pectinase-activiteit geteld. Het aantal bacteriën in de cultivars Gabrielle en Captain Romance was laag ($< 1 \times 10^4$ cfu/ml). Het exacte aantal bacteriën kon voor deze cultivars niet betrouwbaar worden bepaald door de in deze proef gebruikte verdunningen van 10^3 en 10^5 . Er werden op plaat geen tot een enkele bacterie gevonden met pectinase-activiteit. Zowel in Passion als in Sunshine werd met PCR *Erwinia carotovora* aangetoond (Tabel 12).

Tabel 12. Bacteriegetallen per cultivar en de aanwezigheid van *Erwinia* en *Pseudomonas* in de onderste 2 cm van de steel.

cultivar	Bacteriegetal*)	Bacteriën met PCR#)	Bacteriën met pectinase-activiteit
Cultivar 1 Passion	3	Ps, Ecc	Ja
Cultivar 2 Sunshine	3	Ps, Ecc	Ja
Cultivar 3 Gabrielle	1	Ps	nee
Cultivar 4 Captain Romance	1	Ps	Enkele bacterie

*Verklaring bacteriegetallen: 0= geen bacteriën; 1 = 10^3 verdunning 0-30 bacteriën; 2 = 10^3 verdunning 30-300 bacteriën; 3 = 10^3 verdunning niet te tellen; 4 = 10^3 en 10^5 verdunning niet te tellen.

#) Ecc = *Erwinia carotovora* subsp. carotovora; Ps = *Pseudomonas* spp.

Conclusie en discussie experiment 2

Evenals in de voorgaande proef had het niet afsnijden van 2 cm steel meer slijmstelen tot gevolg. De twee cultivars met hogere bacterieaantallen in de stengels hadden meer slijmstelen dan de andere twee cultivars. Dit komt niet overeen met een eerdere proef. Het lijkt er niet op dat een algemeen bacteriegetal een voorspellende waarde heeft voor het wel of niet gaan verslijmen van stengels.

5.4 Analyse van stelen uit zieke partijen

Doel

Vaststellen of bloemen afkomstig uit een gewas met uitval door *Erwinia* meer kans hebben op het optreden van slijmstelen en vaststellen welke bacterie deze slijmstelen veroorzaakt.

Proefopzet experiment 1

Voor deze proef zijn bloemen geogst bij een teler die twee partijen in de kas had staan met uitval door *Erwinia*. Het betrof een partij Florex Gold (geel) en een partij Mango (oranje).

Van elke cultivar zijn 20 visueel gezonde stelen geogst van planten die visueel gezond waren maar die stonden naast een of meer planten die door *Erwinia* waren weggevallen.

De planten zijn 19 mei 2008 geogst uit een kas.

Van de 20 stelen zijn 10 stelen in de uitbloeiruimte van PPO beoordeeld op het ontstaan van slijmstelen en is de houdbaarheid bepaald. Er zijn 2 stelen in één vaas gezet en 5 vazen per cultivar.

Bloemen hebben een afzetsimulatie gehad. Na het oogsten is circa 2 cm van de steel afgesneden en zijn de

bloemen op water gezet: 1 dag bij 9 °C (simulatie kweker), 4 dagen bij 9 °C op water (simulatie handel) en 2 dagen op water bij 20 °C (simulatie detailhandel). Bloemen zijn 26 mei 2008 op de vaas gezet. Bij het op de vaas zetten is weer circa 2 cm van de steel afgesneden.

Resultaten experiment 1

Twee stelen Florex Gold gingen verslijmen (20% slijmstelen), 12 en 14 dagen na aanvang van de vaasperiode.

Conclusie experiment 1

Bloemen geogst uit een partij die is aangetast door *Erwinia* hoeven geen slijmstelen op te leveren.

Proefopzet experiment 2

Deze proef is een herhaling van experiment 1. De planten zijn 17 juni 2008 geogst uit een kas. De bloemen zijn direct 17 juni op de vaas gezet.

Resultaten experiment 2

De bloemen zijn na 17 dagen afgeschreven omdat ze waren uitgebloeid. Er zijn geen slijmstelen waargenomen.

Conclusie experiment 2

Visueel gezonde stelen geogst uit een partij met volop uitval door *Erwinia* hoeft niet tot slijmstelen te leiden.

Discussie experiment 1 en 2

Ter bevestiging van de visuele analyse zouden bacteriemonsters aan de (ogenschijnlijke) stelen meer informatie gegeven hebben; door een fout zijn deze in experiment 1 en 2 niet bepaald.

5.5 Invloed trekken van stelen en afzetsimulatie op slijmstelen

Doel

Onderzoeken of de hoogte waarop een steel wordt getrokken van invloed is op het verslijmen. Knikstelen zouden volgens sommige telers veroorzaakt worden door het vastpakken van de steel bovenaan de steel. Daarnaast is onderzocht of de afzetsimulatie van invloed is op het verslijmen.

Proefopzet experiment 1

Voor de proef zijn door PPO bloemen geogst bij een kweker. De stelen zijn op een normale hoogte getrokken (ongeveer halverwege de steel) of extreem diep, zo dicht mogelijk bij de knol. Na het oogsten van de bloemen zijn ze niet op water gezet maar direct naar Lisse vervoerd. De helft van de bloemen is daar direct in een vaas met leidingwater gezet. De andere helft heeft een afzetsimulatie gehad zoals die ook bij de uitbloeioproeven van de bloemenveilingen worden gegeven.

Voor de afzetsimulatie worden de stelen niet op gelijke lengte gesneden. Deze stonden één dag op water bij 9 °C (simulatie van kweker naar veiling), 4 dagen op water bij 9 °C (transportsimulatie) en 2 dagen op water bij 20 °C (simulatie bloemenwinkel). Vanaf ontvangst bij PPO tot het in de vaas zetten hebben de bloemen in een veilingcontainer met leidingwater gestaan. Voor het in de vaas zetten wordt van elke steel een stukje van enkele cm afgesneden.

De vazen zijn gevuld met leidingwater, 250 ml per vaas.

Als cultivars zijn 'Passion Fruit' en 'Hot Chocolate' gebruikt. Er zijn 2 stelen per vaas en 10 stelen per behandeling gebruikt.

Datum oogst bloemen en aanvang vaasleven zonder afzetsimulatie: 12 oktober 2007

Datum start vaasleven met afzetsimulatie: 19 oktober.

De bloemen zijn alleen afgeschreven op slijmstelen en niet op andere uitbloeiingenmerken.

Resultaten experiment 1

In Tabel 13 is de houdbaarheid in dagen en het percentage slijmstelen weergegeven. Omdat de bloemen ongeacht of ze wel of geen afzetsimulatie hebben gehad min of meer op hetzelfde moment uitgebloeid raakte is de proef in één keer beëindigd. Daardoor hebben de bloemen die een afzetsimulatie hebben gehad een kortere houdbaarheid, ze hebben minder dagen op de vaas gestaan. Bij analyse van de houdbaarheid bleek er alleen maar een betrouwbaar verschil te zijn als gevolg van de afzetsimulatie. De oorzaak daarvan is hiervoor beschreven. Er was geen effect van de cultivar, afzetsimulatie en trekhoogte van de bloemsteel op de houdbaarheid als gevolg van slijmstelen. In de hele proef is slechts één slijmsteel waargenomen, in de behandeling Hot Chocolate die op een normale manier is geoogst (halverwege getrokken) en die een afzetsimulatie heeft gehad. Er is geen analyse uitgevoerd op het aantal slijmstelen omdat er in de proef maar één slijmsteel is voorgekomen.

Tabel 13. Houdbaarheid (dagen) en percentage slijmstelen gemiddeld per behandeling.

behandeling	cultivar	Afzetsimulatie	Trekhoogte	houdbaarheid	% slijmstelen
1	Passion Fruit	geen	Halverwege	24.0	0
2	Passion Fruit	geen	Onderin	24.0	0
3	Passion Fruit	Wel afzetsimulatie	Halverwege	17.0	0
4	Passion Fruit	Wel afzetsimulatie	Onderin	17.0	0
5	Hot Chocolate	geen	Halverwege	24.0	0
6	Hot Chocolate	geen	Onderin	24.0	0
7	Hot Chocolate	Wel afzetsimulatie	Halverwege	16.2	10
8	Hot Chocolate	Wel afzetsimulatie	Onderin	17.0	0

Conclusie en discussie experiment 1

In de hele proef is slechts één slijmsteel waargenomen. Er was doordoor geen effect van de cultivar, afzetsimulatie of trekhoogte van de bloemstelen op het ontstaan van slijmstelen. Deze proef is herhaald.

Proefopzet experiment 2

Deze proef is hetzelfde uitgevoerd als het hiervoor beschreven experiment 1, met dezelfde cultivars. Datum oogst bloemen en aanvang vaasleven zonder afzetsimulatie: 26 oktober 2007
Datum start vaasleven met afzetsimulatie: 2 november 2007
De bloemen zijn alleen afgeschreven op slijmstelen en niet op andere uitbloeikenmerken. Bij het in de vaas zetten van behandeling 9, 10, 13 en 14 is 2 cm van de steel afgesneden. Deze stukjes steel zijn individueel bemonsterd op aantal bacteriën. Circa 2 g materiaal in 2 ml water.

Resultaten experiment 2

De stelen van behandeling 9 en 10 (Passion Fruit) waren zwaar besmet met bacteriën, de stelen van behandeling 13 en 14 (Hot Chocolate) waren besmet maar niet zo zwaar als Passion Fruit. Onverdund zaten de schalen helemaal vol, bij verdunning 10^{-1} zaten de schalen van behandeling 9 en 10 vol en waren de schalen van behandeling 13 en 14 bijna schoon. Er was een duidelijk verschil tussen stengels binnen één behandeling. De ene stengel was zwaar besmet terwijl een andere stengel uit dezelfde bos licht besmet was.

In Tabel 14 is de houdbaarheid en het percentage slijmstelen weergegeven. Omdat de bloemen ongeacht of ze wel of geen afzetsimulatie hebben gehad min of meer op hetzelfde moment uitgebloeid raakten is de proef in één keer beëindigd. Daardoor hebben de bloemen die een afzetsimulatie hebben gehad een kortere houdbaarheid, ze hebben minder dagen op de vaas gestaan. Bij analyse van de houdbaarheid bleek er alleen maar een betrouwbaar verschil te zijn als gevolg van de afzetsimulatie. De oorzaak daarvan is hiervoor beschreven. Er was geen effect van de cultivar, afzetsimulatie en trekhoogte van de bloemsteel op de houdbaarheid als gevolg van slijmstelen. In de proef zijn vier slijmstelen waargenomen, alle in Passion Fruit. Passion Fruit had daardoor betrouwbaar

meer slijmstelen dan Hot Chocolate maar er was geen effect van de afzetsimulatie of de trekhoogte op het ontstaan van slijmstelen.

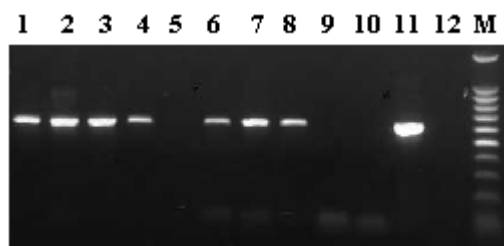
Een van de vier stelen die verslijmde, verslijmde halverwege de stengel. Dit was bij bloemen die een afzetsimulatie gehad hebben.

Tabel 14. Houdbaarheid (dagen) en percentage slijmstelen gemiddeld per behandeling.

behandeling	cultivar	Afzetsimulatie	Trekhoogte	houdbaarheid	% slijmstelen
9	Passion Fruit	geen	Halverwege	19.7	10
10	Passion Fruit	geen	Onderin	19.9	10
11	Passion Fruit	Wel afzetsimulatie	Halverwege	12.1	20
12	Passion Fruit	Wel afzetsimulatie	Onderin	14.0	0
13	Hot Chocolate	geen	Halverwege	21.0	0
14	Hot Chocolate	geen	Onderin	21.0	0
15	Hot Chocolate	Wel afzetsimulatie	Halverwege	14.0	0
16	Hot Chocolate	Wel afzetsimulatie	Onderin	14.0	0

Van alle behandelingen werden de stelen individueel geanalyseerd om de besmettingsgraad te bepalen. Bij de verdunning van 1/100 zijn de verschillen redelijk te onderscheiden. PCR's om *Erwinia carotovora* (Ecc), *Erwinia chrysanthemi* en *Pseudomonas* sp. aan te tonen werden uitgevoerd op de gehomogeniseerde suspensies (voor methode zie 2.1).

Pseudomonas was aanwezig in bijna alle behandelingen (zie Figuur 7).



Figuur 7. **1-4:** behandeling 9,10,13,14; **5-8:** behandeling 11, 12,15,16; **9-10:** watermonsters voor en na het inzetten van stelen; **11-12:** Pos. en neg. controles; **M:** 100bp ladder.

Erwinia carotovora en *Erwinia chrysanthemi* zijn niet aangetoond. Er werden ook geen positieve reacties met *Pseudomonas* gevonden bij 2 watermonsters op het productiebedrijf (een voordat de bloemen erin kwamen te staan en een 1 uur nadat de bloemen in de container gezet werden), hoewel het verschil in hoeveelheid bacteriën op plaat zeer duidelijk te zien. Het gaat waarschijnlijk om 'niet schadelijke' bacteriën.

Conclusie en discussie

Ook in deze tweede proef was er een minimum aantal slijmstelen zichtbaar. Er is wederom geen effect aangetoond van de afzetsimulatie of trekhoogte van de bloemsteel op het ontstaan van slijmstelen. Een bloemsteel verslijmde halverwege de bloemstengel. Dit was het geval bij een behandeling die een afzetsimulatie heeft gehad.

Ondanks de zware besmetting van de onderste 2 cm van de steel van de cultivar Passion Fruit ging slechts 10 tot 20% van de stelen daadwerkelijk verslijmen.

De lichtere bacteriebesmetting in Hot Chocolate leidde in deze proef niet tot slijmstelen.

In bijna alle behandelingen is *Pseudomonas* aangetroffen maar geen *Erwinia carotovora* of *E. chrysanthemi*.

5.6 Effect van voorbehandelingsmiddelen

Doel

Onderzoeken of verschillende voorbehandelingsmiddelen van invloed zijn op het ontstaan van slijmstelen.

Proefopzet

Voor dit onderzoek zijn bloemen van vier cultivars direct vanaf de oogst op het veld in voorbehandelingsmiddelen gezet. Na de afzetsimulatie zijn de stelen op de vaas in schoon kraanwater gezet zonder toevoegingen.

De bloemen zijn geoogst op 9 september 2008 en direct daarna is de proef ingezet.

De afzetsimulatie bij PPO bestond uit 1 dag bij 9 °C op voorbehandeling (simulatie bedrijf), 4 dagen op voorbehandeling bij 9 °C (simulatie handel), 2 dagen op voorbehandeling bij 20 °C (simulatie detailhandel).

Op 16 mei zijn de bloemen in schoon water in de houdbaarheidsruimte gezet.

4 stelen/vaas, 5 herhalingen. Bij op de vaas zetten is circa 2 cm van de steel afgesneden. De bloemen zijn alleen beoordeeld op het verslijmen.

Resultaten

De houdbaarheidstest is bij Treasure en Florex Gold na 21 gestopt en bij Gold Cup en Captain Romance na 27 dagen vanwege het uitgebloeid zijn van de bloemen.

In Tabel 15 is de houdbaarheid in dagen en het percentage slijmstelen weergegeven. In de Tabel is te zien dat bij Gold Cup het toepassen van een reinigingsmiddel leidde tot een lichte verslijming van de stelen en daardoor een kortere houdbaarheid. Bij Captain Romance had de controle de meeste slijmstelen wat met een reinigingsmiddel enigszins en met chloorpillen geheel werd voorkomen.

Ook bij Treasure had de controle last van slijmstelen die het beste werden voorkomen door het gebruik van chloorpillen.

Bij Florex Gold was er geen betrouwbaar effect van de middelen op het ontstaan van slijmstelen hoewel ook hier het effect van de chloorpillen aanwezig lijkt te zijn.

Tabel 15. Houdbaarheid in dagen en percentage slijmstelen gemiddeld per behandeling. CVB oud en CVBN zijn de oude en nieuwe chloorpil van Chrysal.

Beh.	cultivar	Voorbehandeling	houdbaarheid	% slijmstelen
1	Cultivar 1 Gold Cup	Niet	26.8	5
2	Cultivar 1 Gold Cup	CVB oud	27.0	0
3	Cultivar 1 Gold Cup	CVBN	27.0	0
4	Cultivar 1 Gold Cup	reinigingsmiddel	24.9	15
5	Cultivar 2 Captain Romance	Niet	24.3	20
6	Cultivar 2 Captain Romance	CVB oud	27.0	0
7	Cultivar 2 Captain Romance	CVBN	27.0	0
8	Cultivar 2 Captain Romance	reinigingsmiddel	26.3	10
9	Cultivar 3 Treasure	Niet	15.9	65
10	Cultivar 3 Treasure	CVB oud	19.6	20
11	Cultivar 3 Treasure	CVBN	19.6	20
12	Cultivar 3 Treasure	Reinigingsmiddel	12.6	100
13	Cultivar 4 Florex Gold	Niet	20.6	5
14	Cultivar 4 Florex Gold	CVB oud	21.0	0
15	Cultivar 4 Florex Gold	CVBN	21.0	0
16	Cultivar 4 Florex Gold	Reinigingsmiddel	20.0	15
LSD			1.75	16.8

Conclusie en discussie

In deze proef hadden alle cultivars in meer of mindere mate last van slijmstelen. Zowel de oude als de nieuwe formulering van de chloorpil was effectief in het voorkomen van slijmstelen. Alleen bij de cultivar Treasure was het percentage slijmstelen zo hoog dat dit niet door de chloorpillen geheel kon worden voorkomen.

Het toepassen van een reinigingsmiddel had een lichte inbranding van de stengel tot gevolg waardoor de steel soms ging verslijmen. Vermoedelijk is een iets te hoge concentratie gebruikt (1% i.p.v. 0,5%).

5.7 Toepassing van middelen

Doel

Vaststellen of voorbehandelingmiddelen slijmstelen kunnen voorkomen.

Proefopzet

De bloemen zijn geoogst van het veld (getrokken) en direct in de vaas gezet op 21-6-2007.

Uitbloei vond plaats in glazen potten, 3 stelen per pot. Per behandeling waren 4 herhalingen zodat totaal 12 stelen per behandeling zijn beoordeeld.

De proef is uitgevoerd met de cultivars Captain Romance en Crystal Blush. Van alle stelen is circa 2 cm afgesneden voor het in de vaas zetten.

Tabel 16. Behandelingsschema cv's met middelen.

behandeling	cultivar	middel
1	Captain Romance	Controle
2	Captain Romance	Chloorpil CVB 1 tablet/3 l water
3	Captain Romance	Chloorpil CVB 1 tablet/1 l water
4	Captain Romance	Chloorpil nieuw CVBN 1 tablet/3 l water
5	Captain Romance	Chloorpil nieuw CVBN 1 tablet/1 l water
6	Captain Romance	reinigingsmiddel 0,5%
8	Captain Romance	Controle, steel niet afsnijden
9	Crystal Blush	Controle
10	Crystal Blush	Chloorpil CVB 1 tablet/3 l water
11	Crystal Blush	Chloorpil CVB 1 tablet/1 l water
12	Crystal Blush	Chloorpil nieuw CVBN 1 tablet/3 l water
13	Crystal Blush	Chloorpil nieuw CVBN 1 tablet/1 l water
14	Crystal Blush	reinigingsmiddel 0,5%
16	Crystal Blush	Controle, steel niet afsnijden

Resultaten

De bloemen zijn na 3 weken afgeschreven waarmee de proef is beëindigd. Gedurende de proef zijn geen slijmstelen waargenomen. Alle bloem hadden t.a.v. slijmstelen een houdbaarheid van 21 dagen. Wel gingen bloemstelen na 7 tot 10 dagen in meer of mindere mate doorbuigen, iets waarop bloemen in een reguliere houdbaarheidsproef worden afgeschreven. Omdat deze proef specifiek om slijmstelen gaat, is hier alleen op slijmstelen beoordeeld.

Het water met CVB werd gelig, bij alle overige middelen bleef het water helder en de stelen wit.

Conclusie en discussie

- Omdat er geen slijmstelen ontstonden kan er geen conclusie worden getrokken over de werking van de middelen tegen slijmstelen, of het voorkomen van slijmstelen.
- Alle vazen met CVB hadden na één dag al gelig water. Het water met de hoge concentratie CVBN bleef bij beide cultivars helder. Het gebruik van reinigingsmiddel of het niet afsnijden van de stengel zorgde ervoor dat het water helder bleef.

5.8 Doding van bacteriën door voorbehandelingmiddelen

Doel

Overleving vaststellen van *Erwinia* en *Pseudomonas* in verschillende voorbehandelingmiddelen.

Proefopzet

Voor dit onderzoek zijn een isolaat van *Erwinia* (Ecc1) en *Pseudomonas* (Ps1) oorspronkelijk geïsoleerd uit

slijmstelen toegevoegd aan verschillende voorbehandelingmiddelen: leidingwater, PBS, chloorpil (nieuw en oud), reinigingsmiddel en Florissant 520 (Tabel 17). 20 ml bacteriecultuur in niet-steriel leiding water werd toegevoegd aan 20 ml voorbehandelingmiddel in een dubbele concentratie. Buizen zijn weggezet bij 21 °C en bemonsterd 1 en 2 dagen na inoculatie. Als referentie-isolaten werden Ecc 2408 en Ps 5830 gebruikt.

Resultaten

Tabel 17. Proefschema met bacteriesoorten enerzijds, en voorbehandelingmiddel anderzijds.

Bacterie	Start inoculum (cfu)	Behandeling	voorbehandelingmiddel
Ecc1	1x10 ⁵	1	leidingwater
		2	PBS
		3	Chloorpil oud CVB
		4	Chloorpil nieuw CVBN
		5	reinigingsmiddel
		6	Florissant 520
Ecc 2408	1x10 ⁹	7	Leidingwater
		8	PBS
		9	Chloorpil oud CVB
		10	Chloorpil nieuw CVBN
		11	reinigingsmiddel
		12	Florissant 520
Ps1	1,5x10 ⁶	13	Leidingwater
		14	PBS
		15	Chloorpil oud CVB
		16	Chloorpil nieuw CVBN
		17	reinigingsmiddel
		18	Florissant 520
Ps 5830	1x10 ⁸	19	Leidingwater
		20	PBS
		21	Chloorpil oud CVB
		22	Chloorpil nieuw CVBN
		23	reinigingsmiddel
		24	Florissant 520

Toevoeging van een voorbehandelingmiddel aan het leidingwater met bacteriën leidde meestal tot een afname van het aantal bacteriën in het water zowel voor *Erwinia* als *Pseudomonas*. Uitzondering is het gebruik van de oude chloorpil, dat geen effect had op *Pseudomonas*. Het gebruik van de oude of nieuwe chloorpil gaf beide een goede doding van *Erwinia* (Tabel 18).

Tabel 18. Werking van de verschillende voorbehandelingmiddelen tegen de verschillende bacteriën.

voorbehandelingmiddel	Ecc 1	Ecc 2408	Ps 1	Ps 5830
leidingwater	-	-	-	-
PBS (buffer)	-	-	-	-
Chloorpil oud CVB	++	++	-	-
Chloorpil nieuw CVBN	++	++	++	++
reinigingsmiddel	++	++	++	++
Florissant 520	++	++	++	++

- = geen werking; + = vermindering aantal bacteriën; ++ = sterke vermindering aantal bacteriën.

Conclusie en discussie

Er blijkt geen duidelijk verschil in werking tussen het reinigingsmiddel, Florissant 520 en het gebruik van de nieuwe chloorpil CVBN voor doding van *Erwinia* of *Pseudomonas* in leidingwater. Een duidelijk effect is wel te zien bij het gebruik van de oude of de nieuwe chloorpil. De oude chloorpil blijkt *Pseudomonas* niet te doden, de nieuwe chloorpil wel. *Pseudomonas* lijkt dan ook toleranter voor chloor dan *Erwinia* waar tegen de oude en nieuwe chloorpil even goed werkte.

Doding van bacteriën in het vaaswater betekent in ieder geval dat besmetting van de onderste steeldelen (2-5 cm) kan worden voorkomen; of dit slijmstelen kan voorkomen (sommige stelen kunnen mogelijk al latent bacteriën bevatten) is nog de vraag.

6 Invloed teeltomstandigheden en bedrijfsvoering op slijmstelen

6.1 Invloed knollenteelt op slijmstelen

Doel

Vaststellen of de teeltomstandigheden bij de *Zantedeschia*-teler van invloed zijn op het ontstaan van slijmstelen bij de bloementeler. Verder is het bekend, dat bacteriën zoals *Erwinia* zich gedurende langere of kortere tijd kunnen handhaven op materialen of in water (Van Doorn *et al.* 2007). Dit kan een bron zijn van besmetting voor *Zantedeschia*-stelen (Fig 8.). Dit is onderzocht door het nemen van monsters bij enkele telers en de veiling, en door het onderzoeken van zg. biofilms: plakkende bacteriën op materiaal, in dit geval microtiterplaten van plastic.

Proefopzet

Door Agrifirm is in 2007 een proef bij 13 bollentelers uitgevoerd. Van twee cultivars is één partij knollen in het voorjaar verdeeld over 13 telers die de knollen elk op hun eigen wijze hebben geteeld. De knollen zijn vervolgens bij alle bedrijven op dezelfde dag gerooid en naar één adres gebracht om te drogen en bewaren. Alle knollen zijn voorjaar 2008 op een wijze geprepareerd en in een kas geplant. Alleen de knollenteelt in 2007 was verschillend.

De bloemen van Captain Romance zijn geoogst op 15 mei 2008. Na de oogst hebben ze een afzetsimulatie gehad van 1 dag op water bij 9 °C (simulatie bloementeler), 4 dagen op water bij 9 °C (simulatie handel) en 2 dagen op water bij 20 °C (simulatie detailhandel).

Op 22 mei zijn de bloemen in de uitbloeiruimte van PPO gezet bij 20 °C, 12 uur licht en 12 uur donker. Er zijn 4 stelen/vaas gebruikt in 3 herhalingen. Totaal zijn 12 stelen per partij (teler) gebruikt.

De bloemen van Treasure zijn geoogst op 29 mei 2008. Zij hebben dezelfde behandeling gehad na de oogst als hiervoor beschreven bij Captain Romance.

Resultaten

Captain Romance

De laatste bloemen zijn na 15 dagen in de houdbaarheidsruimte weggegooid omdat ze uitgebloeid waren. Bij 7 van de 13 telers ging één van de 12 stelen verslijmen, veelal halverwege de steel. Er was geen verschil in houdbaarheid tussen de bloemen van de verschillende telers (Tabel 19).

Tabel 19. Houdbaarheid in dagen en percentage slijmstelen gemiddeld per teler.

teler	houdbaarheid	% slijmstelen
1	13.9	8.3
2	14.2	8.3
3	14.2	8.3
4	14.3	8.3
5	14.3	8.3
6	15.0	0
7	15.0	0
8	14.6	8.3
9	14.9	8.3
10	15.0	0
11	15.0	0
12	15.0	0
13	15.0	0
LSD	1.36	nvt

Treasure

De bloemen zijn na 21 dagen afgeschreven. In 7 van de 13 partijen ontstonden slijmstelen (Tabel 20). Er zijn daarbij verschillen gevonden tussen de partijen. De bloemen die vorig jaar bij teler 2 en 10 hebben gestaan hadden nu een kortere houdbaarheid als gevolg van meer slijmstelen dan de bloemen van de andere telers.

Tabel 20. Houdbaarheid in dagen en percentage slijmstelen gemiddeld per teler.

teler	houdbaarheid	% slijmstelen
1	21.0	0
2	17.0	33
3	19.6	25
4	18.7	17
5	21.0	0
6	21.0	0
7	21.0	0
8	21.0	0
9	20.5	8
10	17.2	33
11	19.9	8
12	19.0	17
13	21.0	0
LSD	2.77	nvt

Conclusie en discussie

De teelt van één partij Captain Romance knollen bij 13 telers op het veld in 2007 was niet van invloed op het ontstaan van slijmstelen en de houdbaarheid in 2008 nadat de knollen op één adres waren bewaard en in bloei getrokken.

De teelt op het veld was bij Treasure wel van invloed op het ontstaan van slijmstelen in de bloementeel het jaar erna. Ondanks de beperkte omvang van de proef is te zien dat de mogelijkheid bestaat dat

Gezien de omvang van de proef en de uitslagen met betrekking tot slijmstelen is het nog steeds de vraag hoe groot de invloed van de teelt is op het ontstaan van slijmstelen.

Er kan op basis van deze proef dan ook geen uitspraak worden gedaan over welke factor tijdens de teelt van invloed is op het ontstaan van slijmstelen.

6.2 Overleving van bacteriën op materialen

Doel

Kunnen *Pseudomonas* en *Erwinia* overleven op materialen waar *Zantedeschia*-stelen in worden bewaard of mee in aanraking komen?

Proefopzet

Besmet materiaal (fust e.d.) kan een bron zijn van besmetting voor *Zantedeschia*-stelen (Fig 8.; van Doorn *et al.* 2007). Dit is onderzocht door het nemen van monsters bij enkele telers en de veiling.

Er zijn tweemaal bij verschillende telers en op de veiling monsters genomen via een wattenstaafje of door het bemonsteren van een restant vaaswater, die vervolgens zijn geënt op groeimedium. Via PCR is gekeken met welke bacteriën, indien gevonden, we te maken hadden (Tabel 21).

Het opzetrekje is op bepaalde plaatsen bemonsterd (Fig.8).

Resultaten



Figuur 8. Materialen zoals vaas en rekje waar mogelijk bacteriën op kunnen overleven.

De bemonstering van veilingfust, opzetrekjes en water vond plaats tweemaal bij dezelfde kweker (15 mei en 17 juni 2008).

Bemonstering veilingfust bij een kweker op 15 mei 2009

Het monsternummer en de locatie van het genomen monster op 15 mei zijn hieronder vermeld; de resultaten hiervan in Tabel 21:

1. Veilingfust, net gevuld met leidingwater. (Fust ziet er vies uit (biofilm?))
2. Veilingfust, vuil maar nog zonder water (komt zo van de veiling)
3. Opzetrekje, bovenkant (waar bloemen tegenaan schuren)
4. Opzetrekje, idem
5. Veilingfust, schoon, zonder water (komt zo van de veiling)
6. Watermonster. (Veilingfust 's morgens gevuld met water. In de kas bloemen na de oogst daarin gezet. Fust met water gaat direct door naar de veiling. Houden dus geen vaste emmers aan om bloemen in de oogsten).
7. Handmes, snijvlak. (Mes wordt gebruikt om de bossen gelijk te maken).
8. Cirkelzaagje aan de bosmachine. (Bloemen worden op de bosmachine gelegd en dit zaagje maakt de stelen even lang).
9. Buitenkant slijmsteel.

De monsters zijn getest met PCR op *Erwinia chrysanthemi* (Ech), *Erwinia carotovora* (Ecc/Eca) en *Pseudomonas ssp.* PCRs zijn uitgevoerd direct op vloeistof of op individuele kolonies, uitgegroeid na uitplaten en incubatie op NYA-platen van 100 µl.

Tabel 21. Aanwezigheid van *Erwinia* en *Pseudomonas* op materialen, bepaald via PCR

Monster	Ech	Eca/Ecc	<i>Pseudomonas</i>
1 veilingfust met water	-	-	+
2 veilingfust zonder water	-	-	-
3 opzetrekje bovenkant	-	+	-
4 opzetrekje onderkant	-	-	-
5 veilingfust schoon	-	-	-
6 watermonster fust	-	+	-
7 handmes snijvlak	-	-	-
8 cirkelzaagblad	-	+	-

Monster	Ech	Eca/Ecc	<i>Pseudomonas</i>
9 buitenkant slijmsteel	-	-	-
10 (PBS neg. controle)	-	-	-

Hoewel niet alle materialen besmet zijn, blijken opzetrekkjes, water uit veilingfust en een mesje besmet te zijn.

Conclusie en discussie

Het veilingfust met leidingwater (monster 1) en het cirkelzaagje aan de bosmachine (monster 8) blijken besmet met respectievelijk *Pseudomonas* ssp, en *Erwinia carotovorum* ssp (Ec).

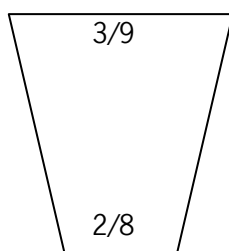
Ps kan dus inderdaad met veilingfust mee komen en als mogelijke infectiebron dienen. Het leidingwater zorgt er mogelijk voor dat Ps los kan weken van de aangekoekte plantenresten of eventuele bacteriële biofilm aanwezig op het fust.

Ook het cirkelzaagje blijkt een duidelijke besmettingsbron te kunnen vormen. Deze bleek besmet met Ec.

Bemonsteren veilingfust, opzetrekkjes en water bij dezelfde kweker (17 juni 2008)

Monsternummer en plaats monster (zie Fig.9)

1. Water container (vies)
2. Opzetrekkje (extension) onderzijde bij korte stelen/bovenzijde bij lange stelen
3. Opzetrekkje (extension) bovenzijde bij korte stelen/onderzijde bij lange stelen
4. Lopende band
5. Watercontainer schoon
6. Vuil fust met schoon water + 1 Zantedeschia-steel
7. Cirkelzaagje aan de bosmachine (zaagje was vettig)
8. Opzetrekkje (extension) onderzijde bij korte stelen/bovenzijde bij lange stelen
9. Opzetrekkje (extension) bovenzijde bij korte stelen/onderzijde bij lange stelen
10. Leidingwater voor vullen fust (neg.controle)
11. Negatieve controle wattenstaafje in 1x PBS



Figuur 9. Bemonstering van het opzetrekkje voor de verschillende monsternummers

Monsters zijn met wattenstaafjes genomen en getest met PCR (Tabel 23) op *Erwinia chrysanthemi* (Ech), *Erwinia carotovora* (Ecc/Eca) en *Pseudomonas* ssp.

Tabel 22. PCR-toets voor Ech, Eca/Ecc en *Pseudomonas ssp* (Ps) op fust (17 juni)

Monster(*)	Ech	Eca/Ecc	Ps
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	+	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	+	-
10	-	-	-
11	-	-	-

Conclusie

In het vuile fust met schoon water + 1 Zantedeschia-steel en aan een opzetstukje voor korte stelen bovenzijde (monster 9) werd Ec gevonden (Tabel 22).

Opgemerkt dient te worden, dat het zaagje in de tweede bemonstering erg zwart was, zelfs vetzig, wat mogelijk de PCR verstoord heeft en dat in het veilingfust met schoonleidingwater een Zantedeschia-steel in de bak stond, waardoor de herkomst van de besmetting (steel of fust) onduidelijk is.

Discussie

Het is aangetoond dat in veilingfust bacteriën kunnen achterblijven. Of Deze hoeveelheden voldoende zijn om Zantedeschia- stelen in korte tijd ook echt te infecteren dient verder uitgezocht te worden. Om dit te bekijken zouden een aantal stelen van dezelfde partij in schoon en vuil fust een tijdje onder geconditioneerde omstandigheden weggezet kunnen worden.

Hoe zit het met de hoogte in de steel waar de verslijming optreedt? Ervaring leert dat de stelen vaak boven het midden knikken terwijl uit eerdere proeven met inkt blijkt dat water uit de vaas maximaal tot een hoogte van 7 cm in de steel wordt opgezogen (5.1).

Een monster van en opzetstukje bleek in PCR positief voor Ec. Het gaat hierbij om de bovenkant van het rekje indien gebruikt als opzetstukje bij korte stelen. Het is aannemelijk dat Zantedeschia- stelen op deze plek beschadigd raken tijdens transport en eventuele bacteriën versmeren aan het metaal.

Voor een betrouwbare analyse zouden uiteraard veel meer monsters genomen moeten worden bij meerdere bedrijven. Er zou ook onderzocht moeten worden welke procedures afdoende zijn om veilingfust te desinfecteren. Meer onderzoek naar het voorkomen van zg. biofilms is wenselijk; uit eerder onderzoek is gebleken dat zowel *Erwinia* als *Pseudomonas* hiertoe in staat is

7 Algemene conclusies en discussie

Bacteriegroei in vaaswater is een algemeen probleem bij snijbloemen. Vooral in roos en Gerbera komen deze problemen voor, vaak in relatie tot verstopte vaten door groei van micro-organismen. Veelal zijn *Pseudomonas*-soorten de boosdoener, maar ook andere species zoals *Bacillus* en zelfs *E. coli* (Marousky, 1977).

Pseudomonas-soorten maar vooral *Erwinia (carotovora* susp. *carotovora*) veroorzaken slijmstelen. Hier is sprake van afbraak van de onderkant van de stelen door o.a. de werking van celwandafbrekende enzymen (pectinasen). Er zijn door andere onderzoekers bij *Zantedeschia* ook andere bacteriesoorten gevonden, zoals *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas veronii*, *Chryseobacterium indologenes* en *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Krezjar *et al.* 2008). In een enkel geval heeft men eveneens *E. chrysanthemi* aangetroffen (Lee *et al.* 2006), de *Erwinia*-soort die momenteel als agressief snot voor veel problemen zorgt in zowel de aardappel- als de bloembollenteelt (Van Doorn *et al.* 2008a).

In dit onderzoek zijn vooral de *Pseudomonas*-soorten *viridiflava* en *fluorescens* aangetroffen, naast enkele malen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc). Deze bacteriën zijn aangetroffen in bloemen afkomstig uit de kas, van het veld en vanuit import. Mogelijk overleeft Ecc slechter of wordt door pseudomonaden weggeconcurrerd; Ecc bleek wel effectiever slijmstelen te veroorzaken.

Via PCR is *Pseudomonas* en Ecc goed aantoonbaar, en beschikbaar voor verder onderzoek. PCR als test om slijmstelen aan te tonen lijkt echter geen haalbare toets voor de veiling (persoonlijke mededeling FloraHolland); andere mogelijke testen moeten in overweging genomen worden. Men denkt aan een enzymatische kleuring, of een specifieke uitplaatstest: testen die met de huidige uitrusting en personeel goedkoop en snel uitvoerbaar zijn.

Resistentie tegen Ecc is aanwezig in bepaalde "geotypes" van *Zantedeschia* (Cho *et al.* 2005) en loopt van bijna resistent tot aan zeer gevoelig. Er zijn berichten, dat er resistentie ingebouwd kan worden tegen zachtrot, en dat er meer of minder resistente cultivars bestaan (Yip *et al.* 2007; Cho *et al.* 2005). Of dit ook bescherming biedt in de naoogstfase (op vaas), is niet duidelijk. Aan resistentie is geen aandacht besteed in dit onderzoek; wel zijn de meest verhandelde cultivars in het onderzoek onder de loep genomen.

Er is geen correlatie gevonden tussen de aantallen bacteriën die in het vaaswater zitten of in de onderste 2 cm van de stengels, en de mate van het optreden van slijmstelen. Het gaat waarschijnlijk meer om de activiteit van de bacteriën; pathogene *Pseudomonas* of *Erwinia* die (grote?) hoeveelheden celwandafbrekende enzymen maken. Het afsnijden van de onderste 2 cm van de steel helpt wel om minder slijmstelen te krijgen (weghalen van het inoculum aan bacteriën).

Verschillende malen werd *Pseudomonas* aangetoond en geen *Erwinia carotovora* of *E. chrysanthemi*. Bacteriën (schadelijk en niet-schadelijk) zijn altijd aanwezig in verschillende hoeveelheden (afhankelijk van partijen); hierdoor is een verband tussen bacterietellingen enerzijds en het ontstaan van slijmstelen anderzijds niet gemakkelijk te maken. Het verband tussen de aanwezigheid (en hoeveelheid/dichtheid) van *Pseudomonas* en het percentage slijmstelen is daardoor moeilijk te leggen. Het lijkt aannemelijk dat in die gevallen waarin voorbehandelingsmiddelen niet effectief waren de stengels al bij de oogst inwendig besmet waren en niet door de middelen werden gereinigd. Het verdient daarom aanbeveling onderzoek uit te voeren naar de teelt en oogst van *Zantedeschia* om te zien of en zo ja waar en wanneer *Erwinia* of *Pseudomonas* in de stelen geïntroduceerd wordt.

Het onderzoek liet zien, dat in de steel wisselende concentraties bacteriën aanwezig zijn, ook halverwege de steel. Het is niet aannemelijk, dat verslijming halverwege de steel of onder de bloem veroorzaakt wordt door actief omhooggekomen bacteriën. Via de passieve sapstroom kan vaaswater in twee weken tijd slechts 5 tot 7 cm hoog in de stengel komen. We moeten er vanuit gaan, dat dit verschijnsel niet door het trekken van de stelen maar door al aanwezige celwandafbrekende bacteriën (*Pseudomonas*, *Erwinia*) veroorzaakt wordt. In sommige experimenten verslijmde bijna 20% van de stengels halverwege de stengel en niet onderaan. In bijna alle gevallen ontstond verslijming halverwege de stengel bij bloemen die een afzetsimulatie hebben ondergaan. Mogelijk is de afzetperiode verantwoordelijk voor het verslijmen

halverwege de stengel.

Er is verondersteld dat het halverwege de stengel verslijmen van de steel veroorzaakt kan worden door het 'te hoog' trekken van de stelen bij de oogst. Onderzoek daarna liet geen effect zien van de hoogte waarop de stengel werd getrokken en het verslijmen. Slijmsteelproblemen kunnen derhalve hun oorsprong mogelijk al in de teelt vinden. Hier is binnen dit onderzoek geen aandacht aan besteed wat betreft de hieraan ten grondslag liggende oorzaken.

Men voert wel aan, dat zachtrot in *Zantedeschia* gestimuleerd wordt door gebrekkige rotatie, natte gronden met een andere pH dan 5.5-6.5 en een overmaat aan stikstof; calcium zou net als in aardappel en witlof weer positief werken op de weerstand tegen *Erwinia*. Dit laatste is niet bevestigd in onderzoek bij bolgewassen. Oogsten van stelen zou niet met vochtig gewas moeten plaatsvinden vanwege het grotere risico op bacterie-infectie; mogelijk zou hier introductie van bacteriën kunnen plaatsvinden, waarna deze bacteriën latent (sluimerend, in lage aantallen) in de plant blijven. Vers geoogste knollen zouden zo snel mogelijk gedroogd moeten worden om huidvorming te stimuleren.

Hygiëne in het bedrijf en vooral in fust en opzetrekjes is aan te raden, te meer *Pseudomonas* en *Erwinia* hier (mogelijk in zg. biofilms) kan overleven. Deze laagjes bestaan vaak uit meerdere bacteriesoorten die, net als in tandplak, beter bestand zijn tegen bv. uitdrogen en zich onder gunstige omstandigheden (water, plantenextracten) explosief kunnen vermenigvuldigen. Het verwijderen van biofilms (vastgehechte laagjes van bacteriën), die vaak veel hardnekkiger zijn, is vaak moeilijk.

Er blijkt geen duidelijk verschil in werking tussen de nieuwe chloorpil, Florissant 520 en een reinigingsmiddel voor doding van *Erwinia* of *Pseudomonas* in leidingwater. Een duidelijk effect is wel te zien bij het gebruik van de oude of de nieuwe chloorpil. De oude chloorpil blijkt *Pseudomonas* niet te doden, de nieuwe wel. Deze nieuwe chloorpil (Chrysal CVBN) heeft in de vergadering van de CTGB op 18 december 2008 een toelating gekregen. *Pseudomonas* lijkt dan ook toleranter voor chloor dan *Erwinia* waartegen de oude en nieuwe chloorpil even goed werkte.

Eerder onderzoek (Emara 2002) liet zien, dat een lage temperatuur (2-8 °C) voor bewaring van stelen het beste is ter voorkoming van slijmstelen; dit zijn temperaturen waar bacteriën nauwelijks kunnen groeien. Een chloortablet blijft aan te raden om slijmstelen te voorkomen. In dit onderzoek is geen correlatie gevonden tussen aantallen bacteriën enerzijds, en mate van verslijming anderzijds. Een test op soort bacterie zal wellicht uitsluitsel kunnen geven; door de werkelijke boosdoener(s) aan te tonen en niet de onschadelijke andere bacteriën is een gerichte check op slijmstelen beter mogelijk.

In de literatuur worden voor verwante bacteriën mogelijke middelen geopperd. Zo zou de combinatie van natriumhypochloriet en waterstofperoxide te kunnen werken om *Pseudomonas aeruginosa* (een humane pathogeen, maar is ook aan te treffen in het milieu) te verwijderen van roestvrij staal en aluminium (DeQueiroz *et al.* 2007). Of dit werkt bij planten is niet bekend.

De geteste middelen werken vrij goed tegen slijmstelen, maar niet 100%. In de literatuur wordt ook aangegeven dat zg. slow-release chloorverbindingen in de meeste gevallen de aantallen bacteriën laag houden ((Marousky 1977); ook chloordioxide (ClO₂) kan het vaasleven van een aantal snijbloemen verlengen.

Externe en interne potentiële pathogenen van *Zantedeschia* kunnen via een nogal rigoureuze behandeling met antifungiciden en antibacteriële middelen gedesinfecteerd worden; men kan namelijk een scala aan organismen aantreffen op rhizomen (waaronder *Fusarium*, *Pythium* en *Rhizoctonia*) (Kritzing *et al.* 1998). Dit is echter niet werkbaar, en richt zich meer op ziekteverwekkende schimmels.

Middelen kunnen waarschijnlijk niet doordringen tot de bacteriën hoger dan 5-7 cm in de steel. Het lijkt raadzaam om ten minste 5 tot 7 cm van de steel te snijden om zo extra besmetting van het vaaswater te verminderen.

Samenvattend: dit onderzoek heeft uitgewezen dat meerdere soorten bacteriën slijmstelen kunnen veroorzaken, dat bacteriën zich ook hoog in de steel kunnen bevinden, en dat het afsnijden van de onderste 3-5 cm een groot deel van de besmetting kan wegnemen. De nieuwe chloorpil werkt beter dan de "oude" pil; toch is de werking beperkt wanneer er al veel bacteriën in het vaaswater aanwezig zijn. Belangrijke

resterende vragen zijn hoe nu stelen hoog in steel besmet kunnen zijn of geraken met Ecc en *Pseudomonas*. Kennis omtrent de fase waarin bacteriën in de plant worden geïntroduceerd is daarom belangrijk. Daarnaast is een simpele (kleur-) test gewenst om de mate van besmetting door slijmsteelveroorzakende bacteriën eenvoudig te kunnen vaststellen; een simpele uitplaatmethode is niet geschikt daar ook onschuldige microben dan zichtbaar worden.

8 Overleg en output

Bijeenkomsten begeleidingscommissie

- Begeleidingscommissie 16 juni 2007, Lisse
- Extra bijeenkomst Slijmstelen Zantedeschia, 6 november 2007 (FPC Zantedeschia)
- Begeleidingscie 17 december 2007
- Begeleidingscie 17 november 2008

Poster slijmstelen (zie bijlage).

(open middag/kennismiddag 2008 en 2009)

Vakbladartikelen

“Slijmstelen in Zantedeschia: *Pseudomonas* is ook een veroorzaker!”

Joop van Doorn, Paul van Leeuwen, Khanh Pham, Robert Dees en John Trompert; BloembollenVisie 2009 (159):33-34

“Slijmstelen in zantedeschia: *Erwinia* niet enige spelbreker”. Paul van Leeuwen en Joop van Doorn. Vakblad voor de Bloemisterij 3 (2009): 44-45

9 Literatuur

1. Cho HR, JH Lim, KJ Yun, RC Snijder, DH Goo, HK Ree, KS Kim, HY Joung and YJ Kim 2005. Virulence variation in 20 isolates of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on *Zantedeschia* cultivars in Korea Acta Hort. 673: 653-659
2. Cottyn, B., K. Vanhouteghem, J. Heyrman, J. Van Vaerenbergh, P. Bleyaert, M. Höfte, P. De Vos, M. Maes (2006). Midrib rot of butterhead lettuce caused by *P. cichorii* and other fluorescent pseudomonads. Proceedings of 11th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Edinburgh, 10-14 July 2006, page 138.
3. DeQueiroz GA and DF Day 2007. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* from surfaces. J. Applied Microbiol. 103: 794-802.
4. Emara A. 2002. *Zantedeschia*, bloem op stand: *Zantedeschia* voorbehandelen en bewaren. Afstudeerverslag Vakgroep Tuinbouw, Agrarische Hogeschool Delft
5. Krejzar V Mertelík J., Pánková I., Kloudová K., Kúdela V. 2008. *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp. Plant Prot. Sci. 44: 85-90
6. Kritzinger EM, R Jansen van Vuuren, B Woodward, IH Rong, MH Spreeth, and MM Slanbber 1998. Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 61-65
7. Lee Y-A, K.-P. Chen and Y.-W. Hu. 2006. Characterization of *Erwinia chrysanthemi*, the soft-rot pathogen of white-flowered calla lily, based on pathogenicity and PCR-RFLP and PFGE analyses Plant Pathology 55: 530-536
8. Liao, Ching-Hsing; Fett, William; Tzean, Sean-Shong and Hoffman, Gabriel 2006. Detection and sequence analysis of an altered pectate lyase gene in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and related bacteria. Canadian Journal of Microbiology 52: 1051-1059.
9. Marousky FJ 1977. Control of bacteria in Gypsophila vase water. Proc. Flo. State Hort. Sci. 90: 297-299.
10. Van Doorn J, P Vreeburg, P van Leeuwen 2008a. Beheersing van *Erwinia* in bolgewassen. PT rapport 11863.
11. Van Doorn J, R Houtenbos, R Dees en J van der Wolf 2008. Overleving van *Erwinia* in water: waakzaamheid geboden. BloembollenVisie 138: 22-23
12. Van Doorn, Danielle van Kampen, Trees Hollinger, Patricia van der Zouwen, Arjen Speksnijder en Jan van der Wolf 2007. Overleving van *Erwinia* in grond en op materialen onderzocht. BloembollenVisie 115: 20-21
13. Van Leeuwen P en J van Doorn 2009. Slijmstelen in *Zantedeschia*: *erwinia* niet enige spelbreker. Vakblad Bloemisterij 3: 44-45.

10 Bijlage (poster Open Middag 2008-2009)



PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING
WAGENINGEN UR

Slijmstelen in Zantedeschia

Joop van Doorn, Paul van Leeuwen, Khanh Pham, John Trompert, Robert Dees, Rianne Houtenbos
e-mail: Joop.vandoorn@wur.nl

Wat is de oorzaak?

Erwinia carotovora ssp. *carotovora* wordt bijna altijd in de knol gevonden.

Nieuw: in het onderzoek is vooral *Pseudomonas* gevonden in stelen van alle herkomsten:

- onder glas
- van buiten
- uit import

Infectie van bloemstelen

Erwinia ging snel dood in schoon leidingwater.

Bacteriën overleefden langer wanneer veel stelen of plantensap aanwezig waren in het vaaswater.

Bacteriën in de vaas gaven nauwelijks slijmstelen.

De gevonden *Pseudomonas* kan ook celwanden oplossen, net als *Erwinia*.

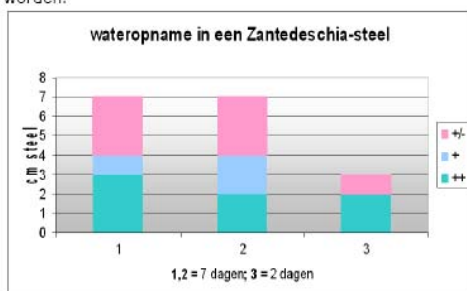
Wanneer vindt steelinfectie plaats?

Regelmatig blijkt de onderste 2 cm van de steel besmet te zijn met bacteriën.

Heeft infectie plaatsgevonden na de oogst?

Daarnaast blijken de bacteriën zowel uit de aanvoer op de veiling als ook direct bij de oogst soms al veel bacteriën halverwege de steel of net onder de bloem te hebben. Het lijkt erop dat besmetting soms al tijdens de teelt plaatsvindt.

Bloemen nemen over het algemeen erg weinig water op; bacteriën en middelen zullen dus niet snel hoog opgezogen worden.



Figuur 1: Wateropname was zeer beperkt.



Figuur 2. Bacteriën soms al in de bovenste helft bij de oogst.

Oogst, voorbehandeling, afzet

- De hoogte waarop de bloemsteel werd getrokken bleek niet van invloed op het verslijmen.
- Toevoegen van middelen zoals een chloorpil aan water kan effectief zijn om water schoon te houden. Het zal de bacteriën in de steel echter niet doden.
- De afzet (simulatie) bleek niet van invloed te zijn op het ontstaan van slijmstelen.

Vervolg van onderzoek in 2008

- Is er een verband tussen het aantal bacteriën in onderste twee cm van de steel en het ontstaan van slijmstelen?
- Moet daarbij specifiek gelet worden op de aanwezigheid van *Erwinia* en *Pseudomonas*?
- Toetsen van middelen om bacteriën in fust en vaaswater te doden.
- Komt de besmetting al vanuit de knol?

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel.: 0252 - 46 21 21
Fax: 0252 - 46 21 00
E-mail: infobollen.ppo@wur.nl
Internet: www.ppo.wur.nl

Productschap  Tuinbouw