

Gezamenlijke toetsontwikkeling op *Erwinia chrysanthemi* in volle gang

Om zeker te zijn dat uitgangsmateriaal, zoals werkbollen van hyacint, vrij is van *Erwinia*, zijn betrouwbare, gevoelige en snelle toetsen nodig. Op laboratoriumniveau zijn ELISA- en DNA-technieken zoals PCR, op agressief snot (*Erwinia chrysanthemi*) wel uitvoerbaar, maar er zijn nog problemen. Praktijkervaring met grotere hoeveelheden bollen of knollen ontbreekt nog. In overleg met de keuringsdiensten BKD en NAK (Emmeloord) wordt de volgende stap naar laboratoriumtoetsen voor de praktijk ingezet.

Tekst: Joop van Doorn, Robert Dees, Wendy Martin, Peter Vreeburg en Paul van Leeuwen, PPO Bloembollen
Foto: PPO Bloembollen

Vooral agressief snot (*Erwinia chrysanthemi*, nu *Dickeya* genoemd) belaagt de bloembollensector in gewassen als hyacint, iris, dahlia en Muscari. In Zantedeschia brengt met name *Erwinia carotovora* (nu *Pectobacterium carotovorum* genoemd) schade toe. Of dit hetzelfde type is dat vroeger het oude witsnot in hyacint veroorzaakte is niet zeker. Er zijn steeds meer aanwijzingen, ook uit de aardappelsector, dat er nu agressievere *Erwinia*-isolaten zijn die van hogere temperaturen houden (klimaatverandering).

De vraag hoe *Erwinia* in het plantgoed terecht komt is niet eenvoudig te beantwoorden. Dit kan via besmetting bij de verwerking van de bollen. We weten ook dat *Erwinia* latent (sluimerend) aanwezig kan zijn en ook via het uitgangsmateriaal "binnen" kan komen. Wanneer het uitgangsmateriaal dus zo vrij mogelijk is van *Erwinia*, zou de teelt sterk moeten opknappen. Maar tijdens handelingen als rooien, schonen en sorteren is het natuurlijk mogelijk dat er, via versmering, toch weer *Erwinia* in het bolmateriaal terecht komt. Voorkomen moet worden dat gezonde partijen op die manier worden besmet.

LABORATORIUMTOETSEN

Een manier om dit bacterierot in te perken, is het toetsen van uitgangsmateriaal zoals werkbollen, en weefselweekmateriaal van dahlia en Zantedeschia. Er is een serologische toets



Fig. 1. *Erwinia chrysanthemi* zit vooral in de neus en in de bolbodem

(ELISA) beschikbaar welke *Erwinia chrysanthemi* aantoonbaar is; met DNA-toetsen (PCR) is zowel *E. chrysanthemi* als *E. carotovora* aan te tonen.

Een belangrijke eerste stap is de monsterbehandeling. Hyacintenbollen geven, vooral kort na rooien, bij fijnmalen een zeer stroperige suspensie die moeilijk te verwerken is. Dit komt door allerlei reservestoffen die in de bol

.....
'De vraag hoe *Erwinia* in het plantgoed terecht komt is niet eenvoudig te beantwoorden'
.....

aanwezig zijn, waaronder fructanen (suikers). Ook dienen de bollen eerst goed schoongemaakt (aarde, bolhuid) te worden. Na onderzoek is gebleken dat *Erwinia* met name in de neus en de bodem zit; deze delen worden fijn-gemalen en in een zogenaamd voorkweek-groeiemedium gestopt. Dit vloeibare, zuurstof-arme groeiemedium bestaat voornamelijk uit celwandbestanddelen (pectine) waar niet veel bacteriesoorten op kunnen groeien; de bacterie moet namelijk speciale celwandafbrekende enzymen kunnen produceren om hier op te kunnen groeien. *Erwinia* kan dat wel, andere bacteriën kunnen dat vaak niet zodat je selecteert op *Erwinia*! Om een hele partij bollen te toetsen moet men steekproeven (een monster) nemen. Bij het toetsen van bollen op *Erwinia*-soorten speelt de monstergrootte dus een belangrijke rol. Om 1% zieke bollen in de partij betrouwbaar (95% betrouwbaarheid) aan te kunnen tonen is minimaal een monster van 300 bollen nodig. Door bollen van het monster in groepjes samen te voegen (poolen) daalt de prijs van het onderzoek en is toch een inzicht te krijgen in het percentage *Erwinia*-zieke bollen.

RESULTATEN TOT NU TOE

Door plakjes van de bollen te onderzoeken op aanwezigheid van *Erwinia* bleek dat *Erwinia* met name in de bolneus zit (Fig.1). Dit moet nog uitgebreider onderzocht worden om zeker te zijn dat bij toetsing van grote aantallen bollen altijd volstaan kan worden met een stukje neus. Ook werd af en toe de bacterie *Pseudomonas* aangetroffen; onduidelijk is of deze ook eenzelfde rot als *Erwinia* kan geven. Na twee dagen bij 25-28°C in het voorkweekmedium bleek *E. chrysanthemi*, en ook *E. carotovora*, voldoende gegroeid te zijn; in deze tijd vermenigvuldigen de aanwezige *Erwinia*-soorten zich minstens een miljoen keer. Dit is ruim voldoende om ook geringe aantallen *Erwinia*-bacteriën zichtbaar te maken in ELISA (Fig.2), en zeker in de gevoeligere PCR-methode. Voor de PCR-toets bleek een DNA-zuivering noodzakelijk; een handeling die meer tijd en geld kost dan wanneer de toets direct op hele bacteriën had kunnen worden uitgevoerd. Ook is onderzocht of de DNA- en ELISA-toets op andere bolgewassen (met andere typen reservestoffen en bestanddelen) werkten. Met de gebruikte voorkweekstap en DNA-isolatie bleek dit het geval voor iris, Zantedeschia, en Muscari. Bij dahlia moet voor ELISA wel een extra stap uitgevoerd worden. Ondanks deze vooruitgang levert de routinematige verwerking van het hyacinten-

bolsap echter nog steeds de belangrijkste problemen op voor de uitvoering van een praktijktoets.

VERVOLG

Om veel praktijkmateriaal te kunnen toetsen, zoals werkbollen, steekproeven van partijen bollen, eventueel veldmonsters, is een routinematige en grootschalige aanpak noodzakelijk. Deze is er nog niet; er moet nog een aantal zaken worden uitgezocht. In overleg tussen PPO, BKD en NAK is nu het streven om in 2009 experimenteel grootschalige pilot-toetsen bij de NAK uit te voeren. PPO en BKD zullen samen, in overleg met de NAK, aan de slag gaan om zaken die een toepassing in de weg staan (o.a. storend plantensap, waar zit *Erwinia* precies in de bol) verder uit te zoeken. Vergelijkend onderzoek, waarbij dezelfde bolmonsters die bij de NAK worden onderzocht, ook door BKD en PPO worden getest, staat ook in de planning. De NAK heeft jarenlange ervaring met bacterietoetsen, ook wat betreft *Erwinia chrysanthemi*, op aardappelpootgoed. Samen met de praktijkkennis van de BKD over het toetsen op bloembollen, de kennis van PPO op het gebied van

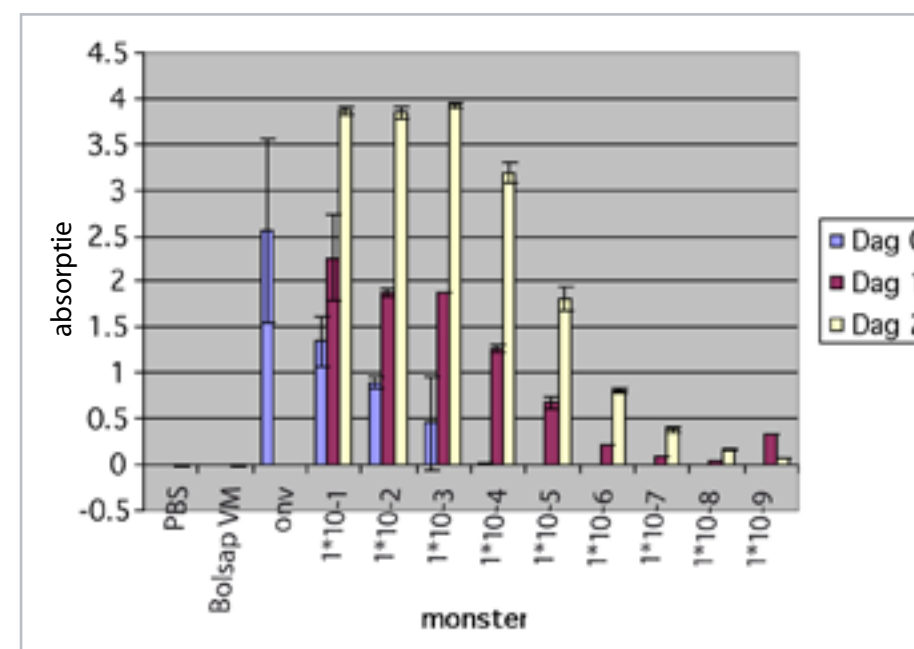


Fig.2. Serologische toets (ELISA) op agressief snot (*E. chrysanthemi*) in voorkweekmedium. Het beste resultaat is na 2 dagen voorkweek (geel). Adsorptie= mate van kleuring in ELISA (hoe meer kleuring hoe meer bacteriën); monster = verdunningen van een hyacintenmonster na de voorkweekstap

NAK werkt aan gedifferentieerde aanpak

De Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van landbouwgewassen (NAK) houdt zich bezig met de kwaliteit en certificering van vooral pootaardappelen, grassen en granen en verricht daarmee het zelfde type werkzaamheden als de BKD. Jaarlijks worden op het laboratorium onder meer zo'n 23.000 monsters pootaardappelen onderzocht op de bacterieziekten bruinrot en ringrot, en zo'n 1600 monsters op *Erwinia*. Op dit moment hanteert de NAK een serologische toets (ELISA) waarmee twee *Erwinia*-bacteriën kunnen worden aangetoond: *Erwinia chrysanthemi* en *Erwinia atroseptica*. Om ook op *Erwinia carotovora* te kunnen toetsen ontwikkelt de NAK momenteel een moleculaire methodiek waarmee alle drie belangrijke *Erwinia*-soorten in één keer kunnen worden aangetoond. Het is deze laatste methodiek die dit voorjaar, als proef, ingezet zal worden voor het toetsen van praktijkmateriaal van hyacint.

De kosten van onderzoek op *Erwinia* in pootaardappelen hangen straks sterk af van de gekozen monstergrootte en van de vraag of een serologische dan wel een moleculaire toets wenselijk is. Ook maakt het uit of de inzender om een kwalitatieve toets (zit er *Erwinia* in mijn partij of niet?) of om een kwantitatieve toets (hoeveel procent *Erwinia* zit er in mijn partij?) vraagt. Bij de NAK wordt gezocht naar een gedifferentieerde aanpak (afhankelijk van de vraag van inzender) waarbij die kosten voor de telers zo laag mogelijk zijn.

Resumé

Erwinia bezorgde menig ondernemer de afgelopen jaren de nodige hoofdbreken. Onderzoek door PPO reikte al een aantal oplossingen aan. Nader onderzoek is gedaan naar de mogelijkheid om partijen te toetsen. In dit artikel de achtergronden bij dit onderzoek.

toetsontwikkeling en van *Erwinia*, zal dit hopelijk leiden tot een spoedige start van toetsingen op *Erwinia*. Dit voorjaar zal de NAK in samenwerking met PPO en BKD als proef een twintigtal partijen hyacint toetsen met een toets, die ze zelf ontwikkeld hebben. Tegelijkertijd zal PPO uitzoeken wat de correlatie is tussen de stress-toets en laboratoriumtoetsen op verdachte hyacintenbollen. Deze stress-toets (zie het artikel op pagina 22 en 23) laat zien of in een partij hyacintenbollen *Erwinia* zit na (hardhandig) sorteren en warm (25-30°C) wegleggen. De mate van *Erwinia*-rot in deze partijen zal moeten uitwijzen in hoeverre de laboratoriumtoetsen een goede correlatie geven met de uiteindelijke kwaliteit van deze partijen bollen. Of er op korte termijn een voor de praktijk toepasbare toets beschikbaar komt, hangt uiteraard af van de verkregen resultaten. Bij succes zullen deze laboratoriumtoetsen mogelijk in de toekomst ook ingezet kunnen worden voor bolgewassen zoals iris, Muscari, Scilla en dahlia. In Zantedeschia komt nauwelijks of geen agressief snot voor. Toetsen op het "oude witsnot" (*E. carotovora*) dat hier de schade veroorzaakt, zal verder onderwerp zijn van onderzoek.

Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw.