

Erwinia: rot voor de bollenteler

Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen, Robert Dees en Wendy Martin

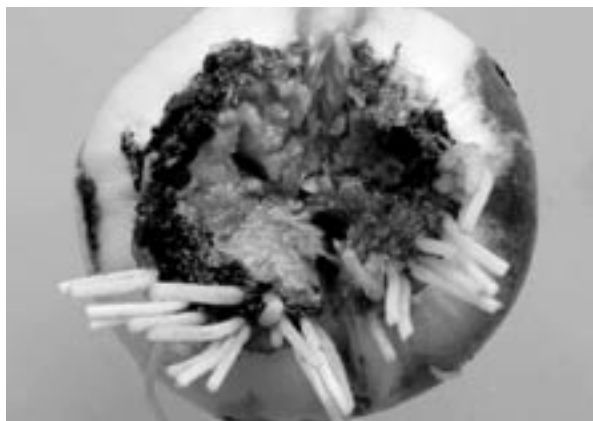
WUR, PPO Bloembollen, Boomkwekerijgewassen en Fruit, postbus 85, 2160 AB Lisse

De afgelopen acht jaar ondervonden bloembolgewassen zoals hyacint, Muscari, dahlia en iris in toenemende mate problemen met zachtrot: agressief snot zoals de gedupeerde telers deze bacterieziekte benoemden. Agressief rot heeft geleid tot grote teeltkundige problemen en economische schade. Deze bacterieaantasting wordt veroorzaakt door *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.). *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*, de veroorzaker van het zogenaamde “oude witsnot”, tast ook bolgewassen aan, maar geeft meestal veel minder problemen.

Vanaf 2004 tot eind 2007 is onderzoek aan *Erwinia* verricht binnen het PT-project ‘Beheersing van *Erwinia* in bloembollen’ en binnen LNV-projecten. Dit onderzoek was gericht op identificatie en toetsontwikkeling, besmettingsroutes, invloed van gewasrotatie en de productieketen op incidentie, overleving en beheersing van met name *Erwinia chrysanthemi*.

Inleiding

Ongeveer 8 tot 10 jaar geleden werden de eerste gevallen van een nieuw zachtrot zichtbaar in de bloembollen, vooral bij hyacint (Figuur 1), maar ook bij gewassen als *Muscari*, *Scilla*, iris, dahlia, freesia en amaryllis. In hyacint verschillen de symptomen sterk van “oud witsnot”, veroorzaakt



Figuur 1. Een door *Dickeya* aangetaste bolbodem van hyacint (boven) en zogenaamde ‘leeglopers’ bij hyacintebollen in de bewaring veroorzaakt door deze bacterie als gevolg van omzetting van de reservestoffen van de bol (onder).

door *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc; nu gereclassificeerd tot *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pcc). Het verschil tussen witsnot en het “nieuwe agressieve snot” is enerzijds het hogere percentage aangetaste bollen, anderzijds de grotere snelheid en mate van aantasting (agressiviteit). Ook werd geconstateerd dat deze nieuwe bacterierot bij hogere temperaturen tot ontwikkeling komt dan de ziekte veroorzaakt door Pcc.

De laatste jaren, vanaf 2003, zijn er in toenemende mate problemen met rot in bolgewassen. Deze rotproblemen worden in de meeste gevallen door *Erwinia chrysanthemi* (tegenwoordig ook *Dickeya* genoemd) veroorzaakt.

De oude benaming “*Erwinia*” wordt nog steeds gebruikt voor de bacteriële rotproblemen in het bloembollenvak die door *Pectobacterium* of *Dickeya* spp. worden veroorzaakt.

In de hele bloembolproductieketen, het veld, kas, bewaring en export, veroorzaakte het agressieve rot in toenemende mate schade, vergelijkbaar met wat zich afspeelt in de pootaardappelsector. Cijfers voor de bollensector zijn niet voorhanden, omdat er niet op *Erwinia* wordt gekeurd; geschat wordt dat de gezamenlijke schade in teelt en export jaarlijks tussen de 4 en 8 M€ bedraagt.

Bij hyacint vindt grote uitval plaats tijdens de bewaring. Soms rotten partijen voor 100% weg. Mogelijke vormen van rot veroorzaakt door *Erwinia* zijn: “leeglopen van bollen” en zogenaamde “kroepoek” (Tabel 1).

In het gewas dahlia zijn er sterke aanwijzingen dat *Erwinia* betrokken is bij het verschijnsel “ploffers” (natrot). In sommige partijen dahlia vallen hoge percentages knollen weg waardoor

Tabel 1. Overzicht van *Erwinia*-soorten in de bloembollensector

<i>Erwinia</i> -soort	Nieuwe benaming	Bijzonderheden	Ziekte
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Ecc)	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Heel diverse soort	witsnot
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Weinig diverse soort; komt tot zover bekend nauwelijks voor in bloembolgewassen	Witsnot?
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Dickeya</i> spp: <i>D. dadantii</i> , <i>D. chrysanthemi</i> , <i>D. zea</i> , <i>D. paradisiacal</i> , <i>D. dianthicola</i> , <i>D. dieffenbachia</i>	In meerdere soorten onderverdeeld	“Agressief snot”
<i>Erwinia rhapontici</i> *	<i>Erwinia rhapontici</i>	Veroorzaakt in hyacint “snotlintjes”	“Inwendig neusrot”
<i>Erwinia herbicola</i> *	<i>Pantoeae agglomerans</i>	Er komen zowel pathogene als niet-pathogene isolaten voor	“Kroepoek”

* wordt weinig aangetroffen

de stekproductie van deze soorten erg wordt bemoeilijkt.

Bij *Zantedeschia* is *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) al lang een probleem; *Dickeya* tast dit gewas vrijwel niet aan. Ecc kan soms tot 30% uitval geven in de teelt. Ook bij export van partijen *Zantedeschia* (Calla) leiden *Erwinia*-aantastingen tot aanzienlijke schade.

In iris wordt sinds enkele jaren veel uitval geconstateerd door zachtrot in de bewaring en tijdens de rooi. Er zijn aanwijzingen dat een *Erwinia*-soort betrokken zou zijn bij dit “stinkend zachtrot” of zelfs hoofdveroorzaker zou zijn. Ook in *Muscari* nemen de problemen met rotbacteriën toe. Een geconcentreerde aanpak, gericht op het *Erwinia*-probleem is dan ook meer dan wenselijk!

Aandachtspunten bollensector

Uit een enquête, gehouden onder bloembollentelers in 2004 bleek, dat ongeveer 70 % van de respondenten in mindere of meerdere mate last had van *Erwinia*. Spoelen van bolmateriaal werd als een belangrijke oorzaak gezien. Op zich niet vreemd omdat *Erwinia* een vochtminnende bacterie is, die snel met vrij water wordt verspreid. Onduidelijk was welke *Erwinia*-soorten verantwoordelijk zijn voor het veroorzaken van rot of snot en of ook andere bacteriesoorten of schimmels (bv. *Pseudomonas* spp. of *Fusarium*) zachtrot kunnen veroorzaken. Tevens werd de vraag gesteld welke toetsmethoden er bestaan om *Erwinia* aan te tonen en welke middelen aantastingen kunnen inperken. Op bedrijfsniveau was er veel belangstelling om te weten te komen of vruchtwisseling *Erwinia* kan overbrengen van het ene gewas naar het andere. Ook wilde men

weten of bemesting het gewas meer weerstand zou kunnen geven zoals calciumgift bij witlof. Ten slotte wilde de telers weten welke verwerkingshandelingen gedurende de keten - van het rooien van bollen tot aan het verpakken voor export - invloed hadden op de ziekte-incidentie.

Typing isolaten en toegepaste toetsmethoden

Analyses van 189 monsters, verdacht van zachtrot, werden uitgevoerd door middel van standaard PCRs. Onderzocht werden 134 monsters van hyacint, zeven van *Zantedeschia* en verder monsters van iris, dahlia, *Muscari*, sierui, amaryllis, freesia, krokus, *Brodiaea* en narcis. In ongeveer 70% werd *Erwinia* aangetroffen. Niet altijd kon *Erwinia* in monsters met specifieke symptomen worden aangetoond. In sommige gevallen werd *Pseudomonas* spp. of *Fusarium* spp. aangetroffen.

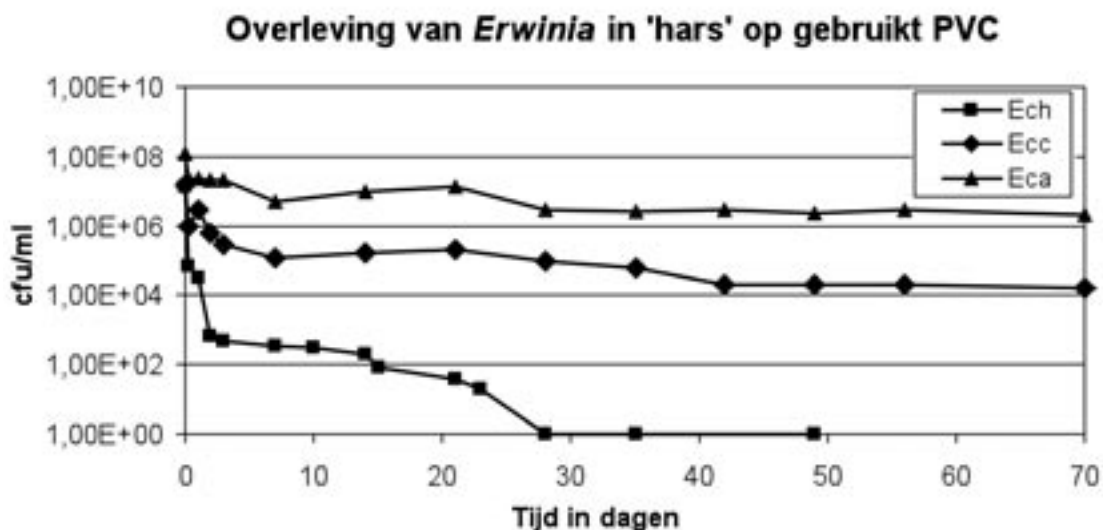
Van een aantal isolaten is onderzocht tot welke soort *Dickeya* deze behoorden. In hyacint werden *D. dadantii* en *D. zea* gevonden. Deze analyses zullen verder worden uitgebreid naar isolaten uit diverse soorten bolgewassen. Naast PCR zijn, in samenwerking met PRI en HZPC TaqMan PCRs getest om o.a. *Pectobacterium* en *Dickeya* te kunnen detecteren. Deze bleken over het algemeen goed bruikbaar. In de meeste gevallen werkte ELISA goed om *Dickeya* aan te tonen; in een paar gevallen werden echter ook kruisreacties met *Pseudomonas* geconstateerd. In samenwerking met PRI is ook Luminex toegepast; deze serologische methode biedt mogelijkheden voor routinematige toepassing (Peters *et al.*, 2007). Ook zijn alternatieve toetsmethodieken onderzocht (Van Doorn

et al., 2006). Stressinductie via mechanische beschadiging van bollen in combinatie met een temperatuurbehandeling wordt momenteel onderzocht op zijn praktische toepasbaarheid met als doel dit op bedrijven zelf te laten toepassen. MIPS (Multiple Imaging Plant Stress) is uitgevoerd op hyacintenbollen uit een zieke partij. De resultaten waren niet eenduidig. Ook niet-aangetaste bollen (*Erwinia*-vrij) gaven een signaal, waarschijnlijk als gevolg van kleine mechanische beschadigingen aan de buitenkant. Hoewel niet-destructieve methodieken om ziekten in de bol te kunnen aantonen zeer wenselijk zijn, lijkt deze methode (nog) niet geschikt.

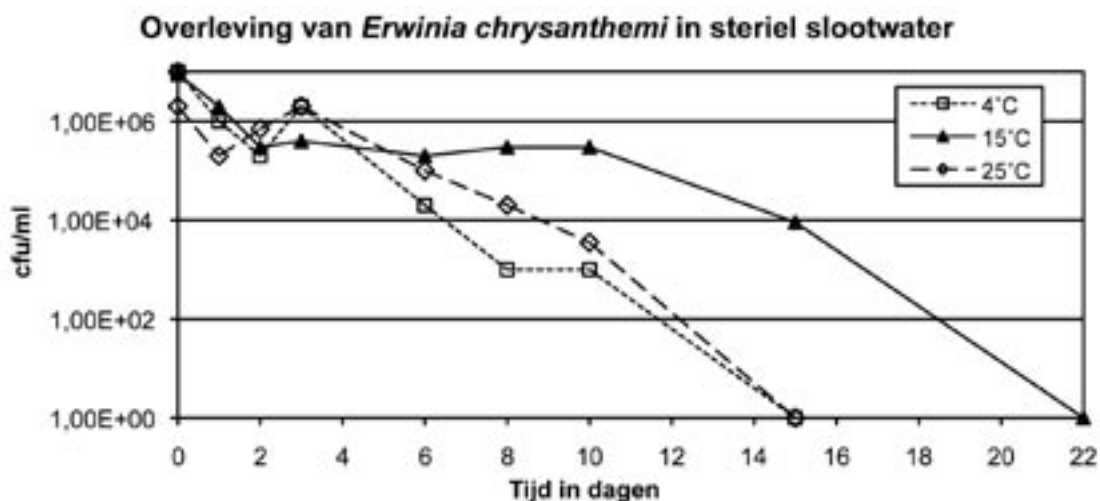
Overleving van *Erwinia*

Hoe *Erwinia* (vooral *Dickeya*) in schone partijen terecht komt, is niet duidelijk. Er zijn verschillende mogelijkheden: via regen, via irrigatiewater, via versmering (besmetting via aangetaste bollen op bv. sorteerbanden) en via latent besmette bollen. Omdat er bij de teelt van een aantal bolgewassen ook waterbroei wordt toegepast, is onderzocht hoe lang *Erwinia* kan overleven in water. Er bleek verschil tussen *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en *Dickeya*. In kraanwater overleefde *Dickeya* nauwelijks een dag; in bassin water langer, evenals in slotwater (Figuur 2). Deze overleving is temperatuurafhankelijk; in sommige gevallen werd de vorming van

ARTIKEL

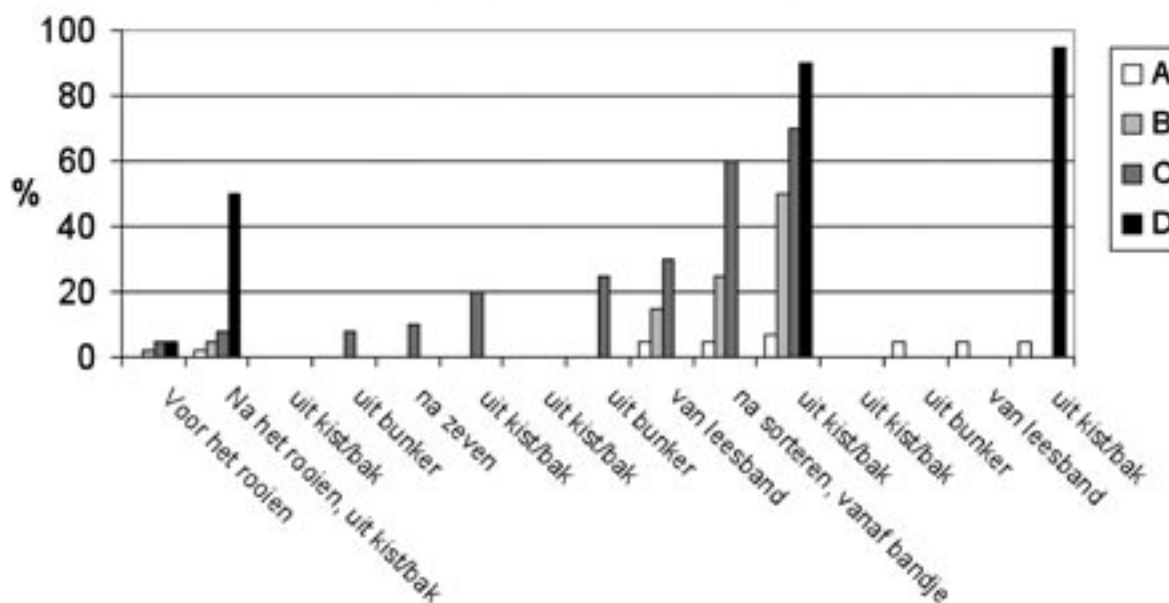


Figuur 2. Overleving van *Dickeya* en *Pectobacterium* spp. in "hars"(extracellulaire polysacchariden) op kunststof (PVC). Ecc = *E. carotovora* subsp *carotovora* (= Pcc = *P. carotovorum* subsp *carotovoru*;; Ech = *E. chrysanthemi*; Eca = *E. carotovora* subsp *atroseptica*.



Figuur 3. Overleving van *Dickeya* (*E. chrysanthemi*) in gesteriliseerd slotwater in kolonievormende eenheden. In tegenstelling tot *Pectobacterium* overleeft *Dickeya* relatief kort.

Bolbeschadiging tijdens verwerking hyacint



Figuur 4. Variatie in het optreden van beschadiging van hyacintebollen per bedrijf en het risico op *Erwinia*-aantasting als gevolg hiervan.

een biofilm geconstateerd, waarin bacteriën in het algemeen langer kunnen overleven dan in suspensies. Op materialen, zoals metaal, beton en vooral PVC, konden deze bacteriesoorten alleen in een bolexudaat ("hars") langer dan een dag overleven (Figuur 3). Als de bacterie vrij in suspensie op materialen wordt aangebracht, is de overleving sterk afhankelijk van de relatieve luchtvochtigheid. Hoe hoger de vochtigheid, hoe langer de overleving. Opvallend was dat *Dickeya* spp. sneller het loodje legt dan *Pectobacterium atrosepticum* en *P. carotovorum* supsp. *carotovorum* (Van Doorn *et al.*, 2007). Bedrijfshygiëne is hier wederom het toverwoord om besmetting van partijen bollen met *Erwinia* te voorkomen.

Ketenonderzoek

De invloed van een aantal stadia in de productieketen van vooral hyacintebollen is onder de loep genomen om te zien waar *Dickeya* spp. kan toeslaan. De mate van aantasting kan worden beperkt door een reeks van maatregelen vanaf rooien tot aan planten. Hygiënische maatregelen, getroffen gedurende de teelt en verwerking werpen vruchten af om verspreiding van agressief rot naar andere partijen te voorkomen. Verschillende ketenstadia zijn onderzocht: vruchtwisseling, bemesting, vermeerdering, drogen, verwerking en bewaring en de invloed van de uitvoering van handelingen op verschillende bedrijven. Figuur 4 geeft aan waar beschadigingen van hyacintebollen optreden bij verschillende bedrijven tijdens handelingen in de keten. Beschadiging staat vaak garant voor een *Erwinia*-aantasting;

bedrijf A heeft het onder controle (weinig beschadiging) terwijl bedrijf D bij rooien en sorteren een stuk voorzichtiger te werk zou moeten gaan!

Het vruchtwisselingonderzoek is gestart met grondbesmetting met *Dickeya* spp. en *Ecc* (*Zantedeschia*) via aangetaste bollen van hyacint, iris en *Zantedeschia*. Vervolgens zijn vijf bolgewassen (de eerder genoemde bolgewassen en dahlia en *Muscari*) in rotatie geteeld op deze percelen. De vruchtwisselingsexperimenten toonden geen relatie tussen besmetting van de grond en aantasting van de gewassen (Vreeburg *et al.*, 2007). De geconstateerde besmettingen werden veroorzaakt door besmetting die al in de aangeplante partijen aanwezig was. Bemesting van percelen met calcium, kalium, stikstof, selenium, mangaan, sporenmix en stalmest had geen duidelijk effect (positief of negatief) op aantasting door *Dickeya* spp. in hyacint. Het vermeerderen van bv. hyacint via snijden of hollen (groei van bolletjes op het wondweefsel) liet zien, dat mechanische overdracht van *Erwinia* mogelijk is, vooral via snijden. Er bleken ook latente besmettingen op te treden welke pas een jaar later zichtbaar werden. Dit en andere ervaringen leren dat gebruik van gezond uitgangsmateriaal van het grootste belang is.

Verwijdering van aangetaste of verdachte planten bij het rooien kan de verspreiding via versmering van *Dickeya* en *Pectobacterium* bij verwerking, onder andere bij het machinaal sorteren, beperken. Na rooien is snel drogen en voorzichtig (met

zo min mogelijk beschadigingen) verwerken bij schonen, sorteren, tellen en verpakken van groot belang. Deze verwerking dient zo laat mogelijk te worden uitgevoerd omdat na wondheling en afharding de kans op aantasting in de tijd minder wordt. Per bedrijf kan beschadiging en dus de kans op *Erwinia*-infectie sterk variëren (Figuur 4). Bij verwerking van bollen is het belangrijk om in verband met de warmteminnende *Dickeya* de temperatuur onder de 23-25°C te houden. Schonen door spoelen wordt uiteraard sterk afgeraden.

Bestrijding

Ozonbehandeling na beschadiging en infectie met *Erwinia* is toegepast op enkele kleine partij- en hyacint. Deze gaf geen beperking van nieuwe aantasting door *Dickeya* spp. Boldompeling van hyacinten met desinfecterende middelen zoals formaline, 'mild acid', Citrex of etherische olie gaven wisselende resultaten en gaven vaak ook meer aantasting. De aanwezigheid van water gaf waarschijnlijk *Erwinia*'s de kans zich te verspreiden. De werking van etherische olie in een bewaarcel kon tot op heden in enkele pilotexperimenten niet bewezen worden ondanks enkele positieve berichten uit de praktijk. UV-bestraling is niet toegepast.

Andere mogelijkheden zijn behandelingen van bollen in bewaarcellen met gasvormige middelen en eventueel een aanpak d.m.v. 'quorum quenching'. Hierbij wordt het infectieproces van de bacterie verstoord door afbraak van signaalstoffen (homoserine lactonen) die belangrijk zijn voor het aanschakelen van virulentiefactoren (o.a. de productie van pectinolytische enzymen). Misschien is introductie van endofytische antagonisten die antimicrobiële stoffen produceren of quenchers van homoserine lactonen produceren een mogelijkheid om latente infectie met *Erwinia* te beheersen (Jafra *et al.*, 2006).

Toekomstig onderzoek: Deltaplan *Erwinia*

Het is duidelijk dat er voor het oplossen van de *Erwinia*-problemen in de bloembollensector (veel) onderzoek nodig is. Er zijn aanwijzingen dat er sprake is van een veel agressiever isolaat/soort van *Dickeya* (persoonlijke mededeling Van der Wolf). Daar ook de aardappelsector vergelijkbare problemen heeft, is een gezamenlijke aanpak verstandig. Hiertoe is het *Erwinia* Deltaplan in het leven geroepen op initiatief van PRI, de pootaardappelsector, de bloembollensector en PPO. Er zal door fundamenteel, strategisch en toegepast onderzoek door de verschillende partijen gewerkt worden aan het oplossen van

de *Erwinia*-problemen. Het toegepaste onderzoek voor de bloembolsector is door PPO en voor de aardappelsector door HZPC al in 2009 gestart. Voor het fundamentele en strategische onderzoek wordt nog gezocht naar financiering. Thema's waaraan zal worden gewerkt binnen het Deltaplan betreffen genomisch onderzoek, plant-pathogeeninteracties (o.a. de infectieroutes), de epidemiologie, diagnostiek van de verschillende *Erwinia*-soorten, resistentie, bestrijding en beheersing. Hierbij ligt de focus vooral op *Dickeya*.

Deze gezamenlijke aanpak zal er toe moeten leiden dat op korte termijn praktische (voor de sectoren toepasbare) informatie beschikbaar komt. Voor duurzame oplossingen op de langere termijn zal uit fundamenteel onderzoek kennis gegenereerd worden om het "rot-probleem" in de toekomst te kunnen beheersen.

Literatuur

- Doorn J van, Hollinger T & Vreeburg P (2006) Snelle toetsen op *Erwinia* geven steeds beter zicht op aantasting BloembollenVisie 87: 22-23
- Doorn J van, Kampen D van, Hollinger T, Zouwen P van der, Speksnijder A & Wolf J van der (2007) Overleving van *Erwinia* in grond en materialen onderzocht. BloembollenVisie 115: 20-21
- Vreeburg P, Doorn J van, Leeuwen P van, Korsuize A & Trompert J (2007) Grondbesmetting en voeding spellen een minder grote rol bij *Erwinia*-besmetting. BloembollenVisie 118: 20-21
- Jafra S, Przynsowa J, Czajkowski R, Michta A, Garbeva P & Van der Wolf JM (2006) Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. Canadian Journal of Microbiology 52: 1006-1015
- Jeroen Peters J, Sledz W, Bergervoet JHW & van der Wolf JM (2007) An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. European Journal of Plant Pathology 117: 97-107
- Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, & Bertheau Y (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel- genes. Applied and Environmental Microbiology 62: 2228-2235
- Darrasse A, Priou S, Kotoujansky A & Bertheau Y (1994) PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovoras* in relation to potato diseases. Applied and Environmental Microbiology 60:1437-1443