

Vervolgonderzoek slijmstelen bij Zantedeschia

Onderzoek naar een gevoelige toets en wijze van overdracht van bacteriën die slijmstelen veroorzaken

Paul van Leeuwen, Wendy Martin en Joop van Doorn

© 2011 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit.

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

Projectnummer: 3234092800
PT nummer: 13751

De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse
: Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Tel. : +31 252 462121
Fax : +31 252 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Inhoud

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Doelstelling van het onderzoek	8
1.2 Algemene opmerking	8
2 OVERDRACHT VAN PECTOLYTISCHE BACTERIËN VIA PARTEREN VAN ZANTEDESCHIA KNOLLEN.....	9
2.1 Inleiding	9
2.2 Materialen en Methoden	9
2.2.1 Statistiek.....	9
2.3 Resultaten.....	10
2.3.1 Infectie van de knollen met Pcc	10
2.3.2 Veldsituatie 2010.....	10
2.3.3 Knoloogst 2010	11
2.3.4 Toetsen van geoogste knollen op <i>Pectobacterium</i>	11
2.3.5 Afbroei van knollen in de kas.....	11
2.3.6 Slijmstelen 2011	12
2.4 Conclusies overdracht bacteriën via parteren.....	12
3 ONTWIKKELING VAN EEN PRAKTISCH TOEPASBARE TEST OM PECTOLYTISCHE BACTERIËN AAN TE TONEN	13
3.1 Inleiding	13
3.2 Materialen en Methoden	14
3.2.1 Spectrofotometrische test.....	14
3.2.2 Cup Plate Test.....	15
3.2.3 Lokalisatie van zachtrot bacteriën in Zantedeschia stelen.....	15
3.3 Resultaten.....	16
3.3.1 Spectrofotometrische test.....	16
3.3.2 Cup plate test.....	17
3.3.3 Protocol cup plate test voor slijmstelen	19
3.3.4 Lokalisatie van zachtrot bacteriën in Zantedeschia stelen.....	19
3.4 Conclusies	20
4 RELATIE CUP PLATE TEST MET HET OPTREDEN VAN SLIJMSTELLEN	21
4.1 Inleiding	21
4.2 Materiaal en methode.....	21
4.2.1 Proef 1: oktober 2010	21
4.2.2 Proef 2: november 2010.....	22
4.2.3 Proef 3: mei 2011	22
4.3 Resultaten.....	22
4.3.1 Resultaten proef 1	22
4.3.2 Resultaten proef 2	25
4.3.3 Resultaten proef 3	26
4.4 Samenvatting relatie tussen cup plate test versus verslijmen.....	29
4.4.1 Proef 1	29
4.4.2 Proef 2	30
4.4.3 Proef 3	30

5	ALGEMENE CONCLUSIES EN DISCUSSIE.....	31
6	COMMUNICATIE.....	35
7	LITERATUUR.....	37
8	BIJLAGEN.....	39

Samenvatting

Een van de grootste problemen bij de export van de snijbloem *Zantedeschia* is, dat de stelen soms gaan verslijmen. Dit wordt veroorzaakt door bacteriën. Dit verkort niet alleen het vaasleven van de *Zantedeschia* stelen, maar tast ook de sierwaarde van de hele bos met andere soorten bloemen aan. Het optreden van slijmstelen kan de groei van het product *Zantedeschia* op deze manier belemmeren.

In 2007 en 2008 is onderzoek uitgevoerd binnen het project “slijmstelen bij *Zantedeschia*” (PT12804).

Hieruit bleek, dat het onduidelijk is waar de slijmstelen veroorzakende bacteriën (*Pseudomonas*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc, voorheen *Erwinia*)) de plant binnenkomen. Deze informatie is van belang om zo effectief mogelijk preventieve maatregelen tegen deze bacteriën te kunnen treffen. Tevens bleek aan het einde van dit onderzoek, dat een praktische toets op slijmstelen veroorzakende bacteriën wenselijk is voor de bloemenveiling FloraHolland.

Deze twee vragen zijn in dit onderzoek opgenomen. Gebleken is, dat besmetting tijdens het parteren van de knollen leidde tot uitval tijdens de knollenteelt, uitval tijdens de bloemeteelt en slijmstelen na de oogst. Het toetsen van ‘steriele’ en ‘besmette’ knollen op de aanwezigheid van slijmstelen veroorzakende bacteriën had geen waarde om uitval tijdens de bloemeteelt of het ontstaan van slijmstelen te voorspellen. Bij toetsing van de geoogste knollen aan het einde van de bewaring bleek dat *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) slechts in een klein percentage van de knollen kon worden aangetoond, zowel in de steriele controle als in de besmette knollen. Nader onderzoek naar de infectieroute van Pcc in *Zantedeschia*-knollen is daarom noodzakelijk voor o.a. goede bemonstering en toetsing op Pcc.

Om pectolytische (slijmstelen veroorzakende) bacteriën te kunnen aantonen is onderzocht of een spectrofotometrische of een uitplaat (kweek) methode geschikt is. De eerste methode is gebaseerd op de afname van de hoeveelheid toegevoegde pectine door de pectinase-reactie van de bacteriën, meetbaar als afname in extinctie bij 230 nm. Voor deze spectrofotometrische methode is een protocol ontwikkeld wat bruikbaar is om pectolytische activiteit te meten. Deze test scoort echter minder goed wat betreft gevoeligheid, reproduceerbaarheid en is gevoelig voor remming door contaminatie met plantensap van *Zantedeschia*. Om praktische redenen bleek een spectrofotometrische test voor routinematig testen van monsters minder geschikt en niet de keuze van de veiling. Daarom is verder onderzoek verricht naar de toepasbaarheid van een zgn. uitplaatmethode op een pectine bevattend groeimedium met hierin uitgeponste gaatjes (cup plate test). Onder laboratoriumomstandigheden bleek er een goede correlatie tussen het verslijmen van stelen enerzijds en de cup plate test anderzijds. Positieve reacties (aanwezigheid van pectolytische bacteriën) in de cup plate test bleken ook positief in controle-testen op een ander groeimedium (CVP) en scoorden ook positief in PCR-testen op Pcc en *Pseudomonas*.

Vanwege de reproduceerbare resultaten en eenvoudige opzet is de cup plate toets gebruikt om de kwaliteit (als indicatie voor het optreden van slijmstelen) voor *Zantedeschia* op de veiling vast te stellen.

Er zijn drie experimenten uitgevoerd in samenwerking met FloraHolland. Bossen *Zantedeschia*-stelen van 10 cultivars werden onderzocht op slijmstelen. Aan bossen uit dezelfde partij werd enerzijds uitbloeionderzoek uitgevoerd en anderzijds bepalingen met de cup plate toets aan fijn gemalen stengelstukjes. Als extra controle op de aanwezigheid van pectolytische bacteriën is in een aantal gevallen analyse met PCR uitgevoerd aan dezelfde monsters. Voor een standaardisatie in de uitvoering van deze testen is een protocol opgesteld.

De cup plate test bleek goed uitvoerbaar en reproduceerbaar (ook op twee verschillende locaties) mits het protocol nauwkeurig werd uitgevoerd. Wanneer de cup plate test negatief was, trad er geen verslijming op in de corresponderende bossen *Zantedeschia*. Echter, wanneer de cup plate test een positieve uitslag aangaf, betekende dit niet dat in alle gevallen verslijming optrad. Verder onderzoek is daarom nodig om deze correlatie tussen een positief signaal in de cup plate test en het optreden van slijmstelen te verbeteren. Dit kan dan een goede test opleveren voor de veiling.

1 Inleiding

Slijmstelen zijn bloemstengels van *Zantedeschia* die op de vaas, met name aan de onderkant, verslijmen als gevolg van bacterieaantasting. Daardoor wordt het vaasleven sterk verkort en tast dit de sierwaarde van de hele bos aan. Vanuit de bloemenexport wordt dit als het grote probleem van *Zantedeschia* gezien en dit kan de groei van dit relatief jonge en groeiende product belemmeren. Daarom is risicovermindering van slijmstelen bij de teelt van *Zantedeschia* een belangrijk onderzoeksthema.

Naar aanleiding van dit probleem heeft PPO, gefinancierd door PT, in 2007 en 2008 onderzoek uitgevoerd in samenwerking met FloraHolland. Binnen het project "slijmstelen bij *Zantedeschia*" (PT12804; van Leeuwen *et al.* 2009) is naar voren gekomen, dat het onduidelijk is waar de slijmstelenveroorzakende bacteriën (*Pseudomonas*-soorten, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), voorheen *Erwinia*) de plant binnenkomen. De mogelijkheid bestaat dat *Zantedeschia*-knollen al (latent) besmet zijn, maar ook dat deze bacteriën geïntroduceerd kunnen worden vanuit het milieu zoals uit een geïnfecteerd gewas. Bij het trekken van stelen kan er een invalspoort voor aanwezige bacteriën ontstaan, die op dat moment de plant en/of de stelen kunnen besmetten. Het is van belang om vast te stellen op welk moment de bloemen besmet raken zodat preventie effectief kan worden. Deze vraag sluit nauw aan bij het Deltaplan *Erwinia* (PT 13374) inzake de vraag of er resistentie bestaat bij een reeks van *Zantedeschia*-cultivars en welke typen bacteriën in monsters (knollen en planten) rot kunnen veroorzaken. De *Zantedeschia* telers willen graag weten of bv. bij het parteren inderdaad Pcc geïntroduceerd kan worden via besmette messen. Hoewel vermoed wordt dat Pcc de veroorzaker is, blijken ook *Pseudomonas*-soorten die pectinasen (celwandafbrekende enzymen) produceren slijmstelen te kunnen veroorzaken. Er zijn ook andere bacteriesoorten die in principe pectolytische activiteit kunnen vertonen, zoals *Bacillus*-soorten (Jayani *et al.* 2005). Deze zijn nauwelijks aangetroffen. Bij lokalisatie-experimenten bleken bij de oogst soms ook veel bacteriën hoog in de steel aanwezig te zijn; het trekken van de stelen lijkt echter geen knik (slijm-) stelen bij de bloemen te kunnen veroorzaken (van Leeuwen *et al.* 2009).

Teeltomstandigheden kunnen invloed hebben op het ontstaan van slijmstelen; welke factoren dit zijn is niet onderzocht. Ook kunnen bacteriën overleven op (veiling-) fust, rekjes en in water, mogelijk door biofilmvorming door deze bacteriën.

Het is duidelijk dat er gezonde en zieke partijen zijn; in sommige partijen *Zantedeschia*-knollen is al een percentage van de knollen besmet met pseudomonaden, mogelijk latent. Ook dit is nader onderzocht in dit project; dit kan te maken hebben met reeds latent besmet uitgangsmateriaal (dit wordt onderzocht in het *Erwinia* Deltaplan C, PT13374).

Het afsnijden van (minmaal) de onderste 2-3 cm van de steel kan dienen als beheersingsmaatregelen; dit levert significant minder slijmstelen op. Er bleek geen correlatie tussen algemene aantallen bacteriën in de bloemstelen enerzijds en het ontstaan van slijmstelen. Dit laatste gegeven was aanleiding voor dit vervolgonderzoek. Belangrijk is om te kunnen vaststellen of er specifiek pectinasen aanwezig zijn die slijmstelen kunnen veroorzaken.

Bovendien is een praktische toets voor de bloemenveilingen wenselijk, daar PCR (DNA) -toetsing voor de veiling niet haalbaar is. Een mogelijkheid is een biochemische toets op de rotveroorzakende enzymen van slijmstelen. Hier liggen verschillende mogelijkheden. Een hiervan is een zg. spectrofotometrische test, waarbij extracten van een plant geïncubeerd worden met een substraat dat lijkt op pectine, een belangrijk celwandbestanddeel van planten. Via een kleurreactie is dan de activiteit van eventueel aanwezige pectinasen meetbaar (Jayani *et al.* 2005). Andere mogelijkheden zijn het gebruik van bacteriele groeimedia die semi-selectief zijn voor pectinasen-producerende micro-organismen. Veelal is pectine dan de selecterende koolstofbron, die pas vrijkomt voor opname wanneer de bacterie deze kan vrijmaken via enzymen.

1.1 Doelstelling van het onderzoek

- a. Vaststellen of besmetting via parteren van (latent) geïnfecteerde knollen kan optreden (zie hoofdstuk 2)
- b. Opzetten van een laboratoriumtoets die slijmsteelveroorzakende bacteriën (pectolytische *Pseudomonas* en *Pectobacterium*) kan aantonen (hoofdstuk 3)
- c. Een praktische toets op slijmstelen voor de veiling, gebaseerd op de meting van enzymactiviteit (gestreefd wordt naar een kleurreactie) of een speciale voedingsbodem (zie hoofdstuk 4).

In het oorspronkelijke project voorstel was ook de vraag opgenomen wat de invloed van de verpakking (bloemenhoezen) is op het ontstaan van slijmstelen. In de periode van het indienen en toekennen van het projectvoorstel is dit onderwerp onderzocht door FloraHolland te Aalsmeer. De conclusie luidde dat hoezen niet van invloed zijn op het ontstaan van slijmstelen. In de eerste vergadering met de begeleidingscommissie is aangegeven dat dit onderzoek niet herhaald diende te worden en de tijd beter in de andere vragen geïnvesteerd kon worden.

1.2 Algemene opmerking

In het onderzoek zijn de gebruikte cultivars anoniem gemaakt. Dit, omdat anders ten onrechte geconcludeerd zou kunnen worden dat bepaalde cultivars veel of weinig last van slijmstelen zouden hebben. Eventuele cultivar gerelateerde gevoeligheid voor slijmstelen maakte geen deel uit van dit onderzoek.

2 Overdracht van pectolytische bacteriën via parteren van *Zantedeschia* knollen

2.1 Inleiding

Slijmstelen in *Zantedeschia* kunnen zeer waarschijnlijk ook worden veroorzaakt door bacteriën die via de knol in de bloemsteel terecht komen. Daarmee kan de knol een belangrijke besmettingsbron zijn. In dit onderzoek zijn T1 knollen, één jaar oud uit weefselkweek en dus bacterievrij, geparteerd met enerzijds een steriel mes en anderzijds met een mes besmet met Pcc.

De knollen zijn daarna buiten geplant en geteeld. Het jaar erop zijn een aantal knollen in de kas geplant en in bloei getrokken waarna bloemen zijn onderzocht op het ontstaan van slijmstelen.

2.2 Materialen en Methoden

Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van drie cultivars: cultivar 1, 2 en 3. Er is gebruik gemaakt van S1-knollen (knollen van één jaar oud, uit zaad geteeld) en T1-knollen (knollen van één jaar oud, uit weefselkweek). Door de keuze van het uitgangsmateriaal is de kans het grootste dat deze nog vrij zijn van bacteriebesmettingen.

De knollen zijn geparteerd met een steriel of besmet mes. Bij het steriele mes is het mes na het parteren van elke knol ontsmet in alcohol. Voor het parteren met een besmet mes zijn rotte knollen met leidingwater gehomogeniseerd. Het mes werd voor het parteren van elke knol in deze waterige oplossing gedoopt die besmet was met Pcc. Het proefschema is weergegeven in tabel 1.

De knollen zijn 27 april 2010 geparteerd. Per behandeling zijn 100 knollen in vier delen gesneden. Na het parteren zijn de partjes gedurende 15 minuten gedompeld in 1% Captan + 0,4% Topsin M voor bescherming tegen schimmelziekten (eerst de steriele partjes, daarna de besmette partjes).

De knollen zijn dezelfde dag op het veld geplant in 40-60 bakken die ingegraven zijn en gevuld met zand van de proeftuin te Lisse. Er zijn 50 partjes per bak geplant, 8 bakken per behandeling.

De planten zijn op het veld standaard bemest en gespoten tegen onkruid, vuur en luisoverdracht.

De (natte) bakken zijn 20 oktober 2010 van het veld gehaald en in de bewaring bij 17 °C gezet. De eerste week van december zijn de knollen uit de bakken gehaald en verder bewaard bij 17 °C.

Tabel 1. Proefschema van de knolbehandelingen.

Behandeling	cultivar	Besmetting tijdens parteren
1	Cultivar 1	Nee
2	Cultivar 2	Ja
3	Cultivar 2	Nee
4	Cultivar 2	Ja
5	Cultivar 3	Nee
6	Cultivar 3	Ja

Eind april 2011 zijn van elke behandeling 2 bakken met elk 5 knollen geplant in de kas bij 18 °C kastemperatuur. Op 15 en 21 juni zijn bloemen geoogst om in de houdbaarheidsruimte te beoordelen op het ontstaan van slijmstelen. Op 6 juli zijn bloemen geoogst om te beoordelen op aanwezigheid van bacteriën in de bloemsteel.

2.2.1 Statistiek

De proeven zijn statistisch verwerkt met het programma GenStat (14^e editie). Er is gewerkt met een betrouwbaarheid van 95%. In tabellen is soms een LSD (least significant difference) aangegeven. Indien in een tabel het verschil tussen twee getallen groter is dan de LSD is het verschil betrouwbaar.

2.3 Resultaten

2.3.1 Infectie van de knollen met Pcc

De vloeistof gemaakt van de rotte knollen waarin het parteermes is gedoopt om de knollen te besmetten is getoetst om vast te stellen welke bacteriën aanwezig waren. Dit is uitgevoerd via PCR (van Leeuwen *et al.* 2009). In deze suspensie is Pcc aangetroffen en geen *Pseudomonas*.

2.3.2 Veldsituatie 2010

Vanaf 2 juni 2010 kwam cultivar 1 boven de grond. Circa 10 tot 14 dagen later kwamen de andere twee cultivars op.

Op 21 juni was zichtbaar dat de opkomst met name bij behandeling 4 en 6 (de besmette cultivars 2 en 3) slechter was dan bij de niet besmette behandelingen. Bij cultivar 1 was dit minder duidelijk zichtbaar.

Op 5 juli was duidelijk zichtbaar dat enkele planten wegvielen in de besmette behandelingen (2, 4 en 6). De planten (donkergroen met waterdoorschoten weefsel) zakten in elkaar, het typische beeld van een *Erwinia* aantasting. Ook later in juli, tijdens een warme periode, vielen enkele planten weg. Het ging veelal om 2 tot 4 planten per bak (50 partjes geplant), dus circa 4 tot 8%. Op Fig. 1a,b en c is de gewasstand van de planten rond half augustus te zien.

Fig.1. Opplant van drie cultivars *Zantedeschia*, niet-besmet (links) en wel besmet (rechts) met Pcc.



a. Cultivar 1 geparteerd met een steriel mes (links) en rechts met een besmet mes.



b. Cultivar 2 geparteerd met een steriel mes (links) en rechts met een besmet mes.



c. Cultivar 3 geparteerd met een steriel mes (links), rechts met een besmet mes.

Eind augustus en begin september, na overvloedige regenval, vielen nog meer planten weg hoofdzakelijk in behandeling 4 en 6 en een enkele in behandeling 2.

Opvallend was dat van de 8 bakken met cultivar 2 (behandeling 4), er 2 relatief goed bij stonden en 6 relatief slecht. De oorzaak daarvan is niet bekend.

2.3.3 Knoloogst 2010

Er zijn grote verschillen gevonden in het aantal geoogste gezonde knollen (tabel 2). Bij elke cultivar leverde parteren met een steriel mes meer gezonde knollen op dan parteren met een besmet mes. Bij parteren met een steriel mes is 95% van de partjes aan het einde van het seizoen als knol geoogst. Bij parteren met een besmet mes is 50% van de partjes weggefallen. Het verschil in aantal knollen zorgde ook voor een verschil in totaal oogstgewicht. Bij cultivar 1 was er geen verschil in het gewicht/knol tussen parteren met een steriel of besmet mes: de geoogste knollen waren even zwaar. Bij de twee andere cultivars leverde parteren met een steriel mes gemiddeld zwaardere knollen op. Door uitval bij de besmette partjes was de plantdichtheid uiteindelijk lager dan bij de niet-besmette partjes. Op grond daarvan werd verwacht dat de knollen van de veldjes met de besmette knollen zwaarder zouden zijn.

Tabel 2. Aantal geoogste gezonde knollen gemiddeld per bak (50 partjes geplant), totaal gewicht (g) gezonde knollen en gewicht/knol (g).

cultivar	Besmetting tijdens parteren	Aantal knollen	Gewicht knollen	Gewicht/knol
cultivar 1	Nee	48.4	1321	27.5
cultivar 1	Ja	18.5	524	26.9
cultivar 2	Nee	46.5	1237	26.7
cultivar 2	Ja	17.8	485	19.9
cultivar 3	Nee	47.0	923	19.7
cultivar 3	Ja	31.3	204	6.5
LSD* =		6.37	162.8	3.54

*LSD = least significant difference: indien het verschil tussen twee getallen in één kolom groter is dan de LSD is het verschil betrouwbaar

2.3.4 Toetsen van geoogste knollen op *Pectobacterium*

Op 29 maart 2011 zijn van elke behandeling 10 visueel gezonde knollen met behulp van een gevoelige PCR toets onderzocht op de aanwezigheid van Pcc (Van Leeuwen *et al.* 2009; Darasse *et al.* 1994). In tabel 3 is het percentage knollen weergegeven waarin Pcc is aangetoond. Pcc werd slechts in een klein percentage van de knollen aangetoond. Opmerkelijk is dat de bacterie zowel in de steriel- als in de besmet-geparteerde knollen werd aangetoond. Blijkbaar zijn er ook besmettingsroutes na het parteren.

2.3.5 Afbroei van knollen in de kas

Voorjaar 2011 zijn van alle behandelingen 10 knollen in bakken met potgrond geplant.

In tabel 3 is het percentage uitval van de planten tot het einde van de bloeiperiode aangegeven. Er is een betrouwbaar effect van de besmetting. Besmetting van de knollen tijdens het parteren leidde tot meer uitval in de nateelt. Er is een tendens zichtbaar dat besmetting van cultivar 3 niet tot meer uitval leidde.

Tabel 3. Percentage uitval van planten tijdens de nateelt in de kas op bakken.

cultivar	Besmetting tijdens parteren	% knollen besmet	% uitval
cultivar 1	Nee	20	0
cultivar 1	Ja	30	60
cultivar 2	Nee	10	0
cultivar 2	ja	10	40
cultivar 3	Nee	10	0
cultivar 3	Ja	0	0

2.3.6 Slijmstelen 2011

Op 15 juni zijn de eerste bloemen uit de kas geoogst en op de vaas gezet. Een week later zijn weer bloemen op de vaas gezet. In tabel 4 is aangegeven hoeveel bloemen zijn onderzocht en hoeveel slijmstelen er zijn waargenomen.

Bij de eerste bloemen (15 juni op de vaas) zijn geen slijmstelen aangetroffen. Bij de tweede oogstdatum zijn alleen bij de besmette planten van cultivar 1 en 2 een aantal slijmstelen waargenomen en niet bij de besmette cultivar 3 of onbesmette knollen. De slijmstelen waren afkomstig van planten met verslijmingssymptomen én van visueel gezonde planten.

Tabel 4. Aantal geteste bloemen en aantal slijmstelen per proef (startdatum).

cultivar	Besmetting tijdens parteren	Aantal geoogste stelen 15 juni	Aantal slijmstelen 15 juni	Aantal geoogste stelen 21 juni	Aantal slijmstelen 21 juni
cultivar 1	Nee	7	0	11	0
cultivar 1	Ja	1	0	7	4
cultivar 2	Nee	8	0	8	0
cultivar 2	ja	5	0	8	2
cultivar 3	Nee	6	0	11	0
cultivar 3	Ja	0	0	4	0

2.4 Conclusies overdracht bacteriën via parteren

- Parteren met een besmet mes leidde tijdens de teelt tot:
 - 1) uitval van partjes na het planten
 - 2) uitval van planten tijdens een warme periode
 - 3) uitval van planten tijdens een zeer natte periodeBij de steriel geparteerde knollen vond vrijwel geen uitval plaats, gemiddeld is 95% van de partjes uitgegroeid tot een knol.
- Bij toetsing van de geoogste knollen aan het einde van de bewaring bleek dat Pcc slechts in een klein percentage van de knollen kon worden aangetoond, zowel in de steriele controle als in de besmette knollen.
Mogelijke verklaringen hiervoor zijn:
 - 1) de gezonde knollen zijn besmet geraakt tijdens de teelt, het rooien en de verwerking
 - 2) de bacteriën in de besmette knollen zijn sterk in aantal afgenomen tijdens de bewaring
 - 3) de bemonstering wordt niet aan het juiste deel van de knol uitgevoerd.
- Na het planten van (een deel van) de knollen op bakken in de kas heeft er enige uitval plaatsgevonden. Uitval vond bij twee van de drie cultivars plaats, alleen bij de knollen die besmet zijn tijdens het parteren.
- In de eerstgeoogste bloemen van de knollen zijn geen slijmstelen aangetroffen. Van de bloemen die een week later zijn geoogst zijn er een aantal gaan verslijmen. De stelen die gingen verslijmen waren van cultivar 1 en 2, dezelfde cultivars als waarvan enkele planten zijn weggefallen bij de behandeling 'besmet tijdens parteren'.

Besmetting tijdens het parteren leidde tot uitval tijdens de teelt, uitval tijdens de bloemeteelt en veroorzaakte slijmstelen. Het toetsen op Pcc na de bewaring van 'steriele' en 'besmette' knollen zoals uitgevoerd in dit onderzoek had geen voorspellende waarde ten aanzien van uitval tijdens de bloemeteelt of het ontstaan van slijmstelen.

3 Ontwikkeling van een praktisch toepasbare test om pectolytische bacteriën aan te tonen

3.1 Inleiding

Pectine is de belangrijkste structurele component van de plantencelwand. Door afbraak van pectine (Fig.2) kunnen plantpathogene micro-organismen (waaronder bacteriën) binnendringen en de plant koloniseren. Zachtrot bacteriën produceren een combinatie van verschillende pectolytische enzymen, maar de secretie (uitscheiding) van pectinases (die zorgen voor de actieve afbraak van plantweefsel). Er bestaan overigens veel soorten pectine en ook veel klassen pectine-afbrekende enzymen (Jayani et al. 2009; Schols et al. 2009). Bij lage concentraties aan pectine wordt de productie van pectinases al gestimuleerd in de bacterie. Doel van dit deelonderzoek binnen dit project is om een eenvoudige, gevoelige test te ontwikkelen. Deze moet geschikt zijn voor de veiling om de aanwezigheid van pectolytische bacteriën die slijmstelen kunnen veroorzaken (*Pseudomonas*, Pcc) te kunnen aantonen.

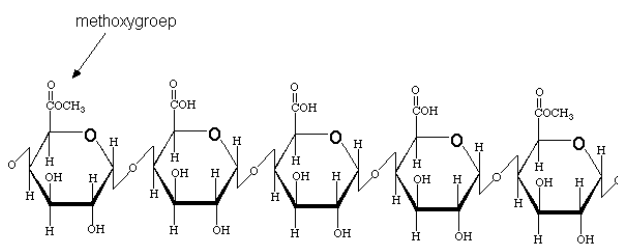


Fig. 2. Pectine, een polymeer van veresterde D-galacturonzuur waarbij de zijketens variabel kunnen zijn en suikers zoals oa. xylose en arabinose bevatten

Er zijn veel verschillende enzymatische testen om deze enzymen aan te tonen. Deze zijn meestal gebaseerd op de afbraak (depolymerisatie) van de polymere verbinding van pectinebevattende substraten. De eerste methode berust op een spectrofotometrische test die de hydrolyse van polygalacturonzuur (een pectineachtige verbinding) meet als toename van de absorptie bij 235 nm. De tweede methode die onderzocht is berust op het zichtbaar maken (structuur en kleur) van de afbraak van pectine in een vast groeimedium. CVP is een van de meest toegepaste media voor de selectie van pectolytische bacteriën. Dit medium bevat de kleurstof crystal violet en pectine (natriumpolypectaat). Ondiepe gaten in de groeiplaat met dit substraat tonen aan wanneer er pectolytische activiteit aanwezig is en de pectine is afgebroken. Hier zijn dan pectolytische bacteriën aanwezig. Een aanpassing van dit principe is de zg. cup plate test, waarbij ronde gaten in een vast, pectinebevattende agar zijn geponst. Hierin kunnen monsters van te onderzoeken bacteriën worden aangebracht en heldere zones ("halo's") zullen zichtbaar zijn daar waar pectolytische enzymen worden uitgescheiden.

In dit onderzoeksdeel zijn zowel de spectrofotometrische testen als de testen met een vast groeimedium onderzocht op hun betrouwbaarheid en toepasbaarheid om pectolytische activiteit vast te stellen, gecorreleerd aan het optreden van slijmstelen in *Zantedeschia*.

In eerder onderzoek is al de belangrijke onderzoeksvraag beantwoord over het deel van de stengel dat het meest betrouwbaar de mogelijke aanwezigheid van slijmstelen veroorzakende bacteriën bevat.. Daarbij is gebleken dat de onderkant van de stelen meestal de eerste plek/ingangsplek van infectie van slijmstelen is en ook de meest betrouwbare bemonsteringsplek voor de zachtrot bacteriën. Bovendien is het onderste stukje stengel het meest praktisch voor de bloemenveiling te gebruiken bij een bemonstering omdat de rest van de bos intact blijft. De vraag blijft dan wel of latente infecties met zachtrot bacteriën in ogenschijnlijk gezonde stelen kunnen worden aangetoond. Daarom zijn *Zantedeschia*-knollen, verdacht van een latente zachtrotinfectie met Pcc in potten geplant in de kas. De hier uitgroeïende stelen zijn vervolgens middels

PCR getest op aanwezigheid van Pcc.

3.2 Materialen en Methoden

3.2.1 Spectrofotometrische test

Test 1: Gebruik van DNS test om pectolytische activiteit in zuivere bacteriecultures te bepalen

DNS staat voor de chemische verbinding 2,4-dinitrosalicylic acid (Miller 1959; Soares *et al.* 2001). De geteste bacteriële isolaten staan in tabel 5. Deze zijn overnacht gekweekt in NB (Nutrient Broth, Oxoid) bij 27°C. De bacteriedichtheid is vervolgens aangepast tot 1×10^8 cfu/ml (kolonievormende eenheden per milliliter kweek) door de optische dichtheid te meten ($OD_{600} = 0.1$) op een Eppendorf Biophotometer spectrofotometer.

Tabel 5. De gebruikte bacteriële isolaten voor de DNS test

Isolaat	pectolytisch	Details gebruikte isolaten
5835	Nee	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A (uit grond, LMG-collectie)
9126	Ja	<i>Pectobacterium carotovera</i> subsp. <i>carotovera</i> (isolaat uit Zantedeschia)
2434	Ja	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Plantenziektkundige Dienst)

Voor 1 liter substraatbuffer werd 12 gr. Tris en 1 ml 0.1 mM $CaCl_2$ op pH 8.5 gebracht en 0.5 gr. Polygalacturonic acid (Sigma) toegevoegd en bewaard bij 4°C. Voor het bepalen van pectolytische activiteit van een monster werd 100 μ l te testen bacteriesuspensie toegevoegd aan 900 μ l substraatbuffer met polygalacturonzuur zodat de effectieve bacteriële eindconcentratie 10^7 /ml bedroeg. Als negatieve controle diende 100 μ l PBS buffer. Absorptie werd vervolgens bepaald bij een golflengte van 230 nm bij $t = 0$ min., 15 min., 60 min. en 24 uur. De veranderingen in absorptie werden vervolgens berekend en de gemiddelde waarden van 3 herhalingen bepaald.

Test 2: gevoeligheid van de DNS-test om pectolytische activiteit van zuivere bacteriecultures te bepalen

Net als bij test 1 zijn de geteste isolaten (Tabel 6) overnacht gekweekt en op $OD = 0.1$ gebracht. Daarna zijn deze isolaten verder verdund om te bepalen waar de detectiegrens van de DNS test ligt. Verdunningen waren per isolaat 1×10^8 cfu, 1×10^7 cfu, en 1×10^6 cfu/ml. De absorptie werd vervolgens na 60 min. gemeten.

Tabel 6. Bacteriële isolaten, gebruikt in de analyse voor gevoeligheid van de DNS test of cup plate test

Isolaat	pectolytisch	Details gebruikte isolaten (alle uit Zantedeschia geïsoleerd)
ST12	Ja	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
9126	Ja	<i>Pectobacterium carotovera</i> subsp. <i>carotovera</i>
ST6	Ja	<i>Pectobacterium carotovera</i> subsp. <i>carotovera</i>
9181	Ja	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>

Test 3. Effect van Zantedeschia plantensap in de DNS test

Van de isolaten uit tabel 7 is 100 μ l aan 900 μ l van verdund Zantedeschia plantensap toegevoegd zodanig dat de bacteriële eindconcentratie op 10^7 /ml werd gebracht. Zantedeschia bladmateriaal werd fijn gemalen in PBS buffer opgenomen (1:5 v/v), gecentrifugeerd bij 800g gedurende 5 minuten. om grove plantenresten te verwijderen). Metingen aan de absorptie zijn na 60 minuten na start van de reactie uitgevoerd.

3.2.2 Cup Plate Test

Proef 1: bepaling van de gevoeligheid van de cup plate test in vergelijking met PCR, verslijmtest en CVP medium

Voor de Cup Plate Test werd het MM-9 medium toegepast (glycerol 0.5%, yeast extract 0.2%, 1mM MgSO₄ · 7H₂O, polygalacturonic acid 0.4% en (Technical) Agar 1.5%; Liao *et al.* 1987). Een zg. tweelagensysteem is gebruikt waarbij 10 ml in een 9 cm doorsnede Petrischaal wordt gegoten. Na stollen wordt vervolgens een toplaag van 15 ml aangebracht met behulp van vier kleine plastic ronde malletjes (diameter van 10 mm) per agarplaat om gaatjes (wells) te gieten (zie Fig. 7).

CVP media en Kings B media werden geprepareerd volgens standaard receptuur van PPO. Voor de verslijmingstest van *Zantedeschia* stelen werden stelen ontsmet met 70% ethanol en in 1 cm stukken gesneden. 10 µl van de te testen bacteriële suspensie werd vervolgens op de top van elk segment aangebracht (5 segmenten per Petrischaal, controles met PBS en NB medium). De stengelstukjes werden na 24 uur beoordeeld op weefselafbraak door pectolytische activiteit.

Voor de identificatie en detectie van Pcc en *Pseudomonas* spp. zijn PCRs uitgevoerd (Darasse *et al.* 1994). Bacterie-isolaten, afkomstig van verslijmde *Zantedeschia* werden uit de PPO-collectie genomen en gekweekt volgens standaard procedures, hierboven beschreven. De bacterie-concentratie werd op OD₆₆₀ = 0.1 gebracht. Van elke bacteriekweek werd 1 ml geconcentreerd via centrifugatie (12.000 x rpm, 10 min.) De pellet werd geresuspendeerd in 200µl PBS en geïncubeerd gedurende 15 min. bij 90° C om de cellen te lyseren. Een 1:20 verdunning in PCR-buffer werd vervolgens direct gebruikt voor PCR-reacties om de identiteit van de bacteriën te bepalen.

Proef 2: bepaling van de ongevoeligheid (robuustheid) van de test voor variatie in monsterpreparatie van Zantedeschia monsters

MM-9 media werden bereid zoals hierboven beschreven. Echter, in dit geval werd een zgn. eenlaagstechniek gebruikt om de zichtbaarheid en toonbaarheid van bacteriële kolonies op de groeiplaten te verbeteren. Hierbij werd het pectine-medium direct in een plaat gegoten en niet op een andere agarlaag. Er werden monsters genomen van blad, steel en knol, afkomstig van gezonde *Zantedeschia*-planten. Plantensap werd vervolgens in PBS buffer (1:5 v/v) opgenomen en gecentrifugeerd (800 x g; 5 min.) om grotere fragmenten te verwijderen. Van elk plantenonderdeel werd 10 µl van Pcc isolaat 9181 aan 990 µl plantensap toegevoegd om zo bacterieconcentraties van 1 x 10⁶ cfu/ml te geven. Vervolgens werd gezond en met bacteriën gespiked plantensapverdundingen op MM-9 platen gebracht (5 x 10 µl). De groeiplaten werden bij kamertemperatuur geïncubeerd en afgelezen na 24, 48 en 72 uur.

3.2.3 Lokalisatie van zachtrot bacteriën in *Zantedeschia* stelen

Eerder onderzoek toonde aan, dat slijmsteelbacteriën meestal onderin de stelen aanwezig zijn. Om hiervan zeker te zijn is nogmaals een lokalisatie-onderzoek uitgevoerd. Vijf stelen met bloem werden getrokken uit bakken met *Zantedeschia* in de kas (cultivar 1). Deze stelen waren afkomstig van planten die visueel gezond waren maar waarvan de knollen mogelijk latent besmet waren met Pcc. De stelen werden vervolgens uitwendig ontsmet met 70% ethanol. Vervolgens werden drie segmenten geknipt uit de stelen:

1. De onderste 5 cm (steelbasis)
2. Een stuk van 5 cm uit het midden
3. Een stuk van 5 cm direct onder de bloem

Het stengelweefsel werd vervolgens gehomogeniseerd in PBS (1: 5 v/v) met behulp van een zgn. hand rollerpers. 100µl van dit homogenaat werd vervolgens aan 900µl voorkweekmedium en gedurende 48 uur geïncubeerd bij 27°C. Monsters werden vervolgens gecentrifugeerd bij 2000 rpm om overblijvende plantweefsel te verwijderen als pellet en het overblijvende supernatant werd vervolgens bij 12000rpm gedurende 10 min. gecentrifugeerd om de bacteriën te concentreren. Voor DNA-isolatie van de verkregen bacteriële suspensie werden standaard DNA-extractiemethoden gevolgd (Kingfisher). De verkregen DNA-fracties werden geanalyseerd in PCR reacties met primers, specifiek voor *Pectobacterium* spp. (Y1/Y2 primers; Darasse *et al.* 1994). PCR-reacties zijn uitgevoerd volgens standaard procedures en thermocycler programma's.

3.3 Resultaten

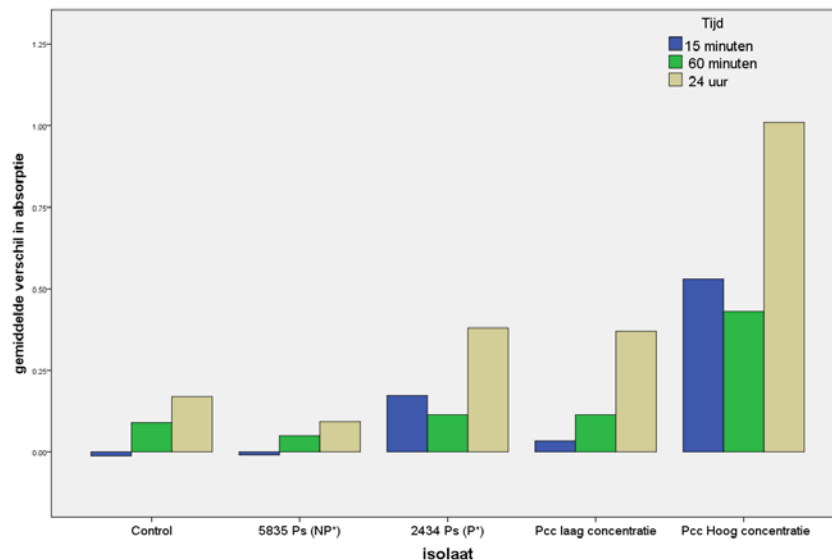
3.3.1 Spectrofotometrische test

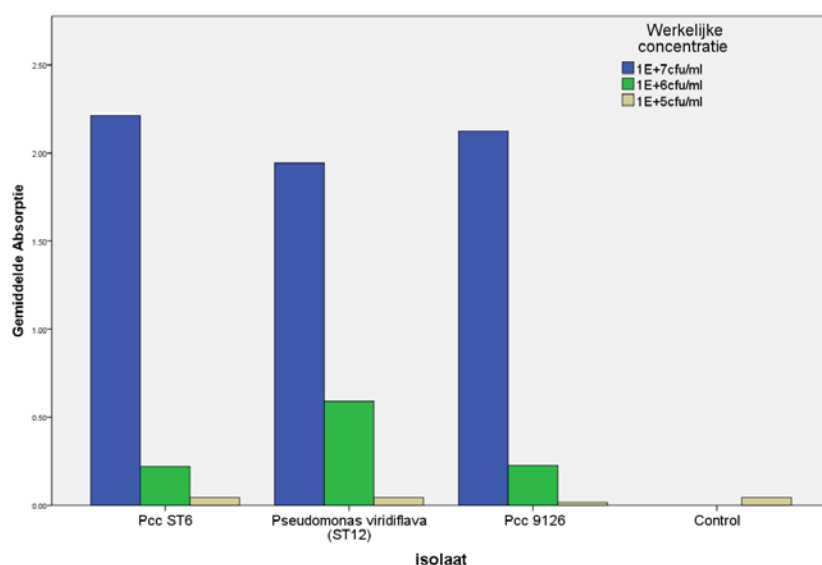
Test 1 en 2: toepassing van de DNS test om pectolytische activiteit te bepalen

De test gaf alleen een uitslag wanneer er pectolytische activiteit in een bacterie-preparaat aanwezig waren. Dit bleek uit de absorptiewaarde van het niet-pectolytische isolaat *Pseudomonas* 5835 (Tabel 5) welke eenzelfde lage absorptiewaarde gaf als de negatieve controle (PBS). Dit is weergegeven in Fig. 4A. Echter, hoewel de pectolytische isolaten (*Pseudomonas putida*, Pcc) in de tijd een toename van de absorptie lieten zien (Fig. 4A), was er vaak geen mooie lineaire toename. Bij gelijke bacteriële concentraties produceerde Pcc een hogere pectolytische activiteit dan *Pseudomonas fluorescens*.

Wanneer de bacteriesuspensies werden verdund, was er geen pectolytische activiteit bij 1×10^5 cfu/ml meer meetbaar (Fig.4B). De absorptiewaarden vielen dan in de zelfde range als de controle.

A





B

Fig.4. Gemiddelde absorptiewaarden van de DNS test van de pectolytische activiteit van de bacterie-isolaten van Tabel 6 (A) en de gevoeligheid van de test bij drie verschillende concentraties (B).
Bij A: *P-Pectinolytische isolaat, NP= Non-Pectinolytische isolaat.

Test 3. Effect van *Zantedeschia plantensap* op de DNS-test

Na 1 uur incubatie in plantensap bleken de meeste uitslagen van de pectolytische activiteit buiten de range van de absorptiemetingen (>2.0 of niet leesbaar) te vallen. Pogingen om de invloed van het plantensap via centrifugatie en filtratie te verminderen leverden geen verbeteringen op.

3.3.2 Cup plate test

Proef 1. Gevoeligheid van de cup plate test in vergelijking met PCR, de verslijmtest en kweek op CVP medium

Tabel 7. Detectie van pectolytische activiteit in bacterie- isolaten uit *Zantedeschia*

Isolaat	Bron/geïsoleerd	PCR		KB	CVP	Verslijmtest		Cup plate test
		Y1/Y2	PEL			Cult A	Cult B	
ST7	Zantedeschia (uit verslijmde stelen)	+	-	-	DC	10S	10S	+
10.1	Zantedeschia (uitverslijmde stelen)	+	+	-	DC	10S	10S	+
10.2	Zantedeschia (uit verslijmde stelen)	-	+	-	SC	NS	1S	-
LMG 5830	Ref. isolaat <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	+	NC	NS	NS	-
PD2434	Ref. isolaat <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	SC	10S	10S	+
9127	Zantedeschia (Pcc)	+	-	-	DC	10S	10S	+
106.3	Slijmstelen 2007	+	-	-	DC	10S	10S	+
106.B1	Slijmstelen 2007	+	-	-	DC	10S	10S	+
PA2	Slijmstelen 2007	-	-	+	NC	NS	NS	-
RO5	Slijmstelen 2007	-	-	-	NC	NS	NS	-
113.3	Slijmstelen 2007	-	-	-	SC	8S	6S	+

DC= diepe putten, SC= ondiepe putten, NC=geen putten, S =aantal stengelstukjes met verslijming; NS =geen verslijming, + test positief resultaat, - test negatief resultaat, Pcc = Pectobacterium car. subsp. car.

Er is een positieve correlatie tussen de verslijmtest en de cup plate test vastgesteld. De correlatie tussen CVP en de cup plate test was hoog. Karakterisatie middels PCR en CVP medium (analyse op holtevorming in pectine door pectinases) gaven aan dat alle Pcc-isolaten pectinolytisch waren (Tabel 8). Fluorescente bacteriekolonies op Kings B medium gaf aan dat hier sprake was van een bacterie, behorende tot de *Pseudomonas fluorescens* groep. Echter, analyse op CVP, met de verslijmtest en cup plate test gaf aan, dat niet alle pseudomonaden pectinolytisch waren (Tabel 7, ref. isolaat LMG5830, PA2 en R05). Uit de literatuur bleek, dat sommige pseudomonaden een ander pel-gen hebben dat niet wordt herkend met de hier gebruikte primers. Daarom is een negatieve uitslag in PCR, maar een positieve reactie in bv. de cup plate test, mogelijk. Een positieve uitslag in PCR, welke als target pectolytische genen heeft (pel primers, Liao *et al.* 1986) correleerde meestal goed met de aanwezigheid van pectolytische activiteit bij de *Pseudomonas* in kwestie zoals tot expressie komt op CVP, cup plate test en in de verslijmtest (Tabel 7).

Proef 2. Ongevoeligheid van de test voor variatie in monsterpreparatie van *Zantedeschia stelen*

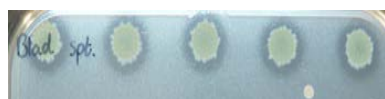
Tabel 8. Gevoeligheid van de cup plate test voor plantmateriaal van *Zantedeschia*

Monster	Aantal positieve testen na 72hrs*
Bladweefsel	0
Stengelweefsel	0
Knolweefsel	0
kraan water	0
Bladweefsel + isolaat 9181	5
Stengelweefsel + isolaat 9181	5
Knolweefsel + isolaat 9181	5

*een positief resultaat = halo-vorming rond de inoculatieplek

Plantenweefsel van *Zantedeschia* gaf in de cup plate test geen halo-vorming (ophelderingszones) rondom de inoculatieplek op de platen (Fig. 5B, Tabel 8). Positieve controles (plantenweefsel plus Pcc-isolaat 9181) produceerden allemaal een halo-effect binnen 48 uur (Tabel 8; Fig. 5A en D). Kraanwater gaf zoals verwacht ook geen halo-vorming (Fig. 5 C).

Fig. 5. Halo-effect als gevolg van pectolytische activiteit in de cup plate test



A: Halo effect, geïnduceerd door Pcc isolaat 9181.



B: Plantensap van gezond controle stengelweefsel



C: Kraanwater (waar niet-pectolytische bacteriën uitgroeien)



D. Niet-pectolytische bacteriën (linker CVP groeiplaat) en pectolytische bacteriën (rechts)

3.3.3 Protocol cup plate test voor slijmstelen

Er is een protocol opgesteld op grond van de experimenten die zijn uitgevoerd om de cup plate test op te zetten .

- 1 cm steel fijnmaken in buffer (1:5 v/v): PBS
- 100 µl (= 100x verdunning) gebruiken voor verdere verdunningen (10 x en 1000x) in buffer (PBS)
- 100 µl in wells van cup plate (in duplo)
- Incubatie bij 27° C
- Aflezen na 1, 2 en 3 dagen op "halo"-vorming (= positieve reactie): opheldering in mm gemeten)
- Gieten van cup plate test volgens apart voorschrift (zie 3.2.2)
- Controle PCRs (op PEL-gen) gaf goede correlatie met positief signaal (identiteit bepalen: *Pseudomonas* of Pcc)

3.3.4 Lokalisatie van zachtrot bacteriën in Zantedeschia stelen.

Op 6 juli zijn bloemstelen geoogst van cultivar 1 waaraan is bepaald of er bacteriën in de bloemstelen aanwezig waren. Er zijn vijf bloemstelen geoogst van de besmette knollen. De stelen zijn uitwendig ontsmet met 70% alcohol volgens standaard procedure om zo alleen eventueel inwendig aanwezige bacteriën aan te tonen. Vervolgens zijn de stengels in drie segmenten ingedeeld; de onderste 5 cm, de middelste 5 cm en de 5 cm direct onder de bloem. In tabel 5 is te zien dat in vier van de vijf stelen Pcc is aangetoond in de onderste 5 cm van de steel. In één steel is ook Pcc aangetoond in de middelste 5 cm. In het stengelstuk onder de bloem is geen Pcc aangetoond. Uit deze toets bleek dat de stelen al besmet waren bij de oogst en de bacteriën via de knol in de bloemsteel komen. De bacteriën bevinden zich vooral in het onderste gedeelte van de steel maar kunnen ook al hoger in de steel aanwezig zijn.

Tabel 9. Aanwezigheid (positief/zwak positief/negatief) van Pcc zoals bepaald via PCR in drie steelsegmenten van Zantedeschia cultivar 1

Onderste stuk	stengel	Middelstuk	stengel	Topstuk	stengel
1.1	pos	1.2	neg	1.3	neg
2.1	pos	2.2	zwak pos	2.3	neg
3.1	pos	3.2	neg	3.3	neg
4.1	zwak pos	4.2	neg	4.3	neg
5.1	neg	5.2	neg	5.3	neg

3.4 Conclusies

De spectrofotometrische test bleek kwalitatief mogelijkheden te bieden om aanwezige pectolytische activiteit van bacteriën aan te tonen. Echter, de gevoeligheid en de wisselende uitslagen (niet lineair met de concentratie aan bacteriën) maakte dit geen geschikte kandidaat voor de ontwikkeling van een praktische toepasbare toets. Bovendien bleek deze testmethode gevoelig voor plantensap: het sap gaf storingen in de metingen. Mogelijk zou een verdere aanpassing van de toets perspectief kunnen bieden, maar in overleg met FloraHolland is besloten deze aanpak niet verder uit te werken.

Voor praktische redenen om routinematig monsters van slijmstelen te testen is een kweekmethode simpeler en beter inpasbaar in de protocollen van een veiling. Daarom bood de cup plate test meer mogelijkheden en zal deze methode gebruikt worden om de steelkwaliteit wat betreft zachtrot (slijmstelen) te onderzoeken. Het voordeel is dat er optisch groei van bacteriën kan worden waargenomen en door de halovorming een indruk kan worden gegeven over de aard van de bacteriën: pectolytisch of niet. Gebleken is dat Pcc een sterkere pectolytische activiteit vertoont in vergelijking met pseudomonaden. Ook is gebleken, dat inderdaad het onderste steelsegment de beste indicator lijkt om slijmstelen aan te onderzoeken. Dit komt overeen met wat eerder (Van Leeuwen *et al.* 2009) is gevonden. Het ontwikkelde protocol is robuust en reproduceerbaar gebleken.

Een extra biotoets op slijmstelen bleek de verslijmtest: door stukjes van gezonde stelen te inoculeren met 10 µl inoculum (te testen bacteriesuspensie) is de identiteit van de bacteriën (pectolytisch of niet) ook door de mate van verslijming goed vast te stellen.

4 Relatie cup plate test met het optreden van slijmstelen

4.1 Inleiding

Bloemenveiling FloraHolland zou graag willen beschikken over een goedkope en betrouwbare toets waarmee vastgesteld wordt of een partij *Zantedeschia* bloemen slijmstelen gaat vertonen of niet. Op het moment dat een dergelijke toets mogelijk is moet nog wel worden bepaald wat de veiling hiermee doet. Kan de bloementeler bij het constateren van slijmstelen voor de rest van de nog te oogsten bloemen nog wel iets veranderen?

Aan het begin van het project is gewerkt aan de ontwikkeling van twee mogelijke toetsen. Na een demonstratie aan FloraHolland heeft de veiling gekozen voor de 'cup plate test'-test als gemakkelijke, goedkope en goed afleesbare toets. Daarna zijn in 2010 en 2011 gezamenlijk drie proeven uitgevoerd door FloraHolland en PPO om vast te stellen of de cup plate-test praktisch gezien goed werkt en of er een correlatie is tussen de uitslag van de toets en het verslijmen van de stelen tijdens de uitbloei.

4.2 Materiaal en methode

Voor het onderzoek heeft PPO de petrischalen voor de cup plate test gemaakt (zie paragraaf 3.2). FloraHolland (kenniscentrum productkwaliteit Naaldwijk) heeft steeds voor vers geoogste bloemen gezorgd die na de oogst direct naar de veiling zijn gebracht zonder dat deze op water zijn gezet dan wel voorbehandeld zijn.

4.2.1 Proef 1: oktober 2010

Voor deze proef zijn vijf cultivars op twee locaties en op twee manieren behandeld (tabel 10). Op beide locaties is van één bos 1 cm van de steel afgeknipt waarna deze bos direct op de vaas met leidingwater is gezet. Van de andere bos is 2 cm van de stelen afgeknipt die vervolgens zijn onderzocht op de aanwezigheid van bacteriën. Ook die bos is daarna direct op de vaas gezet. Voor elke behandeling is één bos bloemen met 10 stelen gebruikt. Uitbloei vond plaats onder standaard uitbloeiomstandigheden: 20° C, 60% RV, 12 uur licht via TL-verlichting.

De bloemen zijn 27 oktober geoogst en de proef is 28 oktober gestart.

Tabel 10. Behandelingsschema 1^e proef.

Behandeling	Locatie	Behandeling	Aantal stelen
1	FH Naaldwijk	Direct op de vaas (1 cm afknippen).	10
2	FH Naaldwijk	2 cm afknippen voor bacterietoets vervolgens op de vaas	10
3	PPO Lisse	Direct op de vaas (1 cm afknippen).	10
4	PPO Lisse	2 cm afknippen voor bacterietoets vervolgens op de vaas	10

De bloemen zijn dagelijks beoordeeld op de aanwezigheid van slijmstelen.

De stukjes steel van 2 cm zijn gehomogeniseerd in 10X (w/v) buffer. Van dit homogenaat werd een 100 maal verdunning gemaakt. Vervolgens werden van deze twee verdunningen (10x en 1000x) 100µl in duplo in elke well van de cup plate test gedaan. De cup plate toets is in Lisse na 1, 2 en 3 dagen beoordeeld, in Naaldwijk na 1 en 4 dagen. Daarbij is vastgesteld of er heldere/doorzichtige ringen (halo's) in de voedingsbodem ontstonden. De platen zijn niet in een broedstoof gezet maar hebben in de labs bij kamertemperatuur (circa 20°C) gestaan. In Naaldwijk zijn na 1 en 4 dagen foto's gemaakt van de platen. Er is gebruik gemaakt van de cultivars 1, 4, 5, 6 en 7.

Zowel in Naaldwijk als in Lisse is ook het totale kiemgetal aan bacteriën in de monsters bepaald.

In Lisse zijn ook enkele rechthoekige schalen met één laag groeimedium in plaats van het dubbellaags cup plate medium (zie paragraaf 3.2) gegoten om vast te stellen of dit ook bruikbaar kan zijn.

4.2.2 Proef 2: november 2010

Deze proef is vrijwel identiek uitgevoerd zoals de eerste proef (tabel 11). Er zijn weer vijf cultivars gebruikt: cultivar 1, 4, 5, 6, 8. Van één bos bloemen is weer 2 cm van de steel afgeknipt om te onderzoeken op aanwezigheid van bacteriën. Van de andere bos is niets afgesneden voordat deze in de vaas is gezet. Dit omdat met het afsnijden mogelijk ook de schadelijke bacteriën worden verwijderd.

Tabel 11. Behandelingsschema 2^e proef.

Behandeling	Locatie	Behandeling	Aantal stelen
1	FH Naaldwijk	Direct op de vaas (niets afknippen)	10
2	FH Naaldwijk	2 cm afknippen voor bacterietoets vervolgens op de vaas	10
3	PPO Lisse	Direct op de vaas (niets afknippen)	10
4	PPO Lisse	2 cm afknippen voor bacterietoets vervolgens op de vaas	10

Door FloraHolland zijn 2, 3 en 6 dagen na inzetten van de proef foto's gemaakt van de cup plate test ter beoordeling. In Lisse zijn de cup plate testen beoordeeld na 1, 2, 4 en 5 dagen.

De bloemen zijn gedurende 14 dagen dagelijks beoordeeld op het verslijmen.

Daarnaast is door FloraHolland een algemene bacterietelling uitgevoerd aan dezelfde stengelstukjes.

4.2.3 Proef 3: mei 2011

De derde en laatste proef was iets anders van opzet dan de voorgaande proeven. De proef is met drie cultivars (cultivar 1, 9 en 10) uitgevoerd op twee locaties (Naaldwijk en Lisse). Op elke locatie is van twee bossen per cultivar een monster van 1 cm van de stelen geknipt om met behulp van de cup plate toets vast te stellen of er pectolytische bacteriën aanwezig zijn. Naast deze twee bossen zijn er op elke locatie nog 8 bossen alleen op de vaas gezet om te onderzoeken op verslijming. Totaal zijn er per locatie per cultivar 10 bossen (100 stelen) getoetst op verslijming; de toets is uitgevoerd op twee van de 10 bossen.. Van de bossen die alleen op houdbaarheid zijn onderzocht is op hetzelfde moment ook 1 cm van de stelen afgeknipt. De cup plate testen zijn in een broedstof bij 27°C gezet. Gedurende dag 1 t/m 4 is vastgesteld of er heldere ringen op de cup plate testen zichtbaar werden.

In Lisse zijn de monsters ook gekweekt op een algemeen bacteriemedium en is ook via een PCR-toets onderzocht of Pcc dan wel *Pseudomonas* aanwezig was.

4.3 Resultaten

4.3.1 Resultaten proef 1

4.3.1.1 Verslijming

Er zijn in deze proef volop slijmstelen waargenomen, op beide locaties (tabel 12). Meer dan 50% van de bossen slijmde binnen 14 dagen volledig. Er was niet één bos zonder een slijmsteel. Wel was er regelmatig een grote spreiding in het aantal slijmstelen tussen de vier bossen van één cultivar.

Tabel 12. Aantal slijmstelen per bos (maximaal 10).

Behandeling	Locatie	Monster	Cultivar 1	Cultivar 4	Cultivar 5	Cultivar 6	Cultivar 7
1	Naaldwijk	Bos 1	10	3	10	10	8
2	Naaldwijk	Bos 2	10	1	6	2	10
3	Lisse	Bos 1	6	10	10	7	1
4	Lisse	Bos 2	10	1	10	10	10



Fig.6. Stelen van experiment 1 in de uitbloeiruin van Lisse na één dag.

4.3.1.2 Testen

Na één dag was er nog geen opheldering in de cup plate test te zien (Tabel 13). Na twee dagen werden heldere ringen in de platen zichtbaar die na drie dagen nog iets duidelijker/groter waren (tabel 14). De uitslag werd na vier dagen niet duidelijker. In tabel 13 is duidelijk te zien dat er op dag 1 nog geen opheldering zichtbaar was. De controlebehandelingen (leidingwater en buffer) lieten ook geen opheldering zien. Dag 3 gaf de meest duidelijke uitslag omdat op dag 4 de groei van (andere) bacteriën het aflezen van de plaat bemoeilijkte. Opvallend is dat bij de 10x verdunning meer heldere ringen zichtbaar zijn dan bij de 1000x verdunning. Bij de 1000x verdunning waren ringen zichtbaar bij cultivar 1 en 5. Dit zijn de twee cultivars met de meeste slijmstelen. In Naaldwijk was een duidelijke opheldering te zien bij cultivar 1 (Fig.7) maar ook wel bij cultivar 7. De andere cultivars lieten een lichte of geen opheldering zien.

Tabel 13. Halo's (in mm) op dag 1, 2 en 3 in Lisse.

Dag 1	Verdunning 10x		Verdunning 1000x	
Cultivar	Herhaling 1	Herhaling 2	Herhaling 1	Herhaling 2
cultivar 1	0	0	0	0
cultivar 4	0	0	0	0
cultivar 5	0	0	0	0
cultivar 6	0	0	0	0
cultivar 7	0	0	0	0
Leidingwater	0		0	
Buffer	0		0	
Dag 2	Verdunning 10x		Verdunning 1000x	
Cultivar	Herhaling 1	Herhaling 2	Herhaling 1	Herhaling 2
cultivar 1	2	3	0	1
cultivar 4	2	2	0	0
cultivar 5	3	3	1	1
cultivar 6	2	2	0	0
cultivar 7	0	0	0	0
Leidingwater	0		0	
Buffer	0		0	
Dag 3	Verdunning 10x		Verdunning 1000x	
Cultivar	Herhaling 1	Herhaling 2	Herhaling 1	Herhaling 2
cultivar 1	3	3	0	3
cultivar 4	4	4	0	0
cultivar 5	5	4	2	2
cultivar 6	3	3	0	0
cultivar 7	1	0	0	0
Leidingwater	0		0	
Buffer	0		0	

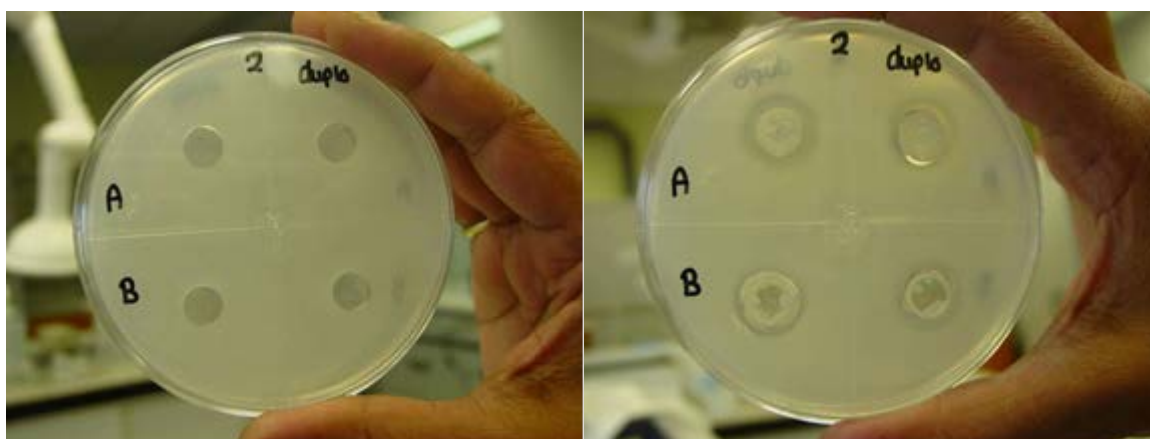


Fig.7. Cup plate toets, uitgevoerd in Naaldwijk aan cultivar 1. Links na 1 dag, rechts na 4 dagen.

De algemene bacterietelling in Naaldwijk liet een groot aantal bacteriën zien. Vooral bij cultivar 1 en 7 ($7 \text{ tot } 9 \times 10^6/\text{ml}$) bleek gemiddeld een factor 500 meer bacteriën aanwezig te zijn. Bij de andere soorten waren gemiddeld 4 tot 5×10^5 bacteriën/ml.

In Lisse zijn ook monsters op het medium bestaande uit één laag gezet. Daarbij was een duidelijk heldere ring te zien bij cultivar 1 en 5, en in mindere mate bij cultivar 4 (Fig.8).

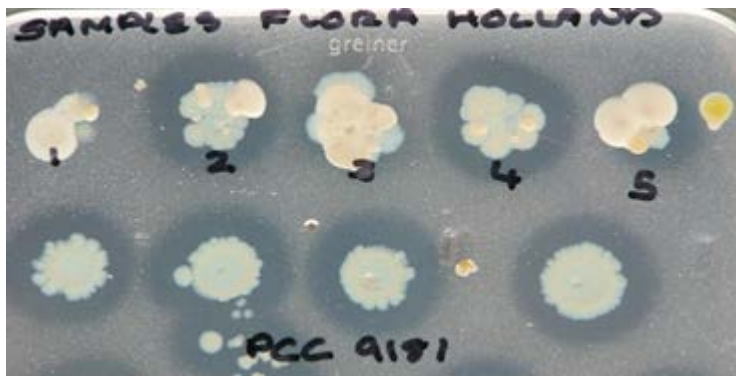


Fig. 8. Enkel laags medium in Lisse. Bij monster 2 (cultivar 1) en 4 (cultivar 5) is duidelijke opheldering, bij monster 5 (cultivar 7) een gedeeltelijke opheldering zichtbaar. Onderaan viermaal een positieve controle (Pcc) met een duidelijke opheldering rondom de opbrengplek.

4.3.2 Resultaten proef 2

4.3.2.1 Verslijming

In tabel 14 is de verslijming in de uitbloeioproeven weergegeven. Er waren grote verschillen in verslijming tussen de locaties. Bij cultivar 1 zijn bijna alle stelen verslijmd met uitzondering van de stelen in Naaldwijk waar 2 cm vanaf is gesneden. In Lisse zijn alle stelen van cultivar 1 verslijmd en één steel van cultivar 8. In Naaldwijk zijn van diverse cultivars een aantal stelen verslijmd waarbij het er op lijkt dat het afsnijden van 2 cm steel vaak tot minder verslijming leidt. Als er problemen met cultivar 1 ontstonden was dat al vrij vroeg in de uitbloeifase.

Tabel 14. Aantal slijmstelen per bos (maximaal 10) na 14 dagen. FH = FloraHolland.

Behandeling	Cultivar 8	Cultivar 4	Cultivar 5	Cultivar 6	Cultivar 1
1 FH niet afsnijden	0	0	1	5	10
2 FH wel afsnijden	0	3	0	1	1
3 PPO niet afsnijden	1	0	0	0	10
4 PPO wel afsnijden	0	0	0	0	10

4.3.2.2 Toets bij FloraHolland

Het beoordelen van de cup plate testen ging niet gemakkelijk. Soms was er alleen een heldere halo op een bepaalde plaats. Daarnaast zijn de platen koel bewaard waardoor condens is ontstaan wat voor verspreiding van de bacteriën heeft gezorgd. Dit bemoeilijkt de beoordeling sterk. In tabel 15 is te zien dat na 2 dagen nog geen duidelijk beeld is te zien. Na 3 dagen was bij één van de vier gaten een opheldering zichtbaar. De beperkte opheldering die bij deze drie cultivars zichtbaar is komt overeen met de cultivars die in Naaldwijk de meeste verslijming gaven. Na 6 dagen waren vooral de ophelderingen bij cultivar 6 duidelijk maar leek er ook opheldering zichtbaar bij cultivar 8, 5 en 1.

Tabel 15. Beoordeling cup plate testen van FloraHolland op basis van foto's (opheldering plaat).

Cultivar	Dag 2	Dag 3	Dag 6	Opmerkingen
Cultivar 8	geen	geen	1 x onduidelijk	Bacteriën lopen uit, moeilijk beoordelen
Cultivar 4	zwak	1 x	Niet te zien	Bacteriën lopen uit, moeilijk beoordelen
Cultivar 5	geen	geen	1 x onduidelijk	Bacteriën lopen uit, moeilijk beoordelen
Cultivar 6	geen	1 x	2 x	
Cultivar 1	geen	1 x	2 x niet duidelijk	

In tabel 16 is te zien dat het algemene kiemgetal van cultivar 1 en cultivar 4 erg hoog was. Het algemene bacteriegetal hoeft dus niets te zeggen over het aantal slijmsteel veroorzakende bacteriën.

Tabel 16. Algemene bacteriegroei (aantallen bacteriën/ml) na twee dagen.

Cultivar	kiemgetal
Cultivar 1	630000
Cultivar 4	800000
Cultivar 5	1200
Cultivar 6	1100
Cultivar 8	4700

4.3.2.3 Toets bij Lisse

In tabel 17 is de opheldering op de cup plate in Lisse weergegeven 2, 4 en 5 dagen na inzetten. Na 1 dag was er nog geen opheldering te zien. Na 4 en 5 dagen was er een duidelijke opheldering te zien bij de meeste cultivars. Opmerkelijk is dat soms een sterkere verdunning een duidelijkere uitslag gaf. Het stengelslijm of het totaal aantal bacteriën beïnvloedt mogelijk de groei van de bacteriën.

De positieve controle waar Pcc aan was toegevoegd reageerde goed en sterk. De negatieve controle waar schoon water of buffer aan was toegevoegd reageerde niet.

De ophelderingen per steel komen niet goed overeen met het verslijmen van de stelen op de vaas.

Tabel 17. Opheldering van de cup plate test na 2, 4 en 5 dagen in mm.

	Dag 2		Dag 4		Dag 5	
Verdunning	10x	1000x	10x	1000x	10x	1000x
Cultivar						
Cultivar 8	0	0	2	3	2	3
Cultivar 4	1	1	4	3	>5	4
Cultivar 5	0	1	2	3	2	4
Cultivar 6	0	0	2	0	3	0
Cultivar 1	0	1	0	2	0	3
Pcc controle	2	2	4	4	>5	>5
Water controle	0	0	0	0	0	0
Buffer controle	0	0	0	0	0	0

Naast de cup plate test is er ook een PCR (DNA) toets op Pcc en *Pseudomonas* uitgevoerd op dezelfde stengelstukjes. Uit deze toets bleek dat in alle stengelstukjes Pcc is aangetroffen en alleen bij cultivar 5 is ook *Pseudomonas* aangetroffen.

4.3.3 Resultaten proef 3

4.3.3.1 Verslijming

In het onderzoek zijn diverse stelen verslijmd zodat de proef ten aanzien van dat aspect geslaagd kan worden genoemd. Na statistische verwerking van de data bleek dat er slechts een tendens was te bespeuren dat cultivar 1 en cultivar 9 meer slijmstelen hadden dan cultivar 10 (tabel 18). De oorzaak hiervan is de enorme spreiding tussen de vazen/bossen. Twee bossen van cultivar 1 zijn volledig verslijmd maar 11 bossen hadden geen enkele verslijmde steel. Bij cultivar 9 zijn nooit meer dan 4 stelen per bos verslijmd maar hadden slechts 6 bossen geen enkele verslijmde steel.

Tabel 18. Aantal slijmstelen per bos (maximaal 10).

Locatie	Cultivar	Bos 1	Bos 2	Bos 3	Bos 4	Bos 5	Bos 6	Bos 7	Bos 8	Bos 9	Bos 10	totaal
Naaldwijk	Cultivar 1	0	0	1	1	10	2	2	0	0	0	16
Naaldwijk	Cultivar 9	1	0	1	1	3	1	2	1	0	1	10
Naaldwijk	Cultivar 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lisse	Cultivar 1	0	10	1	0	1	1	0	0	0	0	13
Lisse	Cultivar 9	3	4	1	3	0	0	2	0	2	0	15
Lisse	Cultivar 10	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	3

Daarnaast werkt de verslijming ook door in de houdbaarheid. De houdbaarheid van de bossen is bepaald door een bloem alleen af te schrijven op verslijming en niet op knikken. Hiermee is te zien in tabel 18 dat een relatief klein aantal bloemen zijn gaan verslijmen. Over de gehele proef hadden de bloemen een houdbaarheid van 13,4 dagen (tabel 19). Cultivar 9 had een kortere houdbaarheid dan cultivar 10. De houdbaarheid van cultivar 1 leek niet verschillend van de twee andere cultivars. Ruim 60% van de verslijmde stelen ontstond 4 tot 7 dagen na aanvang. De andere 40% kwam er in de tweede week bij, tot en met de laatste dag aan toe. Om te zien of er een correlatie was tussen gemiddelde steeldiameter en mate van verslijmen zijn deze van de drie cultivars bepaald. Deze waren van cultivar 1 6-8 mm, van cultivar 9 5-7 mm en van cultivar 10 6-9 mm. Hoewel cultivar 9 en cultivar 1 gemiddeld iets dunnere stelen hadden, was dit niet significant en lijkt de diameter niet van invloed op de mate van het optreden van slijmstelen.

Tabel 19. Houdbaarheid in dagen gemiddeld per cultivar en locatie.

Locatie	Cultivar	Houdbaarheid
Naaldwijk	Cultivar 1	13.3
Naaldwijk	Cultivar 9	13.1
Naaldwijk	Cultivar 10	14.0
Lisse	Cultivar 1	13.5
Lisse	Cultivar 9	12.8
Lisse	Cultivar 10	13.7
LSD		0,72

4.3.3.2 Uitvoering van de cup plate test

De algehele indruk van de cup plate test was goed: deze was goed af te lezen/te beoordelen.

Indien zichtbaar is de grootte van de opheldering (halo) bepaald, uitgedrukt in mm diameter. Indien een halo zichtbaar was, was deze veelal 12 tot 22 mm groot.

Na één dag, circa 24 uur na inzetten van de proef, waren in Lisse nog geen heldere halo's zichtbaar in de proef, maar wel in de positieve controle die besmet was met Pcc. In Naaldwijk liet na één dag ook de positieve controle een duidelijke halo zien en daarnaast leek bij één van de platen een halo zichtbaar te worden. Twee en drie dagen na inzetten van de proef waren duidelijk helder halo's zichtbaar. Vier dagen na inzetten leek de situatie dermate weinig veranderd dat er geen aanvullende waarnemingen zijn gedaan.

Grootte halo bij verdunning 10x

Gemiddeld over de gehele proef waren de halo's bij de 10 x verdunning 4,7 mm groot na 2 dagen en 6,9 mm na 3 dagen. Deze nam in de periode van dag 2 naar dag 3 nog duidelijk toe. Er was een betrouwbaar verschil in de gemiddelde grootte als gevolg van de cultivar en de datum (tabel 20). Bij cultivar 1 waren duidelijk halo's te zien, bij cultivar 9 soms en bij cultivar 10 geen. Op dag 3 waren de halo's groter dan op dag 2. Er was geen verschil tussen de locaties.

Tabel 20. Diameter halo (mm) gemiddeld per cultivar.

Cultivar	Dag 2	Dag 3
Cultivar 1	3.6	7.5
Cultivar 9	0.6	3.2
Cultivar 10	0.0	0.0
LSD = 2.05		

Er is wel een verschil gevonden tussen de onderzochte bossen (tabel 21). Bij Cultivar 1 in Lisse en Cultivar 9 in Naaldwijk was er een verschil in grootte van de halo tussen bos 1 en 2.

Tabel 21. Diameter halo (mm) gemiddeld over de behandelingen bij verdunning 10x.

Locatie	Cultivar	Bos 1	Bos 2
Naaldwijk	Cultivar 1	6.8	2.7
Naaldwijk	Cultivar 9	2.6	1.5
Naaldwijk	Cultivar 10	0.0	0.0
Lisse	Cultivar 1	6.1	6.7
Lisse	Cultivar 9	3.5	0.0
Lisse	Cultivar 10	0.0	0.0
LSD = 2.90			

Grootte halo bij verdunning 1000x

Gemiddeld over de gehele proef waren de halo's bij verdunning 1000x 7,0 mm groot na 2 dagen en 9,4 mm na 3 dagen. De halo's waren bij de 1000x maal verdunning groter dan bij de 10x verdunning. Net als bij de 10x verdunning nam de grootte van de halo toe van dag 2 naar dag 3.

Er is ook bij 1000x verdunning een verschil gevonden tussen de cultivars en bossen (tabel 18).

Tabel 18. Diameter halo (mm) gemiddeld over de behandelingen bij verdunning 1000x.

Locatie	Cultivar	Bos 1	Bos 2
Naaldwijk	Cultivar 1	5.5	4.4
Naaldwijk	Cultivar 9	4.0	9.0
Naaldwijk	Cultivar 10	0.0	0.0
Lisse	Cultivar 1	5.9	5.9
Lisse	Cultivar 9	4.5	9.3
Lisse	Cultivar 10	0.0	0.0
LSD = 3.08			

In tabel 18 is te zien dat steelsuspensies van cultivar 1 en 9 altijd een grote halo gaven. Dat de gemiddelde halo van cultivar 9 kleiner is (bos 1), is veroorzaakt doordat sommige platen geen halo lieten zien. Bij cultivar 10 zijn nooit halo's waargenomen.

Alleen bij cultivar 9 was er op beide locaties een betrouwbaar verschil in grootte van de halo tussen bos 1 en bos 2.

Spreiding in het ontstaan van halo's op twee locaties

Op elke petrischaal zijn twee putjes gevuld om een halo te bepalen (test in duplo). Voor dit onderzoek is dit vijfmaal per bos uitgevoerd.

Bij de beoordeling na 3 dagen bij de 1000x verdunning kwam het slechts incidenteel voor dat in de duplo-toets één van de twee putjes een halo liet zien. In Lisse was dit in 2 van de 30 toetsen het geval, in Naaldwijk in 3 van de 30. Na drie dagen lieten alle putjes (100%) van cultivar 1 een halo zien en bij cultivar 10 liet geen (0%) van de putjes een halo zien. Bij cultivar 9 varieerde het zichtbaar zijn van de halo's (72,5%). Op beide locaties liet één van de twee bossen bijna altijd halo's zien en liet de andere bos soms halo's zien.

PCR toets op stelen

Er is in Lisse ook een PCR-toets uitgevoerd op de stelen van de monsters, gebruikt voor de cup plate test. Daaruit bleek dat *Pcc* aanwezig was bij cultivar 9 en cultivar 10, en *Pseudomonas* bij cultivar 1 en cultivar 10.

Algemene (totale) bacterietelling

In Lisse is ook gekeken naar de algemene bacteriegroei van de stengelmonsters. Hierbij worden op een generiek groeimedium (Nutrient Broth) alle in de stengel aanwezige bacteriën gekweekt (zowel bacteriën die slijmstelen veroorzaken als andere soorten bacteriën).

In Fig.9 zijn de bovenste platen de platen met de 10x verdunning en de onderste platen met de 1000x verdunning. In Fig.9 is te zien dat bij Cultivar 1 (linker 4 platen) bijna geen bacteriën zijn aangetroffen, bij Cultivar 9 heel veel en bij Cultivar 10 ook vrij veel.

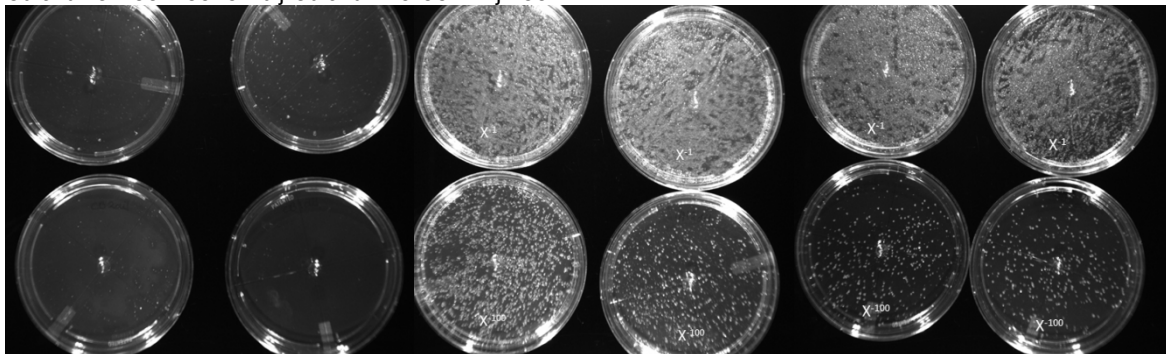


Fig. 9. Weergave van de algemene bacteriegroei op standaard groeiplaten (NB). Van links naar rechts: Cultivar 1, Cultivar 9, en Cultivar 10.

Deze algemene bacterietelling geeft aan dat dit zeker geen voorspelling geeft voor de mate waarin slijmstelen zullen ontstaan. Bij cultivar 10 zijn vrij veel bacteriën gevonden maar die leidde niet tot slijmstelen. Bij cultivar 1 zijn bijna geen bacteriën gevonden maar die paar bacteriën hebben wel tot slijmstelen geleidt. Bij cultivar 9 zijn veel bacteriën aangetroffen die voor een gedeelte voor verslijming zorgden.

4.3.3.3 Correlatie cup plate test en verslijmen van stelen

De correlatie tussen de uitslag van de cup plate test en het verslijmen van de stengels is niet sterk.

In de vier bossen Cultivar 10 die zijn getoetst zijn geen halo's waargenomen en werden geen bacteriën gevonden die slijmstelen kunnen veroorzaken. Uiteindelijk zijn slechts 3 van de 200 stelen verslijmd.

Bij cultivar 1 liet de cup plate test in alle gevallen de aanwezigheid van slijmsteelvormende bacteriën zien. Echter, bij 11 bossen zijn geen slijmstelen aangetroffen.

Bij cultivar 9 was een wisselend beeld te zien: bij twee bossen duidelijke halo's en bij twee andere bossen wisselend. In de uitbloei was het beeld ook wisselend met in de meeste bossen één of meer slijmstelen.

4.4 Samenvatting relatie tussen cup plate test versus verslijmen

4.4.1 Proef 1

De cup plate test was meestal pas na twee of drie dagen na inzetten te beoordelen. Na vier dagen ontstond er teveel bacteriegroei in de wells wat het beoordelen bemoeilijkte. Beoordelen na drie dagen lijkt daarom het beste.

Bij de uitbloei van de bloemen ontstonden veel slijmstelen. Er was een grote variatie in verslijming tussen de bossen. Er was correlatie tussen de cup plate test en het verslijmen, maar niet sluitend. In Naaldwijk lieten twee cultivars (cultivar 1 en cultivar 7) een sterke opheldering in de test zien en waren het vooral de stelen uit deze twee bossen die sterk gingen verslijmen. In Lisse was er opheldering zichtbaar bij cultivar 1 en cultivar 5. Ook deze twee bossen hadden veel slijmstelen maar daarnaast gaven twee andere bossen eveneens veel slijmstelen terwijl er geen duidelijke opheldering in de test zichtbaar was.

4.4.2 Proef 2

De cup plate testen (platen) zijn voorafgaande aan de proef warm of koud bewaard. De in de koelkast opgeslagen platen vormden condens wat tijdens de test voor verspreiding van bacteriën zorgden over de plaat heen en daardoor het aflezen bemoeilijkten. De cup plate testen moeten voor een goede bruikbaarheid warm (kamertemperatuur) worden bewaard. Het sap van het monster “1000x verdunnen” gaf veelal de meest duidelijke opheldering van de plaat in vergelijking met de andere (lagere) verdunningen. Er was ook in deze proef een grote variatie in verslijming tussen de bossen.

Bij de toets in Naaldwijk was na drie dagen opheldering zichtbaar bij die drie cultivars die (met spreiding) slijmstelen lieten zien. In Lisse toonden verschillende cultivars opheldering op de cup plate testen terwijl vrijwel uitsluitend bij één cultivar slijmstelen ontstonden. De correlatie tussen de toets en het verslijmen was dus niet overtuigend.

Met de gevoelige PCR-toets is in Lisse bij alle cultivars Pcc aangetroffen, maar die leidde bij vier van de vijf cultivars niet tot slijmstelen.

4.4.3 Proef 3

Er was volop verslijming in proef 3, maar de spreiding tussen de bossen was erg groot. Het percentage slijmstelen varieerde bij cultivar 1 van 100% in twee bossen tot 0% in 11 bossen.

Door de cup plate testen bij 27 °C te incuberen waren deze na twee en drie dagen goed af te lezen; na drie dagen was de uitslag het meest duidelijk. In deze proef gaf een 1000x verdunning van het plantensap van de steelstukjes de duidelijkste en grootste uitslag (opheldering). De uitslagen waren op beide locaties hetzelfde: cultivar 1 en 9 gaven een duidelijke opheldering maar cultivar 10 liet geen pectolytische activiteit in de vorm van een halo zien. Deze uitslag komt redelijk goed overeen met het totaalbeeld van de slijmstelen waarbij in cultivar 1 de meeste slijmstelen voorkwamen, in cultivar 9 wat minder in cultivar 10 bijna geen slijmstelen voorkwamen.

Er was absoluut geen verband tussen het algemene bacteriekiemgetal en verslijming. Het soort bacterie bepaalt of er slijmstelen ontstaan of niet. De mogelijkheid bestaat zelfs dat het kiemgetal laag is terwijl de aanwezige bacteriën pectolytisch zijn en veel veel verslijming zullen veroorzaken. Mogelijk kunnen andere bacteriesoorten de werking van pectolytische bacteriën zelfs remmen.

Er lijkt geen verband te bestaan tussen de stengeldikte en het gaan verslijmen.

5 Algemene conclusies en discussie

Toetsontwikkeling

Pectine is de belangrijkste component die de stevigheid aan de structuur van stelen geeft. Door depolymerisatie van deze suikerpolymeër door pectinases wordt de stevigheid aangetast en verslijmt de steel.

In het hieraan voorafgaande onderzoek dat is afgerond in 2009 (van Leeuwen *et al.* 2009) is gebleken, dat vooral pseudomonaden en *Pectobacterium carotovorum ssp carotovorum* (Pcc) slijmstelen veroorzaken. Binnen het hier beschreven onderzoek is een enkele andere bacteriesoort aan het licht gekomen in preparaten van slijmstelen op groeiplaten. Mede in het kader van Deltaplan Erwinia deel C (PPO 3234071100) zijn een aantal isolaten uit bolgewassen onderzocht op pectolytische activiteit. De isolaten uit *Zantedeschia* waren veelal Pcc; als *Pseudomonas*-soort werd vooral *P. marginalis* gevonden naast *P. viridiflava*. Een enkele keer werd *Flavobacterium* spp. gevonden, welke ook pectolytische activiteit vertoont. Deze staat niet bekend als een plantpathogene bacterie, maar als een algemeen in de grond voorkomende bacteriesoort. Hoewel schimmels zoals *Fusarium* en gisten ook celwand afbrekende enzymen produceren, zijn deze niet aangetoond. Hiervan is echter niet bekend dat deze schade geven in *Zantedeschia*-stelen. Er is niet gewerkt met voedingsbodems die specifiek selecteren op schimmels om dit vast te stellen. In dit onderzoek is duidelijk geworden, dat een totaal kiemgetal (= aantal kolonievormende bacteriën/ml) aan monsters van slijmstelen totaal geen verband heeft met de kans op slijmstelen. In gevallen dat er slijmstelen optraden is meerdere malen slechts een relatief gering aantal kolonievormende bacteriën op algemene groeiplaten aangetroffen. In gevallen dat er geen slijmstelen optraden in een experiment, werden juist veel bacteriën op de algemene groeiplaten aangetroffen (zie Fig. 9, §4.3.3.2). Dit zijn (niet-pectolytische) bacteriën die voorkomen op stelen en in vaaswater die geen directe relatie hebben met het optreden van slijmstelen.

Een van de projectdoelen was de ontwikkeling van een praktische toets voor de veiling. Er zijn twee mogelijkheden onderzocht: een spectrofotometrische toets en een uitplaattoets.

Spectrofotometrische toetsen berusten allemaal op een kleurreactie als gevolg van de afbraak van een pectine homoloog (Miller *et al.* 1959). In overleg met de veiling is niet verder gewerkt aan de spectrofotometrische toets. Deze vergt namelijk aanschaf van extra apparatuur zoals een spectrofotometer en randapparatuur zoals centrifuges e.d. en kan lage concentraties pectinases niet aantonen. Het voordeel van uitplaattoetsen is dat ook geringe aantallen bacteriën binnen 2-3 dagen voldoende uitgroeien om pectolytische afbraak te tonen. Daarnaast paste een dergelijke techniek in de bestaande logistiek van de veiling. Er is een protocol opgesteld voor het gebruik van deze uitplaattoets, welke een betrouwbaar en reproduceerbaar resultaat gaf.

De cup plate test als methode om pectolytische bacteriën aan te tonen is gebaseerd op de afbraak van pectine in de groeiplaat door pectolytische enzymen. Dit wordt zichtbaar door een opheldering of halo welke verder aangekleurd kan worden met jodium/kaliumjodide. Om zo zo min mogelijk extra chemicaliën te gebruiken is dit laatste niet in het ontwikkelde protocol opgenomen, te meer omdat halo's in de meeste gevallen goed zichtbaar waren. De platen moeten na productie warm worden bewaard om condens te voorkomen. Incuberen bij 27 °C geeft na twee en vooral na drie dagen een duidelijke opheldering bij aanwezigheid van pectolytische bacteriën. Ook het gieten van de voedingsbodem in één laag gaf een goede opheldering; voor standaard gebruik zou deze nog verder getest moeten worden. Standaard uitvoering van de cup plate test is essentieel. Het bleek, dat uitvoering van de test op verschillende locaties variatie in de resultaten gaf, o.a. door een andere bewaartemperatuur van de nog ongebruikte platen. Ook kan de uitgroei van de bacteriën de halo-vorming maskeren, wat het aflezen sterk kan bemoeilijken.

De gebruikte cup plate methode is niet specifiek voor Pcc of *Pseudomonas*. In principe zullen alle bacteriën die pectine kunnen afbreken, zichtbaar zijn op deze groeiplaten. Door gebruik van antibiotica is dit wel te bereiken, bv. door toevoeging van het antibioticum erythromycine (waarvoor Pcc ongevoelig is) kan men veel andere bacteriesoorten remmen. Nadeel zijn dan wel de extra kosten, ook wat betreft het verwerken van afval met restanten antibiotica. Om onderscheid te maken op de cup plate test is ook wel gebruik te maken van de relatieve groeisnelheid: Pcc groeit doorgaans sneller op de cup plate dan *Pseudomonas*.

Correlatie cup plate test en het optreden van slijmstelen

Naast enkele pilot testen zijn driemaal experimenten met bossen *Zantedeschia* (een bos is 10 stelen) uitgevoerd op twee locaties: Naaldwijk en Lisse. Een tiental verschillende cultivars zijn gebruikt. Enerzijds zijn de bossen gebruikt voor standaard uitbloei-analyse (optreden van slijmstelen, dagelijks bekeken), anderzijds werd uit dezelfde batch een of twee bossen gebruikt voor analyse van de onderste 1 of 2 cm van de steel in de cup plate test. De bossen zijn vers getrokken en direct gebruikt voor de experimenten om bewaartijd en -invloed zo veel mogelijk uit te sluiten. Invloed van de dikte van de steel is niet vastgesteld.

De correlatie tussen de uitslag van de cup plate toets en het verslijmen van de stelen is onderzocht. Volgens het opgestelde protocol wordt 1 cm van een te onderzoeken steel fijngemaakt en een verdunning hiervan (met mogelijk aanwezige pectolytische bacteriën zoals *Pcc* en *Pseudomonas*) in een well in de cup plate toets aangebracht. Meestal is de uitslag het beste na 2-3 dagen afleesbaar. Indien er geen reactie op de cup plate zichtbaar is ontstond er vrijwel nooit verslijming. Dit betekent dat verslijming door pectolytische activiteit veroorzaakt wordt. Indien er een opheldering rondom een opbrengpunt op de cup plate toets zichtbaar was, ontstonden er vaak slijmstelen, alleen niet altijd en de mate waarin varieerde sterk. Door het toetsen van vier tot tien bossen per partij ontstond wel een duidelijk beeld dat de verslijming vaak zeer onregelmatig voorkomt in een partij. De voorspellende waarde van de toets over de mate waarin stelen gaan verslijmen lijkt daarom niet groot, hoewel voor een aantal experimenten er wel een goede correlatie gevonden is. De betrouwbaarheid is echter binnen de omvang (steekproefgrootte, aantal bossen) van de experimenten niet voldoende vastgesteld.

Het feit dat de correlatie niet goed is wijst op een mogelijk te gevoelige test. Deze kan verbeterd worden door een drempelwaarde vast te stellen, bv. door een minimale halo diameter te bepalen. De veiling is geïnteresseerd om de toets verder te ontwikkelen.

Overdracht van slijmsteel veroorzakende bacteriën bij parteren

Uit de parteerproef blijkt dat *Pcc* eenvoudig via het parteren verspreid kan worden. De besmette partjes vallen direct na parteren of tijdens de teelt weg. In de visueel gezonde knollen die worden geoogst van besmette partjes is *Pcc* maar in beperkte mate aantoonbaar. Deze knollen geven in de vervolgteelt echter wel de nodige uitval en slijmstelen. Daarmee is aangetoond dat besmette knollen slijmstelen tot gevolg kunnen hebben. De bacteriën zullen zich bij het oogsten van de bloemen meestal in de onderste centimeters van de steel bevinden maar soms ook hoger.

Vanwege de grote variatie in verslijmen binnen een partij bloemen lijkt het erop dat het vermogen om te gaan verslijmen al bij de oogst van de bloem aanwezig is. De besmetting van de partij knollen lijkt daarbij een sterke rol te spelen. Het verkrijgen van schoon uitgangsmateriaal via weefselkweek en het voorkomen van besmetting tijdens de teelt, zoals het voorkomen van besmetting tijdens het parteren lijkt daarom zeer belangrijk bij het terugdringen van slijmstelen.

Uit de experimenten is duidelijk geworden dat een besmet mes *Pcc* kan overbrengen. In de praktijk neemt de teler bij het parteren nog onvoldoende maatregelen om messen zeer regelmatig te ontsmetten, of de messen van parteer machines ("broodmachine") te ontsmetten. Een onderzoeksvraag is om systemen te bedenken die messen op een snelle manier kunnen ontsmetten zonder het parteerproces te vertragen. Een ander aspect waar men in de praktijk extra zorg aan moet besteden is het goed uitzoeken van knollen vóór het parteren om ook op deze wijze verspreiding van de bacterie tijdens het parteren te voorkomen. Tijdens het oogsten van de bloemen blijkt het risico op besmetting met *Pcc* sterk toe te nemen. De eerste stelen die getrokken worden van de knollen zijn veelal ziektevrij, terwijl de bloemstelen die in de daaropvolgende periode van 4-6 weken worden geoogst een stijgend percentage slijmstelen vertonen. Dit is niet alleen in het onderzoek waargenomen maar wordt ook vanuit de praktijk gemeld. Het is niet bekend of *Pcc* juist door deze verwondingen kan toeslaan, of dat de knol al latent besmet was. Dit sluit aan bij de vraag of er cultivars bestaan die minder gevoelig zijn voor *Pcc*. Hier zijn aanwijzingen voor gevonden in het Deltaplan *Erwinia* waarbij tolerantie is gevonden bij een aantal cultivars. Het is echter niet duidelijk of deze dan ook minder last van slijmstelen hebben.

Een andere manier om het probleem van slijmstelen mogelijk te verminderen is het gebruik van zgn. elicitoren: chemische verbindingen die de afweer van de plant aanzetten. Op deze wijze zou in dit geval *Zantedeschia* in staat moeten zijn om een besmetting door Pcc tegen te gaan. Dit aspect zal in het Deltaplan *Erwinia* worden onderzocht.

In een aantal gevallen zijn ook aantastingen waargenomen in gezonde knollen, die later door Pcc bleken te zijn veroorzaakt. Het probleem hierbij wordt aangegeven door andere onderzoeksresultaten in dit project. In de productieketen van *Zantedeschia* is Pcc aan het einde van de bewaring slecht aantoonbaar. De bacterie is dan in veel lagere aantallen aanwezig, of bevindt zich mogelijk op een andere plek in de knol. Ook is het mogelijk dat de besmetting eerder in het productieproces (tijdens de teelt, rooien of verwerking) optreedt. Meestal worden de ogen en het weefsel rondom de ogen van de knol bemonsterd. Dit komt overeen met wat men doet bij het toetsen van pootaardappelen waar alleen de ogen worden getoetst. Meer gegevens over de cyclus van Pcc in de knol is nodig om te weten wanneer welk gedeelte bemonsterd kan worden om een zo groot mogelijke kans te hebben op het detecteren van Pcc. Dit aspect zal in het Deltaplan *Erwinia* worden onderzocht.

Een complicerende factor is het bestaan van zowel pathogene als niet-pathogene isolaten van Pcc. Hier wordt onderzoek naar gedaan binnen het Deltaplan *Erwinia*. Het is gebleken, dat isolaten van Pcc die pathogeen zijn voor aardappel dit niet of nauwelijks zijn voor bv. *Zantedeschia*. Het kan zijn dat met algemene toetsmethoden ook niet-pathogene isolaten worden aangetoond. Binnen het Deltaplan *Erwinia* (PT13374) wordt onderzocht of er specifieke DNA-merkers zijn om de pathogene Pcc in bloembollen te kunnen aantonen. Voor de veiling is deze methode te ingewikkeld en duur. De hier beschreven uitplaattoets zal verder ontwikkeld moeten worden om de veiling een betrouwbare en voorspellende toets op slijmsteel veroorzakende bacteriën te verschaffen.

6 Communicatie

- Begeleidingscommissie: bijeenkomsten op 25 sept. 2009, 26 oktober 2010, 6 oktober 2011,
- 24 sept 2010 overleg met FloraHolland over toets.

- Kennismiddagen PPO Lisse: februari 2009, 2010 en 2011

- Posters (zie bijlagen 1 en 2): "Slijmstelen" en "Slijmstelen: een kweektoets en parteren als bron van besmetting"

- Lezingen :
 - Zantedeschia middag te Breezand, 3 maart 2011
 - LTO Zantedeschia, bezoek proeven + toelichting 15 juni 2011
 - PlantumNL 12 september 2011
 - Jaarvergadering KAVB-produktgroep Zantedeschia 26 september 2011, PPO Lisse

- Vakblad: *Slijmstelen voorkomen: let op bij parteren en toets op bacteriën. Joop van Doorn, Paul van leeuwen, John Trompert en Wendy Martin* (BloembollenVisie 234, december 2011; Vakblad voor de Bloemisterij nr 49, december 2011)

7 Literatuur

1. Darasse A. *et al.* 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Appl. Environm. Microbiol.* 60: 1437-1443
2. Jayani R.S. *et al.* 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.* 40: 2931-2944.
3. Liao, C.H. en J.M. Wells (1986). Diversity of Pectolytic, Fluorescent *Pseudomonads* Causing Soft Rots of Fresh Vegetables at Produce Markets. *Phytopathology*, Vol 77 no 5 p673-677.
4. Liao, C.H. en J. M. Wells (1987). Association of Pectolytic strains of *Xanthomonas campestris* with Soft Rots of Fruits and Vegetables at Retail Markets. *Phytopathology* vol 77, No3 p418-422
5. Mikicinski, A. *et al.* 2010. Pectolytic Bacteria Associated with Soft Rot of Calla Lily (*Zantedeschia* spp.). *J. Phytopathol* 158: 201–209
6. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31: 426-428, 1959.
7. Soares M.M.C.N. *et al.* (2001) Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal Microbiology* 17: 79-82
8. Schols H.A. *et al.* (eds). 2009. Pectins and pectinases. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
9. Tardy, F., W. Nassar, J.R. Baudouy, N.H. Cotte-Pattat. (1997). Comparative Analysis of the Five Major *Erwinia chrysanthemi* Pectate Lyases: Enzyme Characteristics and Potential Inhibitors. *Journal of Bacteriology* p. 2503–2511 Vol. 179, No.8
10. Van Doorn, J., P. van Leeuwen, R. Dees, W. Martin, J. Trompert (2009) Slijmstelen in *Zantedeschia*: *Pseudomonas* is ook een veroorzaker. *BloembollenVisie* 2009 (159): 33-34.
11. Van Leeuwen P. , K. Pham, R. Dees en J. van Doorn (2009). Slijmstelen bij *Zantedeschia*. PPO rapport 3234035700/PT 12804-02
12. Wakil S.M. and K.A.Oyinlola 2011. Diversity of pectinolytic bacteria causing soft rot disease of vegetables in Ibadan, Nigeria. *J. Appl. Biosci.* 38: 2540-2550.

8 Bijlagen

Poster sept. 2011: slijmstelen



PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING
WAGENINGEN UR

Slijmstelen bij Zantedeschia: een kweektoets en parteren als bron van besmetting

Wendy Martin, Paul van Leeuwen, John Trompert en Joop van Doorn
e-mail: Joop.vandoorn@wur.nl

Probleem

- Het verslijmen van de bloemstelen van Zantedeschia tijdens het vaasleven is een van de grootste problemen bij de afzet als snijbloem
- Voorkomen moet worden dat stelen gaan verslijmen.

Oorzaak

- Slijmstelen worden veroorzaakt door pectinolytische (celwandafbrekende) bacteriën
- Zowel in bloemstelen als in vaaswater zijn vooral de bacteriën *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc, voorheen *Erwinia*) en *Pseudomonas*-soorten gevonden.

Waar zit de bacterie?

De bacteriën zijn vooral aangetroffen in het onderste stukje van de bloemsteel, maar ook halverwege de steel of direct onder de bloem. Bacteriën hoog in de steel: door besmetting tijdens de teelt en niet na het oogsten.

Besmetting via de knol

In 2010 zijn steriele knollen geparteerd met een steriel mes, of een mes besmet met *Pectobacterium*.

Door besmetting bij parteren:

- Partjes rotten weg voor uitlopen
- Planten vallen weg in warme periode
- Planten vallen weg in natte periode (Fig.1)

Dus: veel meer uitval door besmetting bij parteren.

Tijdens bewaring:

Pectobacterium in laag percentage in de knollen aangetoond, ook in de controle.

Knollen geplant in de kas in 2011:

- Uitval alleen in knollen van besmet parteren

Slijmstelen:

- Alleen in bloemen van 'besmette partjes'

Voorkomen besmetting bij parteren erg belangrijk:

- goed uitzoeken van knollen voor het parteren
- apparatuur schoonmaken tijdens het parteren



Fig. 1. Na parteren: links steriel, rechts besmet.

Toets op slijmsteelbacteriën

Een toets om stelen in de aanvoer te kunnen toetsen op de aanwezigheid van slijmstelen veroorzakende bacteriën is wenselijk. PPO heeft daarom in 2010 drie verschillende toetsen ontworpen; de cup plate toets lijkt voor de veiling bruikbaar door zijn eenvoud, gevoeligheid en is relatief goedkoop (Fig.2).



Fig.2. Cup plate toets: heldere ringen (halo's) door *Pectobacterium*

Overeenkomst toets en verslijmen

Toets werkt goed; toont altijd slijmsteel bacteriën aan. Proeven door FloraHolland en PPO laten echter geen duidelijk verband zien tussen toets en het optreden van slijmstelen als gevolg van de aanwezigheid van deze bacteriën (Fig.3).

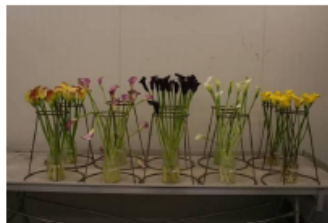


Fig. 3. Slijmstelen tijdens de uitbloei.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Prof. Van Slogterenweg 2
Postbus 89, 2160 AB Lisse
Tel.: 0252-462121
Fax: 0252-462100
Email: info@pbo.ppo@wur.nl
Internet: www.ppo.wur.nl

Productschap  Tuinbouw