Identificatie en beheersing van bacterieziekten in bolgewassen

Onderzoek aan *Xanthomonas, pseudozwart, Erwinia, Pantoea, Curtobacterium, Rhodococcus en Agrobacterium* (2002-2005)

Auteur(s): J. van Doorn, Th. C. Hollinger en P. K. P. Pham

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bollen, Bomen en Fruit
April 2006
PPO nr. 320683

© 2006 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, 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: 36120
Intern projectnummer 320683

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bollen, Bomen en Fruit
Adres : 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

Inhoudsopgave

Pagina

SAMENVATTING 5

1 ALGEMENE INLEIDING 7

2 GEELPOK EN HELSVUUR IN WATERBROEI VAN TULP: OORZAAK VAN KIEP? 9
2.1 Inleiding 9
2.2 Materiaal en Methoden 9
2.2.1 Kweek van bacteriën en monsterbewerking 9
2.2.2 Waterbroei en materialen 9
2.2.3 Opzetten van een PCR-toets en uitvoering op isolaties 10
2.3 Resultaten en conclusies 10

3 *XANTHOMONAS* IN BIJZONDERE BOLGEWASSEN 13
3.1 Inleiding 13
3.2 Materiaal en methoden 13
3.2.1 Bacterie-isolaten en kweek 13
3.2.2 Infectie-experimenten van planten met bacteriën 14
3.2.3 SDS-PAGE en DNA-technieken. 14
3.3 Resultaten 14
3.3.1 Kolonievorm, PCR, DNA-hybridisatie en eiwitpatroon 14
3.3.2 Protocol voor detectie van geelziek (zie ook bijlage 1) 15
3.3.3 Infectie-experimenten 17
3.4 Conclusies en discussie 18

4 PSEUDOZWART 19
4.1 Inleiding 19
4.2 Materiaal en methoden 19
4.2.1 Isolaties van bacteriën 19
4.2.2 PCR 20
4.2.3 Infectie-experimenten 20
4.3 Resultaten 20
4.4 Conclusies en discussie 21

5 WOEKERZIEK IN LELIE 23
5.1 Inleiding 23
5.2 Materiaal en methoden 24
5.2.1 Isolatie en kweek van bacteriën 24
5.2.2 Infectie-experimenten. 24
5.2.3 Dodingspunt van woekerziekte via temperatuurbehandeling 25
5.2.4 Toetsontwikkeling; toetsen van leliebollen, water en grondmonsters 25
5.3 Resultaten en conclusies 25
5.4 Discussie 30

6 WOEKERZIEKTE IN DAHLIA 33
6.1 Inleiding 33
6.2 Materiaal en methoden 33
6.2.1 Isolatie, kweek en identificatie van bacteriën uit dahlia. 33
6.2.2 Toetsontwikkeling 33
6.2.3 Kas- en veldexperimenten 33

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

6.2.4 Afdoding van Erwinia herbicola 34
6.3 Resultaten en conclusies 34
6.3.1 Toetsontwikkeling 34
6.3.2 Infectie-experiment met *E. herbicola* in de buitenteelt 34
6.3.3 Kookexperiment: dodingspunt van *E. herbicola* 35
6.4 Discussie 35

7 ERWINIA 37
7.1 Inleiding. 37
7.2 Materiaal en methoden 37
7.3 Resultaten en conclusies 37
7.4 Discussie 38

8 BEHEERSING VAN BACTERIEZIEKTEN 39
8.1 Inleiding 39
8.2 Materiaal en methoden 39
8.2.1 Bacteriën 39
8.2.2 Middelen 39
8.2.3 Laboratoriumtoets 39
8.3 Resultaten en conclusies 39
8.4 Discussie 40

9 ALGEMENE DISCUSSIE EN TOEKOMSTIG ONDERZOEK 41

10 OUTPUT 43

11 LITERATUUR 45

BIJLAGE 1 47

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Samenvatting

Bacterieziekten in bolgewassen kunnen zowel plotseling toeslaan en grote schade veroorzaken (*Erwinia*), als af en toe de kop opsteken en dan veel schade veroorzaken (*Xanthomonas*, woekerziek). Verder komen er symptomen in bolgewassen voor, die mogelijk door bacterieziekten worden veroorzaakt, maar waar nog geen bewijzen voor gevonden zijn (kiep, pseudozwart).
De vraag vanuit de praktijk en doel van dit project was, om de belangrijkste bacterieziekten in bolgewassen beter te kunnen beheersen door vooral een betere identificatie op te zetten.
Tulpen met kiepverschijnselen zijn onderzocht op *Curtobacterium*, beter bekend als helsvuur of geelpok. Met behulp van een DNA-testmethode (PCR), die eerst ontwikkeld is, is onderzocht of deze bacterie verantwoordelijk is voor de typische kiepverschijnselen in waterbroei van tulp. Hiervoor zijn geen aanwijzingen gevonden; waarschijnlijk zijn fysiologische afwijkingen oorzaak van dit verschijnsel.
Xanthomonas hyacinthi is vooral bekend als veroorzaker van geelziek in hyacinten, maar kan ook verwante gewassen zoals *Scilla, Muscari* en *Puschkinia* aantasten. Minder bekend is dat deze bacterie ook *Eucomis*-soorten kan aantasten. Onderzoek wees uit, dat het hier gaat om dezelfde type *Xanthomonas hyacinthi*, zoals bepaald na analyse van isolaten van de verschillende geelziek-isolaten met biochemische, serologische en DNA-technieken.
Pseudozwart is een merkwaardige aantasting, die sterk lijkt op geelziek maar niet doorgaat in de bol. Tevens lijkt dit alleen in Noord-Holland en voornamelijk in cultivar Anna Marie voor te komen. Ook hier lijken bacteriën geen rol te spelen.
Woekerziekte in lelie en dahlia wordt veroorzaakt door twee verschillende bacteriën. In lelie geeft *Rhodococcus fascians* woekersymptomen door de productie van plantenhormonen. Door een DNA-test kunnen niet-ziekteverwekkende isolaten van ziekteverwekkende isolaten worden onderscheiden. Onderzoek wees uit, dat introductie van deze grampositieve bacterie in lelie (met name in de kas) waarschijnlijk via uitgangsmateriaal plaatsvindt. In dahlia komt *Rhodococcus* wel voor, maar veroorzaakt *Erwinia herbicola* (tegenwoordig bekend onder de naam *Pantoeae agglomerans*) de woekeringen. In dahlia komt ook *Agrobacterium tumefaciens* voor, die een ander type woekeringen (tumorachtige verdikkingen) veroorzaakt. Voor al deze soorten bacteriën zijn DNA-toetsen ontwikkeld voor snelle identificatie.
Erwinia bleek een steeds groter probleem te worden in diverse bollenteelten. Binnen dit onderzoek zijn een aantal toetsen ontwikkeld, op grond van literatuurgegevens en toegepast om aantastingen in de gewassen te kunnen identificeren. Dit onderzoek is voortgezet binnen een ander PT-project vanaf april 2004, alwaar deze informatie zal worden opgenomen.
Achtergondsonderzoek is verder uitgevoerd naar aanleiding van vragen, die binnenkwamen via DiagnostiekService. Dit betrof o.a. de mogelijkheden tot detectie van bacteriën in spoelwater, mogelijkheden tot beheersing van bacterieziekten middels anti-microbiële verbindingen, *Pseudomonas*-problemen in o.a. gladiool en andere vragen op bacterieniveau.
De ontwikkelde toetsen worden ingezet via DiagnostiekService van PPO.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

1 Algemene inleiding

Bacterieziekten in bloembolgewassen kenmerken zich door hun vaak explosieve karakter en fluctuerende aanwezigheid (woekerziekte). Vaak is een correlatie te vinden met het optreden van deze ziekten met veranderde teeltomstandigheden, zoals bij *Erwinia*. In een aantal gevallen gaat het om gespecialiseerde bacterieziekten, zoals *Agrobacterium* en woekerziekte (in dit gewas door *Pantoeae* veroorzaakt) in dahlia. Ook is dit het geval met de nog niet opgehelderde aantasting in hyacint, pseudozwart, in bepaalde cultivars (vooral Anna Marie) op bepaalde locaties (in de "Noord"). In weer andere gevallen zijn bepaalde verschijnselen, zoals kiep bij tulp, niet altijd te herleiden op fysiologische oorzaken. Dan is controle op de aanwezigheid van bacterieziekten om dit kunnen uitsluiten, wenselijk.
In een aantal gevallen is vervolgonderzoek uitgevoerd naar aanleiding van monsters, binnen - gekomen bij DiagnostiekService van PPO. Dit betrof gevallen zoals geelziek, pseudozwart en watermonsters waar men bacterieziekten in vermoedde. Vaak zitten in monsters vele soorten bacteriën, zonder dat het duidelijk is welke nu de ziekte veroorzaakt (Fig. 1). Verder zijn bijdragen geleverd bij het vaststellen van de werking van anti-bacteriële middelen.
Er zijn verschillende bacterieziekten onderzocht. Per hoofdstuk is het doel vermeld. De bijbehorende literatuurreferenties zijn apart aan het einde in hoofdstuk 11 opgenomen.

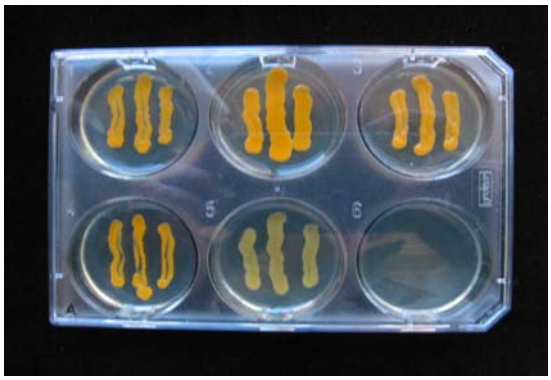


Fig. 1. Diverse bacteriën uit dahlia, op groeimedium gekweekt. De woekerziekte-veroorzakende *Pantoea agglomerans* zit in kweekmedium 5: de groen-gelige bacteriekweek.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

2 Geelpok en helsvuur in waterbroei van tulp: oorzaak van kiep?

2.1 Inleiding

Helsvuur en geelpok in tulp is een bacterieziekte, veroorzaakt door *Curtobacterium flaccumfaciens pathovar flaccumfascians* (vroeger: *Corynebacterium oorti* (Saaltink 1969). In het veld (dan spreekt men van helsvuur) is dit een regelmatig optredende aantasting met als geschiedenis een correlatie met hagel/vorstschade en perioden van hoge temperatuur. Karakteristieke symptomen zijn gescheurde en gekrulde opperhuid, meetsla eerst in het oudste blad, en, afhankelijk van het weer kunnen er vage zilvergrijze vlekken op het blad ontstaan. Bij zware aantasting kan zowel de bladsteel als de bolbodem geel zijn. In de bewaring spreekt men van geelpok vanwege de gele puntjes in de vaatbundels die men ziet als de bol dwars wordt doorgesneden. Helsvuur hoeft niet tot geelpok in de bewaring te resulteren.
Kiep van blad of stengel van tulp is een fenomeen waar de nodige vraagtekens bij staan. In waterbroei van tulp is men symptomen tegen gekomen, die mogelijkerwijs met een bacterieaantasting te maken zouden kunnen hebben. Om naast fysiologische oorzaken als bemestingsproblemen en kascondities bacterieaantasting als oorzaak uit te sluiten, is dit onderzoek opgezet. Dit gebeurde in samenwerking met project 330627 (Pasterkamp): waterbroei van tulp.
Vraagstelling:
Wordt kiepen in waterbroei van tulp veroorzaakt door aantasting van tulp door *Curtobacterium*?
Uitvoering:
Uit watercultures van Leen van den Mark (en later nog van andere cv's zoals Ad Rem) zijn monsters genomen. Tulpen met kiepverschijnselen zijn onderzocht *op Curtobacterium* met behulp van een DNA-testmethode (PCR), die eerst ontwikkeld is.

2.2 Materiaal en Methoden

2.2.1 Kweek van bacteriën en monsterbewerking

Uit een experiment met Leen van de Mark zijn van zowel van blad, stengel als wortels monsters genomen, DNA geïsoleerd volgens standaard PPO-protocol en getoetst in PCR.
Als controles zijn twee isolaten uit de PPO-collectie van *Curtobacterium* genomen. Deze geelkleurige bacteriën zijn op agarkweekplaten bij 28 °C gekweekt volgens standaard PPO-protocol op Rhodo-medium (recept van LMG Gent).

2.2.2 Waterbroei en materialen

Deze zijn uitgevoerd in een klimaatcel met bakken tulpen volgens het waterbroeiprotocol (Pasterkamp). Uit ogenschijnlijk gezonde en kiepende planten zijn monsters getrokken, en

geanalyseerd.
Experiment 1 is uitgevoerd met verschillende partijen c.v. Leen v/d Mark waarbij inhaaldatum en wel/niet toevoegen van voedingsoplossing een verschil zou kunnen geven in kiepen, mogelijk gecombineerd met geelpokaantasting.
Experiment 2 betrof een bacterieproef: bollen behandelen met bacteriesuspensies in waterbroei. Bollen van cv. Ad Rem uit de koeling 9° werden gebruikt; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* LMG 3702 werd gekweekt op Rhodo-medium. Na twee dagen werden de bacteriën afgeschraapt in PBS en de O.D. (optische dichtheid als maat voor het aantal bacteriën per ml) bepaald. Met PBS-buffer en kraanwater 1:1 op O.D. 1.0 gebracht. Er werden 7 bollen per pot gebruikt.
Behandelingen:

1. Bollen niet dompelen, direct op kraanwater
2. Bollen 10 minuten dompelen in *Curtobacterium* O.D. 1.0, daarna op kraanwater
3. Herhaling nr. 2
4. Niet dompelen, bollen in kraanwater + *Curtob*. O.D. 1.0 (9+1 deel)
5. Herhaling nr. 4
6. Bollen dompelen 10 min. in *Curtobacterium* O.D. 1.0, daarna op kraanwater + *Curtob*. O.D. 1.0 (9+1 deel)

De potten werden afgedekt met huishoudfolie, en weggezet in de koude kamer (5°C).
Op 19/3/2002 werden de potten naar de kunstlichtbroeicel van 17°C in een plastic kooi geplaatst, en op 2/4 zijn de potten naar de kas gebracht om de infectie verder een kans te geven.

5 partijen Leen v/d Mark zift 11/12 koeling 9°
Op water 2/1/2002 en 5/2/2002
Inhaaldatum 15/1en 19/2
Voedingsoplossing: NH_4+ K+ Ca + NO_3

2.2.3 Opzetten van een PCR-toets en uitvoering op isolaties

Via database-onderzoek van DNA-sequenties (EMBL, European Bioinformatics Institute) zijn sequenties van C. *flaccumfaciens pv. flaccumfascians* en andere *Curtobacterium* species vergeleken. Op plaatsen waar verschillen waren, zijn primers ontworpen en getest met behulp van PCR op referentie-isolaten uit de PPO-collectie. Daarnaast is gebruik gemaakt van een PCR-test, beschreven in de literatuur (Guimaraes 2001) en geoptimaliseerd betreffende DNA-isolatie uit tulpenblad, -stengel en –bol.

2.3 Resultaten en conclusies

Experiment 1.
Van deze behandelingen zijn 10 kiepplanten bemonsterd. Onderdelen van blad, stengel en bol zijn vermalen tot sap, verdund en op groei medium uitgeplaat op Rhodo-medium (Lab.Microbiologisch onderzoek, Gent). Hier groeide geen *Curtobacterium*-kolonies op. Ook in PCR werd direct op de fijngemalen monsters geen *Curtobacterium* aangetoond. De positieve controles (bacteriën toegevoegd aan plantensap) waren positief in de PCR-reactie.

Experiment 2.
Op 10/4/2002 werd in behandeling 1 geconstateerd, dat 5 van de 7 planten kiep vertoonden en/of nattige plekken vertoonden in het blad. Dit waren de controleplanten, die besmet waren! In behandeling 5 bleken 3 van de 7 planten met kiep- en/of nattige plekken in het blad aanwezig.

Als controle op de aanwezigheid van *Curtobacterium* zijn vele PCRs uitgevoerd aan diverse plantenonderdelen (stengel, blad, symptomen en bollen. Als controle werd bacterie-isolaat LMG 3702 getoetst en bleek positief.

Conclusie
Aangezien in de controleplanten, die niet geinoculeerd waren met bacteriën toch kiep optrad, en in planten met kiep geen *Curtobacterium* is aangetoond, werd geconcludeerd dat deze Grampostieve bacterie geen rol speelt bij dit verschijnsel in tulp. Geconcludeerd is, dat het gaat om een fysiologisch fenomeen; nader onderzoek is daarna gericht op voedingsoplossingen (bestanddelen), vooral op calciumconcentratie.
Verder zijn geen verschillen in bacterielading in kiepplanten en gezonde tulpen gevonden. Via DGGE-analyse (fingerprint van totale bacteriepopulatie) van kiepplanten in vergelijking met gezonde tulpen kan dit eventueel nog zekerder worden vastgesteld.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

3 *Xanthomonas* in bijzondere bolgewassen

3.1 Inleiding

De oorzaak van geelziek in hyacint is bekend: de bacterie *Xanthomonas hyacinthi*. Na veel onderzoek bij het toenmalige LBO zijn er momenteel twee testen, die o.a. bij de BKD en PPO worden uitgevoerd. Het betreft een ELISA met specifieke polyclonale antisera, en een PCR-toets. Ook zijn er zg. monoclonale antistoffen ontwikkeld, eveneens bij het LBO, die gevoelige detectie mogelijk maken (van Doorn, 2002). Wat nog ontbreekt, is een protocol om deze technieken gestandaardiseerd toe te passen op monsters uit verschillende bolgewassen die binnenkomen, afhankelijk van aantal en noodzaak tot specificiteit en gevoeligheid.
De situatie bij bijzondere bolgewassen is deels in het verleden onderzocht. Hierbij kwam naar voren, dat gewassen zoals *Muscari, Chionodoxa*, en *Scilla* eveneens door geelziek aangetast worden. Dit is in tegenstelling met wat met hyacinten gebeurd; planten met secundaire symptomen komen door gedeeltelijke aantasting van de spruit (stralers, zwartrand en zakkers) op in het voorjaar en kunnen als haard fungeren voor verdere verspreiding in het veld. Vragen die telers van bijzondere bolgewassen stellen zijn, of hyacinten haarden voor infectie kunnen vormen, wanneer deze geelziek hebben, en omgekeerd:
Er zijn recentere gegevens over andere bolgewassen, die door *X. hyacinthi* kunnen worden aangetast (Hollinger, 1997). Dit betreft *Eucomis*-soorten, die veel later in het seizoen op het veld geplant en tot bloei komen. Door de afwijkende symptomen bij *E. bicolor* en *E. autumnalis* is niet duidelijk, of het hier gaat over dezelfde typen *Xanthomonas*, of mogelijk een afwijkend type of pathovar, zoals bv. voorkomt in tomaat, waar wel twee verschillende subgroepen van *Xanthomonas* kunnen voorkomen (Van Doorn 2001)

Doel van het onderzoek:
1. Zijn de isolaten die nieuwe waardplanten, zoals *Eucomis* aantasten dezelfde als die hyacint aantasten? Dit is uitgevoerd middels infectie-experimenten van bolgewassen, en via analyse van het eiwit en DNA van deze isolaten.
2. Opstellen van een protocol om op gestandaardiseerde wijze monsters van geelziek te kunnen analyseren in de diverse bolgewassen
3. Toepassing van dit protocol op spoelwater van hyacinten

3.2 Materiaal en methoden

3.2.1 Bacterie-isolaten en kweek

X. hyacinthi-isolaten werden geïsoleerd uit verschillende soorten planten: *Scilla* (Xh Scilla), *Eucomis bicolor* (Xh Eucomis), *Chionodoxa gigantea* (Xh Chionodoxa), en *Puschkinia libanotica* (Xh Puschkinia). De isolaten TV 45 en S148 werden uit hyacint geïsoleerd. Controles waren de bacteriesoorten *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Xanthomonas vesicatoria* uit tomaat, en *Xanthomonas translucens* uit graan. Deze bacteriën zijn gekweekt op gist-bouillonplaten (Nutriet-

Yeast Agar, Oxoid) en in bufferoplossing (PBS) opgenomen na kweek tot een optische dichtheid van 0.5. Dit komt ongeveer overeen met 1 tot 5 x 10^9 bacteriecellen per ml buffer, die dan gebruikt werden voor infectie-experimenten of DNA-analyses. Ook planten, verdacht van geelziek werden geanalyseerd op geelziek door kweek op gist-bouillonplaten of serologische en DNA-technieken (ELISA of PCR).
Spoelwatermonsters van hyacinten zijn geanalyseerd na concentratie van eventuele bacteriën op een filter, welke vervolgens geanalyseerd is door incubatie in groeimedium (gist-bouillon) en directe analyse van deze filters in PCR-reacties.

3.2.2 Infectie-experimenten van planten met bacteriën

Deze experimenten zijn in de jaren 1998 en 1999 uitgevoerd (zie Van Doorn 2002) in de kas. In de gaaskas op het veld zijn infectie-experimenten uitgevoerd in 2002 en 2003 met dezelfde isolaten op *Eucomis bicolor* en *E. punctata*.
Een extra controle op deze isolaten is uitgevoerd in de klimaatcel. Bollen van Carnegie en Delfts Blauw (100 elk) zijn, na bewaring (25 ° C tot 1 december 2002, 17 ° C tot jan. 2003 ontsmet (formaline/captan/carbendazin) in potten (7 per pot) geplant en bij 9 ° C tot maart 2003 bewaard. Na broei in een klimaatcel gedurende 4 weken (23 ° C dagtemperatuur, 18 ° C nachttemperatuur; 8 uur licht per 24 uur) zijn de bloeiwijzen steriel weggesneden en de planten geinoculeerd met de geelziekisolaten (in PBS, OD 0.5) via kwasten van bladeren met carborundumpoeder. Hierna is het klimaatcel regiem aangepast naar 25 ° C dagtemperatuur en 20 ° C nachttemperatuur met een lichtregiem van 12 uur om infectie te bevorderen.

3.2.3 SDS-PAGE en DNA-technieken.

SDS-PAGE is een eiwitscheidingstechniek, waarbij eiwitten op een gel op grootte worden gescheiden, en nakleuring zichtbaar zijn als bandenpatronen. Identieke patronen wijzen op identieke samenstelling van de eiwitten van isolaten (Van Door 2002).
Om verschillen op DNA-niveau zichtbaar te maken tussen de verschillende geelziekisolaten (zie 4.2.1) is PCR toegepast: vermenigvuldiging van stukjes DNA met een enzym (Van Pelt-Verkuil, 1999). Identieke isolaten zullen niet verschillen in de grootte van een DNA-fragment.
Verder zijn zg. DNA-hybridizatie-experimenten uitgevoerd. DNA van alle geelziekisolaten is gezuiverd en vervolgens “geknipt” in kleine stukjes met een speciaal DNA-knipenzym. Na scheiding op een gel wordt dit op een membraan geplakt oftewel gehybridiseerd. Hierna wordt met een gelabeld stukje DNA gekeken, of dit wel plakt aan het DNA van de geelziekisolaten. Verschillen deze toch een beetje, dan is dit te zien op de blot (Van Pelt-Verkuil 1999, Van Doorn 2002).

3.3 Resultaten

3.3.1 Kolonievorm, PCR, DNA-hybridisatie en eiwitpatroon

Na kweek op gist-boullionplaten van de geelziekisolaten Xh Scilla, Xh Puschkinia, Xh Eucomis, TV45 en S148 werden nauwelijks verschillen gezien. Alleen TV45 en Xh Chionodoxa produceerde wat kleinere en plakkerige kolonies. Dit had verder geen diagnostische waarde.

Na PCR van de verschillende isolaten bleken allen eenzelfde DNA-fragment (229 basenparen) te vertonen; een aanwijzing dat de isolaten tot dezelfde type *X. hyacinthi* behoorden. Bij afwijkende subtypen verschilt het DNA-fragment vaak van grootte (Van Doorn 2002).

3.3.2 Protocol voor detectie van geelziek (zie ook bijlage 1)

1.monsterbewerking
Blad-, stengel of bloemsymptomen worden voorzichtig ontsmet in 70 % alcohol en een stukje van 2 cm^2 wordt rond het symptoom uitgesneden met een steriel scalpelmesje en dóór het symptoom ingesneden om bacteriën vrij te laten komen.
Het uitgesneden stukje wordt in 2 ml Tris-buffer (pH = 7.5-8.0) opgenomen en minimaal 30 minuten geschud.

2. Kweek van geelziekbacteriën
Zie 4.2.1 Controle van de voor geelziek typerende okergele kolonies gebeurt via ELISA of PCR (zie 3 en 4).

3. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay)
In een microtiterplaat (96-wells) wordt per te toetsen monster in duplo 100 microliter plantensap per well aangebracht. De wells zijn gecoat met polyclonaal antiserum (gamma-globuline 16), gericht tegen geelziek . Als positieve controle worden verdunningen van geelziekisolaaat S148 (OD = o.1) gebruikt. Als primair antilichaam wordt 100 microliter monoclonaal antilichaam # 8 (Van Doorn 2002) gebruikt in een 1/100 verdunning in de gebufferde zoutoplossing PBS. Na wassen met kraanwater (driemaal 20 seconden)wordt het secundaire antilichaam geit anti-muis gebruikt (GAM, Sigma, 1/10.000 in PBS; 100 microliter), welke gelabeld is met het enzym alkalisch fosfatase, welke een substraat, dat na incubatie en wassen wordt toegevoegd, geel kleurt indien geelziek aanwezig was in het monster.

Tabel 1. ELISA-schema voor detectie van geelziek

Primair antilichaam # 8 (1/100; PBS	2 uur 37 ° C
Secundair antilichaam (GAM-falk.fosfatase)	1 uur 37 ° C
Substraat (10 mg/ml)	1-2 uur 37 ° C

De gevoeligheid van deze ELISA is 50.000 bacteriën/100 microliter; tijdsduur bedraagt 1 ½ dag (overnacht incubatie van plantensap in wells met antigeelziekcoating om deze geelziekbacteriën te “vangen” en 4-5 uur incubatie met primaire en secundaire antistoffen).

4. PCR (Polymerase Chain Reaction)
Deze is gebaseerd op specifieke herkenning van het zg. fimA-gen van *Xanthomonas hyacinthi* (Van Doorn 2001). Wanneer twee primers in een reactievaatje reageren, is geelziek-DNA aanwezig en dus ook de bacterie. Materialen worden samengevoegd volgens Tabel 1.

Tabel 2. Reactieschema van de geelziek-PCR

In reactievaatje	5 microliter monster
	2 microliter primer N65 (50 pmol)
	2 microliter primer C248 (50 pmol)
	5 microliter 10 x buffer (Gibco)
	0.25 microliter Taq-polymerase
	1.5 microliter $MgCl_2$
	31 microliter MilliQ water
Reactievolume:	50 microliter

Als positieve reactie werden 5 microliter bacteriecellen van isolaat S148 gebruikt (OD = 0.1) of 5 microliter DNA, geïsoleerd van deze concentratie bacteriecellen.
Het reactieprogramma in de thermocycler : 4 min. 95 ° C, gevolgd door 35 identieke, achtereenvolgende temperatuurcycli van 30 seconden 95 ° C, 1 minuut 58 C en 1 minuut 72 ° C. De reactie wordt beëindigd met 10 minuten 72 ° C. Reactieproducten worden onderzocht in een 1 % agarosegel en gerund en geanalyseerd zolas beschreven (Van Doorn 2001).
De gevoeligheid van deze test bedraagt 2000 bacteriecellen/100 microliter monster; de t benodigde tijdsduur is ongeveer 3 uur.

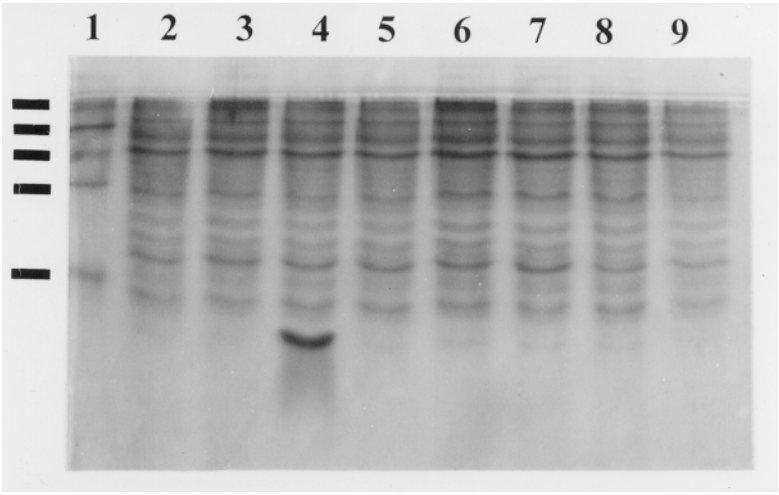


Fig. 2. Eiwitgel met eiwitbandenpatronen van geelziekisolaten uit Eucomis, Chionodoxa, hyacint, Muscari, Scilla en Eucomis. Er zijn geen verschillen zichtbaar, behalve bij 4 (isolaat uit Muscari). Hier wordt blijkbaar een eiwit veel meer gevormd.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

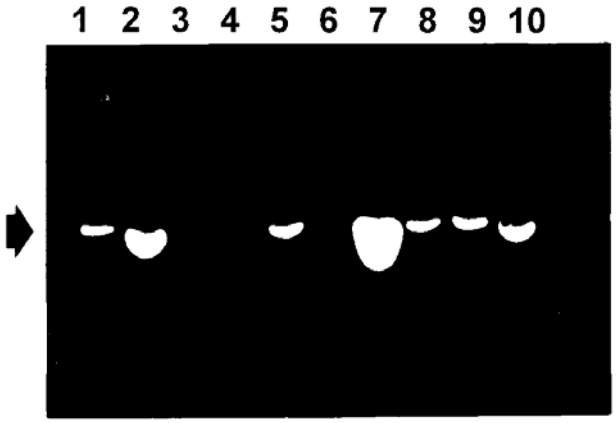


Fig.3 Hybridisatie van DNA van geelziekisolaten uit verschillende bolgewassen (1, 2, 5, en 7-10) en enkele andere soorten bacterien (*Erwinia*, (3) andere *Xanthomonas*-soorten: 4, 6) met een zg. gelabelde probe, specifiek voor geelziek. Alleen de geelziekisolaten worden herkend, zoals te zien aan de witte banden.

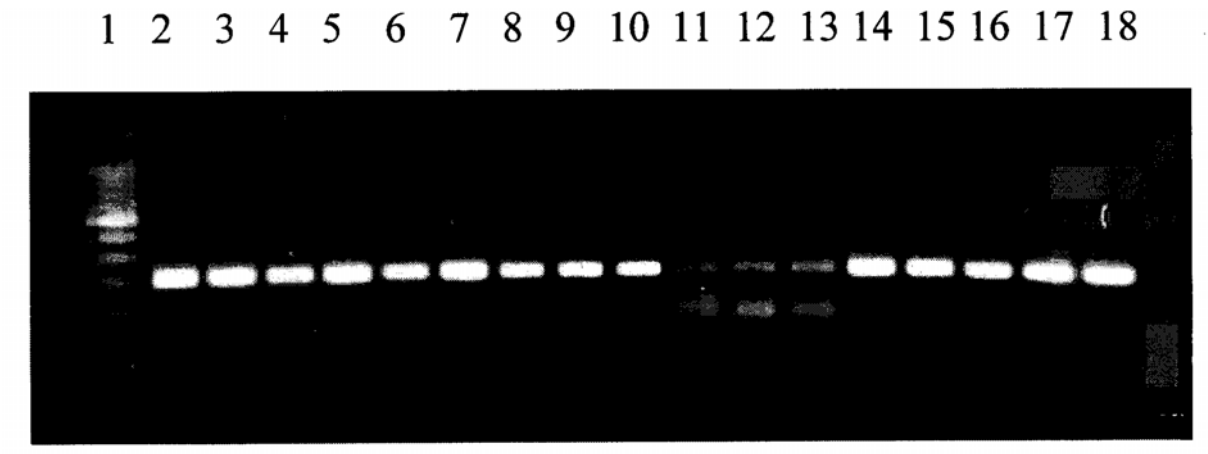


Fig.4. PCR-producten van geeziekisolaten uit hyacint 2-3, Eucomis bicolor,(4-8), E.punctata (9-10), Puschkinia (11-13), en Chionodoxa (14-18). De fragmenten zijn even groot, wat aangeeft dat deze isolaat hoogstwaarschijnlijk niet verschillen in het zg. fimbria-gen.

3.3.3 Infectie-experimenten

Bij deze experimenten bleek, dat alle *Xanthomonas hyacinthi*-isolaten zowel *Eucomis* als hyacint aantasten, in aanvulling op eerdere experimenten. Hoewel sommige isolaten meer symptomen veroorzaakten, werden geen duidelijke verschillen gevonden. Hieruit werd geconcludeerd, dat het hier niet gaat om verschillende typen geelziekbacteriën.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

3.4 Conclusies en discussie

Gebleken is, dat de verschillende isolaten van geelziek in de gewassen hyacint, *Puschkinia, Eucomis, Scilla, Chionodoxa* en *Muscari* identiek zijn tot zover getest in serologische experimenten, eiwitpatroon (Fig.2), infectiegedrag, PCR (Fig.4) en DNA-hybridisatie-patroon (Fig.3). Uitgebreide DNA-fingerprint methoden zoals AFLP zouden nog meer bewijs kunnen geven.
Hoewel er fluctuaties in virulentie zijn (minder of meer aantasting van planten) moeten we er van uitgaan, dat alle geelziek-isolaten de aan hyacint verwante gewassen kunnen aantasten. Dit betekent, dat telers van zowel bijzondere bolgewassen (verwant aan hyacint) als hyacintentelers rekening moeten houden met verspreiding van geelziek via al deze gewassen. Een belangrijke vraag is, of de verspreiding van geelziek in stand gehouden wordt door enerzijds gewassen die later in het seizoen worden geteeld (zoals *Eucomis*), of dat er overleving mogelijk is op andere gewassen of onkruiden (Gonzalez 1991). Er zijn tot op heden geen aanwijzingen dat *Xanthomonas*-soorten (zoals *X. translucens*) die monocotylen zoals grassoorten kunnen aantasten, ook bolgewassen kunnen infecteren (Rademaker 2005). Deze vraag is ook van belang voor verschijnselen als pseudozwart in hyacint (zie hoofdstuk 5). De veroorzaker hiervan is nog onbekend. Infectie-experimenten met diverse andere *Xanthomonas*-soorten heeft nooit infectie bij bv. hyacinten veroorzaakt.
Door hun kleine bolmaat vallen zieke planten van bijzondere bolgewassen zoals *Scilla* en *Muscari* in het veld veel minder op. Bij aantasting, zeker secundaire aantastingen (van het vorige jaar, bol is dan aangetast), zullen zieke planten niet of nauwelijks opkomen.
Naast ELISA is een enkele keer immunofluorescentie microscopie toegepast om geelziek te constateren in plantenmonsters. Hierbij gebruikt men een microscoop met ultraviolet licht. Op een objectglas wordt een plantensapmonster ingedroogd en geincubeerd met antigeelziek antiserum. Na wassen wordt een fluoreserend antiserum, gericht tegen het anti-geelziek antiserum opgebracht. Na incubatie en wasstappen kan, bij aanwezige geelziek bacteriën deze onder de microscoop en UV-licht gezien worden als blauw of groen oplichtende staafjes, afhankelijk van het type fluorescent label . Nadeel van deze snelle techniek is de arbeidsintensiviteit en benodigde expertise; de gevoeligheid is ongeveer 500-1000 bacteriën per 100 microliter sap.
De beschreven PCR-techniek kan nog sneller door toepassing van zg. Real Time PCR, waarbij geen gel-analyse meer nodig is en detectie on-line in het PCR-apparaat kan plaatsvinden. Deze techniek is nu beschikbaar bij PPO Lisse.

4 Pseudozwart

4.1 Inleiding

Al jarenlang komen er meldingen en monsters binnen van hyacinten uit meestal Noord-Holland, die geelziekachtige symptomen vertonen. Het grote verschil is, dat deze aantasting niet de bol aantast. De bladsymptomen zien er echter vrijwel identiek uit, wat de beslissing van de teler of ziekzoeker ernstig bemoeilijkt. Meestal gaat het om cultivar Anna Marie.
De reden is, dat mogelijk een *Xanthomonas*-soort pseudozwart zou kunnen veroorzaken, en de mogelijkheid dat onkruiden (vooral monocotylen zoals grassoorten) tussenwaardplant kunnen zijn van geelziek. De vraag is, of dit nu wel *X. hyacinthi* is, of dat deze afwijkt.
Vraagstelling:
1. wordt pseudozwart in hyacint veroorzaakt door een bacterie, mogelijk verwant aan geelziek?
2. kunnen hyacinten ziek worden door deze isolaten?
3. Kan geelziek overleven in randbeplanting en spoelwater?

De werkhypothese is, dat er mogelijk een bacterie in het spel is. Men moet denken aan niet-minder pathogene *Xanthomonas*-soorten (Poplawsky 1998) of andere minder pathogene soorten (soorten die bv. alleen op gevoelige cv's kunnen toeslaan).
Onderzocht wordt of er in randbeplanting van hyacintenpercelen (grasbermen, slootkanten) bacteriën aanwezig zijn (speciaal op grassen, ook monocotylen) die mogelijk pathogeen kunnen zijn op hyacint. De volgende experimenten zijn daarom uitgevoerd:
- Isolatie van bacteriën uit pseudozwartmonsters en grassen; testen in infectie-experimenten op hyacint
- uitvoering van PCR op geïsoleerde bacteriën met algemene en specifieke primers om een breed scala aan bacteriesoorten te kunnen identificeren

4.2 Materiaal en methoden

4.2.1 Isolaties van bacteriën

Voor analyse van pseudozwart zijn gedurende een aantal jaren monsters verzameld van verdachte hyacinten uit vooral Noord-Holland (o.a. Anna Paulowna). Verder zijn monsters, binnengebracht bij Diagnostiek van PPO nader onderzocht. Hierbij zijn op een algemeen kweekmedium isolaties vanuit deze planten gekweekt en onderzocht middels PCR.
Voor analyse van bacteriën, die kunnen overleven op onkruiden, zijn monsters verzameld uit randbeplanting van hyacintenvelden, en geanalyseerd na kweek op algemeen groeimedium (Nutrient agar) op het voorkomen van speciaal *Xanthomonas*-soorten, maar ook op andere pathogenen zoals *Erwinia herbicola* en *Pseudomonas* ((Beattie 1999) en grampositieve bacteriën zoals *Rhodococcus*.
Voor isolatie uit gras werd 10 gram natgewicht geëxtraheerd in 800 milliliter buffer (PBS) met een zeepoplossing (0.5% Tween-20) gedurende 12 uur onder continu roeren om bacteriën vrij te maken. Na concentratie via filtratie werden filters gekweekt in groeimedium (Nutrient agar of Nutrient broth, firma Oxoid) of fracties van het filter direct getest in PCR.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Onbekende bacterie-isolaten, die aangetroffen werden in pseudozwart-monsters zijn geïsoleerd en voor extra karakterisatie geanalyseerd (Laboratorium voor Microbiologie LMG, Gent, België).

4.2.2 PCR

Om aan te tonen of er mogelijk plantpathogene bacterien in pseudozwartmonsters aanwezig waren, is getoetst met primers, die met name de plantpathogene groep van *Xanthomonas* en *Pseudomonas* kunnen



Fig. 5 Geelzieksymptomen (linkerblad) en pseudozwart (rechterblad) in hyacint (cv Anna Marie). Beide bladmonsters zijn getoetst volgens het geelziekprotocol (zie ook bijlage 1). Het linkerblad was positief op geelziek in zowel ELISA als in PCR in tegenstelling tot het pseudozwartmonster. Beide vertonen spetters op het blad, maar onderscheid visueel is erg moeilijk.

aantonen (Maes 1993). Verder zijn primers gebruikt, die *Erwinia* kunnen aantonen (Smid 1995, Darasse 1994). Daarnaast is middels PCR gecontroleerd op herkenning van ziekteverwekkende bacteriën zoals *Rhodococcus, Agrobacterium* en *Pantoeae* (zie ook hoofdstuk 6 en 7).

4.2.3 Infectie-experimenten

Hiertoe zijn hyacintencultivars Anna Marie en Delfts Blauw geïnfecteerd met de isolaten, zoals beschreven in Tabel 3. Als positieve controle is *Xanthomonas hyacinthi* S148 gebruikt. De experimenten zijn in de klimaatcel uitgevoerd zoals beschreven bij 4.2.2.

4.3 Resultaten

Analyse van mogelijke pseudozwart-veroorzakende bacterie-isolaten vond plaats via PCR met behulp van allerlei primersets, die brede of specifieke groepen bacteriën kunnen aantonen. Hoewel in enkele gevallen een reactie is gevonden met algemene primers, die o.a. Xanthomonas herkennen, is deze noch gekweekt, noch gevonden na nadere analyse. In een aantal gevallen is in grasmonsters een positieve reactie gevonden op *Xanthomonas* middels de algemene PCR op

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Xanthomonas en *Pseudomonas*. Ondanks veel pogingen is geen *Xanthomonas* geisoleerd via kweek op groeimedium. Mogelijk gaat het hier (zowel in pseudozwartmonsters als in grasmonsters) om een zg. epifytisch type Xanthomonas. Deze kan in de vaatbundels leven zonder ziekten te veroorzaken, en deze zijn veelal niet kweekbaar (McGuire 1991)..
Op grond van bladsymptomen is nauwelijks onderscheid te maken tussen geelziek en pseudozwart (Fig.5).
Een aantal malen is *Stenotrophomonas malthophilia* en *Pseudomonas* sp. geïsoleerd uit pseudozwartmonsters; infectie-experimenten met deze isolaten op hyacinten leverden echter geen ziek planten op. Gezien de symptomen is er mogelijk sprake van een bacterieziekte. Mogelijk is het een andere *Xanthomonas*-soort; *Xanthomonas translucens* zou een kandidaat kunnen zijn, evenals *Erwinia herbicola (Pantoea agglomerans*).
Een viertal bacterie-isolaten uit pseudozwart zijn geanalyseerd middels vetzuuranalyse (LMG Gent); dit leverde geen aanwijzingen op plantpathogene oorsprong van deze bacteriën op.

Tabel 3. Overzicht van uit pseudozwartmonsters (2002-2005) geïsoleerde bacteriesoorten

bacterie	type	bijzonderheden
Methylobacterium	onbekend	Geen echte plantpathogeen
Micrococcus	Mogelijk *M. luteus*	Geen echte plantpathogeen
Pseudomonas syringae-groep	Geen pathovar bekend	Plantpathogeen
Pseudomonas fluorescens-groep	Brede groep	Geen plantpathogeen i.h.a.
Erwinia herbicola	*Pantoeae agglomerans*	Kan een pathogeen zijn! (Hfst.7)
Stenotrophomonas maltophilia		Ook een humane pathogeen

4.4 Conclusies en discussie

Een oude discussie betrof het door sommige hyacintentelers geconstateerde fenomeen van pseudozwart een geelziekachtige infectie die echter niet doorslaat in de bol, alleen in enkele cv's voorkomt en nauwelijks te onderscheiden is van geelziek. Deze studie heeft uitputtend onderzocht of er sprake is van een bacterie-aantasting in pseudozwart-planten. Dit lijkt niet het geval. De hypothese, dat een aan geelziek verwante bacterie, een andere *Xanthomonas*-soort, dit zou kunnen veroorzaken, lijkt niet te kloppen. Er zijn wel eens xanthomonaden aangetroffen die monocotylen, vooral grassen kunnen aantasten: *Xanthomonas translucens* pathovar graminis. Verspreiding van epifytische (symptoomloos aanwezig) populaties van dergelijke xanthomonaden kan voorkomen in het veld (Bernal 1996). Onderzocht is, of andere pathovars van X. *translucens*, die ook monocotyelen kunnen aantasten, aanwezig waren. Immers, mogelijk kunnen deze lichtere symptomen veroorzaken. Dit bleek niet het geval; ook infectie-experimenten, uitgevoerd met deze isolaten, hebben geen zieke planten opgeleverd. Het is bekend, dat met name Xanthomonas-soorten goed kunnen overleven onder ongunstige condities, op andere planten (Timmer 1987). Deze hypothese was de reden om allerlei graskanten op in het bijzonder monocotyle onkruiden te bemonsteren en te toetsen op *Xanthomonas*.
Gezien de symptomen en de kweekresultaten is een schimmelinfectie onwaarschijnlijk. Momenteel moet men concluderen, dat het hier gaat om een aspecifieke aantasting, cultivarafhankelijk, en mogelijk geïnduceerd door bepaalde fysiologische omstandigheden. Het is bekend, dat bepaalde

symptomen geïnduceerd kunnen worden door bemesting met stikstof en kalium (McGuire 1991).

5 Woekerziek in lelie

5.1 Inleiding

In lelie komt een bacterieziekte voor, woekerziekte, die haast uitsluitend Aziaten aantast (en niet lijkt voor te komen in Oriëntals) en waarschijnlijk veroorzaakt wordt door de grampositieve bacterie *Rhodococcus fascians*. Op groeimedium (kweekplaten) groeit deze als oranje kolonies uit. Ook in andere gewassen komt deze bacterie voor: boon, erwt, spinazie en witlof en in siergewassen zoals chrysant, geranium, fuchsia en petunia. Naast lelie tast *Rhodococcus fascians* in bol- en knolgewassen gladiool, *Muscari, Gloriosa, Triteleia* en dahlia aan, en moet niet verward worden met knobbelziekte (*Agrobacterium tumefascians*). De symptomen van aantasting zijn, zoals de naam al aangeeft, woekeringen aan de schubben van de plant. Er vindt opbrengstderving plaats door de aantasting, die varieert van een paar aangetaste stengelbolletjes tot aan zware bloemkoolachtige aantastingen met als gevolg slechte of geen groei van de hoofdbol. Er zijn echter aanwijzingen dat de bacterie symptoomloos (latent) voorkomt in het gewas. Leliemateriaal (bollen, uitgangsmateriaal) kan deze bacterie bevatten zonder dat deze wordt opgemerkt, vervolgens verspreid worden en voor aanzienlijke schade zorgen (Van Doorn 2000).
PPO Bloembollen is, samen met de Stichting Ontwikkeling Leliecultuur (SOL; Arjen van den Berg, Andijk) begonnen om in de eerste plaats een gevoelige toets op te zetten. Er zijn een aantal vragen opgesteld die PPO heeft trachten te beantwoorden:

- veroorzaakt *Rhodococcus* woekerziek in lelie?
- Bestaan er ziekteverwekkende en niet-ziekteverwekkende isolaten, en kunnen we *Rhodococcus* via toetsen aantonen?
- hoe komt deze bacterie in de kas en waar bevindt deze bacterie zich: in de grond, in compost, in drainagewater en/of in plantmateriaal?
- Zijn er maatregelen te nemen die aantasting voorkomen, inperken of zelfs kunnen verhelpen?

Als werkplannen zijn opgesteld:

1. onderzoeken of *Rhodococcus fascians* daadwerkelijk woekerziekte in lelie veroorzaakt
2. opzetten van een specifieke en gevoelige identificatie en detectie van woekerziekte (*Rhodococcus fascians*) in lelie die ziekteverwekkende van niet-ziekteverwekkende isolaten kan onderscheiden
3. Middels de ontwikkelde toetsen woekerziekte lokaliseren in lelie (zaad, lelieknollen, en grond)
4. Onderzoeken onder welke condities woekerziekte kan overleven

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

5.2 Materiaal en methoden

5.2.1 Isolatie en kweek van bacteriën

Isolatie uit plant-en bol- of knolmateriaal, en uit grondmonsters vond plaats volgens standaardprotocollen van PPO-Lisse. Als referentie-isolaten is o.a. het plamiedloze en niet-virulente *R. fascians*-isolaat Gent 188/5 gebruikt. Virulente isolaten: NAK 468 , Gent 188 en LBO-11. Als referentie-isolaat voo*r Agrobacterium tumefacians* is LMG85 gebruikt.

5.2.2 Infectie-experimenten.

Hiertoe zijn schubben verwijderd van een aantal cv's van lelie, en geïncubeerd met isolaten van *R. fascians*. De gebruikte cv was de lelie Mero Star. Zie ook Fig.7.
Na enkele pilotexperimenten zijn schubben besmet met isolaat Gent 188/5 (zonder plasmid) en daarna met plasmidbevattende isolaten. Mogelijk treedt bescherming op tegen aantasting, doordat het niet-ziekteverwekkende isolaat 188/5 de niche inneemt waar de ziekteverwekkende isolaten kunnen gaan infecteren. Protocol (tabel 4):
- Schubben 5 minuten gespoeld in stromend water.
- Isolaten opgenomen in 40 ml. PBS+ 0.01% Triton., daarna verdund tot 800 ml met kraanwater.
- 50 schubben zijn er behandeling ca. 5 minuten gedompeld in de diverse verdunningen.
Daarna werden deze verpakt in vochtige vermiculite (5 ltr. vermiculite+ 1 ltr. water). Alle behandelingen werden overnacht geincubeerd op kamertemperatuur; daarna werden behandelingen 3A, 4B, 5B toegepast door te dompelen in de bacterieoplossing (inoculum). Hierna werden de behandelingen verpakt (in plastic) met 1 deel vermiculite + 1,5 deel schubben, en de zakjes weggezet bij 25° gedurende 8 weken.

Tabel 4. Proef inoculatie lelieschubben met diverse woekerisolaten.

nummer	Behandeling 1
1A	Kontrole niet behandeld, wel gespoeld.
1B	PBS+ 0.01% Triton
1C	Spoelen, overnacht kamertemperatuur.
2	Rhodococcus Gent 188/5
3A	Rhodococcus Gent 188/5 + Rhodococcus Gent 188
3B	Rhodococcus Gent 188
4A	Rhodococcus NAK 468
4B	Rhodococcus Gent 188/5 + Rhodococcus NAK 468
4C	Spoelen O/N kamertemp. + dompelen isolaat Nak 468.
5A	Rhodococcus Lelie nr. 11 (Khanh)
5B	Rhodococcus Gent 188/5 + Rhodococcus Lelie nr. 11 (Khanh)
5C	Spoelen, overnacht kamertemp. + dompelen isolaat Lelie 11.

5.2.3 Dodingspunt van woekerziekte via temperatuurbehandeling

Hiertoe zijn woekerziekte-isolaten aan een waterbehandeling blootgesteld, en later getoetst op de aanwezigheid van levende bacteriën (zie Fig.11).

5.2.4 Toetsontwikkeling; toetsen van leliebollen, water en grondmonsters

Dit gebeurde in eerste instantie via ELISA,later via de ontwikkelde PCR (DNA-toets.
Antisera zijn gekocht bij PRI (Wageningen UR) en getest in ELISA op diverse isolaten van *Rhodococcus, Curtobacterium, Agrobacterium* alsmede aangetaste monsters van dahlia.
PCR-primers zijn ontwikkeld door aanpassing van een bestaande PCR (Bell 1999), gebaseerd op een algemene amplificatie van een ribosomaal bacterie-gen 16S rDNA). Deze is door nadere sequentie-analyse specifiek gemaakt door het ontwerpen van nieuwe primers (PPO 2003). Verder zijn primers ontworpen aan de hand van literatuurgegevens (Sawada 1995) voor detectie van *Agrobacterium tumefacians* (om vast te stellen of in sommige gevallen besmetting van lelie was met deze bacterie. Uitvoering van de PCR werd uitgevoerd, zoals beschreven in 4.3.2.
Woekerziekte bleek aantoonbaar zowel met ELISA als met PCR; PCR bleek gevoeliger, en was in staat om onderscheid te maken tussen ziekteverwekkende isolaten (hebben een extra stuk DNA, een zg. plasmied) en niet-ziekteverwekkende isolaten. Dit is gebaseerd op de analyse van veel monsters uit diverse lelie-cv's zoals Brunello, Monte Negro, Prato, en Elite.

5.3 Resultaten en conclusies

Infectie-experimenten
Er is vastgesteld dat inderdaad *Rhodococcus fascians* woekerziek veroorzaakt in lelie. Er zijn namelijk andere bacteriesoorten die ook woekeringen kunnen veroorzaken. Dit is het geval bij dahlia. Infectie-experimenten wezen uit, dat met *R. fascians* geïnfecteerde lelieplantjes na 8 weken woekeringen lieten zien aan de schubben (Fig.6).

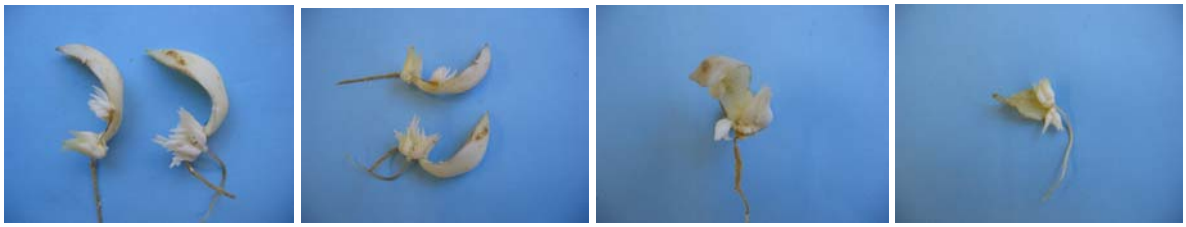


Fig. 6. Lelieschubben uit inoculatie-experiment met *Rhodococcus*-isolaat N 468. Te zien is, dat er woekeringen (en dus extra gewicht) op de schub bij de wortel zijn ontstaan.

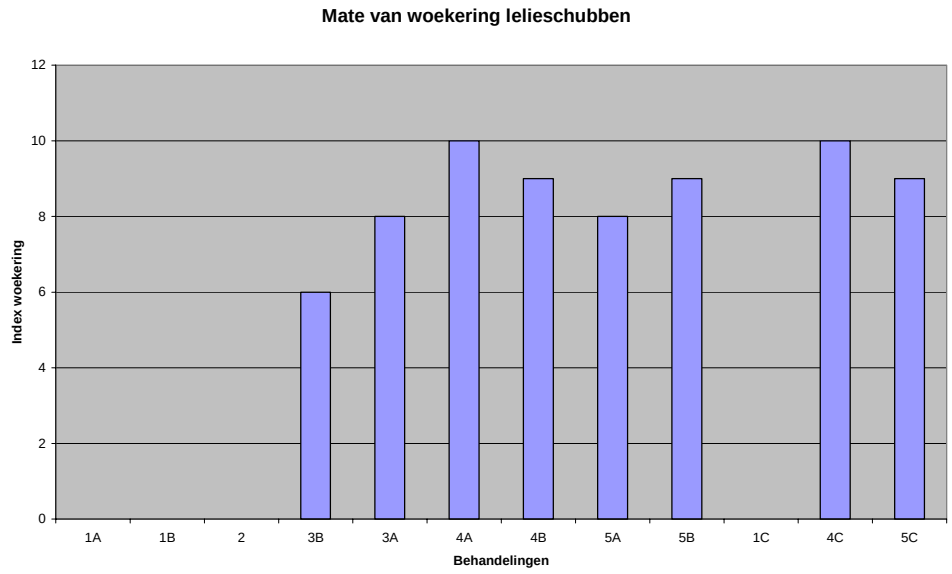


Fig.7. Woekerziekisolaten, gebruikt voor de infectie-experimenten. De nummers met letters corresponderen met de behandelingen. De index geeft de mate van woekerziekte aan: in de controles 1 en 2 waren geen woekeringen te zien.

In figuur 8A is weergegeven het gewicht van de nog niet geïnfecteerde lelieschubben, en in figuur 8 B het gewicht na de behandelingen met o.a. woekerziek-isolaten (volgens Tabel 4). Er is gewichtstoename vooral als gevolg van het ontslaan van woekeringen. Nrs. 1A, B en C zijn controles, nr. 2 is uitgevoerd met het niet-virulentie woekerziekte-isolaat. Te zien is, dat er duidelijk meer gewichtstoename is (Fig. 8A, vergeleken met 8B) als gevolg van de infectie met *Rhodococcus*, doordat deze woekeringen veroorzaakt. Ook in de controles is gewichtstoename ook door de groei van worteltjes (Fig. 8C), maar significant minder doordat gewichtstoename door de woekeringen veel meer bijdraagt aan de totale gewichtstoename van de schub.

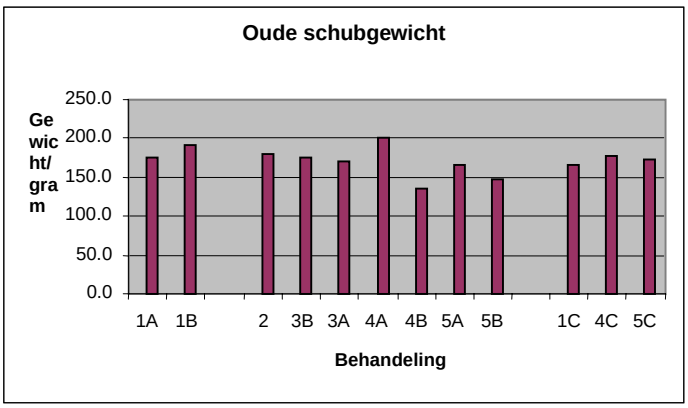


Fig.8A. Lelieschubben, vòòr de behandeling als weergegeven in tabel 4 met woekerziek-isolaten.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

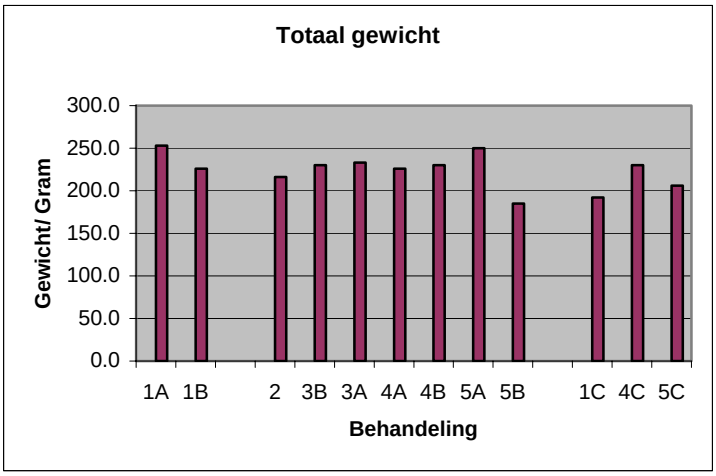


Fig.8B. Gewichten van de geinfecteerde lelieschubben na 8 weeken incubatie

Isolatie van R. fascians uit leliemateriaal
Aan verschillende partijen lelies zijn isolaties verricht om te zien welke bacteriën hier in aanwezig waren. Uit lelies met woekerziek-symptomen werden bacteriën gekweekt die geel/oranje groeide op kweekplaten. Deze zijn geanalyseerd, o.a. LMG Gent, en bleken allen *Rhodococcus fascians* te zijn.

Toetsontwikkeling
Er zijn twee DNA testen ontwikkeld. Een toets toont zowel ziekteverwekkende als niet-ziekteverwekkende isolaten aan. Het is gebleken bij andere bolgewassen, dat ook niet-ziekteverwekkende *R. fascians*-isolaten op de plant kunnen voorkomen, die dus geen symptomen geven. In tabel 5 zijn de ontwikkelde primers weergegeven. Ook voor *Agrobacterium* zijn primers ontwikkeld om eventuele verwarring van symptomen objectief te kunnen vaststellen in PCR.. Belangrijk is, om onderscheid te kunnen maken tussen bacteriesoorten die vergelijkbare (maar voor de kenner verschillende) symptomen geven. *R. fascians* geeft als symptomen zg. “leafy gall”: vertakte scheutjes, terwijl *Agrobacterium tumefaciens* knobbelziekte veroorzaakt. Daarnaast kan *Pseudomonas savatanoi* “ knot disease” geven (maar niet in bolgewassen), en *Pantoeae agglomerans* vergelijkbare symptomen als *R. fascians* (maar vooral in dahlia; zie hoofdstuk 7). Voor het aantonen van alle *R. fascians*-isolaten (dus ook de niet-pathogene) kan gebruikt worden van een algemene DNA-toets, die het zg. 16 S ribosomale DNA herkent en vermenigvuldigt in PCR Maes 2001.
De andere toets toont alleen ziekteverwekkende isolaten aan (Stange 1996). Deze werd gebaseerd op een stukje DNA (*fas*-1) die alleen ziekteverwekkende *R. fascians* -isolaten bezitten. Verdacht leliemateriaal wordt fijngemaakt en het sap verdund. Vervolgens wordt dit sap op kweekplaten gebracht en na incubatie onderzocht op karakteristieke “kolonies”. Deze worden vervolgens getest in een zg. PCR, een DNA-toets waarin een speciaal stukje DNA (in dit geval het stukje, karakteristiek voor de ziekteverwekkende isolaten) vele honderdduizenden malen wordt vermenigvuldigd en daarna zichtbaar gemaakt wordt als een wit bandje op een “gel”. (Fig.9 en

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

10). In andere gevallen kunnen we direct op plantensap deze toets uitvoeren. In plantmateriaal kunnen we lage aantallen bacteriën op deze wijze aantonen (500-5000 bacteriën). Met deze PCR zijn veel cultivars lelie getoetst (Tabel 6). Hieruit bellek, dat deze toets goed werkt op praktijkmateriaal.

Tabel 5. Ontwikkelde primers om woekerziekte in lelie te detecteren

C.	Naam	Grootte	Gen	Bacterie
1	Rhodoattfor / Rhodoattback	344	att	Rhodococcus fascians+
2	RH97L / RH97R	225	fas-1	Rhodococcus fascians+
3	RiborhodoF / RiborhodoR	900	16S	Rhodococcus algemeen
4	AgroVCFor / AgroVCRev	730	virC	Agrobacterium
5	E.chr.ADE1 / E.chr.ADE2	450	pel	Erwinia chrysanthemi

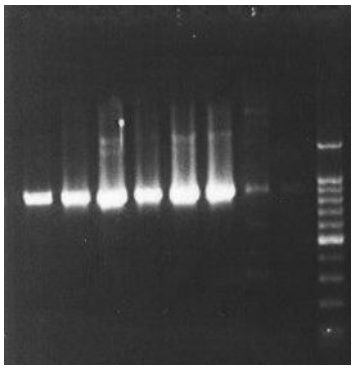


Fig. 9. 16S primers (+/- 900 bp), welke de een positieve reactie geven op de woekerziekte-isolaten S225,NAK468, PD539, Gent188, Gent188/5, LMG3631. *Agrobacterium* en water geven geen signaal. Deze PCR maakt geen verschil tussen ziekteverwekkende en niet-ziekteverwekkende isolaten.

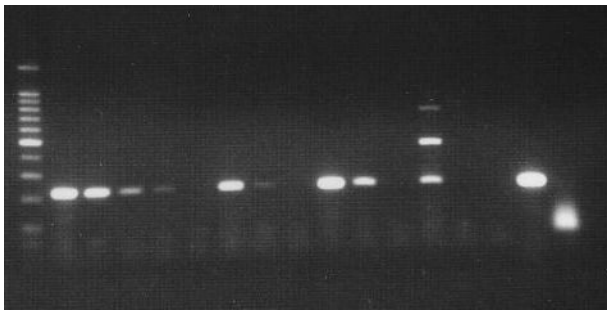


Fig.10. Fas primers (225 bp). PCR is direct op sap van verdachte leliebollen uitgevoerd; deze PCR toont alleen ziekteverwekkende isolaten (met een zg. virulentieplasmied) aan (wittebandjes).

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Tabel 6. Toetsing van diverse cultivars aangeleverd vanuit diverse locaties op de aanwezigheid van *Rhodococcus*.

cv Golden Splendour uit zaad (Koster)	Negatief in PCR: geen woekerziekte
cv Fangio (vd Klugt)	Positief : woekerziekte!
cv Renoir (oriëntal (Andijk)	Positief : ,,
cv Algarve (,,)	Positief ; ,,
cv Golden Show (Datena de Lange)	Positief ; ,,
cv Umbria (J.broerse)	Positief : ,,
cv Avelino (de Ruiter)	Positief : ,,
cv Renoir (de Ruiter)	Positief : ,,

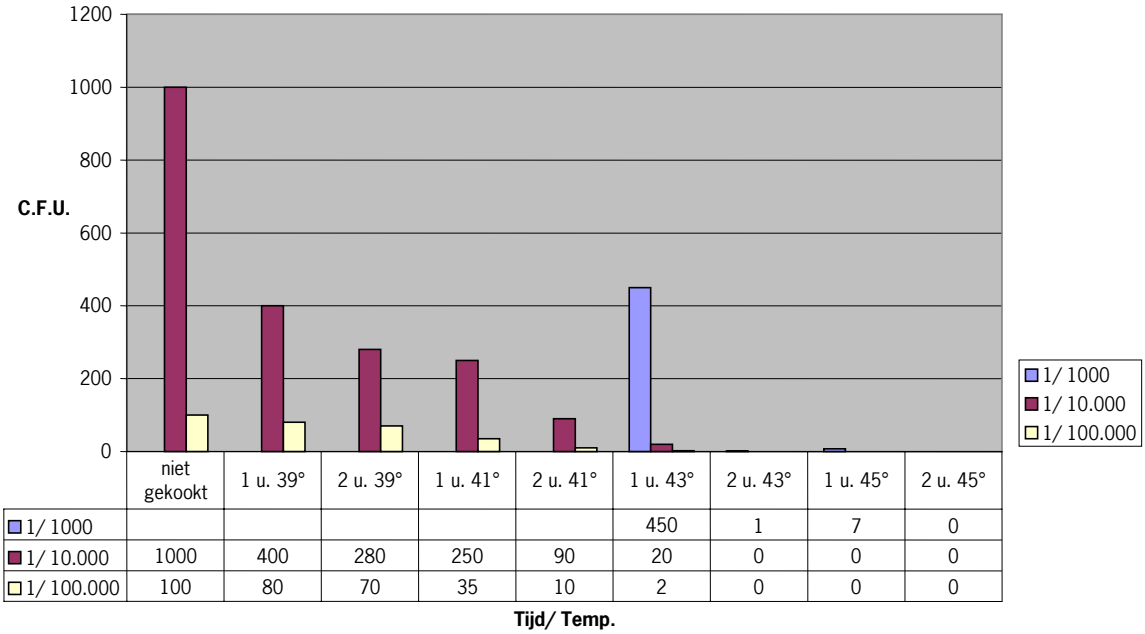
Beheersing van woekerziek in de kas

Hier zijn nog geen experimenten voor uitgevoerd. Stomen van grond lijkt het probleem niet op te lossen; ook lijkt ziektewering van de bodem voor te komen (schadeplek van jaar 1 levert geen schade meer op in jaar 2).

Op laboratoriumschaal is gekeken bij welke temperatuur *R. fascians* 'het loodje' legt. In het kader van het algemene bacterieproject bij het PPO in Lisse werd van de *Rhodococcus*-bacterie het dodingspunt in steriel water vastgesteld om te zien bij welke temperatuur de bacterie, los van bolweefsel, gedood wordt.

Pas na 1 uur en 45 minuten werd geen overleving van *R. fascians* geconstateerd. Deze experimenten moeten herhaald worden.

Fig. 11. Dodingspunt van *Rhodococcus fascians* in lelie. De concentratie van de bacteriën staat vermeld.



	niet gekookt	1 u. 39°	2 u. 39°	1 u. 41°	2 u. 41°	1 u. 43°	2 u. 43°	1 u. 45°	2 u. 45°
1/ 1000						450	1	7	0
1/ 10.000	1000	400	280	250	90	20	0	0	0
1/ 100.000	100	80	70	35	10	2	0	0	0

Toetsing van monsters uit de SOL-kas

I. Basinwater

Toetsing van het basinwater: het aangeleverde water werd wel en niet gefilterd en daarna bewerkt voor gebruik in de PCR toets en voor het kweken van eventuele micro-organismen op agar-medium. Dit werd twee keer herhaald. In de PCR toets werden geen positieve reacties gevonden en op de groeiplaten was geen sprake van *Rhodococcus*-bacteriën.

II. leliezaad

Toetsing van leliezaad: met de code GS en PP werden twee monsters uit leliezaad aangeleverd. Volgens vast protocol werd het zaad overnacht in water bewerkt voor gebruik in de toetsen. Zowel de PCR toets als op groeiplaten werden geen positieve reacties respectievelijk groei waargenomen van *Rhodococcus*.

III. grondmonsters

Toetsing van grondmonsters uit de kas: twee monsters werden aangeleverd, te weten uit de laag 0- 25 cm en laag 25 cm en dieper. Volgens bestaand protocol werden de monsters behandeld en overnacht bewerkt in steriel water. Van de vloeistof werden monsters in diverse verdunningen getoetst. Ook in deze monsters werden geen positieve reacties gevonden in de PCR toets en groeiden geen *Rhodococcus* bacteriën op medium.

IV. toetsing van compost

Twee typen compost zijn onderzocht op aanwezigheid van *R. fascians*. Terra fertiel, bestaande uit bacteriën, schimmels, zeewier, kalk en kleimineralen bevatte inderdaad bacteriën maar geen *R. fascians*; ook in Ecofertiel werd geen *Rhodococcus* aangetoond.

5.4 Discussie

Woekerziekte (*Rhodococcus fascians)* komt algemeen voor in allerlei plantensoorten, waaronder heesters en cactussoorten. Bolgewassen zolas lelie, maar ook *Triteleia, Gloriosa, Muscari*, dahlia en gladiool worden aangetast door deze bacterieziekte.
Er is nu een DNA toets beschikbaar om ziekteverwekkende woekerziekbacteriën (*Rhodococcus fascians*) aan te tonen. Deze is robuust gebleken, en wordt nu regelmatig gebruikt door Diagnostiek van PPO Bollen.
Grondontsmetting middels stomen zou in sommige gevallen te kort kunnen schieten gezien de lange overleving van de bacterie in laboratorium-kookexperimenten. Echter, dit experiment dient herhaald te worden, ook in aanwezigheid van ontsmettingsmiddelen. Grondontsmetting bij de SOL vindt plaats tot op 25 cm minimaal 70 ° C te verhitten; bolmateriaal wordt 2 uur bij 41 ° C gekookt. Hoewel bleek dat dit geen garantie gaf om woekerziekte-vrij te zijn, het jaar daarop. Volgens de SOL verschillen de aantastingen door woekerziek per seizoen, teler en cultivar! Dit duidt sterk op variatie in bedrijfsvoering: manier van bewaring, koken van materiaal en uitzoeken van verdacht plantgoed. Extra verwarrend is het gegeven (SOL), dat op een zware woekerziekplek het jaar hier opvolgend geen woekerziekte gevonden hoeft te worden! Ook leliezaad dat bij 43 ° C werd gekookt, kon toch woekerzieke planten geven.
De meest waarschijnlijke besmettingsroute van woekerziek lijkt te lopen via het leliemateriaal. In grond, compost en basin-water werd geen *Rhodococcus* aangetroffen. Het is mogelijk dat de bacterie in lelie symptoomloos (latent) aanwezig is. Dit zou kunnen betekenen dat vermeerderen

van lelies via schubben risico's met zich meebrengt. Overigens is hier in het verleden naar gekeken (Van Aartrijk 1982), maar gevonden dat er geen overdracht zou zijn van woekerziekte in lelies door vermeerdering via weefselkweek.
De mogelijkheid om bv. uitgangsmateriaal te toetsen is nu aanwezig door de DNA toets toe te passen (Van Doorn 2003).
Beheersing van dit probleem is, naast het weggooien van plantgoed bij lichte aantasting, het koken van het plantgoed en buiten opplanten.
Opvallend is, dat in oriëntals feitelijk geen woekerziekte voorkomt. Mogelijk komt deze bacterie alleen voor in lelies welke "stengeljong' vertonen; aziaten.
Dit zijn resultaten, behaald uit een beperkt aantal experimenten en monsters. Het verdient uiteraard aanbeveling om een aantal experimenten te herhalen. Ook zijn er mogelijkheden om in een test meerdere ziekteverwekkers (waaronder woekerziek) tegelijkertijd aan te tonen. Dit kan door PPO in een projectvoorstel worden opgenomen. Vragen zoals overleving van de bacterie op grotere diepten dan 80 cm, probleem van overleving in grondwater, overleving in relatie tot pH en/of anaërobe omstandigheden en het opstellen van een "best practise" voor telers verdient nog meer aandacht.
Een kleine kans bestaat, dat er nog andere bacteriën zijn die vergelijkbare verschijnselen geven. Uit de literatuur is bekend, dat *Agrobacterium tumefacians* en *Pseudomonas syringae* pathovar *svastanoi* vergelijkbare verschijnselen geven (Stange 1996). Hoewel deze bacteriën verwant zijn inzake hun ziekteverwekking (allemaal produceren zij cytokininen: plantenhormonen die woekeringen geven), zijn de symptomen toch anders (A*grobacterium*) of komt de bacterie niet voor in lelie (*Pseudomonas* pathovar *savastanoi*).

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

6 Woekerziekte in dahlia

6.1 Inleiding

In dahlia komen vaak aantastingen voor op moederknollen met woekerachtige symptomen. Een van deze symptomen wordt veroorzaakt door *Agrobacterium tumefascians*: wratachtige celwoekeringen (knobbelziekte). Een ander type woekering heeft meer een vertakte structuur. Men gaat ervan uit, dat deze door *Rhodococcus fascians* (vroeger; *Corynebacterium fascians*) wordt veroorzaakt. Toch, zoals vooronderzoek uitwees, kan deze bacterie niet altijd uit woekeringen geïsoleerd worden.
Deze aantastingen leveren de stekproductie veel schade op. Vragen die gesteld worden zijn:
- veroorzaakt nu *R. fascians* woekerziekte in dahlia en zijn dit dezelfde typen als die lelie aantasten?
- kan er op woekerziekte getoetst worden?

Werkplannen.
1. Isolatie en karakterisatie van bacteriën uit woekeringen van dahlia
2. infectie-experimenten met geïsoleerde woekerziekte- bacteriën
3. een toets om de veroorzaker gevoelig en specifiek aan te tonen
4. toetsen van verdachte dahlia-monsters, en uitzoeken bij welke temperatuur *E. herbicola* dood gaat (dodingspunt).

6.2 Materiaal en methoden

6.2.1 Isolatie, kweek en identificatie van bacteriën uit dahlia.

Er zijn uit veel verschillende monsters bacteriën gekweekt, en getracht te karakteriseren en te identificeren via PCR en andere technieken. Later zijn referentie-isolaten aangeschaft: de isolaten *Erwinia herbicola pv gipsophila* (LMG3631)en *E. herbicola,* zelf geïsoleerd (de isolaten dahlia 'nek 2', isolaat stro, *E. herbicola* 824/1 uit Isarael, en *E.herbicola* uit Triteleia).
Voor infectie-experimenten worden bacteriën gekweekt op grote agarplaten volgens PPO protocol en na 6 dagen groei bij 28 °C in 40 ml bufferoplossing (PBS) met 100 microliter detergens (Triton X-100), en aangevuld met kraanwater tot 100 ml werkoplossing voor inoculatie.

6.2.2 Toetsontwikkeling

Via sequentieanalyse van PCR-fragmenten van *E.herbicola* zijn sequenties (IAA en ETZ-genen) gebruikt voor primerontwerp.

6.2.3 Kas- en veldexperimenten

In een veldexperiment zijn in een randbeplanting van cv. Red Pigmy vier isolaten van *Erwinia herbicola* gebruikt. De isolaten waren dahlia nek2, isolaat uit stro (ID6462), een uit Israël afkomstig isolaat (Eh. 824/1 en een isolaat uit Triteleia (ID 6463). Hierbij worden 12-15 planten per isolaat geinoculeerd via injectie van 1 ml bacteriesuspensie in de hoofdstengel van de plant op 3-4 cm boven de grond.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Effecten van de inoculaties werden gemeten door bepaling van het totale gewicht, wortelgewicht en nieuwe bolgewicht per behandelde plant.

6.2.4 Afdoding van Erwinia herbicola

Hiertoe zijn temperatuurregimes van 39-45 ° C getest om te zien of gekweekte *E. herbicola* deze overleefden (Fig.15).

6.3 Resultaten en conclusies

6.3.1 Toetsontwikkeling

Uit analyses van uit woekeringen geïsoleerde bacteriën bleek, dat het vooral ging om *Erwinia herbicola (Pantoea agglomerans)*. Een van de tiental isolaten die geïsoleerd zijn (in dit geval uit een woekerzieke Triteleia) met karakteristieken als gramnegatief, gelige morfologie wanneer gekweekt als reincultuur op agarplaten is geanalyseerd via onder meer vetzuuranalyse (LMG Gent, België) tezamen met een referentie-isolaat van PPO met dezelfde eigenschappen (uit stro): ID 6462.
Beide werden gekarakteriseerd, ook via antibioticaprofilering als *Pantoeae agglomerans*.Dit verklaarde, waarom analyses op specifieke *Rhodococcus*, en infectie-experimenten met deze, bij lelie woekerziekte-veroorzakende bacterie, mislukten!
Testen met PCR (met primers op att-gen (naast primers op fas-1(IPT) gen en primers op 16S gen) van *Rhodococcus fascians* bleken dus negatief op *E. herbicola*. Primers zijn ontworpen op basis van literatuurgegevens enerzijds (Lichter 1995, Manulis 2001), en anderzijds na sequentieanalyse van de auxine en cytokinine-genen van *E. herbicola* van isolaten, geïsoleerd uit dahlia en Triteleia.

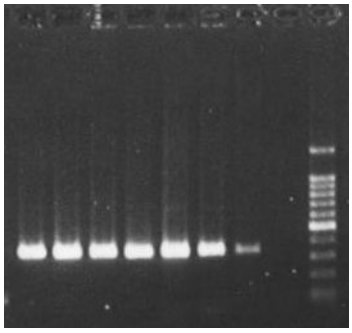


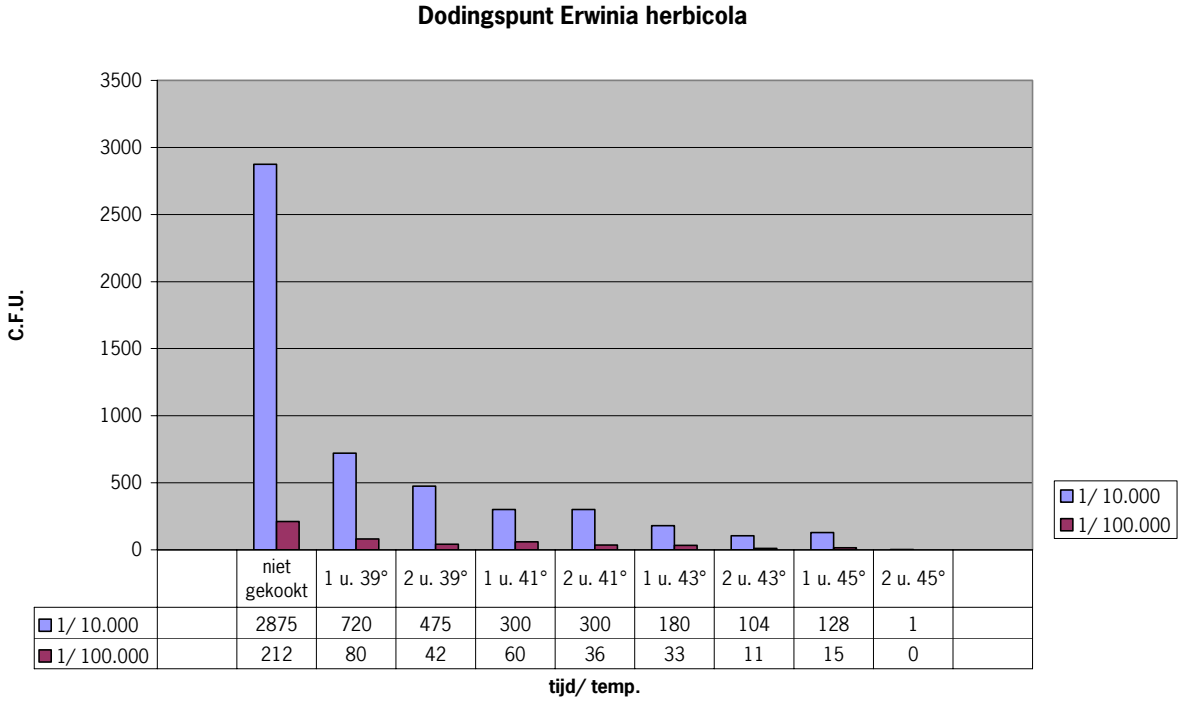
Fig. 12. Positieve PCR-reacties op *E. herbicola* uit oa. dahlia en Triteleia, en negatief op *Rhodococcus* uit lelie. De ladder rechts in de figuur is controle-DNA.

6.3.2 Infectie-experiment met *E. herbicola* in de buitenteelt

Ondanks de goede aantoonbaarheid van *Erwinia herbicola* in dahlia en *Triteleia* is het nog steeds niet helemaal duidelijk of deze bacterie ook de veroorzaker is van het woekerziek in dahlia.
Om de postulaten van Koch rond te krijgen, is in dahlia's op het veld de bacterie ingebracht.
De c.v. Red Pigmy is daartoe geinoculeerd met *E. herbicola*-isolaten (de isolaten dahlia 'nek 2', isolaat stro, *E. herbicola* 824/1 uit Isarael, en *E. herbicola* uit Triteleia
Er werden nauwelijks symptomen gevonden. Mogelijke aantastingen bleken negatief in de toets. Mogelijk is de inoculatie niet goed verlopen. Deze experimenten dienen herhaald te worden.

6.3.3 Kookexperiment: dodingspunt van *E. herbicola*

Erwinia herbicola bleek goed tegen temperaturen van 42 en 43 ° C te kunnen. Pas na 2 uur 45 ° C werden geen levende cellen meer gevonden.



	niet gekookt	1 u. 39°	2 u. 39°	1 u. 41°	2 u. 41°	1 u. 43°	2 u. 43°	1 u. 45°	2 u. 45°
1/ 10.000	2875	720	475	300	300	180	104	128	1
1/ 100.000	212	80	42	60	36	33	11	15	0

Fig.13. Dodingspunt van *Erwinia herbicola*

6.4 Discussie

Dit onderzoek is sterk vertraagd door uit te gaan van de veronderstelling, dat ook in dahlia *Rhodococcus* de veroorzaker zou zijn van woekeringen. Hoewel *Rhodococcus* af en toe aangetoond werd, bleek *Erwinia herbicola* (huidige naam *Pantoeae agglomerans*) de veroorzaker te zijn. Deze bacterie bleek na toetsing van veel monsters ook Triteleia aan te tasten. De PCR-toets is gebaseerd op de genen, die coderen voor de stoffen (planthormonen) die de woekeringen veroorzaken. Dit is belangrijk, omdat aannemelijk is (maar nog niet bewezen) dat er niet-ziekteverwekkende isolaten kunnen voorkomen, net als bij *Rhodococcus* in lelie. Beheersing lijkt mogelijk via kookproeven; of alle cv's 45 ° C kunnen weerstaan, moet onderzocht worden. Een betrouwbare PCR is voorhanden; toch blijft het moeilijk om in ziek materiaal deze bacterie aan te tonen. De woekeringen komen door hormoonactiviteit (Lichter 1995); de locatie van de bacterie varieert sterk, zodat er uitgebreid getoetst moet worden.
Opvallend is, dat *Erwinia herbicola* ook gebruikt wordt bij de bestrijding van pathogene bacteriën (Laux 2001) zoals b.v. *Erwinia amylovora* (perenvuur). Als antagonist zijn zelfs preparaten van *E. herbicola* op de markt!

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

7 Erwinia

7.1 Inleiding.

In 2003 en 2004 is vooronderzoek uitgevoerd binnen project PPO 320683 aan Erwinia in hyacint (zachtrot) en vooral aan watercultures van iris, ploffers in Dahlia, en zachtrot in Zantedeschia.
In april 2004 is een groot project gestart betreffende de beheersing van zachtrot in bolgewassen (PPO 320966).
De *Erwinia*-soorten waar het om ging, betrof *E. chrysanthemi* (dahlia, iris), en de *Erwinia carotovora-groep*: subspecies *atroseptica* en subspecies *carotovora* (Zantedeschia).
Doel van dit onderdeel was, om PCR-toetsen, beschreven in de literatuur (Smid, 1995); Darasse, 1994) toe te passen op *Erwinia*-isolaten.

7.2 Materiaal en methoden

Erwinia-isolaten uit de PPO-collectie zijn gebruikt om de PCR-toetsen te valideren: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (LMG 2408 en 2417), *E. chrysanthemi* (LMG 2804) en *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (LMG2392).

Tabel 7. Gebruikte primers voor het aantonen van *Erwinia*-soorten

primers	doelwit-gen	PCR-fragment	*Erwinia*-soort
Echr ADE1 / Echr ADE2	Pel (pectaatafbraak)	450 bp	*E. chrysanthemi*
Erwfor/Erwrev	Protease-gen	389 bp	E.c. subsp. *atroseptica*
Y1/Y2	16 S rDNA	434 bp	*E. carotovora*- groep

7.3 Resultaten en conclusies

Deze PCRs zijn toegepast op een groot aantal monsters, verdacht van *Erwinia*. Deze gegevens zijn opgenomen binnen project 320966. Een voorbeeld hiervan zijn zg. ploffers bij dahlia. DNA, geïsoleerd volgens standaard protocol uit deze monsters, reageerden alleen positief in PCR met de ADE1- en ADE2-primers.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.



Fig.14. Ploffers bij dahlia, waarschijnlijk veroorzaakt door *Erwinia chrysanthemi.*

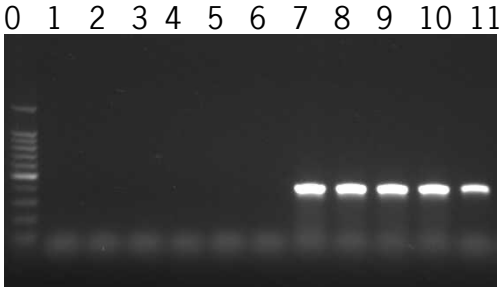


Fig.15. PCR op DNA, geïsoleerd uit Zantedeschia (1-6) en uit ploffers (7-11). Na PCR met primers, specifiek voor *E. chrysanthemi*, reageerden alleen monsters uit dahlia (witte bandjes).

7.4 Discussie

De beschreven PCRs zijn werkzaam, maar in 2005 zijn betere en aanvullende primersets ontwikkeld. Deze zullen binnen project 320966 worden gepubliceerd.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

8 Beheersing van bacterieziekten

8.1 Inleiding

Voor de beheersing van bacterieziekten in bolgewassen zijn erg weinig middelen beschikbaar. Hoewel antibiotica goed werken, zijn deze uit oogpunt van resistentie-ontwikkeling niet toegestaan. Ook middelen, gebaseerd op metalen (zoals koperverbindingen) geven meestal snel resistentie als gevolg van overdraagbare resistentie bij bacteriën via stukjes DNA, zg. plasmiden. De vraag naar alternatieven is groot. Laboratoriumexperimenten om werking van mogelijk geschikte middelen toe te passen is de eerste stap voor screening op geschiktheid. Binnen dit project is kort gekeken enerzijds naar toepassing van bestaande middelen (formaline, Groen-ex, Jet 5), anderzijds naar alternatieve middelen, liefst van natuurlijke oorsprong om toelating te vergemakkelijken. Een voorbeeld hiervan is Cecropine A, dat celwanden van bacteriën en sommige schimmels (Fusarium) lekmaakt, en toepassing heeft in de medische sector (DeLucca 1997).
Andere verbindingen zijn Cecropine A en B, en het bacteriocide middel Gramicidine. De bedoeling was om een simpele proef te gebruiken om de werkzaamheid te testen.

8.2 Materiaal en methoden

8.2.1 Bacteriën

Als bacterie-isolaten zijn geelziekbacteriën gebruikt (isolaat S148).

8.2.2 Middelen

De middelen zijn als aanbevolen werkoplossing gebruikt: Groen-ex (2%), Formaline (2 %), Jet 5 (2%), Citrex (0.5%) en Anolyte (4%), evenals Cecropin A en B (Sigma, beide 1mg/ml), en Gramicidin D (1 gr/ml).

8.2.3 Laboratoriumtoets

Voor het testen van middelen is gebruik gemaakt van een groeiplaatmodel: hiertoe zijn kweekplaten gebruikt, waaruit in et midden een ponsje van 1.5 cm doorsnede is gehaald. Hierin werden de te toetsen middelen aangebracht, en via meting van de remzone hieromheen de werking van het middel gemeten. Experimenten werden uitgevoerd in viervoud, en de platen geincubeerd gedurende 2-4 dagen bij 28 ^{o} C.

8.3 Resultaten en conclusies

Deze simpele opzet lijkt representatief voor wat men ziet in kasexperimenten. Formaline blijkt het beste te werken; ook Citrex heeft een bacterieremmende werking. De middelen Cecropine en gramicidine hebben het nadeel, moeilijk oplosbaar te zijn; hiervoor moet men de zuurgraad aanpassen van het oplosmiddel.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Tabel 8. Groeiremming van bacteriegroei, uitgedrukt in cm

middel	Remming (in cm)	opmerkingen
Controle (water)	0	
Groen-ex	3	
Formaline	3.5	
Jet 5	3.0	
Citrex	3.1	
KBV	1.5	
Cecropine A	1.9	Opgelost in verdund azijnzuur
Gramicidine	3.4	Moeilijk oplosbaar in water

8.4 Discussie

Cecropine-derivaten (Shin 2002) zijn veelbelovend door hun dubbele werking: zowel op bacteriën als schimmels. Nadeel is, dat dit middel niet toegelaten is voor de plantaardige sector, en dat deze derivaten erg duur zijn. Gramicidine biedt mogelijkheden, doordat hier ook folie van gemaakt kan worden, en wellicht toepassing vindt in bekleding van sorteerbanden. Hier is een STW-project voor gestart (NPC.7109), waar PPO in de begeleidingscommissie zit (projectleider Mark Overhand, Gorlaeuslab. Universiteit van Leiden). Voor een intensieve analyse van goede antibacteriële middelen moet voorop staan, dat de toelating een haalbare kaart is. Hier zal binnen het Erwinia-project (PPO 320966) aandacht aan besteed worden.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

9 Algemene discussie en toekomstig onderzoek

Een algemeen project op de identificatie en beheersing van bacterieziekten ligt momenteel niet voor de hand. Via kort onderzoek via DiagnostiekService (de zg. DiagnostiekProjecten) is nu een en ander mogelijk. Voorbeeld hiervan is een project betreffende *Pseudomonas*-problemen in gladiool.
Het belangrijkste bacterieprobleem is momenteel *Erwinia* (witsnot, zachtrot) die veel bolgewassen aantast. Dit wordt onderzocht in het PT-project 3232096600, en ook binnen een door LNV gefinancierd project welke overkoepelend *Erwinia* onderzoekt in vollegrondsgewassen.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

10 Output

Lezingen, voordrachten
- Diverse lezingen in 2003 en 2004 over geelziek in hyacint en bijzondere bolgewassen, en de mogelijkheden tot preventie door vroege detectie
- Lezingen, studiebijeenkomsten en werkbezoeken ten behoeve van *Erwinia*-onderzoek (o.a. 22 september 2003, bijeenkomst Akersloot e.a.)
- Gastcollege HLO Leiden over detectiemethoden van ziekten in bolgewassen (november 2002, 2003, 2004, 2005)
- maandelijks overleg met DiagnostiekService betreffende geelziek en woekerziekteproblemen,naast problemen met *Agrobacterium*, *Pseudomonas* en onbekende bacterieachtige aantastingen van vooral hyacint, maar ook gladiool en andere bolgewassen
- Open Dagen februari 2003 en 2004, PPO Lisse: Erwinia in bolgewassen, een groot probleem (posters)

Publicaties en vakbladartikelen
- J. van Doorn, K. Pham en T.C. Hollinger. Bacterie oorzaak van woekerziekte in lelie. BloembollenVisie 25 (2003): 20-21.
- Joop van Doorn, Trees Hollinger, Peter Vreeburg en Paul van leeuwen 2005. *Erwinia chrysanthemi* veel aangetroffen. BloembollenVisie 53: 22-23
- Paul van leeuwen, John Trompert, Joop van Doorn, Trees Hollinger en Peter Vreeburg 2005. *Erwinia* ook in bijzondere bolgewassen een probleem. BloembollenVisie 56: 22-23.
– Proefschrift J. van Doorn (*Type IV fimbriae of Xanthomonas hyacinthi*) 2002, Vrije Universiteit Amsterdam
- J. van Doorn en Han Bouman. De Groene PCR. In: Moleculaire Diagnostiek (eds E. van Pelt-Verkuil e.a.), Heron reeks, Bohn Stafleu van Loghum Houten/Diegem 2001, herziene versie 2006.

PCR-toetsen
- toets op *Erwinia carotovora*-groep
- toets op *Erwinia chrysanthemi* en *E. carotovora* subsp. *atroseptica*

Dit betreft de implementatie van toetsen, beschreven in de literatuur; nieuwe toetsen zijn/worden ontwikkeld binnen project 320966: beheersing van *Erwinia*.
- toets op *Rhodococcus fascians* (woekerziekte in lelie)
- toets op *Erwinia herbicola* (woekerziekte in dahlia)
- toets op *Agrobacterium tumefacians* (knobbelziekte)
- protocol voor toetsing op *Xanthomonas hyacinthi* (geelziek) in hyacint en bijzondere bolgewassen

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

11 Literatuur

1. Beattie GA, and SE Lindow 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. Phytopathology 89: 353-359.
1. Bell KS, MS Kuyukina, S Heidbrink, JC Philp, DW Aw, IB Ivshina, and N Christofi 1999. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR J. Applied Microbiol. 87: 472-480.
2. Darasse A, S Priou, A Kotoujansky, and Y Bertheau 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. Appl. Environm. Microbiol. 60: 1437-1443.
3. DeLucca AJ, JM Bland, TJ Jacks, C Grimm, TE Cleveland, and TJ Walsh 1997. Fungicidal activity of Cecropin A. Antimicr. Agents Chemother. 41: 481-483.
4. Gonzalez CF, H-L Li, and JW Cosper 1991. *Leersia hexandra*, an alternative host for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Texas. Plant Dis. 75: 159-162
5. Guimaraes PM, S Palmano, JJ Smith, MF Grossi de Sa and GS Saddler 2001. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfascians*. Anthonie Van Leeuwenhoek 80: 1-10.
6. Hollinger TC, PJ van Leeuwen, PJ Muller en J van Doorn 1997. Bijzondere bolgewassen: aantasting door geelziekte komt voor. Bloembollencultuur 6: 27
7. Laux P, G Mao and W Zeller. Studies on the mode of action of *Pantoea agglomerans* 21889 against *Erwinia amylovora*. In: Plant Pathogenic Bacteria (ed. SH de Boer), chapter Disease control, 329-334. Kluwer Academic Publishers, 2001 (The Netherlands)
8. Lichter A, I Barash, L Valinsky and S Manulis 1995. The Genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*: characterization and role in gall formation. J. of Bacteriology 177: 4457-4465
9. Maes M 1993. Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. FEMS Microbiol. Letters 113: 161-166
10. Maes T, D Vereecke D, T Ritsema, K Cornelis H Ngo ,T Thu, M Van Montagu M Holster, and K Goethals 2001. The att locus of *Rhodococcus fascians* strain D188 is essential for full virulence on tobacco through the production of an autoregulatory compound. Mol Microbiol. 42:13-28.
11. Manulis S, N Kogan, L Valinsky, O Dror and F Kleitman 1998. Detection of *Erwinia herbicola* pv.*gypsophilae* in gypsophila plants by PCR.European Journal of Plant Pathology 104: 85-91.
12. McGuire RG, JB Jones, CD Stanley and AA Csizinsky 1991. Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and bacterial spot of tomato as influenced by nitrogen and potassium fertilization. Phytopathol. 81: 656-660.
13. Nassar E, A, Darrasse, M Lemattre, A Kotoujansky, C Dervin, R Vedel, and Y Bertheau (1996). Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. Appl Environ Microbiol. 62 :2228-35.
14. Poplawasky AR and W Chun 1998. *Xanthomonas campetris* pv. *campestris* requires a functional pigB for epiphytic survival and host infection. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 466-475.
15. Rademaker JLW, FJ Louws, MH Schulz, U Rosbach, L Vauterin, J Swings, and FJ de Bruijn 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathol. 95: 1098-1111.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

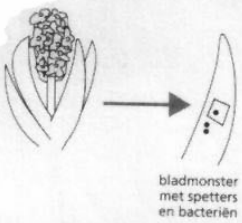
16. Saaltink GJ and MP Maas Geesteranus 1969. A new disease in tulip caused by *Corynebacterium oortii* nov. spec. Neth. J. Pl. Path. 75: 123-128
17. Sawada D, H Leki, and I Matsuda 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic Agrobacterium strains. Appl Environ Microbiol. 61(2): 828-31.
18. Shin SY, KW Lee, Y Kim, JI Kim, KS Hahm, and SW Kang 2002. Structure-antibacterial activity relationship of cecropin A derivatives. Protein Pept Lett 9: 487-493
19. Smid EJ, AHJ Jansen, and LGM Gorris 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in potato tubers using PCR. Plant Disease 74: 505-509.
20. Stange RR, D Jeffares, C Young, DB Scott, JR Eason, and PE Jameson 1996. PCR analysis of the fas-1 gene for the detection of virulent strains of *Rhodococcus fascians*.
21. Timmer LW, JJ Marois and D Achor 1987. Growth and survival of xanthomonads under conditions nonconductive to disease development. Phytopathology 77: 1341-1345.
22. Van Aartrijk J, en GJ Blom-Barnhoorn 1982. Geen overdracht van woekerziekte in lelies door vermeerdering via weefselkweekmethode. Bloembollencultuur 26 maart 1982: p.1012.
23. Van Doorn J. 2002. Type IV fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*: characterization and application for the detection of yellow disease in hyacinths. Dissertatie, Vrije Universiteit.
24. Van Doorn J, TC Hollinger, and B Oudega 2001.Analysis of the type IV fimbrial subunit gene fimA of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in hyacinths. Appl. Environm. Microbiol. 67: 598-607.
25. Van Doorn J en Th C. Hollinger. 2000. Toets op woekerziek in ontwikkeling. Vakwerk 51/52: p.45.
26. Van Doorn J, K. Pham en Th C. Hollinger 2003. Aantonen van woekerziekte in lelie. BloembollenVisie 25: 20-21
27. Van Pelt- Verkuil, E. 1996. De polymerase chain reaction; methodiek en toepassingen van PCR in de moleculaire biologie, 1- 76, LEBO, Bunnik.
28. Vauterin L, P Yang, A Alvarez, Y Takikawa, DA Roth, AK Vidaver, RE Stall, K Kersters and J Swings 1996. Identification of non-pathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants. Systematic and Applied Microbiology 19: 96-105

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bijlage 1

Protocol voor detectie van geelziek in bladsymptomen van hyacint en bijzondere bolgewassen

Monsterverwerking hyacinten verdacht van geelziek.

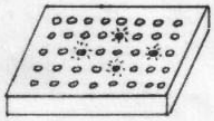


monster via afdeling diagnostiek

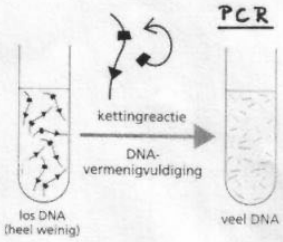
uitsnijden/ opwerken

1. Elisa inzetten 1 nacht koelkast
afwerken: 5 uur
gevoeligheid ca. 500.000 bact.

beide methoden gelijk inzetten
beide negatief: dan 3. proberen



2. PCR ca. 4.5 uur
afwerken: 1 uur
gevoeligheid ca. 5000 bact.



3. Uitplaten: verdunningsreeks maken ca. 30 min.
enkele dagen bij 28°, zonodig kolonies toetsen met 1. en 2.
nogal snel overgroei van andere bacteriën.



(4) Immuno fluorescentie (I.F.): suspensie op objectglaasje brengen en drogen. Behandelen met antiserum en fluorchroom. Ca. 2 uur , visuele beoordeling onder I.F. mikroskoop. Gevoeligheid erg afhankelijk van antiserum