

Beheersing van *Erwinia* in bolgewassen

Agressief snot en witsnot in hyacint, Zantedeschia, Dahlia en andere bloembolgewassen

Joop van Doorn, Peter Vreeburg en Paul van Leeuwen

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bollen, Bomen en Fruit
Oktober 2008
PPO nr. 32 320966 00

© 2008 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: PT11863

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bollen, Bomen en Fruit

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen

: Postbus 16, 6700 AA Wageningen

Tel. : 0317 - 47 83 00

Fax : 0317 - 47 83 01

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
SAMENVATTING	7
1 INLEIDING	9
1.1 Aanleiding: Erwinia duikt op	9
1.2 Doel en aanpak	9
1.3 Bestaande kennis en aanverwant onderzoek	10
1.4 Plan van aanpak	11
1.5 Gebruikte termen en afkortingen	12
2 SAMENVATTING LITERATUURSTUDIE	13
3 ENQUÊTE OVER BACTERIEROT IN BIJZONDERE BOLGEWASSEN EN EEN POSTER MET AANBEVELINGEN	15
3.1 Inleiding enquête	15
3.2 Materiaal en methode enquête	15
3.3 Resultaten enquête	15
3.3.1 Algemeen	15
3.3.2 Bacterieziektes op bedrijf	16
3.3.3 Spoelen	16
3.3.4 Vruchtwisseling	17
3.3.5 Overige vragen en opmerkingen	18
3.4 Conclusies en discussie enquête	19
3.5 Poster	20
4 IDENTIFICATIE EN DETECTIE VAN ERWINIA	23
4.1 Doel van dit onderzoeksdeel	23
4.2 Materialen en Methoden	23
4.2.1 Kweek van bacteriën en herkenning	23
4.2.2 ELISA	23
4.2.3 PCR	24
4.2.4 Real-time PCR	24
4.2.5 MIPS	25
4.2.6 DNA sequentieanalyse van (onbekende) bacterie-isolaten	25
4.3 Resultaten	25
4.3.1 Klassificatie: nieuwe indeling van Erwinia-soorten en subsoorten	25
4.3.2 Specifieke media	26
4.3.3 Collectie van isolaten	26
4.3.4 Karakterisatie en analyse van Erwinia-isolaten	27
4.3.5 Lokalisatie van Erwinia in bollen: analyse van isolaten van Erwinia uit hyacinten opgeplant in Nederland en Frankrijk	31
4.3.6 ELISA en Luminex	31
4.3.7 MIPS	32
4.3.8 PCR (Polymerase Chain reaction) op <i>Erwinia</i>	34
4.3.9 Real-time PCR	34
4.4 Algemene conclusies en discussie	38

5	BIOTOETSEN VOOR HET METEN VAN ERWINIA	41
5.1	Inleiding	41
5.2	Ponsjestoets	41
5.2.1	Materialen en methoden	41
5.2.2	Resultaten en conclusies	43
5.3	Holbolletjes als biotoetsmateriaal	44
5.3.1	Inleiding	44
5.3.2	Materiaal en methode	44
5.3.3	Resultaten en conclusie	44
5.4	Bolinoculatie ("prikproef")	45
5.4.1	Inleiding	45
5.4.2	Materiaal en methoden	45
5.4.3	Resultaten	45
5.5	Stresstoetsen	46
5.5.1	Inleiding	46
5.5.2	Materialen en methode	46
5.5.3	Resultaten	47
5.5.4	Conclusies en discussie	48
6	TOEPASSING STRESSTOETSEN OP LATENTE INFECTIES BIJ HYACINT	49
6.1	Inleiding	49
6.2	Materiaal en methode	49
6.3	Resultaten	50
6.4	Conclusies en discussie	54
7	ERWINIA IN ZANTEDESCHIA	57
7.1	Inleiding	57
7.2	Materiaal en methode	57
7.2.1	Bladinfectie	57
7.2.2	Knolinfectie aanprikken	57
7.2.3	Knolinfectie exicator	57
7.3	Resultaten	58
7.3.1	Bladinfectie	58
7.3.2	Knolinfectie aanprikken	58
7.3.3	Knolinfectie exicator	59
7.4	Conclusie en discussie	59
8	ERWINIA CHRYSANTHEMI (PLOFFERS) IN DAHLIA	61
8.1	Inleiding ploffers in Dahlia	61
8.2	Infectie knollen	61
8.2.1	Materiaal en methode infectie knollen	61
8.2.2	Resultaten infectie knollen	61
8.2.3	Conclusie infectie knollen	62
8.3	Infectie van stekken	62
8.3.1	Materiaal en methode infectie van stekken	62
8.3.2	Resultaten infectie van stekken	63
8.3.3	Conclusies infecteren van stekken	64
8.4	Overdracht van <i>Erwinia chrysanthemi</i> op het veld	65
8.4.1	Materiaal en methode overdracht <i>E. chrysanthemi</i> op het veld	65
8.4.2	Resultaten overdracht <i>E. chrysanthemi</i> op het veld	65
8.4.3	Conclusie overdracht van <i>E. chrysanthemi</i> op het veld	67
8.5	Conclusie en discussie	67

9	VELDPROEVEN MET ERWINIA-BESMETTING: EFFECT OP DE VRUCHTWISSELING	69
9.1	Inleiding	69
9.2	Materiaal en methode	69
9.3	Resultaten	69
9.4	Conclusies en discussie	70
10	INVLOED VAN BEMESTING OP ERWINIA-AANTASTING	71
10.1	Inleiding	71
10.2	Materiaal en methode	71
10.3	Resultaten	72
10.4	Conclusie en discussie	72
11	PREVENTIE VAN ERWINIA IN DE KETEN: BESMETTING BIJ DE VERMEERDERING	73
11.1	Inleiding	73
11.2	Materiaal en methode	73
11.3	Resultaten	73
11.3.1	Bewaring tot planten	73
11.3.2	Veld en oogst	74
11.4	Conclusies en discussie	75
12	PREVENTIE VAN ERWINIA IN DE KETEN: DROGING, VERWERKING EN BEWARING	77
12.1	Inleiding	77
12.2	Materiaal en methode	77
12.3	Resultaten	78
12.4	Conclusies en discussie	80
13	BESTRIJDING ERWINIA DOOR GEBRUIK VAN ONTSMETTINGSMIDDELEN	83
13.1	Inleiding	83
13.1	Materiaal en methode	83
13.2	Resultaten	83
13.3	Conclusie en discussie	84
14	ALGEMENE CONCLUSIES EN DISCUSSIE	87
15	COMMUNICATIE	91
15.1	Vakbladartikelen	91
15.2	Posters	91
15.3	Brochures	92
15.4	Congressen, lezingen	92
15.5	Open dagen	93
16	LITERATUUR	95
	BIJLAGE 1	99

Samenvatting

De afgelopen acht jaar is in toenemende mate bacterierot (zachtrot, agressief rot) opgetreden in bloembolgewassen zoals hyacint, Muscari, Dahlia en iris. Ook in Freesia en Amaryllis zijn problemen; vooral de pootaardappelsector heeft grote schade door met name *Erwinia chrysanthemi* (agressief snot). *Erwinia chrysanthemi* is taxonomisch heringedeeld en vormt nu de groep *Dickeya*; het oude witsnot (*Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* heet nu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). Vanaf 2004 tot eind 2007 is onderzoek aan *Erwinia* verricht binnen het PT-project 'Beheersing van *Erwinia* in bloembollen' (PT 11683). Hieruit is een aantal resultaten, conclusies en aanbevelingen voor verder onderzoek voortgekomen; het meeste is gepubliceerd in artikelen in BloembollenVisie in de nummers van 2004-2008.

- Een **vragenlijst** over *Erwinia* in bijzondere bolgewassen werd door 30% van de telers beantwoord: ongeveer 70% van de telers heeft last van rot; spoelen lijkt een belangrijke oorzaak.
- Een **literatuurstudie** betreffende *Erwinia*-problemen in andere gewassen dan bolgewassen leverde veel informatie over *Erwinia*-problemen in andere teelten (aardappel, witlof- uien-, suikerbiet-, chrysantenteelt) betreffende de infectieroute, mogelijke interacties met schimmels en andere pathogenen.
- **Analyses** op de aanwezigheid van *Erwinia* in diverse bolgewassen zijn uitgevoerd op 189 monsters, waarvan 134 uit hyacint, 7 uit Zantedeschia en de rest vooral afkomstig uit iris, Dahlia, ui, Amaryllis, Freesia, narcis, krokus en Brodiaea. In ongeveer 70% werd *Erwinia* aangetroffen, meestal *E. chrysanthemi* maar ook *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Niet altijd kon *Erwinia* aangetoond worden in monsters, die qua symptomen dit deden verwachten. Ook werden andere pathogenen aangetroffen (*Fusarium*, en mogelijk *Pseudomonas*).
- De beschikbare **DNA-identificatie- en detectiemethoden**, evenals serologische technieken (ELISA, Luminex) zijn getest op laboratoriumniveau en uitgewisseld met PRI en de aardappelsector. De 'gewone' PCR's werken goed. Een aantal zg. real-time PCR's werken nog niet goed. Ook zijn alternatieve toetsmethoden onderzocht. Een *Erwinia*-check via stressbehandeling ('valtoets' of 'stuitertoets', vacuümtoets, invriesmethode) gaf bij gezonde bollen geen symptomen. De valtoets is de meest praktische toets, maar moet nog verder ontwikkeld worden. MIPS (=Multiple Imaging Plant Stress) is uitgevoerd bij PRI. De bedoeling was om te zien of ogenschijnlijk gezonde hyacintenbollen met deze lasertechniek iets van rot (stress) laat zien. De resultaten waren niet eenduidig; ook niet-zieke bollen lieten signaal zien. Deze niet-destructieve methode is daarom (nog) niet geschikt.
- Er zijn twee **biotoetsen** ontwikkeld om de mate van virulentie van *Erwinia*-isolaten te bepalen. Deze toetsen zijn belangrijk om in het vervolgonderzoek gebruik te kunnen maken van virulente isolaten. In Dahlia is het onderzoek aan *E. chrysanthemi* ("ploffers") afgerond. Er zijn nog vragen over o.a. variatie in gevoeligheid bij de verschillende cultivars. In Zantedeschia is het vrijwel uitsluitend *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* die rot veroorzaakt in de knol; in blad en bloem (stelen) is het echter *Pseudomonas* die rot (slijmstelen) veroorzaakt.
- **Middelenonderzoek** is uitgevoerd. Ozonbehandeling na beschadiging is toegepast op enkele kleine partijen hyacint. Deze gaf geen beperking van nieuwe aantastingen door *Erwinia*. Boldompelingen van hyacinten in o.a. formaline, "mild acid", Citrex, enkele desinfecterende middelen en etherische olie gaven wisselende resultaten en vaak ook meer aantasting; de aanwezigheid van water gaf waarschijnlijk infecties meer kans. De werking van etherische olie in een bewaarcel kon in onderzoek niet bewezen worden ondanks berichten vanuit de praktijk.
- Het **vruchtwisselingonderzoek** is gestart met grondbesmetting met drie zieke gewassen (hyacint, iris en Zantedeschia) en met vijf gewassen (eerder genoemde en Dahlia en Muscari) die daarna in rotatie zijn geteeld. De vruchtwisselingexperimenten toonden geen relatie tussen besmetting van de grond en aantasting van de gewassen; de geconstateerde, soms zeer zware besmettingen kwamen mee als besmetting met de partijen zelf. Dit komt overeen met wat men gevonden heeft in het pootaardappelenonderzoek naar *Erwinia*.
- **Bemesting**: er zijn veldbehandelingen toegepast met calcium, kalium, stikstof, Se, Mn, sporenmix, en stal mest om effecten te meten op de aantasting door *Erwinia* bij hyacint. Er werd geen (duidelijk) effect

gevonden; bemesting lijkt geen belangrijke factor te zijn qua invloed op *Erwinia*, voor in ieder geval hyacint en Dahlia.

- In de **keten** bij hyacint is de *Erwinia*-overdracht bij hol- en snijbollen (hyacint) onderzocht om zo de mechanische overdracht te onderzoeken. Vooral bij snijden is overdracht mogelijk en er treden ook latente besmettingen op die pas een jaar later zichtbaar worden.

De mate van aantasting door *Erwinia* kan worden beperkt door een reeks van maatregelen vanaf rooien tot aan planten. Hygiënische maatregelen gedurende de gehele teelt en verwerking zijn van belang om verspreiding naar andere partijen te voorkomen.

Rooien en drogen: voor het rooien op het veld de aangetaste/verdachte planten verwijderen beperkt de verspreiding door de machinale verwerking bij en na het rooien.

Na rooien is snel drogen en voorzichtig (geen beschadigingen) verwerken bij sorteren enz. van groot belang.

Bij de verwerking dient de bolschade en de daarmee verhoogde kans op versmering en aantasting zoveel mogelijk beperkt te worden. De verwerking moet zo laat mogelijk uitgevoerd worden omdat de (kans op) aantasting in de tijd minder wordt. Na verwerking goed terugdrogen; bij de verwerking moet de boltemperatuur bijvoorbeeld onder de 23-25°C worden gehouden; tussentijds ontsmetten (in waterige oplossingen) wordt sterk afgeraden vanwege de kans op *Erwinia* aantasting.

Binnen enkele andere projecten is eveneens kennis betreffende *Erwinia* opgebouwd:

- overleving en verspreiding van *Erwinia* in grond, materialen en water (LNV-project PPO3234023608);
- zgn. slijmstelen van *Zantedeschia* (PT 12804)
- invloed van beschadiging door verwerking op teelt- en exportbedrijven op aantasting door onder andere *Erwinia* (PT 12949);
- opzetten van betrouwbare toetsen op *Erwinia* (PT13601).

1 Inleiding

1.1 Aanleiding: Erwinia duikt op

Ongeveer 8 tot 10 jaar geleden werden de eerste duidelijke gevallen van een nieuw zachtrot bekend in de bloembollen, vooral bij hyacint, maar ook bij gewassen als Muscari en Scilla, iris, en Dahlia. Bij hyacint was voorheen witsnot bekend: deze werd veroorzaakt door *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) (Van Doorn *et al.* 1993). Het verschil tussen dit “oude zachtrot” en het “nieuwe agressieve snot” was enerzijds de grotere aantallen bollen die werden aangetast (hogere percentage uitval), anderzijds de grotere snelheid en mate van aantasting (agressiviteit). Ook werd geconstateerd, dat dit rot bij hogere temperaturen voorkwam dan dat veroorzaakt door Ecc.

De laatste jaren, vanaf 2003, zijn er in toenemende mate problemen met rot in bolgewassen ondervonden. Deze rotproblemen die waarschijnlijk door de bacterie *Erwinia chrysanthemi* (tegenwoordig ook *Dickeya* genoemd) worden veroorzaakt. Kenmerkend voor de rotproblemen in het bloembollenvak was dat de bacterie in toenemende mate schade veroorzaakte in de hele keten (in het veld, kas, bewaring en export). Een zelfde fenomeen deed zich voor in de (poot-) aardappelsector; ook hier vond grote economische schade plaats. In de aardappelsector leidt een declassering als gevolg van een *Erwinia*-besmetting tot een gemiddelde schade van 2€ per 100 kg pootaardappelen. In 2003 werd als gevolg van declasseringen een schade geleden van ca. 17 M€ en in 2004 van een geschatte 6 M€ (Prins *et al.* 2008). Cijfers voor de bollensector waren niet voorhanden, daar er niet op *Erwinia* werd gekeurd; geschat wordt dat de schade (in de teelt en export) jaarlijks tussen de 4 en 8 miljoen euro bedraagt.

In hyacint vindt grote uitval plaats van bollen in de bewaring; *Erwinia* lijkt agressiever en sneller toe te slaan. Bij dit gewas is het een groot probleem; in sommige partijen is uitval tot 100% gevonden. De afgelopen jaren zijn verschillende vormen van rot gevonden in hyacint die mogelijk door *Erwinia* zijn veroorzaakt: “leeglopen van bollen” en zgn. “kroepoek”. Dit grote probleem leidde tot het houden van een enquête onder de hyacintentelers en handel (PT project 330936).

Binnen een aantal projecten, gericht op teeltaspecten van bolgewassen, werd geconstateerd dat er zachtrot optrad. In het gewas dahlia waren er sterke aanwijzingen dat *Erwinia* betrokken is bij het verschijnsel “ploffers” (natrot). In sommige partijen dahlia's vielen hoge percentages knollen weg waardoor de stekproductie van deze soorten erg werd bemoeilijkt (PT-project 330793: ploffers in Dahlia).

Bij Zantedeschia is *Erwinia* al lang een probleem en kan soms tot 30% uitval geven in de teelt; ook bij export van partijen leidde *Erwinia*-aantasting tot aanzienlijke schade.

In iris werd sinds enkele jaren dramatisch veel uitval door zachtrot geconstateerd. Er waren aanwijzingen dat een *Erwinia*-soort betrokken zou zijn bij dit “stinkend zachtrot” of zelfs hoofdveroorzaker zou zijn (PT project 330921). Pas de laatste jaren werd zachtrot aangetroffen in de bewaring van irisbollen; ook bij het rooien werd dit gevonden.

In Muscari zijn grotere problemen geconstateerd met rotverschijnselen.

Samenvattend werd geconcludeerd dat de afgelopen jaren (2000-heden) bij verschillende soorten bolgewassen tijdens de teelt en bewaring in toenemende mate rotverschijnselen waargenomen is waarvan de oorzaak onbekend is. Een geconcentreerde aanpak, specifiek gericht op deze bacterieziekte was wenselijk.

1.2 Doel en aanpak

Het doel was, om overkoepelend in de bollenteelt de oorzaak van de toename van rot in hyacint en een aantal andere bolgewassen vast te stellen. Speciaal is gelet op het doorlichten van de momenten in de keten waar de rot toeslaat (wat is de bron waar *Erwinia* vandaan komt?), het voorkomen en identificeren

van agressievere bacteriestammen en het toepassen van gewasbeschermingsmaatregelen om rot in het veld en onder de rooi-, verwerkings- en bewaringscondities te verminderen of te voorkomen. Ten aanzien van de bijzondere bolgewassen zijn in eerste instantie via een enquête de omvang en aard van de problemen, o.a. in relatie tot vruchtwisseling in kaart gebracht worden.

Tabel 1.1 *Erwinia*-soorten in bolgewassen

Erwinia-soort	Nieuwe benaming	bijzonderheden
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Ecc)	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Heel diverse soort: oud witsnot
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Weinig diverse soort; komt nauwelijks voor in bloembolgewassen
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Dickeya</i> spp: <i>D. dadanthii</i> , <i>D. chrysanthemi</i> , <i>D. zeae</i> , <i>D. paradisiaca</i> , <i>D. dianthicola</i> , <i>D. chrysanthemi</i> , <i>D. dieffenbachia</i>	In meerdere soorten onderverdeeld (7): veroorzaakt het zg. agressief snot
<i>Erwinia rhapontici</i> *	<i>Erwinia rhapontici</i>	Veroorzaakt het hyacint necrose ("snotlintjes")
<i>Erwinia herbicola</i> *	<i>Pantoea agglomerans</i>	Er komen zowel pathogene – als niet-pathogene isolaten van voor

* vormen nauwelijks een probleem in bolgewassen, tot zover bekend.

De hoofdlijnen van het onderzoek en verwachte resultaten waren:

- vaststellen welke *Erwinia*-soorten een rol spelen bij het ontstaan van rot in de verschillende gewassen bij teelt en export. Onderzoeken hoe hun verspreiding in elkaar zit.
- vaststellen of er agressievere of warmteminnende *Erwinia*-stammen bestaan die o.a. hyacint, Zantedeschia en Muscari aantasten. Hierbij wordt kennis gebruikt over de rol van agressieve *Erwinia*-stammen bij de aardappel- (en mogelijk witlof-) teelt.
- het vaststellen wat de bronnen van infecties zijn in het veld en in de bewaring en wat de condities en voorwaarden zijn, nodig om aantasting door *Erwinia* te krijgen
- adviezen en toepassing van een aantal maatregelen, nodig om uitval in de bewaring van bollen in te perken
- methoden om niet-zichtbare (latente) infecties vroegtijdig te detecteren
- inventarisatie en evaluatie van "groene" (niet-chemische) gewasbeschermingsmiddelen en fysische (o.a. temperatuurbehandelingen) om te onderzoeken wat hun mogelijkheden zijn om breder ingezet te worden om aantasting door *Erwinia* te voorkomen of in te perken in met name hyacint (en mogelijk Muscari) en Zantedeschia
- het vaststellen van de omvang van de bacterieproblemen in bijzondere bolgewassen, het belang van *Erwinia* en de rol van vruchtwisseling hierbij

1.3 Bestaande kennis en aanverwant onderzoek

- Er is een enquête gehouden (PT-project 330936) onder hyacintentelers en exporteurs om de omvang en mogelijke oorzaken van het *Erwinia*-probleem in 2002 en deels 2003 in kaart te brengen. De zware aantastingen in 2003 gaven aan dat het probleem enorm is en er geen sprake was van een incident. De resultaten van de enquête en de praktijkervaringen van 2003 gaven aanleiding om uit te gaan van meerdere oorzaken die in combinatie nodig zijn om tot een aantasting te leiden. Belangrijke aspecten zijn de aanwezigheid van *Erwinia* bacteriën,

beschadiging, vocht en hoge verwerkingstemperaturen. De rooidatum en de hiermee samenhangende droog- en verwerkingstemperatuur lijken van groot belang: hoe hoger de temperatuur hoe groter de kans op aantasting. Ook zaken als veel stikstof, partijherkomst, cultivar, bolmaat, heetstook en spoelen lijken belangrijk. De gecompliceerdheid blijkt uit ogenschijnlijk tegenstrijdige praktijkervaringen.

- Voor iris is een project gestart (PPO 330921) om te onderzoeken of stinkend zachtrot in iris veroorzaakt wordt door *Erwinia*. Hiervoor zijn monsters geanalyseerd worden om te zien om welke *Erwinia*-soort (-en) het mogelijk gaat. Binnen dit onderzoek is ook gezocht naar de invloed van spoelen, beschadigen en eventueel drogen van irisbollen in relatie tot de temperatuur.
- Binnen het PT-project 320683 (beheersing van bacterieziekten in bloembolgewassen) is in 2003 vanwege de grote problemen met *Erwinia* gestart met de ontwikkeling van PCR-technieken om verschillende soorten *Erwinia* te kunnen identificeren. Verder zijn infectie-experimenten uitgevoerd om te zien welke isolaten nu zachtrot geven in hyacint. Hiertoe zijn bollen in de bewaring aangeprikt met verschillende soorten *Erwinia*. Al binnen enkele dagen liep het snot uit de gaasbakken. Gebleken is dat meerdere soorten *Erwinia* rotproblemen kunnen geven.
- Binnen het PT-project 330793 (ploffers in Dahlia) was tot voor de start van dit project beperkt aandacht geschonken aan *Erwinia chrysanthemi* als oorzaak. Ook vanuit de kwekerij van bijzondere bolgewassen is aangegeven dat de afgelopen jaren in steeds meer gewassen in toenemende mate problemen zijn ondervonden met bacterierot.
- LNV-project “Beheersing van *Dickeya* en *Pectobacterium* (*Erwinia* spp.) in land- en tuinbouwgewassen” (LNV BO-06-007-2.1.5)

1.4 Plan van aanpak

- Een enquête onder de telers van bijzondere bolgewassen om de omvang, aard en gegevens in detail over deze aantasting te verzamelen (hoofdstuk 3)
- een poster met aanbevelingen voor teelt en bewaring om *Erwinia*-aantasting te beperken of te voorkomen (hoofdstuk 3)
- Een literatuurstudie om alle bekende informatie over *Erwinia* in bolgewassen te verzamelen (hoofdstuk 2)
- Vaststellen welke *Erwinia* een rol speelt bij het ontstaan van rot in de verschillende gewassen in de teelt, bewaring en export. Onderzoeken hoe hun verspreiding in elkaar zit, en hoe het rot zich openbaart in de verschillende ketenonderdelen (hoofdstuk 7, 8, 9)
- Vaststellen of er agressievere of warmteminnende *Erwinia*-stammen bestaan die hyacint, Zantedeschia, en Muscari aantasten. Hierbij wordt kennis geïntegreerd over de rol van agressieve *Erwinia*-stammen bij de aardappel- (en mogelijk witlof-) teelt (hoofdstuk 5, 6)
- Het vaststellen wat de bronnen van infecties zijn in het veld en in de bewaring en wat de condities en voorwaarden zijn, nodig om aantasting door *Erwinia* te krijgen?
- Adviezen en toepassing van een aantal maatregelen, nodig om uitval in de bewaring van bollen in te perken (hoofdstuk 11)
- Methoden om niet-zichtbare (latente) infecties vroegtijdig te detecteren (hoofdstuk 4)
- Inventarisatie en evaluatie van “groene” (niet-chemische) gewasbeschermingsmiddelen, bemesting (calcium) en fysische (o.a. temperatuurbehandelingen) om te onderzoeken wat hun mogelijkheden zijn om breder ingezet te worden om aantasting door *Erwinia* te voorkomen of in te perken in vooral hyacint, Muscari, en Zantedeschia (hoofdstuk 10, 11, 12, 13)
- Het vaststellen van de omvang van de bacterieproblemen in bijzondere bolgewassen, het belang van *Erwinia* en de rol van vruchtwisseling hierbij (hoofdstuk 3, 7, 8)

Een begeleidingscommissie komt eenmaal jaarlijks bijeen om de voortgang te bespreken, en suggesties te doen voor onderzoek in het komende onderzoeksjaar.

1.5 Gebruikte termen en afkortingen

Ech = *Erwinia chrysanthemi*. Volgens een nieuwe taxonomische indeling *Dickeya* spp, waar er momenteel een 6-tal van worden onderscheiden

Ecc = *Erwinia carotovora*, volgens de nieuwe taxonomie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Eca = *Eca*, volgens de nieuwe taxonomische indeling *Pectobacterium atrosepticum*. Deze komt nauwelijks voor in bolgewassen, maar wordt in experimenten wel gebruikt.

MIPS = Multiple Imaging of Plant Stress: meetmethode waarbij fluorescentie van chlorofyl in plantmateriaal een maat voor stress (bv. ziekte) kan zijn
waargenomen als maat voor stress bij de plant

ELISA = serologische methode om bv. bacteriën in plantmateriaal aan te tonen via een kleurreactie

PCR = DNA-methode, vooral gebruikt voor gevoelige detectie, waarbij via een enzymreactie en kleine stukjes kunstmatig DNA (primers) een specifiek stukje DNA van bv. *Erwinia* vermenigvuldigd kan worden

Real-time PCR = PCR waarbij resultaten via lichtsignalen kunnen worden waargenomen

Biotoetsen = testen waarbij effecten van middelen of organismen (in dit geval *Erwinia*) op levend materiaal (in dit geval bollen of bladeren of stelen) worden gebruikt.

Luminex (flow cytometrie) = een toepassing van antistoffen, gecoat aan lichtgevende bolletjes om bv. hoeveelheden bacteriën in een oplossing te kunnen meten. Vergelijkbaar met ELISA.

OD = optische dichtheid; een maat voor de hoeveelheden bacteriën gemeten via lichtmeting

PBS = een bufferoplossing met zout om o.a. bacterie- of plantencellen in te bewaren of om mee te experimenteren

2 Samenvatting literatuurstudie

Deze studie is in mei 2005 afgerond en uitgegeven via het Productschap Tuinbouw ("Is *Erwinia* te beheersen? Een literatuurstudie over rotproblemen in diverse gewassen om met deze kennis *Erwinia* in bolgewassen beter te kunnen aanpakken"). Auteurs Joop van Doorn en Jan van der Wolf; als aparte uitgave bij PT onder projectnummer PPO nr. 320966.

Het meeste onderzoek aan *Erwinia*-bacteriën is uitgevoerd bij aardappel. In dit gewas worden drie ziekteverwekkende *Erwinia*-soorten gevonden: *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *Erwinia chrysanthemi* (Ech) en *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc). Eca speelt in gematigde klimaatsgebieden de belangrijkste rol bij aardappel. Eca is echter relatief waardplantenspecifiek en veroorzaakt, behalve in aardappel, alleen economische schade in witlof en soms in Zantedeschia. Ech is een pathogeen dat een brede waardplantenreeks heeft, en zowel in aardappel als ook in bloembollen voorkomt. In Nederland blijkt momenteel de meeste schade in de bloembollenteelt door Ech veroorzaakt te worden. Ecc is een echte "alleseter" en wordt ook regelmatig uit rottend aardappel- en bloembolweefsel geïsoleerd. Mogelijk bestaan er agressieve en minder agressieve stammen van *Erwinia* in bloembollen, zoals ook gevonden is in aardappel. Het valt niet uit te sluiten, dat andere bacteriën (*Pseudomonas syringae*, *Clostridium*, *Bacillus*) ook een rol kunnen spelen, en dat in sommige gevallen een schimmel (o.a. *Fusarium*) vergelijkbare ziekteverschijnselen geeft.

Erwinia's worden in planten en plantenresten gevonden en komen verder in oppervlaktewater voor. Tijdens de oogst kunnen bacteriën via aerosolen in de hogere luchtlagen terecht komen en via regenwater weer in het gewas. In de grond en op materialen van gereedschappen en materialen sterven *Erwinia*'s vrij snel. Het is wel bekend dat contactbesmettingen tijdens teeltmaatregelen, oogsten, sorteren, bewaren en planten gemakkelijk kunnen optreden. Voor de symptoomontwikkeling is een bepaalde drempelwaarde (aantal bacteriën) in de plant noodzakelijk. Pas bij een hoge dichtheid worden enzymen aangemaakt die de celwanden van het gewas kunnen afbreken.

Bestrijding moet op verschillende niveaus gebeuren. Hierbij spelen goede waarneming- en detectiemethoden een belangrijke rol. De eerste waarneming vindt plaats in het veld, de tweede na het rooien van het gewas. Op basis van de resultaten bij de monstername kan men besluiten probleempartijen langere tijd op het veld te laten staan om verdere aantasting via mechanische beschadiging in te perken. Bekend is dat een waterfilm rond de bollen, die zorgt voor zuurstofarme omstandigheden, een bepalende factor is voor ziekteontwikkeling; goed en snel drogen is dus belangrijk voor inperking van deze bacterie. In de bewaring moet de temperatuur niet hoger zijn dan 20 °C om speciaal Ech geen kans te geven. Er zijn meer of minder gevoelige cultivars van waardplanten. Tolerantie of gedeeltelijke resistentie kan gelden voor alle *Erwinia*'s, maar ook voor een bepaalde *Erwinia*-soort. Zo wordt, tot zover bekend, Zantedeschia niet door *Erwinia chrysanthemi* aangetast.

Erwinia kan als primair pathogeen optreden (vooral Ech), maar wordt ook vaak met andere organismen aangetroffen, waarvan sommigen ook rotsymptomen kunnen veroorzaken (*Pseudomonas* e.a.). Het is onduidelijk wat dan de eerste veroorzaker is.

Wat betreft de overleving en verspreiding van *Erwinia* bestaat geen eenduidigheid. Vooral Ecc kan lang in water en op plantenresten overleven. De aantallen zijn vaak gering (minder dan 1000 bacteriecellen). Vrij in de grond kunnen *Erwinia*'s (veel) minder dan een jaar overleven. Sommige tussengewassen of groenbemesters kunnen waardplant voor *Erwinia* zijn, zoals bepaalde koolsoorten. Vegetatief vermeerderd plantenmateriaal kan besmet zijn met *Erwinia*; hergebruik van reeds geteelde planten is dan ook af te raden. Hoewel verspreiding van *Erwinia* via aerosolen, regen, irrigatie, gewasresten en zelfs insecten kan plaatsvinden, moet vooral rekening gehouden worden met mechanische verspreiding als belangrijkste bron van besmetting. Machines, sorteersers, ontsmettingsbaden en opslagruimtes zijn de belangrijke bronnen van overdracht, vooral als er tijdens teelt- en oogstmaatregelen knolbeschadigingen ontstaan.

Voor Eca en Ech zijn zowel serologische (ELISA) als PCR (DNA) detectiemethoden beschikbaar. Voor Ecc is echter alleen een PCR beschikbaar, maar deze is nog niet in de praktijk geëvalueerd. De gevoeligheid op laboratoriumniveau van PCR is hoog (tot op enkele bacteriën); in veldmonsters is de drempelwaarde ongeveer 1000- 10.000 cellen per reactie. Door een goede detectie van *Erwinia* in bv.

vermeerderingsstappen van uitgangsmateriaal of bij controles in de bedrijfsvoering (productielijn) kan de incidentie van *Erwinia* beperkt worden. Beheersing van *Erwinia* moet zich richten op inperking van besmetting. Teeltmaatregelen kunnen zich richten op ontsmetting van bollen en knollen via bv. UV-belichting en stomen, bemesting (toevoeging van calcium en gips), wondbescherming, groeistimulatie van de plant en het toepassen van antagonisten. Ook het voorkomen van verdere infecties van *Erwinia* door afbraak van signaalstoffen die een rol spelen bij in het ziekteproces, en productie van antibiotica door antagonisten zijn strategieën die nader onderzoek behoeven om het rotprobleem het hoofd te bieden.

3 Enquête over bacterierot in bijzondere bolgewassen en een poster met aanbevelingen

3.1 Inleiding enquête

In 2004 is een enquête gehouden onder de kwekers van bijzondere bolgewassen (inclusief Dahlia en Iris) om een indruk te krijgen over de bacterieproblemen in de praktijk bij de telers van deze gewassen. Voor dit doel is een enquête samengesteld en verstuurd naar alle kwekers van bijzondere bolgewassen die aangesloten zijn bij de Bloembollenkeuringsdienst (BKD).

De resultaten zijn gebruikt binnen het onderzoekproject om de diverse proeven beter af te stemmen op de situatie in de praktijk. De resultaten zijn ook als achtergrond informatie gebruikt.

3.2 Materiaal en methode enquête

In de enquête zijn verschillende soorten vragen gesteld.

- Algemene vragen. Ten eerste kon men de naam en plaats van het bedrijf invullen. Door dit over te slaan was er de mogelijkheid om de vragenlijst anoniem invullen. Verder kon men aangeven welke bolgewassen men teelde en wat het totale areaal aan bijzondere bolgewassen was. Ook kon er worden aangegeven hoeveel land men zelf bezat en hoeveel er werd gehuurd/geruild enz.
- De tweede groep vragen ging over de aanwezigheid van bacterieziektes op het bedrijf, in welke gewassen, de ontwikkeling van de ziektes de afgelopen jaren en of men gewassen spoelt.
- Enkele vragen over spoelen. Is er een relatie tussen spoelen en bacterieziek en worden er gewassen niet meer gespoeld vanwege problemen.
- Enkele vragen rondom vruchtwisseling. Zijn er gewassen in de vruchtwisseling waar ten aanzien van bacterieziektes goede of slechte ervaringen mee zijn, met welke gewassen. Vindt er ook vruchtwisseling plaats met niet-bolgewassen
- Ten slotte waren er nog overige vragen waarbij men kon aangeven welke handelingen naar de mening van de kweker bacterieziek deden toe- of afnemen.

De enquête is najaar 2004 verstuurd waarbij men enkele weken de tijd had om de lijst terug te sturen.

De volledige enquête is als bijlage opgenomen in dit verslag.

3.3 Resultaten enquête

3.3.1 Algemeen

Er was een goede respons op de enquête. Van de 922 verzonden formulieren zijn er 302 teruggezonden, een respons van 32,8%. Dit is een zeer hoge respons. Deze zeer hoge respons en de opmerkingen bij de vragen lieten zien dat het onderwerp zeer actueel was en erg leefde onder de kwekers. Meer dan 97% van de deelnemers gaf zijn naam en adres op wat aangaf dat men zeer betrokken was bij dit onderzoek. De deelnemers waren goed vertegenwoordigd over de regio's waar bijzondere bolgewassen worden geteeld. De meeste ingevulde enquêtes kwamen uit het Noordelijk zandgebied (41%), De Zuid (24%), Kennemerland (12%) en West-Friesland (11%).

De bedrijven teelden tesamen 53 verschillende gewassen waarbij de belangrijkste bijzondere bolgewassen goed vertegenwoordigd waren. Ook kon men het areaal bijzondere bolgewassen aangeven. Ruim 80% van respondenten had een areaal opgegeven. Het totale opgegeven areaal bijzondere bolgewassen (incl Dahlia) bedroeg 885 ha zodat ook hieruit bleek dat het een representatieve enquête was.

Circa 70% van de bedrijven verhuurde minder dan 10% van zijn areaal maar meer dan 35% van de kwekers huurde meer dan 50% van zijn areaal aan land. Dit geeft aan dat de bollen veel op gehuurd land worden geteeld.

3.3.2 Bacterieziektes op bedrijf

In tabel 3.1 is het percentage bedrijven weergegeven dat aangeeft wel eens met bacterierot te maken te hebben gehad. Hoewel bijna 60% aangeeft wel eens last te hebben gehad van bacterieziektes gaf ook ruim 30% aan geen last te hebben gehad van bacterierot. Er is in de uitwerking nog een onderscheid gemaakt naar reactie op basis van de grootte van het bedrijf. Daaruit bleek dat 100% van de grote bedrijven (>20 ha) wel eens problemen had met bacterieziektes en ruim 40% van de bedrijven < 1 ha. Hoe groter het bedrijf des te vaker men bacterieziektes zag. Gemiddeld 15 tot 20% van de bedrijven was er niet zeker van of de uitval, rottigheid door bacterieziektes werd veroorzaakt of niet.

Tabel 3.1 Mate waarin bedrijven wel eens bacterieziektes op het eigen bedrijf zijn tegen gekomen

Ja	57.5%
Nee	31.4%
Wel eens	11.1%

Gewassen waarin men bacterieziek tegenkwam waren vooral: Zantedeschia, hyacint, Muscari, Dahlia, Hollandse Iris. Andere gewassen met bacterieziek (anders dan geelziek) die genoemd zijn en waarvan bekend is dat er bacterieziek in voor kan komen waren: Begonia, Anemone, Freesia, Ranunculus, Galtonia, Arum italicum, Eranthis en Ornithogalum. Daarnaast werden nog diverse gewassen genoemd waarvan niet bekend is of er bacterieziektes in voorkomen of niet.

Op de vraag hoe de van bacterieziektes zich de laatste jaren op het bedrijf ontwikkelden, antwoordde ruim 40% van de deelnemers dat de problemen afnamen, 26% dat het wisselde, 20% dat het evenveel was en 14% dat het toenam. Het leek erop dat men vooral heeft gekeken naar de aantasting in 2004 t.o.v. het jaar ervoor. In 2004 waren over het algemeen minder problemen met bacterieziektes dan in 2003. Op basis van ingezonden monsters en waarnemingen in de praktijk kon los van de enquête worden gesteld dat de problemen in de periode van 2000 tot 2004 zijn toegenomen.

3.3.3 Spoelen

In tabel 3.2 is aangegeven hoe vaak gewassen worden gespoeld. Opvallend is dat de gewassen waarvan eerder is aangegeven dat men problemen heeft met bacterieziektes veelal niet worden gespoeld (Zantedeschia, hyacint, Muscari, Dahlia en Hollandse Iris). Hollandse Iris vormt daarop een uitzondering. Wanneer gekeken wordt naar de relatie tussen spoelen en bedrijfsgrootte valt op dat er meer wordt gespoeld naarmate het bedrijf groter is. Wel 70 tot 80% van de bedrijven met meer dan 10 ha bijzondere bolgewassen spoelt één of meer gewassen. Echter, ook deze bedrijven geven aan sommige gewassen niet te spoelen.

Bij combinatie van de antwoorden over spoelen en aantasting door bacterieziektes bleek dat er geen relatie was tussen bedrijven die spoelen en bedrijven die zeggen last te hebben van bacterieziektes. Dit kan dus te maken hebben met het feit dat niet alle gewassen worden gespoeld.

Circa 50% van de kwekers gaf aan niet extra last te hebben van bacterierot sinds ze spoelen, 12% heeft wel meer last. Ruim 30% van de bedrijven gaf aan te zijn gestopt met spoelen van een gewas vanwege bacterieziektes. Sinds men is gestopt met het spoelen van het gewas met problemen vond 75% van de kwekers over het algemeen dat de problemen zijn afgenomen.

Tabel 3.2 Aantal maal dat van een gewas is aangegeven dat het altijd, soms of niet wordt gespoeld
(gesorteerd op altijd spoelen)

Gewas	altijd	soms	niet	totaal
Lelie	54	3	5	62
Tulp	38	48	51	137
Krokus	30	15	33	78
Iris (Holland)	28	7	15	50
Allium	16	7	38	61
Iris (reticulata ea	13	0	5	18
Scilla	9	1	13	23
Anemone	8	1	2	11
Narcis	7	15	60	82
Fritillaria	7	2	9	18
Muscari	7	1	24	32
Triteleia	6	2	5	13
Chionodoxa	6	0	5	11
Begonia	4	0	4	8
Puschkinia	4	0	3	7
Zantedeschia	1	4	44	49
Hyacint	0	6	29	35
Dahlia	0	1	41	42

3.3.4 Vruchtwisseling

Op de vraag of er bepaalde voorvruchten zijn die meer problemen met bacterieziektes veroorzaken antwoordde slecht 7% dat dit het geval was en bijna 60% dat dit niet het geval was. Hoe groter het bedrijf was des te vaker werd aangegeven dat voorvruchten problemen kunnen geven met bacterieziektes. Er werden veel combinaties van gewassen genoemd die wel eens problemen hebben veroorzaakt. In tabel 3.3 zijn de genoemde combinaties weergegeven. Hierbij moet worden opgemerkt dat het hier gaat om gemelde combinaties en niet om vastgestelde waarnemingen. Als voorvrucht waarna bacterieziektes voorkwamen is vooral de hyacint veel genoemd maar ook lelie, Muscari, Zantedeschia en gras. Als volggewas met problemen is vooral Zantedeschia veel genoemd maar ook Dahlia, Iris (Hollands) hyacint en Scilla. Vijfmaal is gemeld dat men slechte ervaringen had door een gewas tweemaal achter elkaar te telen (Zantedeschia, hyacint en lelie).

Voor al Dahlia en Muscari zijn genoemd als gewassen die last hadden na een teelt van hyacint. Meestal had de voorvrucht geen bacterieziekte of wist men het niet.

Hoewel diverse gewassen werden genoemd als voorvrucht en volggewas komen de gewassen waarin zich de meeste problemen voordoen het meeste naar voren. In een aantal gevallen is het de vraag of het werkelijk om bacterieziektes gaat.

Tabel 3.3 Voorvruchten die volgens de enquête bacterieziektes gaven in volggewas (alfabetisch per volggewas)

Volggewas	voorvrucht
Allium	aardbei
Begonia	bladrammenas
Crocus	freesia
Dahlia (5x)	hyacint (4x), aardappel
Fritillaria	lelie
Hyacint (3x)	Muscari (2x), hyacint
Iris (Hollandse) (3x)	gras, muscari, tulp
Lelie	lelie
Muscari (2x)	hyacint (2x)
Narcis	chionodoxa
Scilla (3x)	hyacint, iris (Hollandse), lelie
Triteleia	iris (Hollandse)
Tulp (2x)	gras (2x)
Zantedeschia (7x)	zantedeschia (3x), astilbe, mirabilis, tulp, ui

Minder dan 25% van de bedrijven geeft aan altijd bolgewassen te hebben als voorvrucht. Als andere voorvruchten zijn genoemd: grasland (20%), akkerbouwgewassen (19%), tussengewassen en groenbemesters (14%), groentegewassen (13%), vaste planten/zomerbloemen (3%) en weet niet (7%). Er vond dus vrij veel vruchtwisseling plaats met niet-bolgewassen. Op de vraag of die niet-bolgewassen problemen gaven met bacterieziektes antwoordde 70 tot 90% van de kwekers dat ze niet wisten of deze voorvruchten van invloed waren of niet.

3.3.5 Overige vragen en opmerkingen

Op de vraag welke teeltmaatregelen problemen met bacteriën verergeren kwamen naast de opgegeven suggesties nog diverse antwoorden. In tabel 3.4 staat hoe vaak een maatregel is genoemd als oorzaak voor het verergeren van bacterieziektes. Vooral beregenen van een gewas en niet snel drogen vindt men de oorzaak van bacterieziektes.

Tabel 3.4 Het aantal malen dat een maatregel is genoemd die bacterieziekte zou doen toenemen
De maatregelen met een streepje zijn in de enquête genoemd, de overige door bedrijven zelf aangegeven

maatregel	toename
- beregenen	98
- niet snel genoeg drogen	93
- grootschalig rooien en verwerken	53
- toename landhuur/verhuur	16
waterpeil	13
warm vochtig weer	12
slechte structuur land	12
koud/nat klimaat	9
veel stikstof strooien	8
beschadiging	5
te warm drogen	4
hoge verwerkingstemperatuur, laat rooien, verspreiding door machines	3
hakselen/composterend/verwaaien	3
oudere partij meer last (Zantedeschia, Muscari, Eranthis, Dahlia)	3
snel drogen, nachtvorst, gewasschade, nog laat in seizoen stikstof strooien	2
sprituen bestrijdingsmiddelen	2

Opvallend is dat toename landhuur/verhuur is genoemd als oorzaak van toename van problemen terwijl in tabel 3.5 te zien is dat deze maatregel ook werd genoemd als maatregel om problemen te beperken. Vermoedelijk zien de voorstanders in vergroting van de vruchtwisseling een kans om de problemen te beperken terwijl de tegenstanders juist voorvruchten zien als oorzaak voor meer problemen.

Tabel 3.5 Het aantal malen dat een maatregel is genoemd die bacterieziekte zou doen afnemen
De maatregelen met een streepje zijn in de enquête genoemd, de overige door bedrijven zelf aangegeven

maatregel	afname
- snel drogen	90
- ruimere vruchtwisseling	60
goede knollen, selectie, weefselkweek, besmet partij opruimen	19
niet spoelen	12
- toename landhuur/verhuur	10
op tijd rooien	6
voorkomen beschadiging	3
bereggenen	2
grootschalig rooien en verwerken	2

Daarnaast werd door 45% van de kwekers nog zeer veel opmerkingen gemaakt en suggesties gedaan waar naar hun mening de problemen vandaan kwamen enz. De opmerkingen hebben onder andere betrekking op: water - spoelen, schonen - drogen - verwerken, bedrijfshygiëne, bereggenen - watergeven, bemesting, vruchtwisseling.

Soms zijn het concrete voorbeelden waarbij men toe- of afname van problemen zag. Soms zijn het ook vragen om onderzoek of bepaalde zaken verband houden met elkaar.

3.4 Conclusies en discussie enquête

- De enquête was representatief gezien de grote respons (> 30%), het grote areaal van 80% van de respondenten die dat hebben opgegeven (885 ha), de 49 verschillende geslachten bolgewassen die ze telen en de mate waarin alle regio's in Nederland zijn vertegenwoordigd.
- Circa 60% van de kwekers gaf aan last te hebben gehad van bacterieziektes. Daarnaast is door een grote groep (15 tot 20%) aangegeven dat het niet altijd duidelijk is of het rot dat men ziet is veroorzaakt door bacteriën.
Vooral grote bedrijven geven aan bacterieziektes tegen te komen. Onduidelijk is of dat komt door de bedrijfsgrootte, de aanwezige deskundigheid op grotere bedrijven, of de gewaskeuze.
De meest frequent genoemde gewassen waar men last heeft van bacterieziektes zijn de bekende gewassen (*Zantedeschia*, *Muscari*, *Dahlia*), inclusief hyacint en Hollandse Iris. Bij de bijzondere bolgewassen zijn gewassen genoemd waarvan bekend is dat er bacterieziektes in kunnen voorkomen maar ook gewassen waarbij dit officieel nooit is vastgesteld. Naar aanleiding van deze enquête zijn monsters onderzocht van gewassen waarin nog niet eerder aantasting door bacterieziektes zijn vastgesteld. Een aantal daarvan bleken inderdaad te zijn aangetast door *Erwinia*.
- Circa de helft van de bedrijven spoelde één of meer gewassen na het rooien. Naarmate het bedrijf groter is werd meer gespoeld. De gewassen waarvan men vermeldde dat ze last hebben van bacterieziektes werden veelal niet gespoeld. De Hollandse Iris vormde daarop een uitzondering, die werd wel veel gespoeld. Slechts 12% van de bedrijven die spoelen zeiden last te hebben van bacterieziektes sinds ze zijn gaan spoelen. Toch geeft 30% van de spoelende bedrijven aan dat ze een of meer gewassen niet meer spoelen vanwege problemen met bacterieziektes. Indien men stopte met spoelen van een gewas nam in 75% van de gevallen de problemen met bacterieziektes af. Vanuit de praktijk wordt duidelijk een verband gelegd tussen spoelen en bacterieziektes.
- Bollen werden veel op vreemd land geteeld (huurland). Slechts weinig mensen geven aan (7%) dat er voorvruchten zijn die problemen geven. Daarbij worden vooral bolgewassen genoemd. Slechts 25% van de bedrijven geeft aan een vruchtwisseling met alleen bollen te hebben. Dat betekent dat erg vaak gras of akkerbouwgewassen als voorvrucht dienden. Daarvan is niet bekend of dit problemen veroorzaakt.

- De bedrijven voelden zich sterk betrokken bij de bacterieproblematiek. Op de vraag welke omstandigheden bacterieziektes doen toenemen of afnemen zijn veel mogelijkheden aangegeven naast de in de enquête genoemde suggesties.
Men zag een toename door beregenen, niet snel genoeg drogen na rooien en grootschalig rooien en verwerken. Daarnaast is ook aangegeven dat de problemen groter worden door: meer landhuur en -verhuur, niet goed beheersen van het waterpeil, warm en vochtig weer, slechte structuur van het land, een nat/koud klimaat en te veel stikstof strooien.
Om problemen te laten afnemen zag men vooral mogelijkheden in snel drogen, ruimere vruchtwisseling, goede partijen aanhouden - selectie - besmette partijen opruimen, niet spoelen en toename landhuur/verhuur.
Men keek verschillend tegen landhuur aan. Aan de ene kant vergroot dit de problemen doordat men op vreemd land komt met voorvruchten die mogelijk problemen veroorzaken. Anderzijds zorgt landhuur voor een ruimere vruchtwisseling met afnemende ziekteproblemen als gevolg. Op basis van de uitslag van de enquête is men vooral bang voor de negatieve effecten van landhuur.
- Door de vele opmerkingen en suggesties die zijn gemaakt ontstond de indruk dat het probleem groter is dan in eerste instantie werd gedacht en dat men volop bezig is te zoeken naar mogelijkheden om de problemen te verkleinen.

3.5 Poster

Op advies van de begeleidingscommissie is dit project gestart met het ontwerpen van een poster (oplage 2000). Dit is bedoeld voor een in-één-oogopslag geven van praktijkinformatie op het bloembollenbedrijf; deze posters zijn in 2004 rondgestuurd en veelal opgehangen op de bedrijfsvloer (Fig. 3.1). De gegevens zijn verkregen uit de ervaringen en kennis die bij aanvang van dit project vanuit de praktijk, literatuur en uit eerder onderzoek verkregen zijn. De poster is door PPO bewerkt en gebruikt voor voorlichting richting Freesia-telers, die eveneens met Erwinia-problemen te maken hebben.

Het aantal verstuurde posters bedroeg ongeveer 1200 naar Zantedeschia-, hyacinten-, iris- en andere telers (mailing via het adressenbestand van PT). Via Open dagen en lezingen in de loop van het project zijn er nog een 100-150 afgegeven aan belangstellenden. LTO groeiservice heeft ruim 20 Erwinia-posters opgehaald voor landelijke Iris- en Hippeastrum commissies.

Zó voorkom je een Erwinia-aantasting

Een combinatie van beschadiging, vocht en hoge temperatuur vormt het grootste gevaar.

Let daar op bij rooien, drogen en verwerken.

Op het veld

Grond en bemesting

- Voorkom tekort of overmaat aan water.
- Teel niet op (te) fijn zand.
- Strooi niet te veel of te laat stikstof.
- Zorg voor voldoende kali.
- Composteer goed.

Voortvrucht

- Vermijd een door Erwinia aangetast gewas als voortvrucht.
- Bladrammenas lijkt een veiliger tussengewas dan gras.



Bereggen

- Beregen, indien noodzakelijk, uitsluitend vroeg in het seizoen.
- Beregen niet bij hoge temperatuur. (beregening en gewasbeschadiging vergroten de kans op Erwinia.
- Zantedeschia: wekelijks beregenen lijkt minder Erwinia-problemen te geven, dan incidenteel (veelal te laat) beregenen.

Hakselen

- Voorkom dat bij hakselen verspreiding optreedt naar omliggende percelen.
- Afslepen, afschuiven enz. heeft bij verspreidingsgevaar de voorkeur.

Rooien en drogen

Rooien

- Root direct na loofverwijderen.
- Root op tijd (de best gegroeide bollen zijn mogelijk gevoeliger).
- Op voorraad rooien kan, maar niet bij regen en felle zon.
- Hyacint en iris: root bij lage temperatuur onder droge omstandigheden.



Spoelen

- Spoelen vergroot de kans op verspreiding van en aantasting door de Erwinia-bacterie sterk; dus niet spoelen is veiliger.

Drogen

- Droog direct na rooien en spaar kisten niet eerst op.
- Droog snel en bij de laagst mogelijke temperatuur.
- Hyacint: in gaasbakken buiten op de wind of voor de droogwand met zoveel mogelijk lucht en zo weinig mogelijk warmte.
- Zantedeschia: na rooien snel drogen bij 17-20°C.



Verwerking, teelt en handel

Verwerking

- Beschadiging geeft een opening voor de bacterie en geeft vocht. Beperk dit zo veel mogelijk door zo min mogelijk machines te gebruiken. Maak machines schoon vóór een andere partij wordt verwerkt.
- Vermijd verwerking bij hoge temperatuur (warmer dan 25°C), vooral in combinatie met hoge RV (meer dan 75 %).
- Droog na elke verwerking de bollen bij een zo laag mogelijke temperatuur.
- Verwerk de bollen niet direct na rooien maar pas als ze goed droog zijn (dus zo laat mogelijk).
- Wacht met verzending tot enkele dagen na verwerking zoals inpakken en tellen. Zo wordt duidelijk of bij aflevering deze partij door Erwinia aangetaste bollen (leeglopers) bevat.
- Droog altijd na.
- Zantedeschia: Verwerk de knollen als ze goed droog zijn (enkele weken na het rooien).



Fust

- Stem het type fust af op het droog- en bewaarsysteem.

Uitzoeken

- Hyacint en iris: bij een geconstateerde aantasting leidt direct uitzoeken vaak tot meer aantasting.

- Droog de bollen eerst goed.
- Zoek ze niet te snel opnieuw uit (het uitzoeken moet bij voorkeur vlak voor het planten bij een zo laag mogelijke temperatuur gebeuren).
- Droog na dit uitzoeken weer goed bij een zo laag mogelijke temperatuur!

Afleveren

- Lever pas af als de bollen goed droog zijn en niet direct na verwerking.
- Leveranciers en afnemers moeten goede afspraken maken over ontvangst, bewaren, nadrogen en fust.
- Weet wat de risico- partijen zijn en ga daar extra zorgvuldig mee om.



En verder nog...

Ontsmetting

- Het reinigen van fust door middel van koken of ontsmetten is een goede hygiënische maatregel.
- Ontsmettingsmiddelen voorkomen alleen verspreiding van de bacterie; in de bol aanwezige Erwinia-aantasting wordt juist hierdoor gestimuleerd.
- Hyacint: ontsmetten tegen roet na sorteren voor de heetstook kan tot meer Erwinia-aantasting leiden. De bij PPO Bloembollen beschikbare roettoets kan helpen om onnodig ontsmetten te voorkomen. Voeg tegen verspreiding altijd 1 % formaline toe.



Heetstook

- Hyacint: mogelijk kan te snel afkoelen na de heetstook extra risico's inhouden, te langzaam afkoelen echter verhoogt de kans op heetstookschade. Bij verwerking na de heetstook de bollen bij voorkeur zo kort mogelijk voor planten verwerken; de temperatuur voor verwerken eerst verlagen tot onder de 25°C.

Plantgoed

- Plantgoed dat een aantasting heeft zal in de nateelt ook meer kans geven op een aantasting.
- Geef daarom alle aandacht aan de maatregelen ter voorkoming van een aantasting.
- Iris: vernietig plantgoed van een partij waarvan in het leverbaar regelmatig veel aantasting zit.

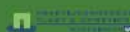
Deze aanwijzingen zijn gebaseerd op voorlopige praktijk- en onderzoekservaringen.

Lees meer in:

BloembollenVisie 31, 32 en 33 (2004) voor hyacint
BloembollenVisie 7 (2003) voor Zantedeschia
BloembollenVisie 14 (2003) voor iris

Meer informatie:

PPO Bloembollen, Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse, tel. 0252-462121
E-mail: peter.vreeburg@wur.nl of joop.vandoorn@wur.nl



Productie: Hap Tulpbouw

Fig. 3.1 De *Erwinia*-poster, zoals rondgestuurd in 2004

4 Identificatie en detectie van *Erwinia*

4.1 Doel van dit onderzoeksdeel

Het gevoelig, specifiek en liefst ook snel (binnen enkele uren tot enkele dagen) kunnen identificeren en detecteren van *Erwinia*-soorten is een voorwaarde om in staat te zijn om naast kenmerkende symptomen (natrot, verwelking, uitval van planten) ook in symptoomloos bolmateriaal te kunnen vaststellen of *Erwinia* de veroorzaker is. Dit kan op verschillende wijzen; al deze methoden hebben hun voordelen en nadelen. Voor een goede identificatie is het belangrijk om te weten wat de eigenschappen van deze soorten zijn en hoe deze hierop zijn ingedeeld (taxonomie) en waarop men deze op grond hiervan kan onderscheiden. De laatste jaren is de taxonomische indeling van vooral *Erwinia chrysanthemi* gewijzigd. Het aantonen van een *Erwinia*-besmetting kan via bemonstering en identificatie of detectie van geïsoleerde of nog aan het plantmateriaal gebonden bacteriën. Ook zijn er mogelijkheden om via symptoomanalyse, al of niet zichtbaar voor het blote oog, uitspraken te doen over een aantasting. De technieken die hiervoor in aanmerkingen komen zijn:

1. kweek van *Erwinia* en herkenning op (speciale) kweekplaten (agar met toevoegingen)
2. verzamelen en karakterisatie van isolaten (sequentieanalyse, merkers zoals RecA, DnaX),
3. taxonomie: indeling van *Erwinia*-soorten in de genera *Dickeya* en *Pectobacterium*, ook via DNA sequentieanalyse)
4. serologische technieken (ELISA, Luminex)
5. PCR (standaard of real-time)
6. MIPS (Multiple Imaging of Plant Stress)

4.2 Materialen en Methoden

De gebruikte technieken worden kort toegelicht en voor details verwezen naar bestaande publicaties of rapporten.

4.2.1 Kweek van bacteriën en herkenning

Gebruikt zijn, naast een standaard voedingsbodem (Nutrient Yeast Agar, Oxoid) een semiselectieve voedingsbodem met pectine: CVP. Deze is beschreven en heeft het voordeel dat bacteriën welke pectinasen produceren (zoals Ech, Ecc en Eca) putjes maken (Van Doorn, BloembollenVisie 2005) en zo worden aangetoond.

Er zijn meerdere media beschreven in de literatuur (Bdliya *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006, Cother *et al.* 1980). Er is gebruik gemaakt van een pectine, afkomstig uit Frankrijk (Helias).

4.2.2 ELISA

Voor de ELISA op *Erwinia chrysanthemi* is gebruik gemaakt van een antiserum van Plant Research International met de concentraties zoals aangegeven door PRI. Het gebruikte protocol was van Peters *et al.* (2007). In essentie werd voor de ELISA-toets met γ -globuline en conjugaat Ech van PRI:

- per well 100 μ l verrijkingsmedium + 100 μ l monstersap (niet gecentrifugeerd).
- plaat overnacht in 24° stoof.
- wassen, conjugaat 3 uur en 1 uur substraat
- doormeten bij 405 nm

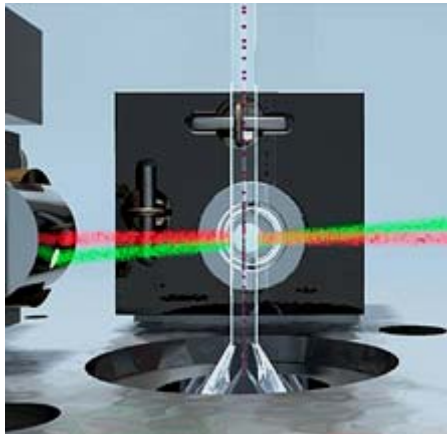


Fig. 4.1 Een weergave hoe lasers gelabelde bolletjes kunnen meten bij Luminex

Deze techniek is uitgevoerd door PRI (J.M. van der Wolf en medewerkers) en berust op het scannen van monsters via een dunne buis waar fluorescente microbolletjes via lasers worden afgelezen. Microbolletjes worden gecoat met (in dit geval tegen Ech) antiserum, en toegevoegd aan ruw plantensap, verdacht van *Erwinia*-besmetting. Vervolgens wordt na enkele was- en incubatiestappen fluorescent anti-Ech antilichaam toegevoegd. Bolletjes en fluorescentie (alleen dus wanneer Ech aanwezig was) worden dan via lasers en gevoelige meetapparatuur waargenomen; deze methode is kwantitatief en eventueel geschikt om meerdere soorten bacteriën tegelijkertijd te meten (Peters *et al.* 2007). Deze techniek is getest naast ELISA en PCR voor identificatie- en detectie van Ech (van Doorn *et al.* 2006).

4.2.3 PCR

Deze techniek berust op het selectief kunnen vermeerderen van een gekozen stukje DNA (target-gen) met behulp van twee stukjes kunstmatig gemaakte enkelstrengs DNA (primers) die het target flankeren. Het vermeerderen gebeurt door middel van een enzym (polymerase) die kopieën maakt van het target (amplicons) in een geconditioneerde omgeving (speciale buffer met magnesium en nucleotiden) bij bepaalde temperaturen (Van Doorn *et al.* 2001).

Voor *Erwinia* zijn een aantal primers voor diverse groepen *Erwinia* beschreven in de literatuur; enkele bleken niet of niet goed werkzaam te zijn. Dit is gebleken in het onderzoek binnen dit project; hierin is samengewerkt met PRI wat betreft de ontwikkeling van real-time PCR primers.

Deze methode maakt gebruik van zg. primers die specifieke stukjes DNA van (in dit geval) de *Erwinia*-groep, of van *Erwinia*-soorten (*Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*) en subsoorten (*E. carotovora* subsp. *carotovora* en subsp. *atroseptica*) herkennen. Voor een nadere beschrijving van PCR: van Doorn *et al.* 2001. In de keuze en het gebruik van primers om *Erwinia*-soorten en subsoorten aan te tonen is overlegd binnen dit project met Plant Research International WUR (Jan van der Wolf en medewerkers).

4.2.4 Real-time PCR

Voor een gedetailleerde beschrijving van deze kwantitatieve PCR-techniek zie hoofdstuk 7 van Moleculaire Diagnostiek (Niesters, 2001). Dit type PCR is gewenst door o.a. de Bloembollenkeuringsdienst vanwege zijn hogere betrouwbaarheid en snellere uitvoering en geschiktheid voor vaste protocollen. Het is gebaseerd op het maken van zg. probes die voorzien zijn van een fluorescerend molecuul dat gaat fluoresceren wanneer deze probe een stukje DNA herkent dat vermenigvuldigd wordt in PCR (het amplicon). Hoe meer amplicons gevormd worden, hoe meer fluorescentie (licht) er vrijkomt. Dit kan gemeten worden in het real-time PCR-apparaat via fotocellen en weergegeven als een grafiek. Omdat dit proces deels lineair is, kan men hiermee (semi-) kwantitatief werken; bovendien hoeven de reactievaatjes waar deze reactie zich afspeelt, niet geopend te worden wat de kans op fouten vermindert.

De PCR reacties zijn uitgevoerd in 20 µl reactievolume (lichtdoorlatende microtiterplaatjes) met commercieel verkrijgbare mastermix (BioRad Mastermix), een primerconcentratie van 300nM per primer en een (indien geen SYBERGreen-reactie) probeconcentratie van 250nM.

Per PCR-reactie: 10 uM forward en 3 uM backward primer (10 x verdunning van de stockoplossing van 100 uM Referentie-isolaten van *Erwinia*: Ecc (LMG2408); Eca (LMG2392), Echr (LMG2804).

PCR profiel: 2-staps amplificatie bij 58 en 72 °C (40 x 20 " 95 °C, 20 " 58° C, 20 " 72 °C);

1-staps amplificatie bij 60 °C (40 x 15 " 95 °C denaturatie, 60 " 60 °C).

De analyses werden uitgevoerd in triplo, welke in de zelfde run geanalyseerd werden. De amplificatie reacties werden uitgevoerd op een Stratagene MX cyclus. De dataanalyse en de Cycle threshold (C_T) berekening werden uitgevoerd met Stratagene software. Deze C_T waarde werd gebruikt als maat voor de hoeveelheid DNA in het monster. En maakt kwantificering mogelijk.

Voor het bepalen van het lineaire gebied van de amplificatiereactie zijn 10 tot 10.000X verdunningen gemaakt van het DNA. De, na de reactie, berekende C_T waarden werden uitgezet tegen de verdunningsfactor

4.2.5 MIPS

MIPS (Multiple Imaging of Plant Stress) is een speciale meetmethode die tegelijkertijd fluorescentie (veroorzaakt door bv. stress door beschadiging of ziekteaancontaminatie) en zichtbare kleuren in planten kan bepalen. Feitelijk wordt de vitaliteit van plantenweefsel bepaald; fluorescentieverandering van chlorofyl zijn hier vaak mee gecorreleerd. Deze techniek wordt gebruikt om in een vroeg stadium bij planten bepaalde ziektes vast te stellen.

De apparatuur bestaat uit gevoelige camera's, waarbij via lasergeïnduceerde fluorescentiescanning plantmateriaal wordt onderzocht op afwijkende signalen. Het grote voordeel van deze methode is, dat deze niet-destructief is en dus op levende planten bruikbaar is.

4.2.6 DNA sequentieanalyse van (onbekende) bacterie-isolaten

DNA sequentieanalyse is de techniek om de identiteit van organismen (in dit geval: is het *Erwinia* of een andere bacteriesoort?) vast te stellen. Hiertoe wordt via PCR het zg. 16 S DNA vermenigvuldigd en geïsoleerd, waarna de DNA basenvolgorde (unieke genetische codes) wordt bepaald via zg. DNA base volgordes (ACGCCTTT enz.) en deze codes te vergelijken met databestanden zoals GenBank (de Amerikaanse database), DDJB (de Japanse DNA database) of EMBL, de Europese DNA databank. In GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zijn zeer vele DNA-sequenties van allerlei organismen opgeslagen, waaronder die van *Erwinia* en andere bacteriesoorten. Op deze wijze is vast te stellen of een onbekende, uit ziek plantmateriaal geïsoleerde bacterie een *Erwinia*-soort is of een andere (schadelijke) bacterie.

4.3 Resultaten

4.3.1 Klassificatie: nieuwe indeling van *Erwinia*-soorten en subsoorten

In de bloembolgewassen werden feitelijk vijf *Erwinia*-soorten aangetroffen, waarvan twee de grootste schade veroorzaken (Tabel 4.1: *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*). Door reclassificatie door taxonomen is de situatie gewijzigd (Samson *et al.* 2004; Gardan *et al.* 2003).

Tabel 4.1 *Erwinia*-soorten vroeger en nu

<i>Erwinia</i>-soort	Nieuwe benaming	bijzonderheden
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Heel diverse soort, het zg. “oude witsnot”
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Weinig diverse soort, vormt een probleem (zwartbenigheid) in aardappel; wordt weinig/niet aangetroffen in bloembollen
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Dickeya</i> spp.: <i>D. dianthicola</i> <i>D. zeae</i> <i>D. chrysanthemi</i> <i>D. dadanthi</i> <i>D. paradisiaca</i> <i>D. dieffenbachiae</i>	Het zg. agressief snot dat de laatste jaren is opgedoken in de bollensector. Het is nog onduidelijk welke soort (-en) nu voorkomen in de verschillende bolgewassen.
<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>Erwinia rhapontici</i>	Hyacint necrose
<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	Er zijn zowel pathogene – als niet-pathogene isolaten

4.3.2 Specifieke media

Gebruikt zijn, naast een standaard voedingsbodem (Nutrient Yeast Agar, Oxoid) een semiselectieve voedingsbodem met pectine: CVP. Deze is beschreven en heeft het voordeel dat bacteriën met pectinases (zoals Ech, Ecc en Eca) putjes maken.

Er zijn meerder media beschreven in de literatuur (Lee *et al.* 2006); ook wordt het pectine door meerdere firma's geleverd. Het probleem is, dat pectine uit veel verschillende substraten te maken is. Belangrijk is echter of dit pectine goed door *Erwinia*-soorten afbreekbaar is, de groeisnelheid niet beïnvloedt en of de groeiplaten niet te zacht worden na afbraak van dit bestanddeel. Na vergelijkend onderzoek bleek dat van Helias door de goede eigenschappen van dit type pectine de beste. Dit kwam overeen met bevindingen van Plant Research International (persoonlijke mededeling van der Wolf 2005). Nadeel is dat dit type pectine (nog) niet commercieel verkrijgbaar is en we afhankelijk zijn van uitgifte door de onderzoekster.

Als voorkweek wordt dit medium ook gebruikt, zoals beschreven (Peters *et al.* 2007). Er wordt bij 28 °C stilstaand gekweekt gedurende 2 dagen; onder de (semi-) anaerobe omstandigheden groeit *Erwinia* (veel) beter dan andere bacteriën zodat er sprake is van semiselectieve kweekcondities.

Verder onderzoek naar het effect van verschillende soorten en merken pectine wordt uitgevoerd binnen het project “Protocollering detectie *Erwinia* in bolgewassen” (PT13061).

Om te proberen bij eventuele menginfecties met zowel Ech als Ecc specifiek Ech te isoleren kan menspecifieke voedingsbodem maken met het antibioticum erythromicine.

Volgens literatuur (Perombelon *et al.* 1985) heeft toevoegen van erythromycine aan CVP medium (350 µg/plaat 10 ml) en/of kweken bij 37°C tot gevolg dat alleen Ech kolonies uitgroeien. In medium, gemaakt met erythromycine is dan vanaf gewone CVP en NYA agarmedium een reinstrijk gemaakt. Door dit te herhalen is meestal Ech rein te isoleren (controle via PCR).

4.3.3 Collectie van isolaten

Uit diverse bolgewassen zijn de afgelopen vier jaar *Erwinia*'s geïsoleerd en gekarakteriseerd middels uitplaten (semiselectief medium), PCR en in een aantal gevallen ook ELISA (Ech). In het geval van isolatie via uitplaten op media zijn ook andere organismen gevonden die rotverschijnselen geven (vooral uit monsters van rot bij hyacint). Een overzicht van de resultaten is weergegeven in Tabel 4.2.

Tabel 4.2. *Erwinia*-isolaten, verzameld gedurende 2004-2007 uit diverse bolgewassen

Monster uit:	Aantal isolaten	Ech	Ecc	Andere organismen
hyacint	134	61	33	<i>Pseudomonas</i> , <i>Fusarium</i>
Muscari	9	5		
Zantedeschia	7	2		
iris	11	4	2	
Allium	5		1	<i>Pseudomonas?</i>
Dahlia	3	3		
Freesia	3	1		<i>Fusarium</i>
Narcis	3	1		<i>Fusarium</i>
Crocus	1			
Brodea	1	1		
Amaryllis	3	2		
Ornithogalum	2		2	
Colocasia	1		1	
Triteleia	1	1		
Gladool	1			
Oxalis	1			
Anemone	3	2		

Er zijn ook irismonsters geanalyseerd binnen een ander project: (PT 330921 zachtrot in iris); deze monsters met rotverschijnselen bevatten voornamelijk *E. chrysanthemi* en in veel mindere mate Ecc. In het algemeen is er de laatste jaren veel meer *E. chrysanthemi* gevonden dan in voorgaande jaren; isolaten uit de jaren 1980 waren voornamelijk *E. carotovora* subsp. *carotovora* in hyacint, terwijl in Dahlia voornamelijk Ech werd gevonden. Mogelijk komt dit ook doordat de toenmalige identificatietechnieken minder goed waren.

Opvallend is dat *E. carotovora* niet samen gevonden is met *E. chrysanthemi* in 2004 en 2005; wel in 2006 en 2007.

Bij analyses van op het oog gezonde hyacintenbollen werd in een aantal gevallen Ech gevonden; dit zijn voorbeelden van een zg. latente infectie (symptoomloze planten met een pathogeen).

Een aantal onbekende bacteriesoorten, geïsoleerd uit symptomen zijn nader geïdentificeerd (Tabel 4.3); het valt niet uit te sluiten dat andere bacteriën of schimmels rot kunnen veroorzaken. Dit bleken vooral *Pseudomonas*-soorten te zijn; ook is bij hyacint wel *Xanthomonas* gevonden. De schimmel *Fusarium* werd ook gevonden en kan ook een rot veroorzaken; deze vorm van rot is echter veel droger en is door experts op het oog te onderscheiden. Al deze organismen maken pectinases, enzymen die celwanden afbreken. Ook zg. saprofytische bacteriën zoals *Bacillus* spp., die doorgaans als onschuldige bewoner op het plantenoppervlak leven, kunnen een arsenaal aan celwandafbrekende enzymen bezitten en mogelijk rot veroorzaken (Ochial *et al.* 2007).

4.3.4 Karakterisatie en analyse van *Erwinia*-isolaten

Er is gekeken naar zg. latente infecties in vooral hyacint. Hiertoe zijn gezonde hyacintenbollen (Delft Blue) bemonsterd op verschillende plekken. Een aantal karakteristieke kolonietypen zijn geïsoleerd en onderzocht met behulp van een algemene PCR met primers die het (taxonomisch discriminerende) 16 S rDNA amplificeerde, gevolgd door alignment in een database (EMBL) met zeer veel bacteriële 16 S rDNA-sequenties.

De resultaten zijn weergegeven in Tabel 4.3. Een aantal zg. endofytische bacteriën (niet schadelijk) werden gevonden; ook werd eenmaal Ech gevonden. Dit geeft aan dat *Erwinia* inderdaad aanwezig kan zijn zonder visuele symptomen, maar dat niet uitgesloten kan worden dat ook andere bacteriën zachtrotverschijnselen kunnen geven.

Tabel 4.3 Karakterisatie van onbekende bacteriën, gevonden in gezonde hyacintenbollen (Delft Blue, 2004)

Isolaat uit hyacint	soort	Similarity index*	opmerking
H21B	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.41	Mogelijk <i>Ps. putida</i>
H24	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Klebsiella spp.</i> <i>Serratia subspp.</i>		Drie isolaten/soorten door elkaar
H25B	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Stenotr. maltophilia</i> , <i>Serratia spp.</i>		Drie isolaten/soorten doorelkaar
H27B	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.643	Biotype 3
H28C	<i>Microbacterium spp.</i>	0.785	Coryneforme bacterie
H38B	<i>Cedeceae davisae</i>		
H39C	<i>Rhizobium spp.</i>	0.66-0.68	
H43	<i>Rhanella aquatilis</i>	0.699	
H44	<i>Rhodococcus spp.</i>	0.819	Coryneforme bacterie

* S.I: hoe dichter bij 1, hoe hoger de kans dat dit daadwerkelijk deze bacterie is.

Verder zijn een aantal isolaten van *Erwinia* uit de collectie van PPO gebruikt als referentie; deze zijn gecontroleerd via PCR en via analyse bij PRI.

4.3.4.1 RecA

Voor identificatie van *Erwinia*-isolaten zijn een aantal primersets beschreven, die bij gebruik in PCR bv. Ech kunnen aantonen. Voor een verdere indeling van de isolaten (bv. op agressiviteit, of plantensoortspecificiteit) schieten deze te kort. Hiertoe zijn andere merkers in het genoom geanalyseerd: het recA-gen (Waleron *et al.* 2002) en fingerprinting via zg. REP-PCR. Deze laatste genereert een streepjespatroon, waarmee isolaten van elkaar onderscheiden kunnen worden (<https://www.msu.edu/~debruijn/>). Dit is uitgevoerd door PRI (Speksnijder en medewerkers.).

Via PCR is een deel van het recA-gen geïsoleerd van een aantal *Erwinia*-isolaten uit bloembolgewassen en de DNA-volgorde bepaald. Vervolgens zijn deze onderling vergeleken, ook met isolaten uit aardappel om te zien of er speciale groepen te vinden zouden zijn.

Het leek erop, dat de Ech uit bloembollen verschillen met die geïsoleerd uit de aardappel; deze behoren namelijk niet tot serogroep 1 waartoe de aardappel-isolaten veelal behoren. Voor Ecc worden geen duidelijke sequentieverschillen in het recA-gen gevonden. Dit is momenteel nog in onderzoek. De Nederlandse bloembollenisolaten, tot zover onderzocht, zijn ondergebracht in een zg dendrogram en bij andere isolaten (voornamelijk uit aardappel geplaatst op grond van verwantschap (Fig. 4.2).

4.3.4.2 Karakterisatie van biovars van *Erwinia chrysanthemi* via PCR en ELISA

Een aantal referentie-biovarisolaten van de PD zijn geanalyseerd door PPO. Op deze isolaten zijn zowel PCR als Elisa-toetsen uitgevoerd om te zien of deze met de bestaande toetsmethoden (PCR, ELISA met anti-Ech antiserum) konden worden aangetoond.

Elk isolaat is gekweekt op NYA voedingsbodem, kolonies afgeschraapt in buffer (PBS) en op O.D. 0.1 gebracht. Voor ELISA zijn verdunningsreeksen gemaakt (10^{-1} tot 10^{-4} / 10^{-5}) en gamma globeline en conjugaat van PRI gebruikt. Volgens PPO protocol zijn deze experimenten ingezet en verwerkt en voor PCR de Ech-specifieke primers (ADE₁₊₂ primers) volgens PPO protocol ingezet.

De resultaten zijn te zien in Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Karakterisatie van verschillende biovars van *E. chrysanthemi* met PCR en ELISA

Isolaat	PD code	Herkomst (plantensoort)	Biovar	Elisa-toets	PCR Ech	Opmerkingen
Ech	484	Solanum	5	+	+	
Ech	552	Scindapsus	3	+	+	
Ech	827	Aglaonema	3	+	+	
Ech	846	Dianthus	5	+	+	
Ech	857	Pelargonium	6	-	-	Volgens sequentieanalyse Ecc!
Ech	868	Euphorbia	5	+	-	Volgens sequentieanalyse Ech.
Ech	1073	Dieffenbachia	2	+	+	
Ech	1325	Kalanchoe	7	+	+	
Ech	1344	Syngonium	3	+	+	
Ech	2008	Allium	3	+	z+	
Ech	4712 (= I13 PPO)	Ixia	3?; 6?	-	-	Afwijkend isolaat
Ech	PPO H4 Hyac.PPO	Hyacint	1	nd	+	
Ech	PPO M11	Muscari	1	nd	+	
Ech	Controle LMG 2804	Chrysant	nd	+	+	

(nd = niet uitgevoerd; ? = onduidelijk; - = negatief)

Opvallend is het aantal verschillende biovars; mogelijk clusteren bepaalde biovars bij bepaalde soorten planten (bv. biovar 5 in Solanum en Euphorbia), en heeft dit consequenties voor de mate van agressiviteit/pathogeniteit op andere gewassen (dus: kan biovar 3 hyacint aantasten?). De isolaten 857 en 868 zijn nader onderzocht via sequentieanalyse van het 16 S rDNA-gen. Het isolaat uit Pelargonium bleek een Ecc te zijn; het isolaat uit Euphorbia niet! Dit geeft aan, dat er verschillen binnen Ech bestaan die de identificatie bemoeilijken. De nieuwe taxonomie van Ech in *Dickeya* spp. tekent zich hier af (bv. biovar 2 uit Dieffenbachia is nu *Dickeya dieffenbachiae*). Een verdere verfijning van PCR-analyse is daarom gewenst om er zeker van te zijn dat Ech betrouwbaar en specifiek aangetoond kan worden in plantmateriaal. Het blijkt, dat er een kans is dat bepaalde soorten *Dickeya* niet of slecht herkend worden met standaard primers in PCR (Tabel 4.4, Ech 868 en Ech 2008).

De diversiteit van de *Dickeya*-soorten, ook binnen bolgewassen blijkt ook uit twee vondsten in een narcissencultivar; hieruit werd *Dickeya dadanthii* geïsoleerd. Dit is vastgesteld op rond van het 16 S rDNA-profiel. In narcis echter wordt vrijwel nooit een zachtrotaantasting gevonden, veroorzaakt door *Erwinia* (*Dickeya*). Infectie-experimenten, uitgevoerd binnen een ander project (achtergrondonderzoek Diagnostiek) met deze isolaten op dezelfde cultivar van narcis gaven geen aantasting. Waarschijnlijk staat dit geval op zich en is geen algemeen fenomeen, hoewel het bolgewas *Amaryllis* ook af en toe last heeft van zachtrothinfecties.

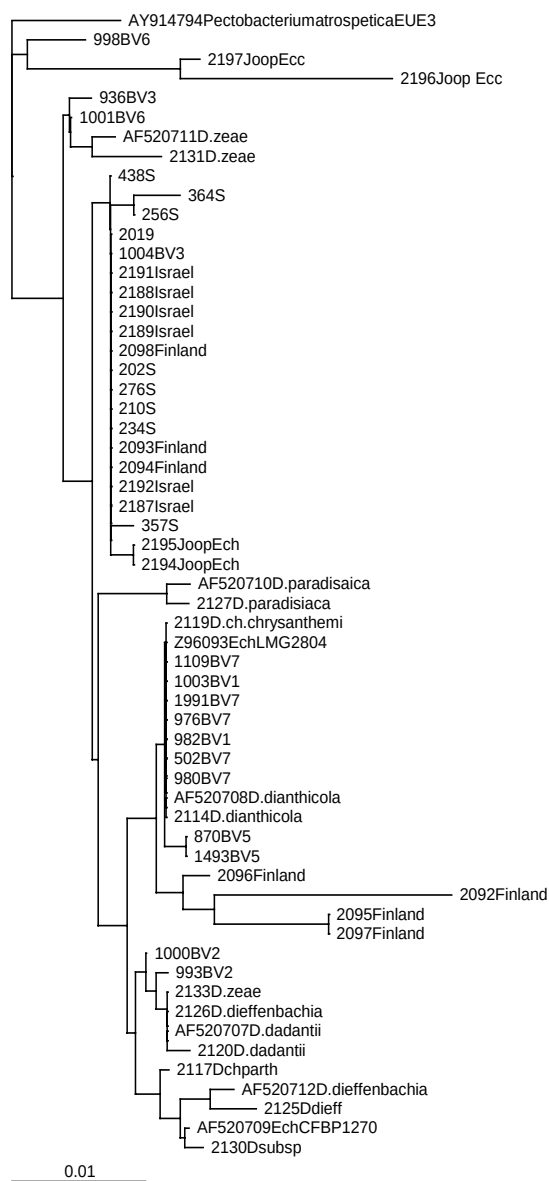


Fig. 4.2 Verwantschapsboom (dendrogram) met hierin weergegeven enkele bloembollenisolaten temidden van aardappelisolaten zoals geanalyseerd door PRL op grond van oa. RecA en DnaX-sequenties

4.3.5 Lokalisatie van Erwinia in bollen: analyse van isolaten van Erwinia uit hyacinten opgeplant in Nederland en Frankrijk

Een aantal malen (2005, 2006) is via DiagnostiekService van PPO gemeld dat er verschillen zijn tussen identieke partijen hyacint (Anna Marie) waarbij een deel in Nederland en een deel in Frankrijk opgeplant is (Bordeaux-gebied).

Bij de Franse opplant werd enkele weken eerder gerooid dan de Nederlandse partij (eind maart); daar bleek toen bovengronds versnotting te zien van de planten en ook bolaantasting. De vraag die gesteld is was: waar ziet Erwinia, welke soort is dit en is er verschil tussen de Franse en Nederlandse ziektebeelden en lokalisatie?

Een aantal monsters van de Franse en de Nederlandse opplant zijn onderzocht op de aanwezigheid van Ecc en/of Ech middels ELISA en PCR.

De conclusie was, dat in 2005 in de Franse hyacinten zowel Ech als Ecc werd gediagnosticeerd, terwijl in Nederland (veel) later alleen Ech is gevonden. Echter, in 2006 is in een vergelijkbare situatie (een partij hyacinten opgeplant zowel in Frankrijk als in Nederland) zoel in het Nederlandse als in de Franse partijdeel Ech en Ecc aangetoond.

4.3.6 ELISA en Luminex

Deze techniek berust, net als bij immunofluorescentie en ELISA, op herkenning van bv. bacteriën met antiserum.

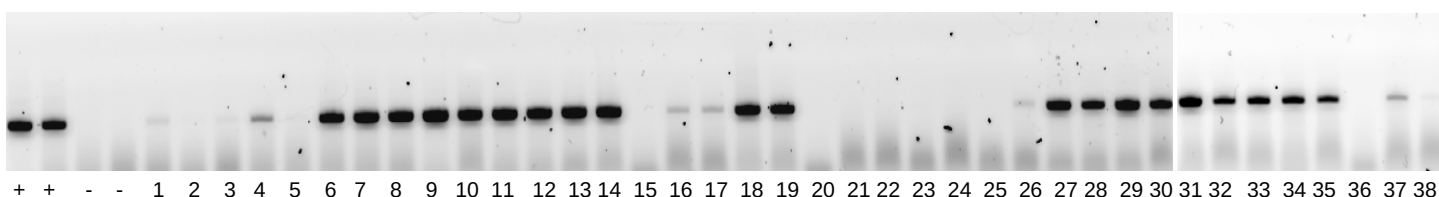
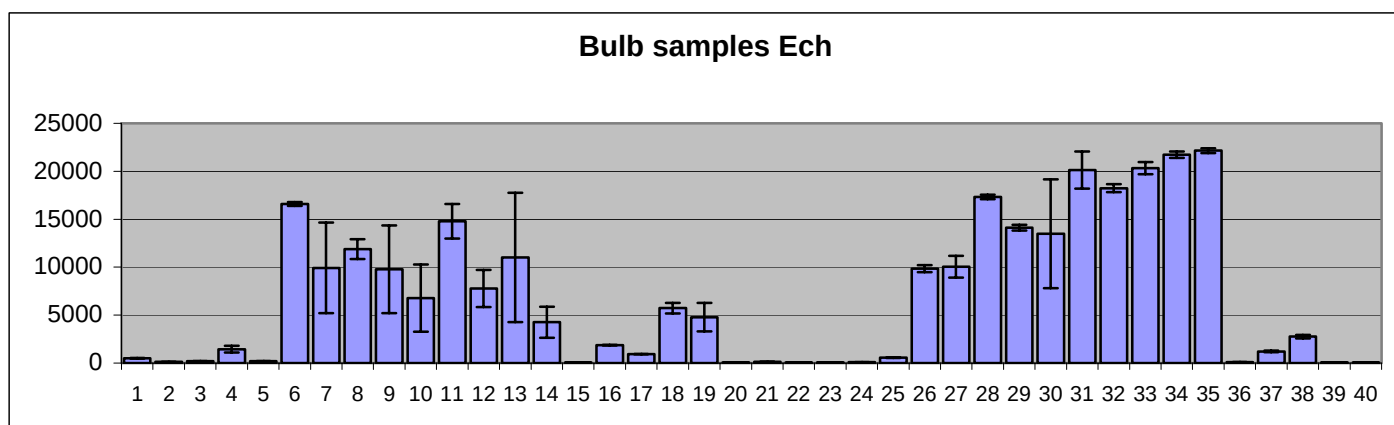


Fig. 4.3. Resultaten van Luminex-analyse van hyacintenbollen met Ech. Hieronder is weergegeven de resultaten, verkregen via PCR (Ech-specifieke primers) na gelelectroforese. (+ = positieve controle; - = watercontrole; 15, 20, 39, 40: alleen buffer).

ELISA is als identificatie- en detectietoetsingsmethode regelmatig toegepast om Ech aan te tonen; omdat er geen (commercieel) antiserum is tegen Ecc (een te diverse groep klaarblijkelijk om een gemeenschappelijk antigen voor serumtargeting te kunnen maken) is veel vaker PCR gebruikt (zie verder).

Luminex is in een aantal experimenten gebruikt om te zien of voor percentage ziektebepalingen deze snellere en veelzijdige serologische techniek toepasbaar is (stresstoetsen hoofdstuk 7; van Doorn *et al.* 2006). Fig. 2 toont de goede correlatie tussen de Ech-bepaling middels Luminex en PCR-resultaten. Hoewel Luminex

slechts enkele malen is gebruikt, is gebleken dat deze iets gevoeliger is dan ELISA (Peters *et al.* 2007), mogelijkheden biedt om aan eenzelfde monster meer soorten bacteriën te bepalen, maar sterk afhangt van de kwaliteit van het antiserum. Gezien de relatief hoge kosten van deze techniek (bolletjes, apparaat, patent) en de afwezigheid van een anti-Ecc serum is momenteel ELISA even goed bruikbaar.

4.3.7 MIPS

Door ziekten kan er stress ontstaan in een plant: afweerreacties en metabolische processen, gericht op het inperken van vreemde stoffen via het binden van toxische stoffen of het afsluiten van delen van de plant via verkurking of versnelde afsterving. Het zou ideaal zijn om dergelijke processen direct aan een plant, en in ons geval, direct aan een bol of knol zichtbaar te maken zonder dat de plant beschadigd wordt door monsternamen. Plant research International heeft een dergelijke techniek ontwikkeld, die zich bewezen heeft voor diverse soorten planten. De techniek is gepatenteerd en wordt uitgebaat door een bedrijf (<http://www.plant-dynamics.nl/index.php>). Met behulp van het zichtbaar maken van stress in een plant door excitatie van chlorofyleiwitten door bv. aantasting door een schimmel (Schapendonk *et al.* 2002) is wellicht vroegtijdige infectie meetbaar.

Voor bloembollen is dit niet onderzocht en zeker niet wat betreft bolmateriaal. Daarom zijn enkele experimenten met besmette partijen hyacintenbollen uitgevoerd (van Doorn *et al.* 2006).

In Fig. 4.4 is te zien, dat ook in gezonde bollen klaarblijkelijk stress aanwezig is, of dat de techniek ook in gezonde bollen signaal geeft. De gebruikte bollen waren met *Erwinia* besmet, zoals visueel en middels PCR aangetoond.

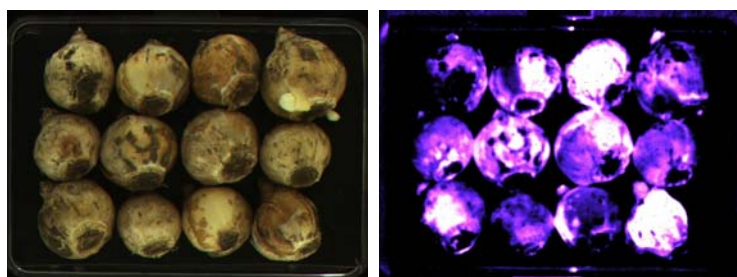


Fig. 4.4. Gezonde Aiolous-bollen visueel (links) en via MIPS-imaging (rechts)

Een tweede poging om verschillen te kunnen aantonen met wel en niet beschadigde bollen en wel en niet aangetast door *Erwinia chrysanthemi* is in 2006 uitgevoerd (Van Doorn *et al.* 2006).

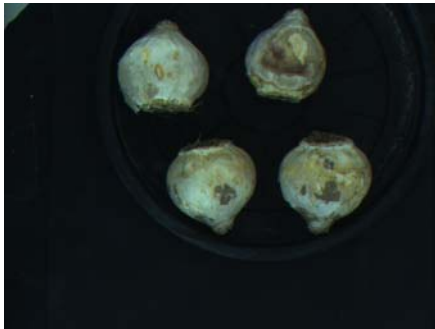
Tabel 4.5 Stress opgewekt bij hyacinten cv. Aiolus (uit 30° bewaarcel; 6 bollen per behandeling; 3 onbehandeld, 3 behandeld zoals aangegeven)

bol	behandeling	resultaat (signaal in MIPS)
1 gezond (Fig. 4 1a)	Geen (controle)	Lichte fluorescentie (Fig.4 1b)
2 (gezond)	Valtest* valplek met viltstift	Lichte fluorescentie
3 (gezond, uit zieke partij) (fig.4 1la)	idem	Idem (Fig4 1lb)
4 (gezond)	Zoals 1 plus injecteren** met buffer	Idem
5 (gezond) (fig.3a)	Zoals 3 plus injecteren** met <i>Erwinia</i> (Ech)	Idem (Fig.3b)
6 (zieke bol)	geen	Idem
7 (gezond, uit zieke partij)	Zoals 2, plus neus geïnjecteerd met <i>Erwinia</i> (Ech)	Idem
8 (zieke bol: hars aan de buitenkant)	geen	Idem

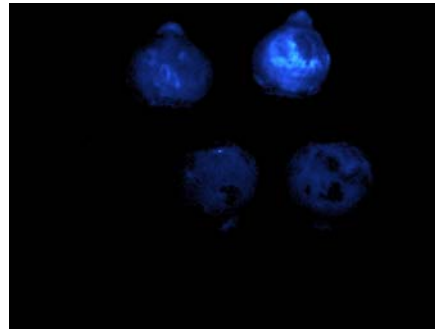
* 2 dagen voor de meting met MIPS laten vallen.

** 100 microliter buffer ingespoten, met viltstift aangegeven

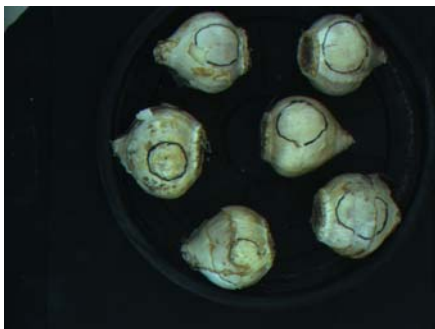
Het bleek, dat er weinig fluorescentie te zien is op de plekken van de bollen waar het zichtbaar zou moeten zijn (valplekken). Zelfs aanprikken om zo *Erwinia* in te brengen leverde geen (extra) fluorescentie op. Ook hars aan de buitenzijde van een gezonde bol gaf geen fluorescentie. De sterkste fluorescentie gaven nieuwe gezonde spruiten in de bol! Dit betekent dat de reacties, gemeten in MIPS, onder de gebruikte instellingen van het apparaat geen correlatie lieten zien tussen signaalhoogte enerzijds en aantasting of stress anderzijds. Waarschijnlijk moeten andere componenten dan chlorophyl benut worden om stress in hyacintenbollen te kunnen waarnemen.



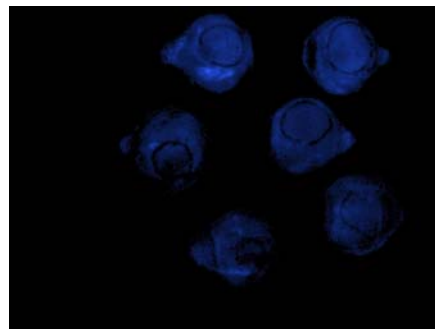
Ia



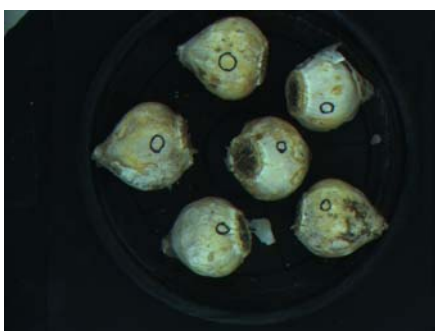
Ib



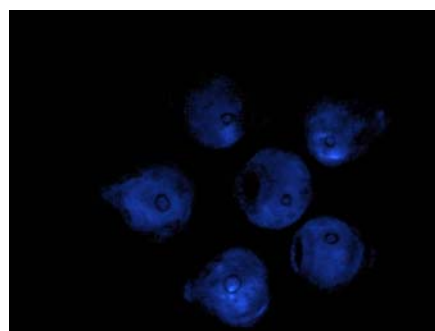
IIa



IIb



IIIa



IIIb

Fig. 4.5 Foto's en MIPS-opnames van hyacintenbollen (*Aiulus*) behandeld volgens tabel 4.5)

4.3.8 PCR (Polymerase Chain reaction) op *Erwinia*

Tabel 4.6 Overzicht van de PCRs om *Erwinia*'s aan te tonen

<i>Erwini</i> -soort	primers	target	amplicon	referentie	opmerkingen
E.c.-groep	Y1, Y2	Pel-gen	434 bp	Darasse <i>et al.</i> 1994	In gebruik
Eca		metalloprotease	389 bp	Smid <i>et al.</i> 1995*	Niet algemeen gebruikt
Eca	ECA1f-ECA2r	repeat	690 bp	De Boer <i>et al.</i> 1996	In gebruik
Ech	ADE1-ADE2	pelADE	420 bp	Nassar <i>et al.</i> 1996	In gebruik
Ecc	EXPCCR- EXPCCF	Mogelijk een periplasmatisch eiwit	550 bp	Kang <i>et al.</i> 2003	Niet betrouwbaar (dit onderzoek)

De primers voor Ecc van Kang zijn uitgebreid getoetst na hun recente publicatie. Gebleken is dat deze het in een aantal gevallen niet werken. De primers bleken slechts een deel van de Ecc-isolaten te amplificeren. Gebleken is ook, dat een van de primers niet goed ontworpen was; er bleek in de publicatie van Kang een fout gemaakt te zijn. Ook door aanpassing van deze forward-primer bleek deze PCR niet betrouwbaar; daarom is deze niet verder gebruikt. Ecc wordt onderscheiden middels een dubbel-PCR (positief voor de Ec-groep, negatief voor Eca). Daar Ecc een heterogene groep vormt, verdient het aanbeveling om mogelijke Ecc te toetsen niet alleen met de Kang-primers, maar ook met Y1-Y2 (positief resultaat) en met de Eca-primers (die dus negatief resultaat moeten geven).

De PCRs op Ech en Ec zijn uitgebreid gebruikt bij de analyse van allerlei monsters binnen dit project. De optimalisatie en validatie van de protocollen voor toepassing bij de (bloembollen-) keuringsdienst ligt binnen het project "protocollering *Erwinia*-toetsen" (PT13061) dat in 2007 is gestart.

4.3.9 Real-time PCR

Deze techniek berust, net als standaard PCR, op het selectief kunnen vermeerderen van een gekozen stukje DNA (target-gen) met behulp van twee stukjes kunstmatig gemaakte enkelstrengs DNA (primers) die het target flankeren onder geconditioneerde omstandigheden en middels de werking van het enzym polymerase. Het verschil ligt in de signalering: in tegenstelling tot standaard PCR kunnen via fluorescent gelabelde probes licht uitgezonden worden, wanneer tijdens de reactie herkenning van het amplicon plaatsvindt (Fig. 4.5).

Er is gewerkt aan real-time PCR met probes (MGB/TaqMan) en met SYBRGreen (een fluorescente stof die aan DNA (en niet speciaal aan een stukje target-DNA) bindt. In samenwerking met Plant Research International en HZPC Metslawier zijn primers en sequenties naast elkaar gelegd om zo de beste te selecteren.

4.3.9.1 TaqMan

Primer en probe ontwerp: de primers en 5'MGB- probes zijn ontworpen met behulp van de Primer express software (Applied Biosystems). Zie Tabel 4.7.

Voor de algemene *Erwinia*-test (*Erwinia*-soorten algemeen) zijn primers en probe voor de *Erwinia*-test ontworpen op het 16S rDNA in een, voor *Erwinia*, conservatief gebied beschreven door Toth *et al.* 1999. De probe en primers zijn zo ontworpen dat op andere Enterobacteriaceën geen product gevormd zal worden.

De primers en probe voor de Ech test zijn ontworpen op het *Pel/D* gen. De ADE primers (Nassar *et al.* 1996) zijn gebruikt in combinatie met de ontworpen MGB-probe.

De primers en probe voor de Ecc test zijn ontworpen op het amplicon beschreven door Kang *et al.* 2003. Voor primer/probe sequenties, zie tabel 4.7.

Primers zijn ontworpen voor Eca mbv. Primerexpress op het amplicon beschreven door De Boer *et al.* 1995

Tabel 4.7 *Erwinia*-soort, primers en probe voor real-time PCR detectie

Test		Forward primer		Reverse primer		MGB probe; 5'-Fluor Label,6-FAM
Erwinia	ErwiniaF2	TGCAAGCGTTAATCGGAATG	ErwiniaR3	CTCTAGCCTGTCAAGTTTGAATGC	ErwiniaP1	CGGTCTGTTAAGTTGGATG
ECH	EchF1	CAGATCAGCGTTCCGTCCA	EchR1	AATTTGCCATTGCTGCCAA	EchP1	CACCACCATCATCGG
ECC	EccF1	TCTTCACATTGGCGCTGGT	EccR1	GCCGACCTTCTATACCGGAAC	EccP1	CGCACCATAAAGC
ECA	EcaF2	TGCGTTAGCCTTTACCGAGG	EcaR2	ACGGAAGGATTTCGCACGTA	EcaP2	CAACCCCGGATTGC

Gekeken is of de ontwikkelde primers en probes goed werken: of de specificiteit van de primers voldoende zijn voor een stamidentificatie op basis van SYBRGreen detectie en bepalen of TaqMan/probe detectie extra kan bijdragen aan de specificiteit van de (semi-kwantitatieve) identificatie van *Erwinia*-soorten die voorkomen in bloembollen.

Eerst is uitgezocht bij welke temperatuur de reacties het beste verlopen en of een eenstaps- dan wel tweestapsreactie (zie Materiaal en Methoden, onderdeel real-timePCR) beter is. Deze zijn uitgevoerd met SYBRGreen (PCR-profiel: 2-staps amplificatie bij 58 en 72 °C (40x 20sec 95°, 20sec 58°, 20 sec 72°C); 1-staps amplificatie bij 60°C (40x 15sec 95°, 60sec 60°C). De resultaten zijn weergegeven in Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Vegelijking van de optimale annealingtemperatuur voor real-time PCR voor *Erwinia*-soorten

Primers	Stammen	58 °C	PCR eff. bij 58°	60° C	PCR eff. bij 60°
Erw alg	Ecc	24.6	73	20.8	94
(F3/R3)	Eca	13.6	79	9.9	96
	Ech	13.6	60	12.6	152
Ec alg	Ecc	17.8	70	16.3	88
(Y1/Y2)	Eca	27.1	84	27.3	78
	Ech	36.2	-	36.2	-
Eca	Ecc	33.9	67	31.5	-
(F2/R2)	Eca	12.8	78	13.6	98
	Ech	-	-	31.3	-
Ech	Ecc	-	-	-	-
(F1/R1)	Eca	-	-	-	-
	Ech	35.1	-	30.8	74

PCR profiel: beide profielen ontliepen elkaar niet erg. De amplificatie van Ech primers op Ech verloopt bij het 1staps 60 °C protocol echter iets beter waardoor dit protocol te prevaleren is.

PCR efficiency: de meeste vallen binnen de acceptatiegrenzen; alleen de amplificatie- efficiency van *Erwinia*-algemene primers op DNA van Ech verliep wat te snel maar dit hoeft geen problemen op te leveren.

Specificiteit: Deze primers geven zelfs op basis van SYBRGreen detectie genoeg specificiteit om deze stammen te onderscheiden.

Real-time PCR Erw algemeen: zoals verwacht detecteerde deze alle gebruikte stammen hoewel Ecc iets minder makkelijk (misschien heeft deze minder copien van het target multicopy gen). Bij gebruik van gelijke DNA-concentraties zou dit nog eens voor een reeks stammen getest kunnen worden.

Real-time PCR Ec alg: De Ech-stam werd zeer zwak geamplificeerd met een Ct-waarde buiten het betrouwbare gebied. Zowel de Ecc- als de Eca-stam werden goed gedetecteerd met een voorkeur voor de

Ecc-stam. Terwijl Erw algemeen Ecc minder goed detecteert is dat met de Ec alg juist omgekeerd. Met een combinatie van Erw algemeen en Ec algemeen kunnen dus conclusies worden getrokken over de identificatie van de stam.

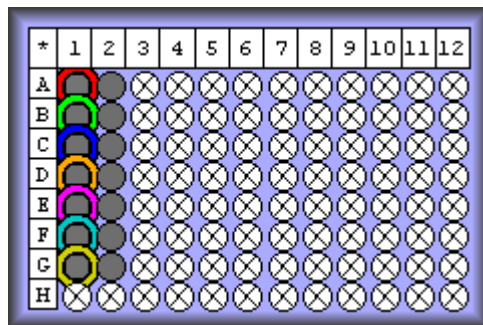
Real-time PCR Eca: deze primer detecteert nog steeds Ecc en Ech maar een veel lagere gevoeligheid dan detectie van Eca. Er zitten 18 Ct-waarden tussen, een zeer duidelijk verschil.

De Ech-primers (zie Tabel 4.8) detecteren alleen Ech-stammen. Het is waarschijnlijk een single copy gen en daarvoor is een redelijke hoeveelheid DNA nodig. Bij te lage verdunningen valt de Ct-waarde niet binnen de 35 cycles. Voor een succesvolle real-time PCR met SYBRGreen op Ech moet een voldoende hoeveelheid template DNA aanwezig zijn.

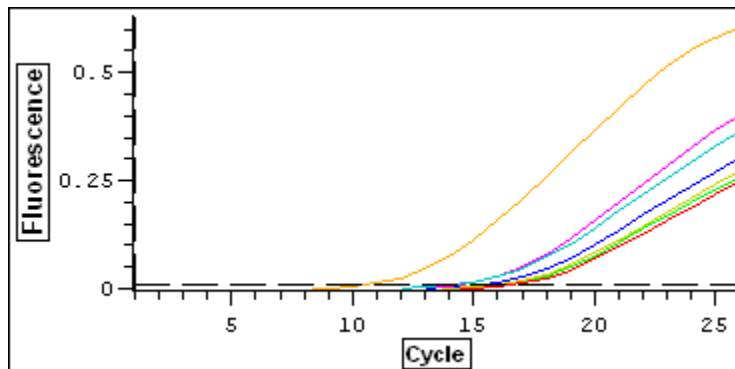
Samenvattend: voor de identificatie van Ecc werken de Erw alg-primers matig, de Ec alg –primers goed, de Eca-primers zeer matig tot niet en Ech-primers werken niet.

Voor de identificatie van Eca werken de Erw alg-primers goed, de Ec alg-primers matig, de Eca-primers goed, en de Ech-primers geven geen reactie.

Voor de identificatie van Ech werken de Erw alg-primers goed, de Ec alg-primers zeer matig tot niet, de Eca-primers zeer matig tot niet en de Ech-primers slechts matig.



A.
 User: Shared
 Data File: C:\Program Files\Opticon Monitor
 2\Users\Shared\Data\Shared20041026_121607.tad2
 Active color: 1 (Run 1: SBG1)
 C(T) Threshold: 0.007350
 Threshold has been set manually.



B.

Well	Well Type	Well Label	C(t)	copies
Run 1: SBG1: Standard A1	Standard	E.chrys. O.D. 0.1	16.368	10000
Run 1: SBG1: Standard B1	Standard	1/10	15.865	1000
Run 1: SBG1: Standard C1	Standard	1/100	15.081	100
Run 1: SBG1: Sample D1	Sample	dna 1/10	10.367	5.42649e-006
Run 1: SBG1: Sample E1	Sample	1/100	14.072	2.51668
Run 1: SBG1: Sample F1	Sample	1/1000	14.050	2.33338
Run 1: SBG1: Sample G1	Sample		15.695	765.422

C. C(T) Control Graph $y = 1.53x + -21.12$; $r^2 = 0.984$

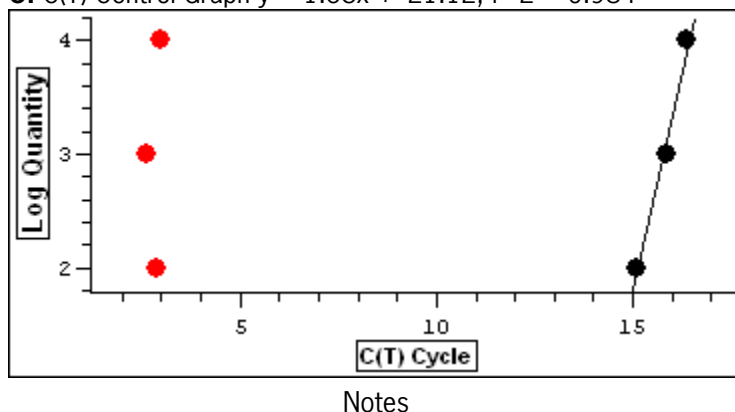


Fig. 4.6 Een voorbeeld van een real-time PCR (SYBRGreen) aan Ech: zowel aan hele cellen als aan gezuiverd DNA
 A = lokalisatie van de reacties in een zg. reactieplaat; B = de geanalyseerde monsters in real time PCR die overeenkomen met de kleur en locatie in de reactieplaat. Na ongeveer 8 reacties (cycles) is er voldoende DNA gemaakt opdat de fluorescentie zichtbaar wordt (geel); de andere reacties (o.a. verdunningen) komen pas na cycle 15 op; C = bepaling van de zgn. Ct waarde (cycle threshold): waarde waarbij het signaal boven de achtergrond uitkomt.

4.3.9.2 Resultaten met TaqMan/MGB probe.

Erwinia-test: de test werkt goed voor het aantonen van Ech en Eca, alle geteste stammen geven een positief resultaat. Enkele Ecc-stammen (5) geven geen goed resultaat. Na het sequencen bleek dat de sequentie van deze stammen afwijkt van de algemene *Erwinia*-sequentie consensus Deze stammen zijn allen geïsoleerd van de bolgewassen hyacint en *Zantheseschia*!

Ech test: bij deze test zijn twee sets primers gebruikt. Naast de gepubliceerde ADE1 en ADE2 zijn zelf-geselecteerde Taqman primers gebruikt, beide sets in combinatie met de MGB-probe (tabel 4.7). De reden voor het gebruik van twee sets primers is de verschillen in sequentie tussen de verschillende *Pe*-genen in

Ech. Slechts één van de geteste stammen geeft een negatief resultaat in beide taqman tests. De identiteit van deze stam (IPO1999) zal mbv. conventionele tests gecontroleerd worden.

Ecc test: een deel van de geteste Ecc-stammen geeft een negatief resultaat in de Ecc-test. Van de 19 geteste stammen geven 9 een negatief resultaat. Een deel van deze stammen was echter ook negatief in de algemene Erwinia-test. Na sequencen van het 16S rDNA bleek dat de sequentie afweek t.o.v. gepubliceerde sequenties.

Eca test: na sequentieanalyse van de gebruikte teststam en 15 andere Eca-stammen bleek dat de teststam en stam IPO 1162 een afwijkende basevolgorde hebben in de sequentie waar de probe ontworpen was. Een nieuw set primers en probe is ontworpen. Eén stam wijkt af; IPO 1448, geïsoleerd van een wilde variant aardappel, geeft een C_T van 30. Het zou kunnen dat het geen Eca-stam is. Deze conclusie wordt ondersteund door het positieve resultaat met de Ech-test op deze stam.

Geconcludeerd kan worden, dat de TaqMan PCR redelijk werkt, maar dat aan de systematiek van *Erwinia* verder onderzoek gewijd moet worden om afwijkende isolaten toch te kunnen identificeren of te detecteren.

4.4 Algemene conclusies en discussie

Toetsing op *Erwinia* is nog niet sluitend. Dit geeft de verandering in taxonomie en de nieuwe indeling in *Dickeya* (Ech) en *Pectobacterium* (*E.carotovora*) al aan. Het lijkt erop, dat vooral de *Dickeya*-soorten wel eens waardplantvoorkeur(en) kunnen hebben. Ook lijkt er variatie op te treden in de sequenties, zoals gevonden voor o.a. het 16 S rDNA. Hierop wordt ingespeeld door ook andere genen te gebruiken voor indeling van deze soorten.

De isolaten uit bloembolgewassen zijn vergeleken met een pannel van isolaten uit andere gewassen. De "bollenisolaten" clusteren op verschillende plekken binnen de verwantschapsboom (Fig.4.2). Ze behoren echter niet tot *Dickeya zea*. Ze zijn in feite nergens aan verwant, behalve dan dat het wel duidelijk "Dickeya's" zijn. Ze vallen onder een aparte groep waarin ook buitenlandse aardappelstammen zitten (Israel en Finland) en een aantal Nederlandse aardappelstammen (zg. S-nummers). Deze resultaten zijn bevestigd met dnaX en recA-sequenties. Het is een echte aparte groep welke in toekomstig onderzoek nader gekarakteriseerd moet worden om bv. betere identificatie en mogelijke waardplantspecificiteit te ontdekken. Het kweken van *Erwinia* benodigt een medium met pectaat, dat door zijn pectine-afbrekende enzymen (dus ook celwanden van planten) kan worden omgezet in groeistoffen (suikers). Kweek van Ecc, Ech onder anaerobe omstandigheden selecteert voor deze bacterie. Een probleem is, wanneer zowel Ech als Ecc in monsters aanwezig zijn, iets dat vanaf 2006 is waargenomen in hyacinten afkomstig uit Frankrijk. Het is niet duidelijk of het hier dan gaat om agressieve Ecc (vergelijkbaar met Ech) of met een toevallig aanwezige Ecc. Minder pathogene Ecc kunnen aan de buitenkant van de bol aanwezig zijn. In het geval van monsterbewerking wordt de buitenkant van de bol altijd ontsmet met 70% alcohol of 0.5% bleekwater na langdurig spoelen in kraanwater.

Er zijn verschillen tussen deze twee *Erwinia*-soorten; Ech heeft o.a. een hogere optimumtemperatuur (30 °C) (literatuurstudie van Doorn *et al.* 2005) en is resistent tegen het antibioticum erythromycine. Ondanks toevoegen van dit antibioticum en kweek bij hogere (34-37 °C) is het (erg) lastig mengsels van deze twee soorten *Erwinia* van elkaar te scheiden voor isoalaatcollecties.

Wat betreft detectie en beheersing van *Erwinia*'s vormt vooral Ecc een diverse groep die voor kort niet goed detecteerbaar was. Kang en medewerkers hebben een PCR gepubliceerd die ogenschijnlijk isolaten van Ecc goed aantonen. Deze toets is echter niet betrouwbaar (Speksnijder 2004, persoonlijke mededeling). Ook bleek uit onderzoek van PPO, dat niet in alle gevallen *Erwinia* in rotsymptomen van hyacint aantoonbaar was. Dit kan echter ook betekenen dat (naast het niet goed uitvoeren van de toets) er nog andere organismen zijn die rot veroorzaken. Onderzoek naar het beter aantonen van isolaten van Ecc en ook Ech en onderzoek naar het bestaan van agressievere stammen of biovars in de bollenteelt is gewenst. Het voorkomen van andere soorten *Erwinia* moet niet vergeten worden. *Erwinia rhapontici* kan soms in andere teelten een probleem zijn, maar kan tot op heden niet goed worden gedetecteerd. De rol van latent aanwezige *Erwinia*'s (bv. in *Zantedeschia*) verdient de nodige aandacht. Latent aanwezige bacteriën zouden in zeer lage aantallen aanwezig kunnen zijn, maar misschien ook in een "viable but not culturable state": in

deze staat zullen de bacteriën zich niet vermenigvuldigen, maar na een bepaalde impuls weer tot leven komen (Aertsen *et al.* 2004). Het aantonen van bacterie-cellen in deze situatie is dan erg moeilijk.

Het antiserum wat gebruikt wordt om via ELISA of Luminex Ech aan te tonen is redelijk specifiek. Toch komen vals-positieve reacties voor; vaak lijken dit isolaten, behorende tot Eca te zijn. Een nieuw/extra antiserum zou wenselijk zijn.

ELISA heeft nog de voorkeur boven Luminex; ondanks de veelzijdigheid, multiplexkarakter en snelheid is de techniek duur door patenten en apparatuur. De keuringsdiensten geven nog de voorkeur voor ELISA.

Wanneer de ontwikkeling van een Luminex, gebaseerd op detectie via nucleïnezuurprobes voortzet, kan dit een goede en snelle detectiemethode zijn om meerdere bacteriesoorten tegelijkertijd (in hetzelfde monster) aan te tonen.

De standaard PCR lijkt goed te werken. Toch werd in ongeveer 30% van de monsters met zachtrot geen *Erwinia* aangetroffen. In een aantal gevallen werd *Pseudomonas* gevonden; in nieuw onderzoek moet blijken of deze bacteriesoort inderdaad zelfstandig rot kan veroorzaken of een “trendvolger” is die in aangetast plantenweefsel toeslaat. Een verschil is, dat *Pseudomonas* andere typen pectinasen maakt, en aeroobe omstandigheden nodig heeft om zich te handhaven.

Ecc geeft waarschijnlijk een mildere aantasting als Ech. In isolaten uit hyacintenmonsters, afkomstig uit Frankrijk zaten zowel Ecc als Ech. Ecc kan ook schade geven, maar kan ook als nietpathogeen aan de buitenkant van een plant aanwezig zijn. Toch moet de rol van Ecc niet onderschat worden. Bijzonder is, dat in *Zantedeschia* voornamelijk Ecc een rol speelt bij zachtrot. Echter, in een recente publikatie (Lee *et al.* 2006) zijn in Taiwan in witbloemige Calla's Ech gevonden, die op grond van een afwijkende virulentie en verschillen in DNA tot een apart pathotype zouden kunnen behoren.

Mechanische of stresstoetsen zijn ontwikkeld om op eenvoudige wijze een praktisch bruikbare toets voor telers en exporteurs te ontwikkelen. Deze zijn gebaseerd op het toebrengen van stress door schade aan de bollen binnen een partij (steekproef) en is voornamelijk getest op hyacinten. Om te testen of de symptomen door *Erwinia* komen, wordt meestal een PCR uitgevoerd. Protocolontwikkeling tbv. de Bloembollenkeuringsdienst om *Erwinia*-soorten betrouwbaar te kunnen aantonen en de toetsen te valideren wordt uitgevoerd binnen project PT13061 (“protocollering detectie *Erwinia*”).

Mogelijkheden om zonder schade toe te brengen aan bloembollen toch een betrouwbare analyse op eventueel zachtrot (latente infectie) te kunnen geven is momenteel niet voorhanden (Van Doorn *et al.* 2007b). MIPS bleek niet geschikt; ook de toepassing van een zg. zuurscheider (wat berust op doorlichten van bollen via röntgenstraling) werkte niet.

5 Biotoetsen voor het meten van Erwinia

5.1 Inleiding

Er zijn een aantal verschillende biotoetsen ontwikkeld: effecten van *Erwinia*-isolaten op bollen, bladeren of stelen om de werking van middelen, of de mate van agressiviteit/pathogeniteit te kunnen vaststellen. Deze werken aanvullend op laboratoriumtoetsen om bv. *Erwinia*-soorten te kunnen detecteren. Biotoetsen kunnen indicaties geven of er verschil in agressiviteit is tussen bacterie-isolaten, en ook voor resistentietoetsen gebruikt worden.

Vaak zijn verschillende biotoetsen noodzakelijk. Er zijn pathogenen die op bladeren nauwelijks effect hebben, maar des te meer kunnen toeslaan in de wortels of knollen (bv. “ploffers” door Ech bij Dahlia). Er zijn een aantal toetsen ontwikkeld en toegepast:

- Ponsjestoets: bladschijfjes van *Zantedeschia*, gebruikt om de pathogeniteit van *Erwinia*-isolaten vast te stellen, en de werking van mogelijke antagonistische bacteriesoorten
- Holboltoets: incubatie van “pluis” (kleine hyacintenbolletjes) met *Erwinia*-isolaten
- Bolinoculatie: aanprikken van bollen en knollen met een bacterieverdunning
- Stresstoetsen: val-, invries en vacuümmethode (op hyacintebollen)

Een proef om Dahlia te onderzoeken op gevoeligheid voor *Erwinia*-isolaten (knolinoculatie) is opgenomen in hoofdstuk 8.

5.2 Ponsjestoets

Deze is gebaseerd op het protocol zoals beschreven (Snijder *et al.* 2002) door bladponsjes van *Zantedeschia*-bladeren te gebruiken. Agressievere isolaten zullen sneller het bladmateriaal afbreken doordat deze mogelijk meer of andere pectinasen produceren. Ook zijn antagonisten getest om te zien of deze *Erwinia*-isolaten kunnen remmen. Dit zijn diverse soorten bacteriën die ofwel antibiotica-achtige producten maken, ofwel andere remmende eigenschappen vertonen. Deze zijn grotendeels geïsoleerd uit hyacintenmateriaal zelf (Jaffra *et al.*; bijlage 1).

5.2.1 Materialen en methoden

Experimenten zijn uitgevoerd in zg. 6-wells platen met 3 ml buffer (PBS), 1 bacterie-isolaat per plaat. Bladeren van *Z. aethiopica* cv. Flame (matig gevoelig voor Ecc), afkomstig van planten uit het veld (niet uit de kas) zijn gebruikt. De bladeren zijn gedesinfecteerd door incubatie (30 min.) in 0.5% bleekwater, gevolgd door wassen in leidingwater gedurende 5 x 1 minuut.

Bladschijfjes zijn uitgesneden middels een kurkenboor (diameter 2.5 cm). Incubatie vond plaats in de plastic 6-well platen onder 100% luchtvochtigheid bij 20 °C onder een lichtregime van 10 licht en 14 uur donker (klimaatkast met verlichting).

Op dag 1 zijn (indien van toepassing) 10⁶ cfu/ml antagonisten (bacteriën) toegevoegd;

Op dag 2 werden *Erwinia*-isolaten toegevoegd (10⁴ cfu/ml).

Op dag 3 vindt de eerste beoordeling plaats (17 uur na inoculatie met *Erwinia*). Een index van 0 tot 5 geeft de mate van aantasting aan: 0: geen aantasting; 1 is lichte aantasting van de randen van het bladponsje < 1 mm; 2 = randaantasting 1-3 mm; 3 = meer dan 3 mm randaantasting; 4 = ponsjes in zijn geheel glazig; 5 = ponsjes vallen uiteen.

1. Alleen PBS
2. LMG 2408 <i>E. car.car.</i> (Zanted.)
3. LMG 2804 <i>E. chrys.</i> (ref.strain)
4. LMG 2392 <i>E. car. atroseptica</i>
5. Ech PD 484
6. Ech PD 552
7. Ech PD 827
8. Ech PD 846
9. Ech PD 857
10. Ech PD 868
11. Ech PD 1073
12. Ech PD 1325
13. Ech PD 1344
14. Ech PD 2008
15. Ech PD 4712
16. PPO H4 Hyac. 2004
17. PPO M11 Hyac. 2004
18. PPO Ech Freesia 2006
19. PPO Ecc Iris broeierij 2006
20. PPO Ecc Ornithogalum 2006
21. PPO Ech Muscari
22. PPO Ech Hyacint

Tabel 5.1 Gebruikte *Erwinia*-isolaten

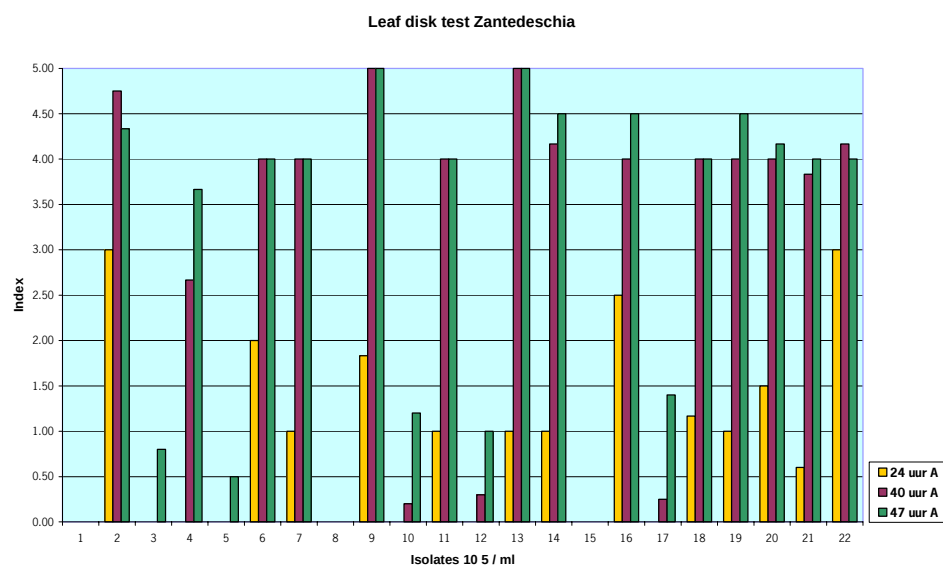


Fig 5.1 Incubatie van Zantedeschia-bladponsjes na 24, 40 en 47 uur met 10^6 cfu/ml *Erwinia*-cellen

5.2.2 Resultaten en conclusies

1. Agressiviteitsverschillen van Erwinia-isolaten

Ecc-isolaten (2, 19, 20) tastten de bladponsjes maximaal aan. Echter, ook Ech-isolaten deden dit, hoewel hier grote verschillen tussen zijn en de gemiddelde aantasting duidelijk minder was dan met Ecc-isolaten. Isolaten 3, 5, 8 en 15 gaven nauwelijks aantasting, terwijl een groot aantal andere isolaten (o.a. 6, 7, 9, 11 en 13) dit wel deden. Een verschil leek de wat latere start van productie van pectinolytische enzymen vergeleken met de Ecc-isolaten. Er waren ook een aantal gematigd agressieve isolaten: 10, 12 en 17. Mogelijk is de agressiviteit afhankelijk van het type biovar van Ech. Isolaat PD 484 en PD 846 (biovar 5) waren nauwelijks agressief en geïsoleerd uit aardappel resp. anjer. Ook het Eca-isolaat was gematigd agressief. Isolaat PD1325 (biovar 7) was geïsoleerd uit Kalanchoe en ook nauwelijks agressief in vergelijking met andere isolaten die voornamelijk tot biovar 3 behoren. Deze biovars zijn nu herbenoemd tot soorten van *Dickeya* (biovar 3 is bv. nu *Dickeya dadantii*, terwijl biovar 5 *D. chrysanthemi* is).

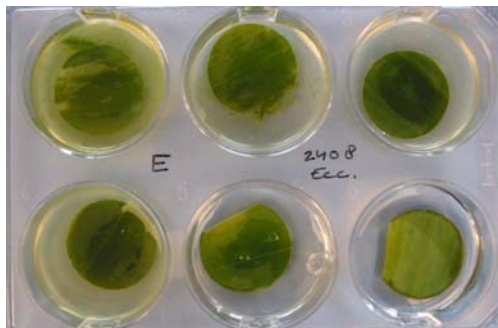


Fig. 5.2 Bladponsjes van Zantedeschia, geïncubeerd met Erwinia-isolaten

Deze toets lijkt perspectieven te bieden om agressiviteitsverschillen te kwantificeren van Erwinia-isolaten.

2. Remmende werking van een aantal antagonisten

De antagonisten waren afkomstig van Sylwia Jafra (PRI/Universiteit van Gdansk). Uit hyacint werden zowel endofytische als omgevingsbacteriën geïsoleerd, die vervolgens op hun antibioticaproductie dan wel afbrekend vermogen van signaalstoffen voor Erwinia-virulentie beoordeeld werden. Na voorscreening zijn een viertal antagonisten volgens protocol getest op de referentiestammen van Erwinia (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Geteste antagonisten

nr. 10 <i>Pantoea agglomerans</i>
nr. 12 <i>Pantoea dispersa</i>
nr. 48 <i>Pseudomonas</i> spp.
nr. 51 <i>Pseudomonas fluorescens</i>

De experimenten met alleen antagonisten toonden geen symptomen; de bladponsjes werden niet aangetast. Als negatieve controles werden *Xanthomonas hyacinthi*, *Pseudomonas syringae* en het antibioticum ampicilline (50 µl/ml) gebruikt.

Behalve antagonist 10 gaven de meeste geteste antagonistische bacteriën (*Pseudomonas* spp.) remming (echter, niet significant) van aantasting door Ech, maar bijna niet t.a.v. Ecc-isolaten, en wisselend in de verschillende experimenten die zijn uitgevoerd.

De antagonisten die zg. quorum sensing beïnvloeden (door remming van het signaal wat aanzet tot o.a. meer productie van pectinolytische enzymen) gaven geen effect; de isolaten die een antibioticum produceren wel. Deze resultaten zijn niet in overeenstemming met wat Jafra vond; zij vond een sterker

remmend effect in haar experimenten.

De juiste concentratie en juiste groeifase van de antagonisten is waarschijnlijk belangrijk. Om een goede werking van antagonisten te scoren dienen de groeicondities, concentraties en moment van toediening van deze bacteriën beter onderzocht te worden.

5.3 Holbolletjes als biotoetsmateriaal

5.3.1 Inleiding

Met isolaten van zg. antagonisten tegen *Erwinia* zijn proeven gedaan in Zantedeschia-ponsjes. Dezelfde isolaten daarvan werden getoetst met “pluis” (minibolletjes, gegroeid op het holvlak van werkbollen) van holbollen. Als protocol is de methode gebruikt zoals bij de Zantedeschia ponsjesproef. Dezelfde antagonisten (Tabel 5.2) zijn toegepast.

5.3.2 Materiaal en methode

Holbolletjes werden voorzichtig van de holbol losgebroken of gesneden met een scalpelmessje en bolletjes van hetzelfde gewicht gebruikt.

Ontsmetten geschiedde gedurende 1 minuut in 1% chloor, gevolgd door naspoelen met kraanwater.

De bolletjes worden in 20 ml suspensie van een antagonist of *Erwinia*-isolaat geïncubeerd gedurende 15 minuten. Hierna worden de bolletjes afgesloten weggezet in een klimaatkast bij 23°C.

Na 1 dag werden bolletjes in een verdunning van een *Erwinia*-isolaat gedurende 15 minuten geïncubeerd en hierna weggezet op vochtig filtreerpapier bij 23°C in een klimaatkast. Concentratie *Erwinia*-isolaten: 10^7 cfu/ml.

5.3.3 Resultaten en conclusie

Alle controles (PBS) gaven geen aantasting. Per behandeling bleken een aantal bolletjes met de schimmels *Penicillium* of met *Aspergillus* aangetast.

De overige behandelingen met antagonisten gaven hetzelfde beeld.

Na drie dagen: Buffer (PBS): 14 bolletjes, 0 positief

Ech: 14 bolletjes, 8 positief

Eca: 15 bolletjes, 5 positief

Tabel 5.3 Aantal aangetaste bolletjes (n= 25 stuks) na incubatie met alleen *Erwinia*-isolaten antagonisten en beide.
(+ = antagonist en *Erwinia*)

Isolaat/ antagonist (16S DNA)		Ecc	Ech	Eca	Opmerkingen
Controle water	0	-	-	-	3 bollen met <i>Penicillium</i>
Controle Ecc		9	-	-	
Controle Ech		-	9	-	
Controle Eca		-	-	4	4 bollen met <i>Penicillium</i>
nr. 10 <i>Pantoea agglomerans</i>	0	-	-	-	
nr. 12 <i>Pantoea dispersa</i>	0	-	-	-	
nr. 48 <i>Pseudomonas</i> spp	0	-	-	-	
nr. 51 <i>Pseudomonas fluor.</i>	0	-	-	-	
nr. 10 <i>Pantoea agglom.</i> +		8	7	8	
nr. 12 <i>Pantoea dispersa</i> +		5	2	6	remming
nr. 48 <i>Pseudomonas</i> spp. +		16	11	7	stimulatie
nr. 51 <i>Pseudomonas fluor.</i> +		12	5	1	stimulatie

Geconcludeerd kon worden, dat het aantal aangetaste bolletjes in de controle met *Erwinia* wel hoger was

geworden, maar procentueel gezien nog niet hoog genoeg voor significante conclusies. Isolaat 48 + *Erwinia* gaf zelfs meer aantasting in plaats van minder. Deze experimenten zijn herhaald; de resultaten fluctueerden maar gaven hetzelfde beeld. Antagonist nummer 12 lijkt het meeste effect te geven bij Ecc- en Ech-infectie. Deze uitslag van deze toets komt niet overeen met de resultaten van Jafra (bijlage 1). Nrs. 10 en 12 zijn nrs. H 440 en H17 in haar experimenten, die daar wel een effect gaven. Zoals ook geconcludeerd bij de posnjesproef moeten experimenten met antagonisten waarschijnlijk sterk gestandaardiseerd worden uitgevoerd. Fluctuaties in kweekcondities, concentratie en moment van toediening hebben veel invloed op het eventuele remmende effect op het ziekteproces, veroorzaakt door *Erwinia*.

5.4 Bolinoculatie (“prikproef”)

5.4.1 Inleiding

Deze methode is het meest direct. In de literatuur wordt deze techniek vaak toegepast op bol- en knolgewassen; ook worden wel stengelinoeculaties toegepast. Ondanks de weinig subtiele toediening kan deze methode een gewenst zwart-wit effect geven.

Bol-knolinoeculatie van *Erwinia*-isolaten is toegepast voor Dahlia-knollen en enkele *Zantedeschia*-knollen (zie hoofdstuk 8 en 9).

5.4.2 Materiaal en methoden

Hyacintenbollen worden net boven de wortelkrans met een bacteriesuspensie (OD = 0.1) via een injectiespuit. De aangeprikte bollen worden onder hoge RV (afgesloten plastic container met vochtig filtreerpapier).

Aan de binnenkant van het deksel ronde, vochtige filter aangebracht bij 23-25°C.

Per behandeling worden 10 bollen ingezet (White Pearl, Pink Pearl, Jan Bos) en drie isolaten: Ecc, Eca en Echr (referentie-isolaten)

De beoordeling op leeglopers of witsnot vond plaats vanaf 2-3 dagen na aanprikken.

Voor *Zantedeschia* of Dahlia-knollen is een vergelijkbaar protocol gebruikt.

5.4.3 Resultaten

Tabel 5.4 Prikproef hyacint en *Zantedeschia*

Isolaat	gewas	symptomen	opmerkingen
LMG 2804 (Ech)	hyacint	2 dagen	
LMG 2408 (Ecc)	hyacint	4 dagen	
LMG (Eca)	hyacint	5 dagen	Lichte aantasting
<i>E. raponthici</i> 134	hyacint	geen	Veroorzaker snotlintjes
<i>E. raponthici</i> 135	hyacint	geen	
LMG 2804	<i>Zantedeschia</i>	geen	
LMG 2408	<i>Zantedeschia</i>	2-3 dagen	Rotte plekken

Deze methode is afhankelijk van het moment waarop de bollen worden gebruikt. Hoe later na het rooien, hoe later symptomen optraden. De infectie verliep beter door toevoeging van detergens (0.05% Triton X-100) aan de bacteriesuspensie, en door het wegleggen na inoculatie bij hogere temperaturen (30 °C).

5.5 Stresstoetsen

5.5.1 Inleiding

Deze zijn gebaseerd op de constatering dat beschadiging van bollen (speciaal hyacintenbollen) kan leiden tot versnelde symptoomontwikkeling zoals leeglopen van bollen en andere rottingsverschijnselen. Door stress (bv. door hogere of lagere temperaturen, beschadiging, onderdruk of andere oorzaken) zal eventueel aanwezige Ech of Ecc sneller tot expressie komen. Als een teler een partij bollen koopt, wil hij graag weten of ze wel gezond zijn. Bij deze toets wordt gekeken naar een methode die telers eventueel zelf uit kunnen voeren om het percentage latent zieke bollen te bepalen.

Hierbij werd uitgezocht of latent aanwezige *Erwinia*-bacteriën in 'gezonde' bollen in staat zijn zachtrot te veroorzaken na stressbehandelingen.

Er zijn drie soorten "stress" aangebracht:

1. Onderdruk (vacuüm): deze vacuümtoets is uitgevoerd in een exicator; de behandelde bollen worden vervolgens teruggeplaatst bij 30°C
2. Invriezen: Behandeling in de vriezer bij -20°C en terugplaatsen bij 30°C,
3. Mechanische beschadiging (valtoets): bollen werden van een bepaalde hoogte gevallen zodat beschadigingen ontstond; daarna terugplaatsen bij 30°C.

Als controle of bij symptoomontwikkeling zijn bollen getoetst met ELISA of (real-time) PCR of Ech aanwezig is in deze bollen.

5.5.2 Materialen en methode

Per proef zijn 100 hyacintenbollen (Carnegie 14 cm) gebruikt.

1. De vacuümtoets: een zak met 100 hyacintenbollen werd in de exicator gelegd en afgesloten. De exicator werd aangesloten aan een vacuümpomp en aangezet totdat het gewenste aantal mBar is bereikt (aangegeven op een meter tussen de exicator en de pomp (Fig. 5.3).

De bollen werden bij 30°C gezet, zodat *Erwinia* goed kan groeien. Na een aantal dagen werd bepaald hoeveel bollen ziek zijn geworden.



Fig. 5.3 Bollen bij onderdruk in een exicator

Tabel 5.5 Behandelingen uitgevoerd in de exicator op hyacintenbollen

Nr. behandeling	Behandeling
1	15 min -200mBar
2	15 min -400mBar
3	15 min -600mBar
4	1 uur -600mBar
5	2 uur -600mBar
6	4 uur -600mBar
Controle	Geen behandeling (30°C)
7	15 min -200mBar in water
8	15 min -400mBar in water
9	15 min -600mBar in water
Controle	15 min in water

2. Invriestoets: 4 manden met ieder 100 bollen werden in de vriezer gezet van -20°C. Na 2, 4, 6 en 15 uur werd een mand uitgehaald en bij 30°C gezet. Na een aantal dagen is gekeken hoeveel bollen ziek zijn en wat de optimale 'vriestijd' is voor deze proef.

3. Valtoets: 100 bollen per 6 laten vallen van ongeveer 70 cm hoogte in een gaasbak. Met nog eens 100 bollen werd dit herhaald met twee keer laten vallen in de gaasbak. De bollen werden geïncubeerd bij 30 °C. Na een aantal dagen is gekeken hoeveel beschadiging en dus ziekte is opgetreden.

5.5.3 Resultaten

5.5.3.1 vacuümtoets

Na de behandeling in de exicator zijn er na 4 dagen geen zieke bollen waar te nemen.

Na 7 dagen waren er alleen bij behandeling 9 drie zachte bollen, alle andere behandelingen hadden geen effect en alle bollen waren gezond gebleven.

Ook zijn er monsters genomen uit het water nadat de bollen in vacuüm zijn geweest om te controleren of *Erwinia (chrysanthemi)* via water andere bollen kan besmetten. Er bleek geen Ech aanwezig in het water. Wel zijn er vier andere bacteriesoorten gevonden, waaronder Ecc en een *Pseudomonas*-soort.

5.5.3.2 Vriestoets

Tabel 5.6 Percentages zieke hyacintenbollen (Carnegie) na invriezen

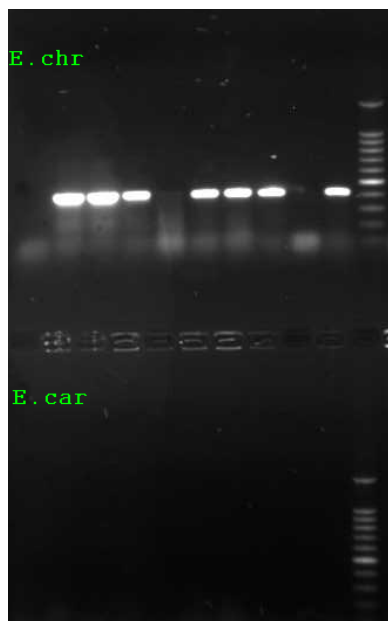
Incubatie bij -20 °C	% ziek na 4 dagen na invriezen	% ziek na 7 dagen na invriezen *	Controles (gezonde bollen)
2 uur	10%	6%	-
4 uur	50%; 9% licht aangetast	4%, 7% licht aangetast	21% "schuim"
6 uur	100%	- *	-
15 uur	100%, waarvan 34% met "schuim"	- *; harsachtige substantie	-

* na 4 dagen zijn alle zichtbaar zieke bollen verwijderd

Omdat vermoedelijk ook bollen zacht geworden zijn door vriesschade (vanaf 4 uur), zijn er van een aantal symptomen monsters genomen om met PCR *Erwinia* (Ech of Ecc) aan te tonen.

Uit deze toets bleek in de meeste monsters *Erwinia chrysanthemi* te zitten, maar in geen enkel monster *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Fig. 3). De symptomen in de bol (zacht worden) zijn voornamelijk het gevolg van Ech. Vooral in het "schuim" werd Ech aangetoond; bij langdurig (meer dan 3 uur) invriezen lekte

er een harsachtige substantie uit de bol; hier zat vaak dan geen *Erwinia* in en is waarschijnlijk een bolreactie op het invriezen (celbeschadiging).



Tabel 5.7 Behandelingen en PCR-identificatie

	E.chr.	E.car.
1= Gezonde hyacint <i>Carnegie</i>	-	-
2= behandeling 2 uur -20°C, halfzacht	+	-
3= behandeling 2 uur -20°C, zacht	+	-
4= behandeling 15 uur -20°C, schuim 1	+	-
5= behandeling 15 uur -20°C, schuim 2	-	-
6= behandeling 6 uur -20°C, zonder schuim	+	-
7= behandeling 6 uur -20°C, zonder schuim (ploft bij opensnijden)	+	-
8= behandeling 4 uur -20°C, paarskleuring bij wortel	+	-
9= behandeling 15 uur -20°C, vorstschade 1	-	-
10=behandeling 15 uur -20°C, vorstschade 2	+	-
M= Marker		

Fig.5.4 PCR-toetsen op Ech en Ecc in monsters zoals aangegeven in tabel 5.7

Na de vriestoets blijkt dat 2 uur bij -20°C het meeste effect en de minste schade geeft.

5.5.3.3 De valtoets

De resultaten hiervan zijn weergegeven in hoofdstuk 8.

5.5.4 Conclusies en discussie

De vriesproef geeft het beste resultaat, maar om een goede conclusie te geven moet de proef herhaald worden, eerder na het rooien.

Omdat bij de vriesproef niet duidelijk was wat het ziektebeeld van vriesschade of *Erwinia* is, is een toets gedaan met 50 gezonde bollen. Deze bollen zijn 2 uur in de vriezer gezet en vervolgens bij 30°C gezet. Hieruit bleek dat het 'hars' die uit de bollen komt, waarschijnlijk door vriesschade ontstaat en geen *Erwinia* bevat. Waarschijnlijk is het schuim dat uit de bollen komt wel afkomstig van *Erwinia*.

Tevens is de proef waarschijnlijk te laat in het seizoen uitgevoerd, waardoor de bollen te droog zijn en er met de vacuüm- en valproef geen resultaat is. Deze proef is eerder uitgevoerd (vlak na rooien) met meer resultaat. Als deze proef eerder na het rooien wordt uitgevoerd, kunnen de bollen waarschijnlijk ook korter behandeld worden waarbij een duidelijker resultaat zal zijn.

6 Toepassing stresstoetsen op latente infecties bij hyacint

6.1 Inleiding

Op het oog gezonde bollen kunnen besmet zijn met *Erwinia*. Later in de keten kunnen zich omstandigheden voordoen waarop een dergelijke besmetting leidt tot aantasting wat tot stinkende leeglopende bollen geeft. Dit leidt tot zeer grote directe en indirecte schade. Deze latent besmette bollen zouden niet verder de afzet of vermeerderingsketen in moeten. Het is dus belangrijk te weten of latent besmette bollen in een partij voorkomen. Door bollen onder stress te zetten door beschadigen en invriezen wordt getracht aanwezigheid van *Erwinia* zichtbaar te maken. Naast deze stresstoetsen worden ook bollen op aanwezigheid van *Erwinia* getoetst.

6.2 Materiaal en methode

2006

Drie leverbaarpartijen twee plantgoedpartijen van Carnegie en één plantgoedpartij Anna Marie zijn op twee of drie data aan een stresstoets onderworpen en beoordeeld op aanwezigheid van aantasting door *Erwinia*. De partijen waarin een aantasting werd vermoed of al na rooien was gezien, waren afkomstig van verschillende bedrijven. Van één bedrijf kwam zowel een besmet partij als een gezond partij. Het leverbaar werd half juli en 2 en 4 weken later behandeld en het plantgoed in juli of augustus en na bewaring en heetstoken half oktober. De “stressbehandeling” bestond uit sorteren over 8 platen, een vrijwel individuele val van 70cm in een gaasbak of 2 x overstorten uit een bak van 90cm hoogte in een gaasbak met wel veel bol op bol contact.

Bij deze wijze van beschadigen kan altijd een nieuwe besmetting optreden en is de uitslag niet uitsluitend bepalend voor wat er al aanwezig is aan besmetting, maar ook voor wat er mee kan gebeuren als bollen worden verwerkt. Bij het plantgoed in oktober is sorteren niet opgenomen.

Voor de toets werden de bollen minimaal 3 dagen bewaard bij 30°C en na de val werden ze 5 dagen bewaard in plastic bij 30°C. Daarna werd het plastic verwijderd en werden de bollen weer bij de gebruikelijke leverbaar- of plantgoed temperatuur van 25°C of 30°C bewaard. Het percentage aangetaste bollen werd bepaald 5 dagen na de val bij het verwijderen van het plastic en later in november.

Alle behandelingen werden in 3 herhalingen à 90-100 bollen uitgevoerd.

Van enkele partijen is een monster bollen door PRI getoetst op aanwezigheid van *Erwinia chrysanthemi* met Luminex. Na afloop werden van 2 partijen van 100 bollen werden 20 mengmonsters van 5 bollen (1/8 van elke bol) getoetst. Van een partij werden de controlebehandeling en een “stress”-behandeling getoetst.

2007

Naast de valtoets werd ook een invriestoets uitgevoerd. Ook dit is een wijze om bollen onder stress te zetten waardoor mogelijk *Erwinia* gaat toeslaan. Voordeel zou zijn dat dit een beter beeld kan geven van het percentage bollen met latente *Erwinia* zonder dat er door de behandeling een nieuwe besmetting optreedt. De valtoets was een redelijk individuele val van 70cm in een gaasbak, waarna de bollen in plastic bij 30°C gedurende 5 dagen zijn bewaard. Daarna werd het plastic verwijderd en werden de bollen bij 25°C bewaard. Bij de invriestoets werden bollen in een open plastic zak bij -20°C gelegd gedurende 2 uur en daarna ook bij 30°C gelegd in de dicht gemaakte plastic zak. Na 5 dagen werd het plastic verwijderd en bij 25°C bewaard. De beoordeling vond plaats na het verwijderen van het plastic en later begin september. De behandeling na 3 maanden is in oktober beoordeeld.

De geteste partijen waren leverbaar van Carnegie, Pink Pearl en L'Innocence en waren partijen waarin een aantasting werd verwacht op grond van de ervaringen van vorig jaar of wat al op het veld was te zien. Op

de drie bedrijven werd bemonsterd direct na rooien en vervolgens na 1, 2, 3, 4 en 12 weken daarna. Bij het bemonsteren werden geen zichtbaar aangetaste bollen meebemonsterd. De bollen waren tot aan sorteren ongesorteerd en dus variabel in maat en vanaf sorteren is een veel voorkomende maat bemonsterd. Van de partij Carnegie zijn ook bollen direct na rooien bij PPO bewaard maar verder niet verwerkt maar wel gelijktijdig bemonsterd. Elke vorm van verdere beschadiging en verspreiding werd daarmee voorkomen. Van alle monsters werd ook op de dag van bemonstering het droge stofpercentage vastgesteld en werden bollen getoetst met PCR op aanwezigheid van Ech en Ecc.

6.3 Resultaten

2006

Tussen de partijen werd als snel een verschil in aantasting waargenomen. Bij het verwijderen van het plastic werd nog niet alle aantasting gevonden.

In enkele gevallen was de aantasting erg beperkt en was het onderscheid tussen een aantasting door *Erwinia chrysanthemi* en Ecc niet altijd duidelijk. Bij Anna Marie kwam naast in te knippen bolbodems (met name Ech) ook natte neuzen (vooral Ecc) voor. In een later stadium of in november was onderscheid maken vrijwel onmogelijk.

Bij Carnegieleverbaar werd bij partij A 70% en bij partij B 55% van de in november vastgestelde aantasting waargenomen (Tabel 6.1). Bij partij A veroorzaakte het vroeg sorteren en 2x storten de meeste aantasting en die aantasting lag ook veel hoger dan bij de controle en bij storten ook hoger dan 2 weken later. Dit was ook de partij waar vooraf al 4% snotbollen was verwijderd. Bij partij B werd een beperkte aantasting zichtbaar door de stresstoets, maar partij C bleef gezond ondanks de diverse verwerkingen op verschillende tijdstippen.

Tabel 6.1 Percentage door *Erwinia* aangetaste bollen bij leverbare bollen na een stresstoets en beoordeling in november

behandeling	partijen Carnegie leverbaar		
	partij A met 4%	partij B met 0.2%	partij C met 0.3%
geen	4.0	0.0	0.0
	13-jul	20-jul	20-jul
sorteren	11.3	0.7	0.0
val 70cm	4.3	0.4	0.0
2x storten	13.5	1.9	0.0
	27-jul	4-aug	4-aug
sorteren			0.0
val 70cm	7.7	1.9	0.0
2x storten	6.0	0.0	0.0
			17-aug
sorteren			0.0
val 70cm			0.0
2x storten			0.4

Vijf dagen na de toets voor de heetstook was bij Anna Marie en Carnegie D 71 tot 85% van de uiteindelijke aantasting in november zichtbaar.

Bij het plantgoed werd bij partij Carnegie D en bij Anna Marie veel aantasting gevonden (Tabel 6.2). Bij het plantgoed veroorzaakte het sorteren en 2x storten voor de heetstook een duidelijke toename. Na de heetstook gaf een toets geen toename te zien. Partij E reageerde niet op een extra beschadiging.

Tabel 6.2 Percentage door *Erwinia* aangetaste bollen bij plantgoedbollen na een “stresstoets” en beoordeling in november

behandeling	Carnegie plantgoed		Anna Marie
	partij D met 5%	partij E met 0,2%	partij met 0.4%
	14cm	10/14cm	10/14cm
geen	1.1	1.5	1.5
	16-aug	26-jul	20-jul
sorteren	11.5	1.5	6.7
val 70cm	4.4	1.1	1.9
2x storten	7.8	0.0	4.4
	17-okt	17-okt	17-okt
val 70cm	1.9	0.4	0.4
2x storten	1.5	0.0	0.0

Er was geen harde relatie tussen de uitgangsbesmettingen en het percentage na bewaring, al of niet na een stresstoets. Vooral bij de lagere percentages in het uitgangsmateriaal liepen de percentages soms wel of soms niet op. De partijen met de hoogste aanvangsaantasting kwamen ook in de stresstoets als meest besmet naar voren.

Partij C bleek ook in de Luminextoets van PRI volledig vrij van Ech. Van partij D werden zowel van de controle met 1,1 % aantasting, als van behandeling met de val van 70cm met 4,4% aantasting bollen getoetst (exclusief de 5% die er vooraf al uit was gegaan). In respectievelijk 18 en 16 van de 20 monsters a 5 bollen werd *Erwinia chrysanthemi* aangetoond. In een ander partij van hetzelfde bedrijf met voor het 6% verwijderde bollen werd in alle monsters *Erwinia chrysanthemi* aangetoond.

Door bollen te beschadigen en daarna warm en vochtig weg te zetten kon ook een aantasting door *Aspergillus niger* (“roet”) optreden als deze in de partij aanwezig is. In 4 van de 6 partijen bleek dit ook voor te komen, waarvan in enkele partijen zeer ernstig.

2007

Afhankelijk van de partij werd al meer of minder snot gezien bij het eerste monster. In de monsters werden geen zichtbare aangetaste bollen meer genomen uitgezonderd de controle die direct na rooien was genomen en waarbij de bollen onverwerkt waren weggelegd. In partijen zat 2% (L'Innocence), 6% (Pink Pearl) of 11-12% (Carnegie) aantasting (Tabel 6.3). Omdat door de telers bij het verwerken ook aangetaste bollen werden verwijderd lagen de percentages in de controle vaak hoger dan in de monsters. Bij de partij A2 die onverwerkt werd bewaard, werd na een val of invriezen meer aantasting gevonden dan in de bij de teler bemonsterde bollen die hij verwerkt en uitgezocht had (A1). Bij het nemen van het monster werd in de niet verwerkte bollen ook meer aantasting gezien (tot 5%).

Door het laten vallen, bevriezen en door verwerking op de bedrijven kon de aantasting sterk oplopen. De gevoeligheid voor *Erwinia* (totaal % aan eind van de bewaring) nam vanaf rooien of vanaf 1 week na rooien veelal in de loop van de tijd af. Het % droge stof nam in de tijd toe van gemiddeld 30% kort na rooien naar 31% na 1 week, 33% na 2 tot 4 weken en 34% na 12 weken. Dit droger worden van de bollen kan mede van invloed zijn geweest op een aantasting.

Door het invriezen werd meer aantasting waargenomen dan door het vallen. Soms was echter niet echt duidelijk of dit wel door *Erwinia* werd veroorzaakt.

Van de licht neusrotte bollen die niet werden verwijderd en waarbij vooral wordt gedacht aan Ecc (witsnot) als oorzaak, werd een enkele keer bij de latere beoordeling niets meer terug gevonden. Meestal werd de bol volledig aangetast.

Tabel 6.3 Percentage door *Erwinia* aangetaste bollen na toepassing van val- of vriestoets op verschillende momenten tijdens de bewaring

Monster moment			% droge stof	% snot zichtbaar bij monster-name	valtoets					vriestoets				
					% na 5 d verwijderd	% neussnot niet verwijderd	% totaal snot na 5 d	% snot later zichtbaar	% snot totaal 5d weg + laat	% na 5 d verwijderd	% neussnot niet verwijderd	% totaal snot na 5 d	% snot later zichtbaar	% snot totaal 5d weg + laat
			A1 Carnegie, bemonsterd bij teler											
dag 0	na rooien	3-jul	29.4	1.0	0.0	0.7	0.7	4.7	4.7	2.0	3.7	5.7	14.0	16.0
1 week	sorteren	10-jul	32.9	1.0	3.3	1.3	4.7	8.0	11.3	4.0	1.7	5.7	5.3	9.3
2 weken	droogwand	17-jul	32.8	1.5	0.3	0.0	0.3	3.3	3.7	3.3	0.0	3.3	4.6	7.9
3 weken	droogwand	24-jul	33.9	1.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	3.7	0.0	3.7	5.0	8.7
4 weken	cel	31-jul	33.6	1.0	1.3	1.0	2.3	1.0	2.3	te lang in de vriezer				
12 weken	cel	2-okt	35.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0
controle geen toetsbehandeling alleen beoordeling laat			10.7											
			A2 Carnegie, na rooien direct in bewaring bij PPO							10.7				
dag 0	na rooien	3-jul	29.4	1.0	1.4	5.4	6.8	12.3	13.6	2.3	1.0	3.3	9.8	12.1
1 week	cel	10-jul	30.7	0.0	5.7	2.3	8.0	9.0	14.7	14.0	4.3	18.3	6.3	20.3
2 weken	cel	17-jul	32.9	3.3	3.8	0.0	3.8	14.8	18.6	17.3	0.0	17.3	6.7	24.0
3 weken	cel	24-jul	33.8	2.7	1.0	0.0	1.0	5.1	6.2	8.6	0.3	8.9	4.8	13.3
4 weken	cel	31-jul	33.4	5.3	3.0	0.0	3.0	4.2	7.2	te lang in de vriezer				
12 weken	cel	2-okt	32.6	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	9.0	0.0	0.0	0.0	16.3	16.3
controle geen toetsbehandeling alleen beoordeling laat			12.3							12.3				
			B Pink Pearl, bemonsterd bij teler											
dag 0	na rooien	28-jun	30.4	0.0	4.0	6.6	10.6	8.6	12.6	5.6	18.3	23.9	33.5	39.2
1 week	na oprapen	5-jul	29.3	0.1	2.3	20.3	22.6	24.9	27.3	1.0	18.0	19.0	20.6	21.6
2 weken	cel 25°C	12-jul	33.3	2.0	4.0	5.0	9.1	5.7	9.7	3.8	6.4	10.2	9.8	13.6
3 weken	cel 25°C	19-jul	33.4	2.0	1.7	1.0	2.7	2.7	4.3	2.0	1.3	3.4	4.4	6.4
4 weken	cel 25°C	26-jul	33.6	0.0	0.3	0.0	0.3	0.3	0.7	0.0	0.0	0.0	1.7	1.7
12 weken	niet meer aanwezig													
controle geen toetsbehandeling alleen beoordeling laat			6.0							6.0				
			C L'Innocence, bemonsterd bij teler											
dag 0	na rooien	9-jul	30.8	0.0	1.0	1.7	2.7	7.3	8.3	1.3	1.0	2.3	2.7	4.0
1 week	na drogen	17-jul	31.2	1.0	0.0	0.4	0.4	2.1	2.1	6.3	2.8	9.1	6.3	12.7
2 weken	na drogen	24-jul	33.7	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0	2.0	1.7	0.3	2.0	0.7	2.3
3 weken	na sorteren	31-jul	32.3	0.0	0.7	0.0	0.7	5.0	5.7	2.7	0.4	3.1	3.1	5.7
4 weken	cel	7-aug	33.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.3	2.0	0.0	1.7
12 weken	cel	10-okt	35.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	2.4	2.4	4.8
controle geen toetsbehandeling alleen beoordeling laat			2.0							2.0				

Na 5 dagen bewaring in plastic werd tussen ca 10 en 100% (gemiddeld 55%) van de uiteindelijke aantasting gezien. Wel was er een redelijke relatie tussen wat na 5 dagen werd gezien en wat uiteindelijk aanwezig was (fig 6.1).

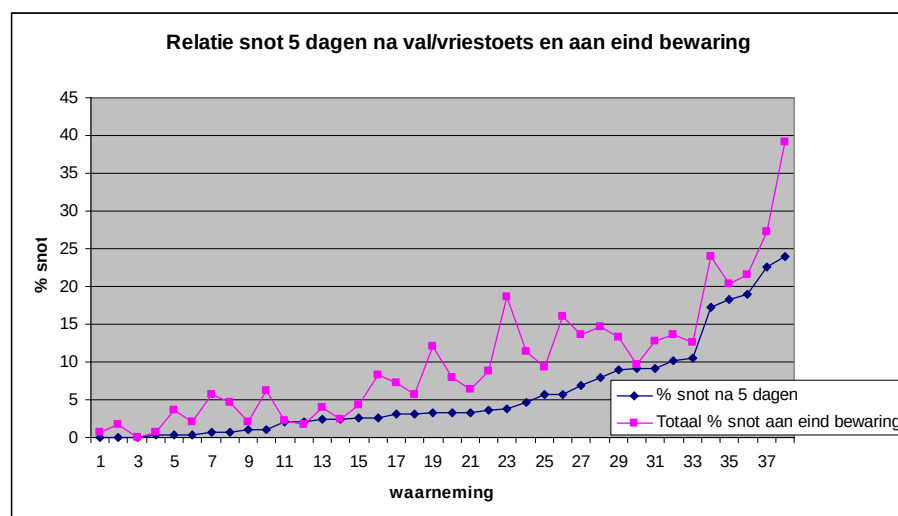


Fig 6.1. Verband tussen zichtbare aantasting door *Erwinia* van 5 dagen na een val of invriezen en de aantasting na een langere bewaring in september

De beschadiging met de hoge vochtigheid en temperatuur leidde tijdens de 5 dagen in de plasticzakken ook tot veel aantasting door *Aspergillus niger* (roet) bij de partijen Carnegie en L'Innocence. Bij de valtoets was dit meer dan bij de vriestoets. Bollen die al vochtig zijn bijvoorbeeld direct na rooien of na oprapen van het veld, geven bij bewaren in dichte plasticzakken veel problemen door schimmelvorming. De zakken zijn dan eerder geopend om enige droging te krijgen. Later in de tijd met drogere bollen speelt dit niet of veel minder.

Van de monsters werden direct na bemonstering ook 30 bollen getoetst in mengmonsters van 5 bollen. De resultaten in Tabel 6.3 en bevestigen dat de partij Carnegie zwaarder besmet was dan de beide andere partijen. In de partijen A1 en A2 werd veel Ech en Ecc aangetoond. Zeer vaak werden beide in de zelfde monsters gevonden. Er waren vrijwel geen monsters waar geen *Erwinia* in voor kwam. Bij de partijen B en C kwam Ecc vaker voor en ook vaker alleen in een monster dan partij A. *Erwinia chrysanthemi* kwam minder vaak voor en de hoeveelheid bacteriën was ook lager. Afhankelijk van de beoordeling van de twijfel gevallen was ca 10- 20 of 20-40 % van de monsters vrij van *Erwinia*. De monsters die bij het snijden een lichte aantasting van de bol lieten zien werd zowel alleen Ech als alleen *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* gevonden maar ook beide bacteriën. In enkele gevallen echter werd geen van beide *Erwinia*'s aangetoond of slechts zeer weinig.

Ten opzichte van de val en vriestoets werd een hoger percentage besmetting aangetoond. Bij de meeste monsters was bij snijden geen enkele vorm van aantasting waarneembaar maar er bleek dus wel *Erwinia* in de neus en/of bodem aanwezig.

Tabel 6.4 Resultaten van PCR-toetsing van monsters (5 bollen/herh). Codering PCR voor aantoonbaarheid *Erwinia*: - = geen; +/- = zeer zwak; + = zwak; ++ = middelmatig sterk en +++ = sterk

tijdstip	herh	Carnegie A1		Carnegie A2		Pink Pearl B		L'Innocence C	
		Ech	Ecc	Ech	Ecc	Ech	Ecc	Ech	Ecc
0w	a	+++	+/-	+++	+/-	-	++	-	++
	b	+++	+/-	+++	+/-	++	++	-	-
	c	+++	-	+++	-	++	+	-	++
	d	+++	++	+++	++	+++	++	-	++
	e	+++	+/-	+++	+/-	+	+	-	-
	f	+++	++	+++	++	-	++	-	+++
1w	a	-	+/-	+++	+	+	++	+/-	++
	b	-	+/-	+++	+++	++	++	-	+
	c	+	+++	+++	+++	+/-	++	-	+/-
	d	-	+++	+++	+++	+/-	+++	+/-	++
	e	-	+++	+++	+++	++	+++	-	++
	f	-	+++	+++	+++	++	+++	-	++
2w	a	+++	+++	++	+	-	-	+	+++
	b	+++	+++	++	+	-	-	+	++
	c	+++	+++	++	+	-	-	-	++
	d	+++	+++	++	+	-	-	++	+
	e	+++	+++	+++	+	-	-	-	+++
	f	+/-	+++	+++	-	-	-	-	+++
3w	a	+++	+++	+++	+	-	+/-	++	+++
	b	+++	+++	+++	-	-	+/-	++	+++
	c	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+
	d	+++	-	+++	+	-	++	+	+
	e	+++	-	+++	++	+/-	+	++	+
	f	+++	+++	+++	++	-	+	-	+/-
4w	a	+++	+++	+++	++	+/-	+/-	++	-
	b	+++	+++	+++	+	-	+/-	+++	+/-
	c	+++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	-	-
	d	+	+++	+++	+	-	+	-	+/-
	e	+	+++	++	++	+/-	+/-	-	-
	f	-	+++	+++	+	+/-	-	+++	+++

bij snijden snotsymptomen

Tabel 6.5 Percentage van de monsters waar *Erwinia* in is aangetoond met PCR (zie Tabel 6.4)

partij	alleen		Ech+ Ecc	geen Ech/cc
	Ech	Ecc		
indien +/- wel besmet is				
A1	10	20	70	0
A2	10	0	90	0
B	3	30	47	20
C	3	43	40	13
indien +/- niet besmet is				
A1	20	17	57	7
A2	20	0	80	0
B	0	30	27	43
C	7	40	30	23

De codering +/- is zeer zwak en kan een zeer lichte besmetting betekenen maar kan ook een achtergrondreactie zijn in de toets.

6.4 Conclusies en discussie

- Door een vorm van stress in de vorm van beschadiging of invriezen toe te passen kan een aanwezige besmetting na 5 dagen deels naar voren komen. Een valtoets geeft meer risico op nieuwe aantastingen door de behandeling dan een invriestoets, maar een invriestoets geeft mogelijk ook een aantasting die niet door *Erwinia* is veroorzaakt.
- Bollen die op het oog uitwendig en bij het afsnijden van de deel van de neus of bodem volledig gezond waren, bleken toch besmet te kunnen zijn door *Erwinia chrysanthemi* en/of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. De PCR-toets gaf meer besmetting te zien dan de val- of vriestoets.
- Er waren ook bollen die wel snotverschijnselen lieten zien maar waarbij *Erwinia chrysanthemi* of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* niet werden aangetoond.
- Hyacinten zijn later in de tijd minder gevoelig voor beschadiging en de stresstoets.
- De stresstoets en de PCR-toets moeten nog verder verbeterd worden voor een betrouwbaarder beeld.
- De bewaring na de stressbehandeling onder vochtige en warme omstandigheden roept een aantasting op door *Aspergillus niger* (roet) en soms andere schimmels. De plasticzak zal dan eerder geopend moeten worden.

De hier toegepaste stresstoetsen geven een indicatie van de aanwezigheid van een *Erwinia*-besmetting in de partij. Bij langere bewaring na de stresstoets komt er nog (veel) meer aantasting naar voren en bij een PCR-toets wordt nog meer gevonden. Bij de PCR-toets is er onduidelijkheid over de twijfelgevallen. Ligt dit aan de toets of is er te weinig *Erwinia* aanwezig om goed aan te tonen.

Praktisch gezien zullen altijd de omstandigheden bepalen of een latente besmetting leidt tot een aantasting en uitval. De bollen moeten een "normale" verwerking en stress kunnen doorstaan zonder ziek te worden. Afhankelijk van de bestemming van de bollen moet de toets betrouwbaarder zijn. Voor bijvoorbeeld werkbollen moet de toets alle besmettingen laat zien. Bij leverbaar zou de lat iets lager kunnen liggen. De kans is anders aanwezig dat veel meer bollen (partijen) als onbruikbaar worden bestempeld dan nodig. De vraag is dan wat een "normale verwerking" is.

Algemeen is de vraag wat is de relatie tussen mate van besmetting en de benodigde stressbehandeling waarbij de bol ziek wordt. Bij elke stressbehandeling is de afweging of het een individuele behandeling moet zijn of dat de behandeling ook nieuwe besmettingen mag veroorzaken zoals dat ook bij verwerking van bollen plaatsvindt.

Duidelijk is dat er nog meer onderzoek naar het aantonen van latente besmettingen moet gebeuren. Daarbij moet ook een keuze gemaakt worden voor een "praktijktoets" en/of een "labtoets". Bijkomende vraag is of er (altijd) op beide *Erwinia*'s moet worden getoetst of alleen op *Erwinia chrysanthemi*. De praktijk lijkt vooral bang voor *Erwinia chrysanthemi*, maar bijvoorbeeld de export maakt geen onderscheid: elke snotbol is

reden de bollen terug te sturen. Probleem hierbij is dat het ook vaak niet te zien is welke van beide Erwinia's de oorzaak is. Bovendien bleek in 2007, in tegenstelling tot voorgaande jaren, vaak dat beide tegelijk aanwezig waren.

Ook is zichtbaar geworden dat er nog een andere oorzaak is van versnotting van bolrokken dan beide genoemde Erwinia's. Ook dit vraagt extra onderzoek.

7 Erwinia in Zantedeschia

7.1 Inleiding

Zantedeschia is een gewas waarin vaak uitval door *Erwinia* voorkomt. Veelal is in rottend weefsel de bacterie *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* aangetroffen en een enkele keer *E. carotovora* spp. *atroseptica*. Door een stagiair zijn een aantal infectieproeven uitgevoerd om een indruk te krijgen hoe gemakkelijk verschillende soorten *Erwinia* het gewas Zantedeschia kunnen aantasten. Er is een blad- en knolinfectieproef uitgevoerd en een proef met knollen in een exicator waarbij de bacteriën met onderdruk in de knol zijn gebracht (zie hoofdstuk 6).

7.2 Materiaal en methode

7.2.1 Bladinfectie

Voor de bladinfectie is gebruik gemaakt van blad van de cultivar 'Hot Chocolate'. Per behandeling zijn 10 bladeren gebruikt die apart in een vaas stonden. De bladeren stonden in de uitbloeiruimte waar een temperatuur van 20 °C was met circa 60% rv en 12 uur licht per etmaal. In Tabel 7.1 zijn de behandelingen weergegeven. De bladeren zijn op een oplossing met bacteriën gezet met een OD=0,1 (optische dichtheid) wat ongeveer overeenkomt met 10⁸ bacteriën/ml. De proef is 15 maart 2006 ingezet. Als beoordeling is een standcijfer voor de mate van verslijming van de stelen gegeven.

Tabel 7.1 Proefschema Zantedeschia-infectieproeven

Behandeling	Infectie
1	Controle PBS
2	<i>Erwinia chrysanthemi</i> (Ech)
3	<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> (Ecc)
4	<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> (Eca)
5	Controle geen infectie (niet van toepassing bij bladinfectie)

7.2.2 Knolinfectie aanprikken

Voor de knolinfectie is gebruik gemaakt van knollen van de cultivar 'Flame'. Per behandeling zijn 40 knollen geïnfecteerd, verdeelt over 4 herhalingen. De knollen zijn 15 maart 2006 geïnjecteerd met de bacteriën volgens het proefschema. Per knol is 1 ml vloeistof geïnjecteerd. Na het infecteren zijn de knollen bij 23 °C gezet, een temperatuur gunstig voor de bacteriën en ingepakt in plastic. Daarbij lagen de knollen los van elkaar om onderlinge besmetting te voorkomen. In Tabel 7.1 zijn de behandeling weergegeven. Na twee weken zijn de knollen beoordeeld op rottend weefsel.

7.2.3 Knolinfectie exicator

Voor de knolinfectie is gebruik gemaakt van knollen van de cultivar 'Flame'. Per behandeling zijn 40 knollen geïnfecteerd, verdeeld over 4 herhalingen. De knollen zijn geïnfecteerd in de exicator volgens het proefschema. In de exicator zijn de knollen ondergedompeld in de bacteriesuspensie waarna gedurende 15 minuten een onderdruk van 60 mBar is aangehouden. Onder deze omstandigheden zouden de bacteriën in het weefsel kunnen dringen zonder verwonding van de knol. Na het infecteren zijn de knollen konden ze uitdruipen en zijn ze in een broedstoom bij 23 °C gezet, een temperatuur gunstig voor de bacteriën. In Tabel 7.1 zijn de behandeling weergegeven. Na twee weken zijn de knollen beoordeeld op rottend weefsel.

7.3 Resultaten

7.3.1 Bladinfectie

De eindbeoordeling van de stelen vond plaats op 24 maart. De stelen zijn beoordeeld op de mate van verslijming. In Tabel 7.2 zijn de resultaten weergegeven. In de tabel is te zien dat veruit de meeste verslijmde stelen zijn verkregen indien de stelen op een oplossing met Ecc waren gezet. Ook Eca veroorzaakte meer verslijming en insnoering van stelen dan de controle. Het water met Ech had geen effect op de bladstelen.

Opvallend is dat de stelen op de oplossing met Ecc na twee dagen al massaal begonnen te verslijmen terwijl de stelen op Eca pas een aantal dagen later lichtere symptomen lieten zien. Bladstelen representatief voor de verschillende behandelingen zijn op foto 7.1 te zien.

Tabel 7.2 Gemiddelde stengelscore per behandeling (1=harde groen stengel, 10= volledig verslijmde steel)

Behandeling	Percentage ploffers
<i>E. chrysanthemi</i>	1,0
<i>E. c. caratovora</i>	7,6
<i>E. c. atroseptica</i>	3,4
Controle	1,0
LSD*	0,41



Foto 7.1 Bladstelen enkele dagen na inzetten proef met van boven naar beneden: Controle, Eca, Ecc en Ech

7.3.2 Knolinfectie aanprikken

Op 20 maart, 5 dagen na infectie waren de eerste symptomen zichtbaar. Knollen geïnjecteerd met Ecc vertoonde zachtrotte plekken. Alle overige knollen bleven hard. De aantasting begon veelal rond de plek van infectie. In tabel 7.3 is de eindbeoordeling (2 weken na infectie) weergegeven. Alleen infectie met Ecc veroorzaakte knollen met zachtrot. Wel 75% van de knollen was aangetast. De aantasting varieerde wel van een zachtrotte plek van 1 cm diameter tot volledig verrotte knollen inclusief vastzittende bijknollen. De

andere twee soorten *Erwinia* veroorzaakten geen rot.

Tabel 7.3 Gemiddeld percentage knollen met zachtrot per behandeling

Behandeling	Percentage zachtrot
E. chrysanthemi	0
E. c. caratovora	75
E. c. atroseptica	0
Controle	0
LSD*	11,9

7.3.3 Knolinfectie exicator

Ook in deze proef zijn alleen rotte knollen (50%) gevonden na infectie met Ecc. Knollen geïnfecteerd met Eca en Ech waren alle visueel gezond, er was geen rotting zichtbaar. Doordat de knollen niet zijn aangeprikt ontstond de rotting op verschillende plaatsen op de knol na infectie met Ecc. De knollen zijn beoordeeld op de plaats waar de rotting begon. Tussen de zachte knollen van behandeling Ecc is onderscheid gemaakt tussen de volgende typen aantasting:

1. Nog geheel hard en reukloos (is nog geen garantie dat knol niet ziek is)
2. Zacht bij de spruit
3. Geheel zacht
4. Zacht op andere plaats dan bij de spruit/bijbol

Opgemerkt moet worden dat het onderscheid alleen de eerste week goed te maken was, daarna werd vaak de gehele knol zacht. De beoordeling van de knollen is in Tabel 7.4 weergegeven.

Tabel 7.4 Aantal zachtrotte knollen van de exicatorproef

Type aantasting	Aantal knollen
1	20
2	7
3	3
4	10
Totaal	40

Opvallend is dat het zacht worden in bijna de helft van de gevallen begon in de spruit. Daarnaast ontstond rotting ook vaak op zichtbare lichte beschadigingen.

7.4 Conclusie en discussie

Hoewel elke infectieproef slechts eenmalig is uitgevoerd komen de resultaten wel goed met elkaar overeen. Dit vergroot de betrouwbaarheid van dit onderzoek.

Bij alle drie de infectiemethodes bleek Ecc veruit het meest pathogeen te zijn. *Erwinia carotovora* spp *atroseptica* (Eca) veroorzaakte in één proef een lichte aantasting. Het toedienen van Ech leverde geen rotting op (Van Leeuwen *et al.* 2005)

Deze waarnemingen komen redelijk goed overeen met monsternames van rotte *Zantedeschia* in de afgelopen jaren. Uit rotte *Zantedeschia* is meestal Ecc geïsoleerd maar een enkele keer ook Eca (Ma *et al.* 2007). Ech is nooit uit rotte *Zantedeschia* geïsoleerd.

Doordat de toetsen maar op één wijze zijn uitgevoerd kan er niet geconcludeerd worden dat Eca en Ech nooit voor problemen kunnen zorgen. Mogelijk kunnen deze bacteriën wel rot veroorzaken indien er hogere concentraties aanwezig zijn of wanneer de knollen niet goed gedroogd in rust zijn zoals in deze proeven. Het is goed denkbaar dat een nog vochtige, vers gerooide knol gevoeliger is voor aantasting.

Gezien het feit dat ook Ecc de nodige problemen kan veroorzaken (en niet alleen in Zantedeschia) verdient het aanbeveling ook aandacht aan Ecc te geven in verder onderzoek. Er zijn aanwijzingen dat bij Ecc, net als bij Ech, virulentere isolaten voorkomen (Yap *et al.* 2004).

8 *Erwinia chrysanthemi* (ploffers) in Dahlia

8.1 Inleiding ploffers in Dahlia

Sinds 1998-1999 hebben veel dahliastekproducenten last van ploffers tijdens de stekproductie. Ploffers zijn knollen die natrot wegvallen tijdens de stekproductie. De oorzaak van dit verschijnsel was niet bekend. In de helft van de gevallen dat ploffers werden onderzocht werd de bacterie *Erwinia chrysanthemi* aangetoond, zowel bij PPO als bij de PD. Een tweetal infectieproeven waarbij het blad van bewortelde stekken werd ondergedompeld in een oplossing met *E. chrysanthemi* leverde geen besmette planten of knollen op. Op basis hiervan werd geconcludeerd dat *E. chrysanthemi* niet de veroorzaker was van ploffers. Een enquête onder stekproducenten leverde de suggesties op dat de bemesting/minerale samenstelling van de knol van invloed zou kunnen zijn op het ploffen, evenals omstandigheden in de teelt, bewaring en opleg. Ook de rijpheid van de knol (niet goed afgerijpt zijn bij rooien) werd als mogelijke oorzaak gezien. Onderzoek naar het effect van deze aspecten op het verschijnsel ploffers leverde op dat deze factoren wel van invloed waren op het ploffen maar niet de oorzaak waren. Gedurende dat onderzoek zijn wel steeds meer aanwijzingen verkregen dat *E. chrysanthemi* mogelijk toch wel een rol speelde bij het ploffen. Binnen dit project zijn infectieproeven uitgevoerd met knollen (par. 8.2), en stekken (par. 8.3). De knollen gegroeid uit de stekken zijn opgelegd om ploffers vast te stellen. Daarnaast is onderzocht of overdracht op het veld plaats kan vinden (par. 8.4).

8.2 Infectie knollen

8.2.1 Materiaal en methode infectie knollen

Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van knollen van de cultivars 'Deepest Yellow' en 'My Love'. De knollen zijn 12 april 2005 opgelegd. De eerste twee weken is een kastempertuur van 15 °C aangehouden om de knollen te laten bewortelen, daarna is de temperatuur verhoogd naar 23 °C. Eind april, toen de knollen goed waren beworteld, zijn deze geïnfecteerd. Per cultivar zijn 100 knollen met een injectienaald geïnfecteerd met twee verschillende stammen van Ech. Een stam was afkomstig uit de collectie van de universiteit van Gent. Deze stam was afkomstig uit een verwelkingszieke plant. De andere stam is geïsoleerd uit een ploffer. Per knol is één verdikte wortel/peen ingespoten. In Tabel 8.1 zijn de behandelingen weergegeven. Bij het maaien is na elk veldje de heggenschaar ontsmet om overdracht van de bacterie op deze wijze te voorkomen. Het onderzoek is uitgevoerd bij PPO Lisse.

8.2.2 Resultaten infectie knollen

Binnen één week na het infecteren van de knollen waren de eerste ploffers zichtbaar, vooral bij de cultivar 'Deepest Yellow'. Op de plaats waar de bacteriën waren ingebracht begon de knol te schuimen.

Op 2 juni zijn de knollen cv. 'Deepest Yellow' beoordeeld en op 17 juni de knollen van de cv. 'My Love'. Het percentage ploffers is weergegeven in tabel 6. In de tabel is te zien dat beide isolaten van *E. chrysanthemi* bij 'Deepest Yellow' een hoog percentage ploffers tot gevolg had. Ook in de controle ploften 14% van de knollen. De partij 'Deepest Yellow' was blijkbaar niet vrij van de veroorzaker van ploffers. De cultivar 'My Love' had geen ploffers in de controle. Ech uit een verwelkingsplant gaf net niet meer ploffers dan de controle, de *Erwinia* uit een ploffer vandaan wel. Bij beide cultivars was er geen betrouwbaar verschil in reactie tussen beide isolaten *Erwinia*.

Tabel 8.1 Percentage ploffers per behandeling

Cultivar	Infectie	Percentage ploffers
'Deepest Yellow'	Niet (controle)	14.0
'Deepest Yellow'	<i>E. chrysanthemi</i> (verwelking)	62.0
'Deepest Yellow'	<i>E. chrysanthemi</i> (plover)	69.0
'My Love'	Niet (controle)	0.0
'My Love'	<i>E. chrysanthemi</i> (verwelking)	14.0
'My Love'	<i>E. chrysanthemi</i> (plover)	24.0
LSD		16.6

8.2.3 Conclusie infectie knollen

- *Erwinia chrysanthemi* was in staat om knollen van twee cultivars te laten ploffen na infectie. Dit was het geval bij zowel het *Erwinia*-isolaat afkomstig van een verwelkte plant als bij het isolaat van een geplofte knol.
- Er was geen betrouwbaar verschil in reactie tussen de beide isolaten.
- Deze proef maakt het aannemelijk dat *E. chrysanthemi* de veroorzaker is van het ploffen van dahliaknollen; het is nog niet het wetenschappelijke bewijs.

8.3 Infectie van stekken

8.3.1 Materiaal en methode infectie van stekken

Voor dit onderzoek is gebruik gemaakt van bewortelde stekken van de cultivars 'Karma Serena' en 'Gallery Pablo'. Voor deze cultivars is gekozen omdat het stekken betrof van knollen die één jaar op het veld zijn geteeld nadat het materiaal afkomstig was uit weefselweek. Daardoor was de kans erg groot dat dit materiaal nog niet besmet was met bacteriën.

De bewortelde stekken zijn in de steel met een injectienaald geïnoculeerd met Ech afkomstig uit een verwelkingszieke plant (isolaat universiteit van Gent) of met een Ech- isolaat afkomstig uit een plover. Daarnaast zijn ook gezonde stekken geplant in potgrond waar gemalen ploffers doorheen zijn gewerkt. Het infecteren van de stekken (met injectienaald of planten op besmette grond) vond plaats op 27 april 2005. De bewortelde stekken hebben na de infectie gedurende een maand in de kas gestaan in een multiplaat bij 18 °C. De stekken stonden vanwege de multiplaat los van elkaar in hun eigen potgrond. De stekken zijn 23 mei 2005 op het veld geplant en eind oktober gerooid.

De knollen zijn 25 januari 2006 in de kas opgelegd. Na het opleggen was de kastemperatuur 12 °C tot 13 °C. Vanaf 13 maart is een temperatuur van 23 °C aangehouden. Per behandeling zijn 4 herhalingen met elk 25 stekken/knollen gebruikt. In Tabel 8.2 is het proefschema weergegeven. Bij behandeling 2B, 2C en 2D zijn per abuis de stekken met beide isolaten geïnfecteerd. Elke herhaling is apart op een bak opgelegd om infectie tijdens de stekperiode zoveel mogelijk te voorkomen.

Tabel 8.2 Proefschema

Nr.	Cultivar	besmetting
1	'Serena'	niet (controle)
2	'Serena'	<i>E. chrysanthemi</i> (Gent)
3	'Serena'	<i>E. chrysanthemi</i> (uit ploffer)
4	'Serena'	grond besmet met ploffers
5	'Pablo'	Niet
6	'Pablo'	<i>E. chrysanthemi</i> (Gent)
7	'Pablo'	<i>E. chrysanthemi</i> (uit ploffer)
8	'Pablo'	grond besmet met ploffers

De postulaten van Koch zijn uitgevoerd door stekken te infecteren met Ech, daar een knol uit te laten groeien en als deze ploft vaststellen of daar weer de bacterie Ech uit te isoleren is.

8.3.2 Resultaten infectie van stekken

De eerste week na het planten van de stekken eind mei, zijn er een aantal zeer warme dagen geweest. Op dat moment hingen diverse planten uit verschillende behandelingen slap. De twee daarop volgende weken was het weer aanmerkelijk koeler en herstelden de planten zich. Er waren geen slappe planten. Weer twee weken later (30 juni) waren er duidelijk planten aan het verwelken en planten met bruine bladranden. De proef is op dat moment beoordeeld.

Tabel 8.3 Aantal verwelkte planten en aantal planten met bruin blad op 30 juni, aantal geoogste knollen (maximaal 25) gemiddeld per behandeling, totaal oogstgewicht (g) en gewicht per knol gemiddeld per behandeling

Cultivar	Infectie	Aantal verwelking	Aantal Bruin blad	Aantal geoogst	Totaal gewicht	Gewicht Per knol
'Serena'	Niet	0.0	0.0	25.0	5594	219.5
'Serena'	<i>E. chrysanthemi</i> Gent+ploffer	1.0	19.3	15.5	2256	137.4
'Serena'	<i>E. chrysanthemi</i> ploffer	0.3	21.5	5.0	1107	177.8
'Serena'	Ploffer in grond	0.3	0.0	23.5	4914	209.4
'Pablo'	Niet	0.0	0.8	25.0	4591	183.6
'Pablo'	<i>E. chrysanthemi</i> Gent	1.0	10.5	24.0	3446	144.1
'Pablo'	<i>E. chrysanthemi</i> ploffer	6.5	18.5	10.0	1237	123.8
'Pablo'	Ploffer in grond	1.0	0.0	22.8	3768	166.4
LSD		2.80	4.36	3.31	1082.4	ns

In Tabel 8.3 is te zien dat veruit de meeste verwelkte planten op 30 juni aanwezig waren in 'Pablo' die met *E. chrysanthemi* uit een ploffer was geïnfecteerd. Er was geen verschil tussen de andere behandelingen. Er waren op 30 juni 3 behandelingen die duidelijk meer bruin blad hadden dan andere behandelingen. Dat waren 'Serena' en 'Pablo' geïnfecteerd met Ech uit een ploffers. 'Serena' had evenveel bruin blad geïnfecteerd met Ech uit Gent én Ech uit een ploffer. In feite zijn het alle drie behandelingen die bedoeld of onbedoeld met Ech uit een ploffer zijn besmet.

De drie behandelingen die op 30 juni het meeste bruine blad hadden hebben uiteindelijk het hoogste percentage uitval bereikt. In Tabel 8.3 is bij het aantal geoogste knollen (maximaal 25) te zien dat veruit het kleinste aantal knollen is geoogst bij 'Serena' geïnfecteerd met Ech uit een ploffer. Iets minder uitval is verkregen na infecteren van 'Pablo' met Ech uit een ploffer. Nog minder uitval, maar wel betrouwbaar meer dan alle andere overige behandelingen, is gevonden bij 'Serena' die met Ech uit Gent én uit een ploffer is geïnfecteerd.

Het grootste totale oogstgewicht per veldje is verkregen bij de controles en 'Serena' geplant op grond met

ploffers. Vooral stekken geïnfecteerd met Ech uit een ploffer gaven een laag oogstgewicht vanwege de uitval. Ook infectie met Ech uit Gent gaf een lager totaal oogstgewicht. Bij beide soorten gaf het planten van stekken op grond met daar doorheen gewerkt een ploffer geen lagere opbrengst.

Opleg

Eén van de behandelingen met de cultivar 'Serena' is met beide isolaten geïnfecteerd.

In Tabel 8.4 is te zien dat binnen 2 weken na het verhogen van de kasttemperatuur bij de cultivar 'Serena' een heel hoog percentage van de knollen ploffen. Dit was het geval bij beide isolaten van *Erwinia*. Er waren op die datum geen betrouwbare verschillen tussen de andere behandelingen.

Op 21 april was het percentage ploffers iets hoger ten opzichte van de eerste datum. Het hoogste percentage ploffers is verkregen bij 'Serena' na infectie met beide isolaten *Erwinia* maar ook 'Pablo' geïnfecteerd met *Erwinia* afkomstig uit een ploffer gaf meer ploffers dan de controles. Een week later (28 april) was er een sterke toename van het percentage ploffers bij 'Pablo' geïnfecteerd met *Erwinia* uit een ploffer.

Bij de eindbeoordeling op 22 mei bleek het hoogste percentage ploffers te zijn verkregen door 'Serena' te infecteren ongeacht met welk isolaat *Erwinia* en 'Pablo' na infectie met het plofferisolaat. Bij 'Pablo' gaf infectie met het isolaat uit Gent wel meer ploffers dan de controle. Ook het door de grond werken van geplofte knollen leidde bij 'Serena' tot meer ploffers dan de controle.

Tabel 8.4 Percentage ploffers in de loop van het stekseizoen gemiddeld per behandeling

Cultivar	Infectie	28 maart	21 april	28 april	22 mei
'Serena'	Niet	0.0	1.0	1.0	1.0
'Serena'	<i>E. chrysanthemi</i> Gent+ploffer	73.6	80.8	82.0	83.2
'Serena'	<i>E. chrysanthemi</i> ploffer	65.6	81.3	81.3	84.4
'Serena'	Ploffer in grond	6.6	13.1	15.4	26.3
'Pablo'	Niet	0.0	0.0	0.0	0.0
'Pablo'	<i>E. chrysanthemi</i> Gent	2.4	11.8	16.6	26.9
'Pablo'	<i>E. chrysanthemi</i> ploffer	24.3	39.6	63.9	78.8
'Pablo'	Ploffer in grond	0.0	4.9	7.3	11.1
LSD		29.19	24.79	27.85	24.43

Uit twee geplofte knollen is de bacterie *Erwinia chrysanthemi* weer geïsoleerd waardoor voldaan is aan de postulaten van Koch.

8.3.3 Conclusies infecteren van stekken

- *Erwinia chrysanthemi* is de veroorzaker van ploffers in Dahlia. Door de postulaten van Koch uit te voeren is onomstotelijk vastgesteld dat *Erwinia chrysanthemi* niet alleen verantwoordelijk is voor verwelkingsziekte in Dahlia maar ook voor ploffers tijdens de stekproductie (Van Leeuwen *et al.* 2006).
- Stekken geïnfecteerd met twee verschillende isolaten van *E. chrysanthemi* gaven op het veld enkele planten met bekende verwelkingszieksymptomen. Daardoor is ook uitval ontstaan. Daarnaast zijn er ook planten zonder symptomen geweest die een visueel gezonde knol gaven. Een zeer hoog percentage van deze knollen bleek na het verhogen van de kasttemperatuur na het opleggen te ploffen.
- Er is een duidelijk verschil in virulentie tussen de twee isolaten. Veruit het hoogste percentage ploffers is verkregen na infectie met het isolaat afkomstig uit een ploffer. Dit isolaat gaf overigens ook het hoogste percentage planten met verwelkingszieksymptomen en de meeste uitval op het veld. Ook infectie met het *E. chrysanthemi* isolaat uit Gent gaf meer ploffers dan de controle.
- Besmetting via de grond leidde bij één van de twee cultivars tot een hoger percentage ploffers dan de controle. Besmetting via de grond is wel mogelijk maar verloopt blijkbaar niet gemakkelijk.

8.4 Overdracht van *Erwinia chrysanthemi* op het veld

8.4.1 Materiaal en methode overdracht *E. chrysanthemi* op het veld

Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van stekken van de cultivar 'Stolze von Berlin' afkomstig uit een partij met veel ploffers. De helft van de stekken (2 herhalingen) waren afkomstig van knollen die gingen ploffen, de andere helft van de stekken van knollen die niet ploften. Daarnaast zijn stekken gebruikt van de cultivar 'Karma Serena' afkomstig van knollen die één jaar op het veld zijn geteeld nadat het materiaal afkomstig was uit weefselweek. Daardoor was de kans erg groot dat dit materiaal nog niet besmet was met bacteriën.

Op het veld zijn op dwarsregels om en om een regel van de verschillende cultivars geplant.

In droge periodes hebben de planten geen extra water gehad of zijn ze extra beregend (per veldje met een gieter) om daarmee de bacterie-overdracht te stimuleren.

De stekken zijn 24 mei 2005 op het veld geplant en eind oktober gerooid. Bij het maaien zijn de veldjes in een keer van voor naar achter gemaaid, zoals in de praktijk gebruikelijk is.

De knollen zijn 25 januari 2006 in de kas opgelegd. Na het opleggen was de kastemperatuur 12 °C tot 13 °C. Vanaf 13 maart is een temperatuur van 23 °C aangehouden.

Per behandeling zijn 4 herhalingen met elk 25 stekken/knollen gebruikt. In Tabel 8.5 is het proefschema weergegeven.

Tabel 8.5 Proefschema

Behandeling	cultivar	Extra water gift
1	'Stolze von Berlin'	Nee
2	'Serena'	Nee
3	'Stolze von Berlin'	Ja
4	'Serena'	Ja

Voor herhaling A en B van 'Stolze von Berlin' zijn stekken gebruikt afkomstig van ploffers, voor herhaling C en D stekken van visueel gezonde knollen uit de plofferpartij.

Elke herhaling is apart op een bak opgelegd om infectie tijdens de stekperiode zoveel mogelijk te voorkomen.

Van 'Serena' zijn in een andere proef stekken van dezelfde partij geplant zonder besmetting als een controle op de gezondheidstoestand van de partij stekken.

8.4.2 Resultaten overdracht *E. chrysanthemi* op het veld

Tijdens de teelt is viermaal extra water gegeven aan behandeling 3 en 4.

De stekken groeiden na het planten goed weg. Vrij kort na het planten werd in een warme periode een enkele slappe (verwelkings-) plant gezien bij 'Stolze von Berlin'. Eind juni zijn het aantal verwelkte planten genoteerd. In Tabel 8.6 is te zien dat er alleen bij 'Stolze von Berlin' verwelkte planten zijn waargenomen.

Tabel 8.6 Aantal verwelkte planten (maximaal 24) gemiddeld per behandeling op 30 juni, percentage uitval bij rooien, totaal oogstgewicht (g) en gewicht (g) per knol gemiddeld per behandeling

Behandeling	cultivar	Extra water	Aantal verwelkt	% uitval	Totaal gewicht	Gewicht/knol
1	'Stolze von Berlin'	Nee	2.5	24.0	2377	129.3
2	'Serena'	Nee	0.0	11.5	3306	159.7
3	'Stolze von Berlin'	Ja	3.5	21.9	2769	144.7
4	'Serena'	Ja	0.0	11.5	3516	167.2
LSD			1.66	10.68	715.9	ns

Bij de oogst van de knollen bleken er meer knollen van 'Stolze von Berlin' weggevallen te zijn dan van 'Serena'. De uitval is toe te schrijven aan verwelkingsziekte. Door de uitval was het totaal oogstgewicht van 'Serena' groter dan van 'Stolze von Berlin'. Er was geen verschil in gemiddeld knolgewicht tussen de beide cultivars.

Er was geen effect van het watergeven op de verwelking.

Zoals in de proefopzet al is aangegeven zijn bij Stolze von Berlin voor twee herhalingen stekken van ploffers gebruikt en voor twee herhalingen stekken van visueel gezonde knollen. Wanneer die worden gemiddeld per herkomst van de stekken (over de behandeling watergeven heen) ontstaat het beeld zoals is weergegeven in Tabel 8.7.

Hoewel bij de stekken afkomstig van ploffers veel meer planten lijken te zijn verwelkt en weggevallen is het verschil niet betrouwbaar. Het oogstgewicht van de knollen afkomstig van stekken van ploffers was kleiner dan van stekken van visueel gezonde knollen.

Tabel 8.7 Aantal verwelkte planten (maximaal 24) op 30 juni, percentage uitval, totaal oogstgewicht (g) en gewicht per knol (g) gemiddeld per herkomst van de stekken van 'Stolze von Berlin'

cultivar	Herkomst	Aantal verwelkt	% uitval	Totaal gewicht	Gewicht/knol
Stolze von Berlin	ploffer	4.75	34.4	1908	121.3
Stolze von Berlin	Nee	1.25	11.5	3238	152.7
LSD		ns	ns	853.8	ns

Opleg

In Tabel 8.8 is te zien dat er geen betrouwbare verschillen in percentages ploffers waren tussen de behandelingen. Toch bestaat de indruk, evenals op het veld, dat het percentage ploffers bij Stolze von Berlin geplukt van plofferknollen hoger was dan van visueel gezonde knollen.

Extra water geven op het veld had geen extra ploffers tot gevolg.

Opvallend is dat het percentage ploffers bij 'Serena' net zo hoog is als bij 'Stolze von Berlin'. Blijkbaar heeft er zeer gemakkelijk overdracht plaatsgevonden van de bacterie op het land.

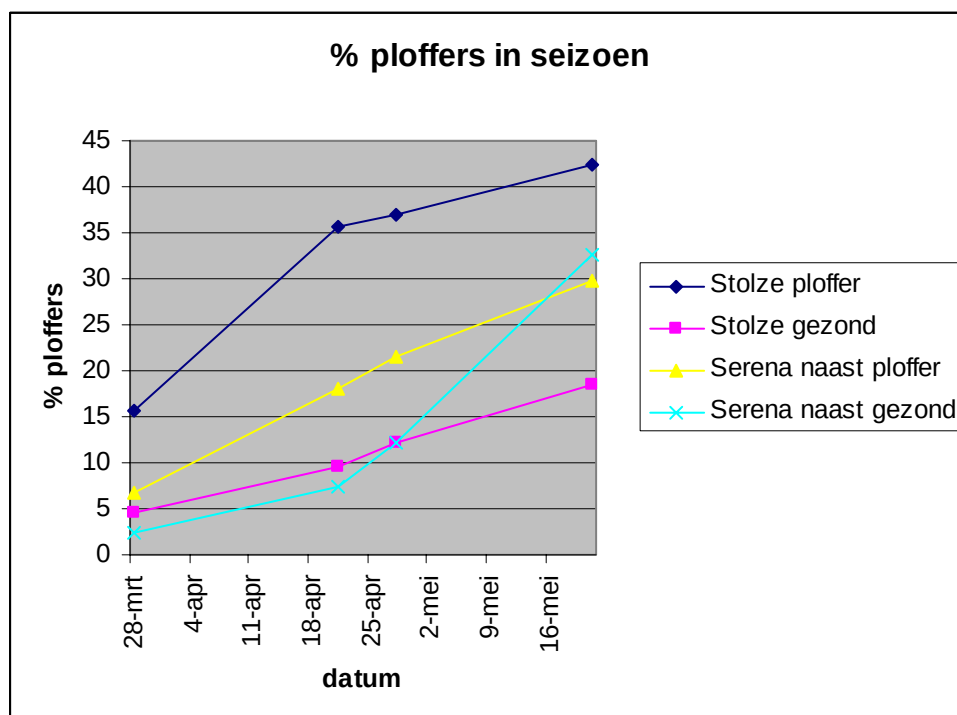
De controlestekken 'Serena' in een andere proef (zie Tabel 8.2) bevatte geen ploffers. Daarmee is uitgesloten dat de partij 'Serena' al besmet was.

Tabel 8.8 Percentage ploffers gemiddeld per behandeling

Cultivar	Herkomst	Extra water	% ploffers
'Stolze von Berlin'	Ploffer	Nee	51.0
'Stolze von Berlin'	Visueel gezond	Nee	17.9
'Stolze von Berlin'	Ploffer	Ja	33.9
'Stolze von Berlin'	Visueel gezond	Ja	18.8
'Serena'	Visueel gezond	Nee	36.5
'Serena'	Visueel gezond	Nee	31.4
'Serena'	Visueel gezond	Ja	23.2
'Serena'	Visueel gezond	Ja	34.0
LSD			46.27

In Figuur 8.1 is te zien dat twee weken na het opstoken van de kastemperatuur (28 maart) er al direct knollen gingen ploffen. In de loop van het seizoen kwamen daar nog veel knollen bij. In het begin zijn de meeste ploffers gevonden bij 'Stolze von Berlin' geplukt van plofferknollen. Bij alle behandelingen nam het

percentage ploffers tijdens de stekperiode sterk toe. Dit kan erop duiden dat er besmetting tijdens de stekperiode heeft plaatsgevonden.



Figuur 8.1 Percentage ploffers in de loop van het seizoen gemiddeld per behandeling

8.4.3 Conclusie overdracht van *E. chrysanthemi* op het veld

- Gedurende één groeiseizoen heeft op het veld een hoog percentage (meer dan 30%) overdracht van *Erwinia chrysanthemi* plaatsgevonden. In een andere proef zijn stekken 'Serena' van dezelfde partij geplant waarin later 0% ploffers bleken te zitten.
- Deze proef geeft niet aan hoe de overdracht van *E. chrysanthemi* heeft plaatsgevonden, via de grond, het maaien of op een ander wijze.
- De extra watergiften op het veld tijdens de teelt waren niet van invloed op het percentage ploffers.
- Er was geen betrouwbaar verschil tussen de stekken van Stolze von Berlin afkomstig van ploffers of visueel gezonde knollen. De stekken afkomstig van ploffers leken echter wel een hoger percentage knollen met ploffers op te leveren. Het niet statistisch betrouwbaar aan kunnen tonen van dit verschil is mogelijk door de beperkte omvang van de proef te verklaren.

8.5 Conclusie en discussie

Erwinia chrysanthemi blijkt de veroorzaker te zijn van ploffers in Dahlia. Van deze bacterie was al langer bekend dat die bacterieverwelkingsziekte kon veroorzaken. De bacterie blijkt nu twee verschillende symptomen te kunnen veroorzaken. Infectie van knollen met de bacterie leidde direct tot ploffers terwijl infectie van stekken leidde tot knollen die gingen ploffen. Uit deze knollen kon de bacterie weer geïsoleerd worden (Van Leeuwen *et al.* 2006).

Infectie via de grond, door stekken op grond te planten waar doorheen ploffers waren verwerkt, was mogelijk maar leverde een laag percentage zieke knollen op. De overdracht verliep veel sneller (30% in één jaar) door gezonde en besmette stekken naast elkaar op het veld te planten. Het is niet duidelijk of de overdracht op het veld via de grond, wortels, via het maaien van het gewas of op een andere wijze heeft plaatsgevonden. Op basis van dit onderzoek lijkt besmetting vanuit de eigen partij (zieke plant naast een gezonde plant) het meest gemakkelijk te verlopen. Ziektevrij uitgangsmateriaal om het probleem te verkleinen is daarvoor zeer belangrijk.

9 Veldproeven met *Erwinia*-besmetting: effect op de vruchtwisseling

9.1 Inleiding

Vanuit de praktijk zijn ervaringen gemeld die sterk duiden op een besmetting vanuit een voorvrucht. Echter, er zijn veel meer ervaringen die er op wijzen dat die besmetting niet optreedt. Als besmetting met *Erwinia* ook via de bodem belangrijk is zou dit grote gevolgen kunnen hebben voor de vruchtwisseling omdat *Erwinia* veel gewassen kan aantasten. Om die reden is in 2004 onderzoek gestart op PPO om na te gaan of een bemetting vanuit de grond voor meer aantasting zorgt. Bij de toegepaste besmetting en nageteelde gewassen zit *Zantedeschia*, waarvan bekend is dat de aantasting veroorzaakt wordt door *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* en niet door *Erwinia chrysanthemi*. *Ecc* kan ook bij andere bol/knolgewassen voor aantasting zorgen zoals hyacint (witsnot).

9.2 Materiaal en methode

In het najaar werden op de tuin van PPO Lisse, aangetaste bollen/knollen van hyacint, iris en *Zantedeschia* door de grond gewerkt. Extra was er een gecombineerde behandeling van aangetaste hyacint met compost, omdat over het gebruik van (eigen) compost de meningen eveneens verdeeld waren. Vervolgens werden hyacint, iris en Muscari en in het voorjaar Dahlia en *Zantedeschia* geplant. De bollen werden na rooien tijdelijk onder minder gunstige omstandigheden gedroogd en bewaard (o.a. beschadigd en vochtig en/of bij hoge temperatuur bewaard) om een aanwezige besmetting meer kans te geven. Het onderzoek is twee jaar uitgevoerd waarbij in het tweede jaar dezelfde grond opnieuw werd besmet maar ter voorkoming van andere ziekten werd wel een ander gewas dan het eerste jaar geplant. *Zantedeschia* kwam op de plaats van hyacint, Dahlia op de plaats van Muscari, Muscari op de plaats van iris, hyacint op de plaats van *Zantedeschia* en iris op de plaats van Dahlia.

Na bewaring werd de aanwezige aantasting vastgelegd. De beoordeling vond plaats afhankelijk van het gewas plaats in najaar (hyacint en Muscari), winter (Dahlia en *Zantedeschia*) of voorjaar (iris). De Dahliaknollen werden opgelegd ter bepaling van het aantal geplofte knollen bij de stekproductie. Het onderzoek lag in 3 herhalingen.

9.3 Resultaten

Op het veld werd geen of nauwelijks aantasting waargenomen.

Na rooien en drogen en bewaren was dit wel het geval (Tabel 9.1). Tussen de jaren waren per gewas grote verschillen in mate van aantasting. De spreiding in aantasting tussen de herhalingen was ook groot mede waardoor geen verschillen konden worden aangetoond.

Het aanbrengen van zieke bollen of knollen heeft geen toename van de aantasting veroorzaakt. Er was geen invloed van de aangebrachte compost op een aantasting door *Erwinia*.

Tabel 9.1 Het percentage aangetaste bollen/knollen na een jaar teelt op in het najaar besmette grond en bewaring onder voor *Erwinia* gunstige omstandigheden

besmetting van de grond	% aantasting in het op besmette grond geteelde gewas									
	hyacint		Muscari		iris		Dahlia		Zantedeschia	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
geen	0.7	17.9	44.4	0	0.6	5	0	0	13.4	16.7
aangetaste hyacint	2	31.7	50.0	0	1.0	4.3	0	1.1	23.9	2.9
aangetaste hyacint + compost	0.3	11.9	43.2	1.3	1.2	3.9	0	0	15.9	0.0
aangetaste iris	0	25.0	52.0	0	1.3	3.9	0	3.3	29.4	11.1
aangetaste Zantedeschia	0	4.4	46.4	0	0.8	6.1	0	0	21.7	13.3
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
geen	0.7	17.9	44.4	0.0	0.6	5.0	0.0	0.0	13.4	16.7
gemiddeld van de besmettingen	0.6	18.3	47.9	0.3	1.1	4.6	0.0	1.1	22.7	6.8
totaal gemiddeld per gewas	0.6	18.2	47.2	0.3	1.0	4.6	0.0	0.9	20.9	8.8

9.4 Conclusies en discussie

- In het najaar in de grond aangebrachte door *Erwinia* aangetaste bollen of knollen veroorzaakten geen toename van de *Erwinia* aangetaste bollen of knollen.
- Composttoediening had geen effect op een aantasting door *Erwinia*.
- De in een partij aanwezige (latente) besmetting is veel meer bepalend voor een aantasting dan een eventuele grondbesmetting.

Onderzoek naar overleving (Van Doorn *et al.* 2007a) van *Erwinia* in de grond geeft aan dat *Erwinia* kort overleeft (in afwezigheid van plantenresten). Voor Ech was dit nog veel korter dan voor Ecc (3 weken respectievelijk 3 maanden). In dit onderzoek op de tuin van PPO bleek twee jaar lang dat ook bolrestanten met *Erwinia* geen belangrijke rol spelen in de besmetting. De al in de partij aanwezige besmetting bleek in dit onderzoek veel belangrijker te zijn. Dit uitte zich in zeer grote verschillen tussen de jaren per gewas. Niet uitgesloten kan worden dat er bepaalde (andere dan hier) omstandigheden zijn dat er wel een besmetting vanuit besmette grond kan optreden. De enkele praktijkervaringen die er zijn wijzen daar toch wel sterk op en er is nog geen andere verklaring voor die gevallen (Vreeburg *et al.* 2007b). Deze resultaten bevestigde de mening dat in de partij aanwezige latente besmetting zeer belangrijk is en dus voorkomen moet worden (Vreeburg *et al.* 2006).

10 Invloed van bemesting op *Erwinia*-aantasting

10.1 Inleiding

Regelmatig wordt de vraag gesteld of bemesting en bolinhoud invloed kan hebben op de gevoeligheid voor *Erwinia*. In de enquête in 2004 kwam dit ook naar voren. Bedrijven die veel kalium gaven bleken minder last hebben. In PPO bemestingsonderzoek veroorzaakte een late N-gift over het gewas meer aantasting door *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* op het veld waarbij een bolaantasting door snel rooien en fel drogen kon worden voorkomen.

Vanuit andere onderzoek- en praktijkervaringen en literatuur is bekend dat diverse elementen invloed op groei en ontwikkeling kunnen hebben en daarmee een indirect positief of negatief effect kunnen hebben op de weerstand en ziektegevoeligheid.

Om na te gaan of het gesignaleerde effect van kaliumbemesting ook onder proefomstandigheden optreedt is samen met andere nutriënten onderzocht of er minder *Erwinia* zou kunnen zijn na toediening.

Na een oriënterend onderzoek werd het tweede jaar een groter onderzoek uitgevoerd.

10.2 Materiaal en methode

In 2005 is oriënterend ervaring opgedaan met hyacint door in het voorjaar extra gift (-en) te geven met K (2 x 100kg patent kali of Multi K), N (75kg in ammoniumnitraat), sporenelementen (4 x 5 l Wuxal 1) en Mn (4 l Mandrolin). De middelen werden gestrooid of gespoten op een lichtbesmette partij Delft Blue en op een zwaar besmette partij Blue Star. Ook op iris werd een beperkt oriënterend proef uitgevoerd.

In 2006 werd een uitgebreider onderzoek uitgevoerd op een “gezonde” partij Delft Blue en op een “besmette” partij Carnegie. De bolmaat was 10-13cm en er waren 3 herhalingen.

De aantasting werd in november vastgelegd na een periode van mindere snelle droging na rooien, gevolgd door een warme bewaring bij 30°C.

Het perceel waarop het onderzoek werd uitgevoerd was een oudere bollentuin met een normale voedingstoestand. Het jaar ervoor was stalmest toegediend. Er werd een standaard bemesting toegepast. De nutriënten die gegeven werden kwamen daar boven op (Tabel 10.1).

Tabel 10.1. Behandelingschema

behandeling
controle geen
40 ton/ha stalmest
Ca dompelen
Ca in veur bij planten
200 kg extra patent kali
100 kg N extra
20 l Wuxal
16 l Mandrolin (Mn)
34,5kg Kaliumsilicaat
Ca onderdruk na rooien

10.3 Resultaten

Het eerste jaar werd 8 juli gerooid en na 10 dagen werd duidelijk dat in de besmette partij bij enkele behandelingen een zware aantasting aanwezig was. Bij beide behandelingen waar extra kalium was gegeven werd veel aantasting gezien (15-22%). In de controle en de andere behandelingen bleef de aantasting beperkt tot 1%. Ook de oriënterende proef met iris gaf een gelijk beeld. Bij de andere partij werd vrijwel geen aantasting gezien.

Het tweede jaar werd in beide partijen een zware aantasting waargenomen. Er werd echter geen positief effect op de aantasting waargenomen door de toegepaste behandelingen (Tabel 10.2). De behandeling met onderdruk na rooien leidde wel tot extreem veel verrotting. Waarschijnlijk zouden de bollen ook zonder de calcium verloren zijn gegaan door de onderdruk.

Tabel 10.2. Het percentage door *Erwinia* aangetaste bollen na behandelingen van voor het planten tot na het rooien na bewaring voor *Erwinia* gunstige omstandigheden

behandeling	Delft Blue	Carnegie (besmet)
controle	13	21
gemiddelde 3 beh. voor /bij planten	15	27
gemiddelde 5 beh. in het voorjaar	15	22
Ca onderdruk na rooien	77	97

10.4 Conclusie en discussie

Extra toediening van K, Ca, N, Mn, Se, sporenmix en stalmest leidde niet tot een vermindering van de aantasting door *Erwinia*.

Het positieve effect van kalium zoals gezien in de enquête onder hyacintentelers in 2004 werd in onderzoek op deze tuin niet bevestigd. Opvallend was zelfs de nadelige invloed in het eerste oriënterende jaar. Niet uitgesloten kan worden dat onder andere omstandigheden waarbij in de grond een of meer tekorten of overschotten van bepaalde elementen aanwezig zijn, er wel effecten kunnen worden gezien van bepaalde elementen (Vreeburg *et al.* 2007b).

De aantasting leek vooral gebonden aan de in de partij aanwezige (latente) besmetting en de omstandigheden na rooien. Voorkomen van deze latente besmetting verdient de hoogste aandacht.

11 Preventie van Erwinia in de keten: besmetting bij de vermeerdering

11.1 Inleiding

Hyacinten worden vermeerderd via hollen of snijden van geselecteerde en door de BKD gekeurde bollen: de zogenaamde werkbollen. Als in deze werkbollen een aantasting door *Erwinia* aanwezig is kan deze besmetting doorgegeven worden aan de volgende generatie bollen. Bij het vermeerderen zullen de zichtbaar zieke bollen niet worden gebruikt. Echter ook niet-zichtbaar zieke bollen kunnen latent besmet zijn. Omdat het uitgaan van gezond uitgangsmateriaal van cruciaal belang is in de strijd tegen *Erwinia* wordt in dit onderzoek nagegaan wat de gevolgen zijn van een besmetting bij hollen en snijden tijdens de bewaring en de nateelt tot leverbaar. In het voorjaar van 2006 was door een stagiaire al ervaring opgedaan met besmetting van messen bij de vermeerdering, waaruit bleek dat er een forse besmetting op kan treden.

11.2 Materiaal en methode

In 2006 zijn een zichtbaar besmette partij Carnegie en een op het oog gezonde partij Delft Blue gehold en gesneden.

De hol- en snijmessen werden, uitgezonderd de controle, besmet door de messen door een gekweekte cultuur van *Erwinia chrysanthemi* te strijken of door een zwaar aangetaste bol (Carnegie) te snijden. De aangetaste bollen zijn niet getest op welke soort *Erwinia* aanwezig was.

Na de mesbesmetting werden telkens 8 bollen gehold of gesneden en op volgorde bewaard. Daarna werd het mes schoongemaakt en ontsmet in 70% alcohol, afgedroogd en opnieuw besmet voor een volgende herhaling. Per behandeling waren er 10 herhalingen voor de controle en 5 herhalingen voor de besmette behandelingen.

Na het hollen en snijden werden de bollen 4 dagen gedroogd bij 23 of 25°C (controle alleen 25°C) en daarna 3 dagen nagedroogd bij 30°C. De bollen werden daarna bewaard bij 23°C tot het planten in november.

De aangetaste bollen werden voor het planten verwijderd. Bij planten werden alle bollen van hetzelfde hol/snij nummervolgorde per behandeling gezamenlijk geplant (herhalingen bijelkaar) en zo enkele jaren verder geteeld. Na rooien werden de bollen standaard gedroogd en bewaard bij 30°C en heetgestookt bij 2w 38°C + 3d 44°C. Daarna werden de bollen geplozen en beoordeeld op percentage aangetaste bolletjes. Besmetting vanuit andere eenheden is voorkomen door alles met de hand te rooien en te verwerken en door tijdens de bewaring papier op de bollen te leggen tegen druipers van de bak erboven.

De aantasting is vastgelegd tijdens de bewaring waarbij de aangetaste bollen zijn verwijderd. Op het veld is een eventuele aantasting waargenomen.

11.3 Resultaten

11.3.1 Bewaring tot planten

Al kort na het snijden werd een aantasting door *Erwinia* gezien. Eind augustus zijn de meeste snotbollen verwijderd. Bij planten werden alsnog enkele bollen verwijderd.

Duidelijk bleek dat door het snijden de meeste aantasting ontstond (Tabel 11.1). Na hollen kwam vrijwel geen aantasting voor. De verschillen tussen beide cultivars waren beperkt. De verschillen tussen beide droogtemperaturen waren niet duidelijk. Onbekend is waarom er bij Delft Blue na besmetting met een

snotbol en bewaring bij 23°C zoveel meer aantasting ontstond dan bij Carnegie. Een snotbol als besmetting gaf veelal meer aantasting (Tabel 11.1 en 11.2) dan de gekweekte zuivere cultuur van *Erwinia chrysanthemi*.

Gesneden bollen (10 stuks) die er op moment van planten gezond uitzagen en die in de reeks van 8 bollen vlak voor of na een aangetaste bol kwamen werden getoetst op aanwezigheid van *Erwinia chrysanthemi*. Daarvan werd er bij één een besmetting vastgesteld. Bij 10 holbollen werd geen besmetting aangetoond. Ook in enkele niet-besmette snijbollen werd geen *Erwinia* aangetoond.

Tabel 11.1 Percentage door *Erwinia* aangetaste hol- en snijbollen tijdens de bewaring tot planten als gevolg van besmetting bij vermeerderen, de vermeerderingswijze en de bewaring

besmetting ho/snijmes	droog- temp.	her- haling	% aangetaste bollen								gemid. % snot	% aangetaste bollen								gemid. % snot	% aangetaste bollen								gemid. % snot	% aangetaste bollen								gemid. % snot
			Carnegie snijden									Carnegie hollen									Delft Blue snijden									Delft Blue hollen								
			bolnummer (achter elkaar gesneden)								bolnummer (achter elkaar gehold)								bolnummer (achter elkaar gehold)								bolnummer (achter elkaar gesneden)											
niet	25°C	a	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	1.3	1	2	3	4	5	6	7	8	2.6	1	2	3	4	5	6	7	8	0
		b	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		c	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		d	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		e	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		f	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		g	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		h	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		i	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		j	1	2	3	4	5	6	7	8		22.6	1	2	3	4	5	6	7		8	0	1	2	3	4	5	6		7	8	17.8	1	2	3	4	5	
met Ech	23°C	a	1	2	3	4	5	6	7	8	22.6	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	17.8	1	2	3	4	5	6	7	8	0
		b	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		c	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		d	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		e	1	2	3	4	5	6	7	8		27.8	1	2	3	4	5	6	7		8	0	1	2	3	4	5	6		7	8	60.2	1	2	3	4	5	
snotbol	23°C	a	1	2	3	4	39	6	7	8	27.8	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	60.2	1	2	3	4	5	6	7	8	0
		b	1	38	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		c	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		d	1	2	3	4	5	40	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		e	1	2	3	4	5	6	7	8		27.6	1	2	3	4	5	6	7		8	0	1	2	3	4	5	6		7	8	27.8	1	2	3	4	5	
met Ech	25°C	a	1	2	3	4	5	42	7	8	27.6	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	27.8	1	2	3	4	5	6	7	8	0
		b	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		c	1	2	3	4	5	6	43	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		d	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		e	1	2	41	4	5	6	7	8		42.6	1	2	3	4	5	6	7		8	0	1	2	3	4	5	6		7	8	35.2	1	2	3	4	5	
snotbol	25°C	a	1	2	3	4	5	6	7	8	42.6	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	35.2	1	2	3	4	5	6	7	8	0
		b	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		c	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		d	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
		e	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		0	1	2	3	4	5	6	7		8	1	2	3	4	5	6	7	

= aangetaste bol

■ = aangetaste bol

De variatie in mate van aantasting en aantal bollen binnen een reeks was groot, maar gaf gemiddeld wel een logische lijn te zien. De besmetting liep af naarmate meer bollen zijn gesneden (Tabel 11.2), maar liep soms door tot en met de achtste en laatste bol. De besmetting kan mogelijk dus nog langer aanwezig zijn. Een snotbol als besmettingsbron gaf veelal meer aantasting en bleef langer besmettelijk in een reeks dan een besmetting met gekweekte Ech.

Tabel 11.2 Percentage door *Erwinia* aangetaste snijbollen, gemiddeld over 2 cultivars

besmetting snijmes	droging na snijden	bolnummer (achterelkaar gesneden)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Ech	23°C	90	40	10	0	20	10	10	0
snotbol	23°C	90	60	50	70	20	30	30	0
Ech	25°C	100	60	30	20	10	0	0	0
snotbol	25°C	70	60	40	40	40	30	20	20
gemiddeld		87.5	55	33	33	23	18	15	5

11.3.2 Veld en oogst

Op het veld werden enkele volledig door *Erwinia* in elkaar zakkende planten waargenomen in gesneden en besmette Carnegies.

Na rooien en bewaren inclusief heetstook werden de bollen geplozen en op opbrengst en aantasting beoordeeld. Hierbij bleek dat een besmetting van de messen bij hollen en nog meer bij snijden leidde tot een aantasting door *Erwinia*. Opvallend was dat er ook in de gesneden controles een aantasting werd gevonden en dat er geen aantasting was bij de bij 23°C gedroogde en met *Erwinia chrysanthemi* besmette hol- en snijbollen. Bij laatstgenoemde behandelingen waren wel al veel bollen (18 en 23%) tijdens de bewaring na snijden aangetast en verwijderd. De besmetting met een snotbol gaf meer aantasting dan met een gekweekte cultuur van *Erwinia chrysanthemi*.

Tabel 11.3. Het percentage door *Erwinia* aangetaste bolletjes en het percentage van de opgeplante partijtjes (elk volgnummer bij de vermeerdering per behandeling apart) na een jaar teelt, waarin aangetaste bolletjes voorkwamen

besmetting	droging	% snotbolletjes in de geoogste bolletjes	% partijtjes met snotbollen	% snotbolletjes in de geoogste bolletjes	% partijtjes met snotbollen
		Delft Blue hollen (gemid 18st/bol)		Delft Blue snijden (gemid 10,5 st/bol)	
geen	25°C	0.0	0.0	1.2	50.0
geen	25°C	0.0	0.0	0.0	0.0
Ech	23°C	0.0	0.0	0.0	0.0
snotbol	23°C	0.6	12.5	20.5	83.3
Ech	25°C	0.3	12.5	4.2	57.1
snotbol	25°C	1.0	25.0	4.7	37.5
		Carnegie hollen (gemid 27,5st/bol)		Carnegie snijden (gemid 13,8st/bol)	
geen	25°C	0.0	0.0	4.5	12.5
geen	25°C	0.0	0.0	0.0	0.0
Ech	23°C	0.0	0.0	0.0	0.0
snotbol	23°C	0.1	12.5	8.1	71.4
Ech	25°C	0.1	12.5	3.0	57.1
snotbol	25°C	0.2	12.5	2.2	25.0

De gehele opbrengst is weer opgeplant en wordt verder vervolgd in een vervolgproject (Deltaplan *Erwinia*).

11.4 Conclusies en discussie

- Met *Erwinia* besmette hol- en snijmessen besmetten hol- en snijbollen, waarbij de aantasting kort daarna zichtbaar kan worden maar ook pas maanden of een jaar later (en mogelijk nog later) als dus een latente besmetting is veroorzaakt.
- De besmetting bij snijden is veel ernstiger dan bij hollen.
- Omdat een besmetting onzichtbaar kan zijn, is het uit oogpunt van het voorkomen van besmetting door *Erwinia* een absolute noodzaak uit te gaan van gezonde *Erwinia*-vrije werkbollen. Daarbij verdient hollen sterk de voorkeur boven snijden (Vreeburg *et al.* 2007a).

Bij de bestrijding van *Erwinia* wordt uitgegaan van twee richtingen: gezond starten vanaf de werkbol en daarna voorkomen van een nieuwe besmetting. Dit onderzoek maakt duidelijk hoe belangrijk het uitgaan van *Erwinia*-vrij uitgangsmateriaal is. De besmetting die optreedt door het mechanisch vermeerderen waarbij zeer veel verwonding plaatsvindt en vocht optreedt, heeft vergaande gevolgen voor de teelt. Dat er na snijden veel meer besmetting optreedt dan bij hollen is te verklaren door de wijze van verwonding en droging. Bij hollen is de wond groot maar kan daarna goed drogen. Bij snijden moet de wond opentrekken door drogen en daarvoor is meer tijd en/of een hogere temperatuur nodig. Bij hollen wordt afhankelijk van de holler het mes één tot meerdere keren gebruikt om precies op de juiste diepte te hollen. Mogelijk dat bij

meermalig gebruik van het mes de op het mes aanwezige besmetting is “afgeveegd” voordat de juiste diepte is bereikt. Bij snijden wordt het snijmes (met een extra pin in het midden) één keer diep in de bol gedrukt en kan daarbij een deel van de besmetting achterlaten maar ook nog een deel weer meenemen naar de volgende bol. Hierdoor is het verklaarbaar dat de besmetting vele bollen achterelkaar kan treffen. Deze besmetting, gecombineerd met een langzamer droging en een hogere temperatuur, maakt het gevaar met snijden veel groter. Ook kan het zijn dat meer bacteriën door de snellere droging bij hollen zijn gedood alvorens zij de bol konden binnendringen. Het is overigens bekend, dat bij hogere temperaturen andere celwandafbrekende enzymen worden aangemaakt door *Erwinia* (Smadja *et al.* 2004). In dit onderzoek werd ook aangetoond dat op het oog gezonde bollen besmet blijken te kunnen zijn en dat deze besmetting pas veel later tot uiting kan komen. Opvallend is ook in dit onderzoek dat een partij waarvan gedacht werd dat deze niet of nauwelijks besmet was met *Erwinia* (Delft Blue) toch aantasting laat zien al was dat wel alleen bij de snijbollen. Opvallend is ook dat na een jaar teelt geen aantasting werd gevonden bij de met *Erwinia chrysanthemi* besmette hol- en snijbollen die bij 23°C waren gedroogd. Tot planten was er wel veel aantasting (18 – 23%) maar er lijkt geen latente besmetting te zijn opgetreden die het jaar daarna tot uiting komt. Het is de vraag welke combinatie van tijdsduur en temperatuur in staat is om wonden snel af te sluiten voor infectie en *Erwinia*-bacteriën doden.

12 Preventie van Erwinia in de keten: droging, verwerking en bewaring

12.1 Inleiding

Na rooien moeten de bollen gedroogd, verwerkt en bewaard worden. Leverbaar gaat naar de handel en plantgoed gaat na de heetstook weer de grond in. Praktijkervaringen en de huidige kennis van *Erwinia* geven aan dat er in die periode veel verspreiding en aantasting kan optreden. Beschadiging met vocht en hoge temperatuur geven *Erwinia chrysanthemi* kans tot aantasten. Beide omstandigheden komen veelvuldig alleen en in combinatie voor. Om de risico's die daarbij optreden in beeld te brengen zijn een aantal praktische handelingen en tijdstippen waarop een en ander geschiedt toegepast of bemonsterd. Dit zijn zowel handelingen bij de teler als bij de export.

12.2 Materiaal en methode

In 2004 werden door de praktijk plantgoed- en leverbaarpartijen geleverd waarin een *Erwinia*-besmetting werd verwacht op grond van ervaring met die partij in voorgaand jaar of met de resultaten van tegelijkertijd in Frankrijk geteelde en daardoor vroegere bollen. Met die partijen werd onderzoek gedaan naar de invloed van omstandigheden na rooien bij drogen, rond verwerken en verpakken bij de export op een aantasting door *Erwinia*.

De behandelingen (zie overzicht leverbaar en plantgoed) zijn in 3 herhalingen á 100 bollen uitgevoerd en na bewaring bij 25°C (leverbaar) en 30°C (plantgoed) in het najaar beoordeeld op aantasting door *Erwinia*. Per behandeling is altijd met twee verschillende partijen gewerkt, omdat de mate van de aanwezige besmetting vooraf niet bekend is.

Behandelingen met leverbaar en plantgoedpartijen 2004:

Leverbaar van Anna Marie en Splendid Cornelia

Droogomstandigheden (11 beh)

drogen buiten (1 en 3 dagen op grond en 3 en 7 dagen in gaasbak)
 binnen (3 d droogwand) bij 20, 25 of 30°C
schonen wel of niet

Sorteeromstandigheden (17 beh)

temperatuur voor sorteren 20, 25 of 30°C
 na sorteren 25°C of 2 dagen 20°C + 25°C
tijdstip na 1, 2, 3 of 4 weken

Inpakken in kleinverpakking (8 beh)

tijdstip na 3, 5, 7 en 9 weken
terugdrogen niet of na verpakken in kleinverpakking gedurende 3 dagen bij 25°C

Plantgoed van Blue Star en Delft Blue

Droogomstandigheden (11 beh)

drogen	buiten (1 en 3 dagen op grond of 3 en 7 dagen in gaasbak)
	binnen (3 d droogwand) bij 20, 25 of 30°C
schonen	wel of niet

Sorteeromstandigheden (17 beh)

temperatuur	voor sorteren 20, 25 of 30°C
	na sorteren 25°C of 2 dagen 20°C + 25°C
tijdstip	na 1, 2, 3 of 4 weken

Heetstook (9 beh)

afkoelen na 44°C	"normaal" en snel
sorteren	1 of 3 weken na de heetstook
temperatuur	na heetstook 20, 25 of 30°C

Alles heetgestookt op een controle na

In 2005 werd op twee bedrijven een plantgoedpartij en een leverbaarpartij bemonsterd. Het eerste monster werd genomen voor het rooien vanuit het veld en vervolgens na de verschillende verwerkingstappen op de bedrijven (Fig. 12.1).

Na bemonstering werden de bollen op PPO bewaard bij 25°C (leverbaar) of 30°C (plantgoed). De monsters voor en direct na rooien werden eerst 1 week bij 25°C gedroogd. De helft van de bollen werd na de monsternamen een week bij 34°C bewaard voor ze bij 25°C of 30°C bewaard werden. Dit had als reden om een aantasting mogelijk meer te stimuleren. Plantgoed werd bemonsterd tot het planttijdstip en het leverbaar tot het afleveren. Aan het eind van de zomer werd op aantasting beoordeeld. Tussentijds werd wel al gelet op het ontstaan van aantasting die zichtbaar werd door leeglopende bollen. Elk monstermoment lag in 3 herhalingen. De zichtbaar zieke bollen werden niet mee bemonsterd, maar het percentage werd wel genoteerd en door de telers werd aangegeven welk percentage bij uitzoeken was verwijderd.

In 2005 werd bij een exportbedrijf nagegaan of de zuurscheider (Havatec) mogelijkheden biedt voor selectie op *Erwinia*. Deze zuurscheider meet met röntgenstraling de ruimte tussen rokken en scheidt vervolgens de bollen in gezond, verdacht of ziek. De ervaringen met *Erwinia* waren wisselend.

Eind oktober werd een partij hyacinten (15cm bollen van Blue Jacket) die zwaar was aangetast en al twee keer over de zuurscheider was uitgezocht, beschikbaar gesteld door een exporteur om na te gaan of dit systeem wel voldoende werkte. Ervaring was dat er na het selecteren telkens weer veel aantasting optrad. De partij was inmiddels ook al behoorlijk uitgedroogd en iets aangetast door *Penicillium* en *Aspergillus niger*. Vooraf werden de bollen (per behandeling 6 bak á 300 stuks) over 4 platen gesorteerd en daarmee licht beschadigd waarbij de aangetaste bollen werden verwijderd. Daarna gingen de bollen over de zuurscheiderlijn en aansluitend wel of niet over de tellijn. De bollen werden bij 25°C bewaard en verwerkt. Bij één behandeling werden de bollen van 3 dagen voor sorteren tot 3 dagen na de zuurscheider bij 20°C bewaard. De bollen werden op 3 data na het sorteren over de zuurscheider geleid om verschil in mate van aantasting te krijgen, omdat de herkenning van de snotsymptomen mogelijk afhankelijk was van de ernst van de aantasting.

Voorafgaande aan elke datum van toepassing werd de machine afgesteld door een monster bollen door de machine te leiden ter afstelling van de machine, zoals gebruikelijk bij verwerking van een partij bollen.

12.3 Resultaten

Leverbaar 2004

In 2004 was de temperatuur vanaf rooien en gedurende de zomer gemiddeld aan de lage kant en duidelijk lager dan in 2002 en 2003. Er was wel een warme periode eind juli begin augustus. Dit zal veel invloed hebben gehad op de mate van aantasting in de praktijk en in het onderzoek. In de praktijk viel de aantasting relatief mee.

Bij de leverbare bollen van Splendid Cornelia bleef de aantasting door *Erwinia* gemiddeld onder 1%.

Bij Anna Marie lag het percentage aantasting bij het droog- en sorteerdeel op de teeltbedrijven ook onder 1%, maar bij de export nam de aantasting toe tot gemiddeld 4%. De lage aantasting op de bedrijven waar

de bollen vandaan kwamen was hiermee vergelijkbaar. Bij het kleinverpakken werd op twee data een verhoogde aantasting waargenomen (Tabel 12.1). Vooral bij de vroegste inpakdatum (één week na sorteren) waarbij direct de kleinverpakkingen in omdozen verpakt werden viel op met veel aantasting. Dit was wel de periode met de hoogste temperatuur. Die stijging was niet te zien als na het kleinverpakken eerst werd teruggedroogd. Het verpakken eind augustus gaf in beide situaties een iets verhoogde aantasting te zien. De warmte was op 13 augustus voorbij.

Tabel 12.1. Percentage door *Erwinia* aangetaste bollen van de cultivar Anna Marie na machinale kleinverpakking

kleinverpakkings- datum	verpakt in doos	% snotbollen
30-jul	30-jul	11.2
	2-aug	1.7
13-aug	13-aug	1.3
	16-aug	3.8
27-aug	27-aug	5.8
	30-aug	5.0
10-sep	10-sep	1.7
	13-sep	2.1
LSD		2.9

Plantgoed 2004

Bij het plantgoed van Delft Blue werd tussen de behandelingen een gemiddelde aantasting tussen 2 en 10% gevonden. De variatie in aantasting was zodanig dat vooral tendensen zichtbaar werden. Een lagere temperatuur (20°C) tijdens drogen en verwerken leidde veelal tot minder aantasting dan een hogere temperatuur van 25-30°C. Meer verwerking leidde tot meer aantasting. Buiten drogen gaf zowel goede als slechte resultaten waarbij er geen duidelijke relatie was met de weersomstandigheden.

Bij het plantgoed van Blue Star werd tot de heetstook geen aantasting waargenomen. Aan het eind van de heetstook werd een enkele snotsliert zichtbaar en na de heetstook werd er soms zeer veel aantasting zichtbaar. Hierbij bleek dat er in de heetstookcel een gradatie ontstond in enkele stapels gaasbakken van vrijwel geen aantasting in de onderste 2 gaasbakken tot ca. 30% in de bovenste (10^{de} en 11^{de}) gaasbak. Bij de andere bollen in de cel, waaronder de partij Delft Blue, trad dit overigens niet op. De aantasting leek geen relatie te hebben met de behandeling voorafgaande aan de heetstook. Op het bedrijf waar de bollen vandaan kwamen waren ook al enkele jaren problemen met aantasting aan het eind van en kort na de heetstook.

Bemonstering van plantgoed- en leverbaarpartijen op bedrijven in 2005

Al bij het bemonsteren voor het rooien werden rotte bollen bij twee partijen waargenomen. In deze twee partijen (Delft Blue leverbaar van het ene bedrijf en Carnegie plantgoed van het andere bedrijf) nam de aantasting in de loop van het seizoen toe (Fig. 12.1), terwijl bij de andere twee partijen vrijwel geen aantasting optrad. In de grafiek is het gemiddelde weergegeven van de bewaring bij 25/30°C en 34°C omdat de verschillen afwezig of beperkt waren. Als er verschil was dan was er meer aantasting bij de hoogste temperatuur.

Bij de leverbare Delft Blue nam de aantasting toe bij elke volgende bemonstering. Bij bemonsteren werd al een zware aantasting gezien van 5% voor het rooien tot 30% na tellen. In de op het oog gezonde bollen van de monsters kwam daar tussen 3 en 12% bij. Beide opgeteld leidde dit tot de sterk stijgende lijn in de grafiek.

Bij het plantgoed van Carnegie werd ook bij rooien al 3% aantasting waargenomen en deze liep bij het bemonsteren op tot 20%. In de op het oog gezonde bollen werd tot 11% gevonden met een opvallende 25% na sorteren voor de heetstook. De sterkste toename van het vele snot werd duidelijk veroorzaakt door het sorteren.

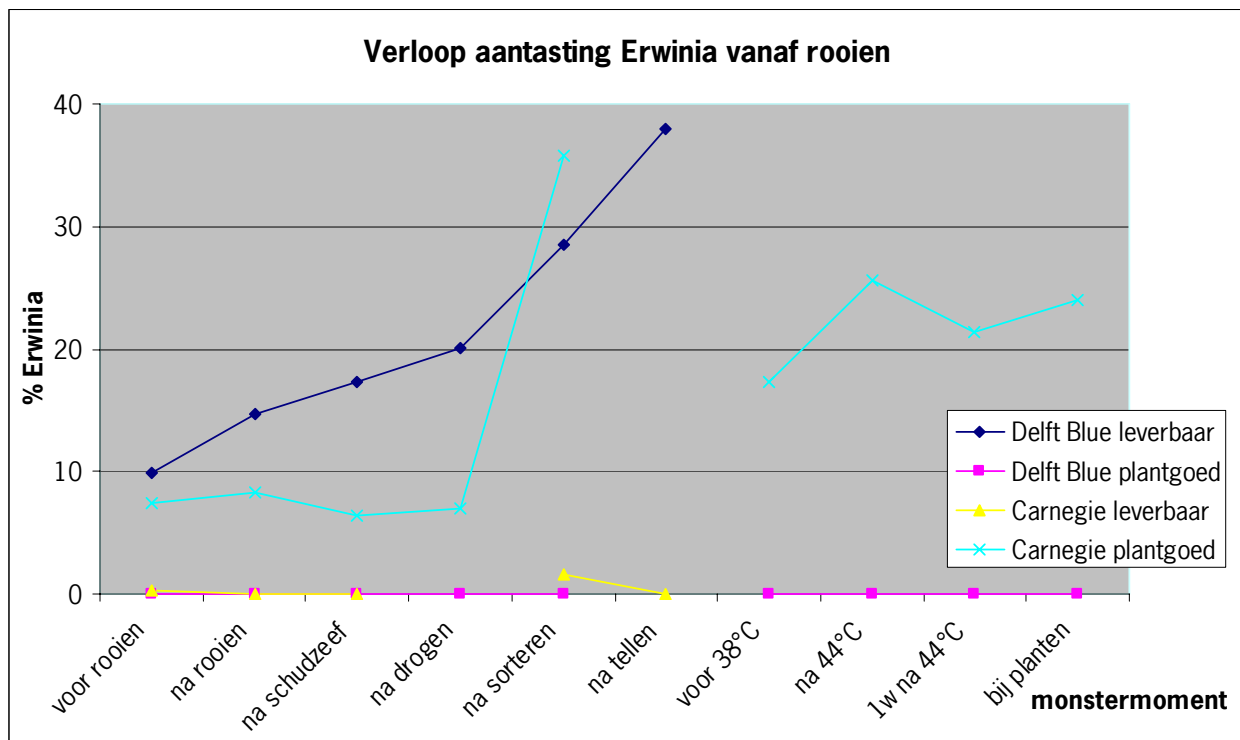


Fig 12.1 Het verloop van het percentage door *Erwinia* aangetaste bollen in de loop van het seizoen op twee bedrijven bij twee partijen

Zuurscheider 2005

De partij die eerder in het seizoen na uitzoeken over de zuurscheider telkens veel aantasting liet zien, werd nu maar beperkt aangetast tot 2%. Van de door de machine geselecteerde verdachte bollen bleek slechts 1% echt een snotbol te zijn en van de door de machine als zieke bollen geselecteerde bollen was 11 tot 67% (gemiddeld 35%) echt door *Erwinia* aangetast. De meeste bollen die als verdacht of ziek werden geselecteerd waren aangetast door *Penicillium* en roet of vertoonden andere afwijkingen. Volledig door *Erwinia* aangetaste bollen (volledig zacht) werden ook niet door de machine herkend. Door het sorteren werd de aantasting verhoogd met 0,2% en door de zuurscheider werd dit verder verhoogd naar gemiddeld 1,6%. De aansluitende telunit gaf ook een tendens naar meer aantasting. Opvallend was wel dat vrijwel geen nieuwe aantasting optrad als de bollen rond de verwerking bij 20°C waren bewaard (0,2%).

12.4 Conclusies en discussie

- De risico's op aantasting door *Erwinia* nemen toe door hogere temperatuur tijdens drogen en verwerken en door beschadiging als gevolg van handelingen zoals schonen, sorteren en kleinverpakken. Voorwaarde is wel dat een besmetting met *Erwinia* aanwezig moet zijn.
- Niet alle partijen lijken besmet met *Erwinia*.
- De mate van aantasting wordt beïnvloed door de klimaatomstandigheden rond en na het rooien en tijdens de verwerkingsperiode.
- Laat in het seizoen is de zuurscheider, die werkt met röntgenstraling om ruimte tussen de rokken te meten, niet in staat door *Erwinia* aangetaste bollen goed te selecteren. Wel worden veel door *Penicillium* en *Aspergillus niger* aangetaste bollen gevonden. De lijn met de machine beschadigt bollen en veroorzaakt daardoor ook nieuwe aantastingen.

De relatief koele zomer in 2004, het onvoldoende zeker zijn van een verwachte aantasting in een partij en

de grote variatie in besmetting binnen een partij waren mogelijke de oorzaken dat de verwachte effecten niet met duidelijke cijfers konden worden aangetoond. De gevonden tendensen pasten wel in het verwachtingspatroon. Duidelijk werd wel dat omstandigheden bij teler en exporteur belangrijk zijn in het ontstaan van aantastingen. Uit de praktijk zijn meer ervaringen bekend dat het verwerken tijdens een periode van zeer hoge temperatuur kan leiden tot een extra aantasting. Dat droging na beschadigen belangrijk is bleek duidelijk bij de export bij het direct in dozen pakken op de datum waarbij de temperatuur ook zeer hoog was. Praktijk is echter dat daar bij de export veelal geen tijd voor is. Hogere temperaturen hebben ondermeer invloed op de virulentie van *Erwinia* (Smadja *et al.* 2004).

Opvallend was het enorme effect van de plaats in de stapel in een cel waarin de heetstook werd gegeven. Mogelijk is een tijdelijk of gedurende een langere periode een temperatuurverschil opgetreden en heeft dat tot deze uitbraak van aanwezige latente besmetting geleid. Bij de beoordeling werden wel wat heetstookschade gevonden in de vorm van glazige bollen. Ook dit kwam hoger in de stapel meer voor. Het verschil in temperatuur en eventuele oorzaak zijn niet opgemerkt tijdens de heetstook. De cel stond wel voller dan normaal. Mogelijk dat als eerder in het bewaartraject de temperatuur al tijdelijk hoger was geweest de aantasting al eerder zichtbaar was geworden. Heetstook lijkt dus een duidelijk stressfactor waarbij een latente aantasting kan uitbreken en bevestigde daarmee de ervaringen van de betreffende teler. In 2005 werd bij besmette partijen het risico op aantasting door verwerking overduidelijk aangetoond. Duidelijk was ook het grote gevaar van sorteren voor de heetstook. Dit was al bekend met betrekking tot roet. Bij de teler werd de aantasting in deze partij zichtbaar tijdens de heetstook. Maar ook zonder heetstook bleek het sorteren hier voor zeer veel aantasting te zorgen. De betreffende teler is inmiddels ook vrijwel afgestapt van het sorteren voor de heetstook. Ook werd duidelijk dat zonder besmetting veel beschadiging kan optreden zonder dat er een aantasting optreedt. Duidelijk werd ook dat de aantasting erg partijgebonden is en dat verschillende jaargangen meer of minder besmet kunnen zijn. Dit geeft aan dat het bij elkaar doen van verschillende jaargangen gevaarlijk is en sterk moet worden afgeraden. In 2005 was er een hittegolf in de tweede helft van juni en dat is mogelijk de reden dat er in tegenstelling tot voorgaande jaren veel meer aantasting optrad bij de vroeg gerooide preparatiebollen.

De zwaar aangetaste partij uit de export werd laat in het seizoen van 2005 door extra verwerking nog maar beperkt zieker. Dit is mogelijk een gevolg van de sterke indroging waardoor de bol ook meer beschermd wordt door veel losse vellen en taaiere rokken. Dat een besmet partij laat in het seizoen minder snel wordt aangetast komt overeen met veel praktijkervaring. Het is daarom goed voor te stellen dat de lijn met zuurscheider vroeg in het seizoen voor veel nieuwe aantastingen zorgde zoals de ervaring was met deze partij. Een door *Erwinia* aangetaste bol vertoont ook geen ruimte of holten tussen rokken en zal daarom ook slecht worden gevonden door de zuurscheider.

13 Bestrijding *Erwinia* door gebruik van ontsmettingsmiddelen

13.1 Inleiding

Bij de verwerking van bollen ontstaat beschadiging en kunnen *Erwinia*-bacteriën worden verspreid en zorgen voor besmetting en infectie. Omdat verwerking zonder beschadiging onmogelijk is, is een middel gewenst dat de opgetreden besmetting zou kunnen voorkomen of beperken. Omdat water ideaal is voor verspreiding van ziekten zou een ontsmetting liefst niet via een dompeling of bespuiting moeten worden uitgevoerd. Omdat die mogelijkheden zeer beperkt zijn worden toch vooral dompelmiddelen getest. Er is formaline dat een toelating heeft voor hyacint, maar de toelating voor dit middel staat ter discussie. Diverse middelen zijn getest als dompelbehandeling of als ruimtebehandeling. Vele daarvan hebben (nog) geen toelating (Vd Wolf JM *et al.* 2006).

13.1 Materiaal en methode

In 2005 zijn vier middelen waaronder 2 middelen van PRI Wageningen, formaline en Dipper (ascorbinezuur) als dompelmiddel getest op een besmet partij Delft Blue in november.

In samenwerking met de leverancier van een ozonontsmetter zijn op PPO Lisse beschadigde bollen kort daarna op een lopende band (15 sec) bij een aardappelteler in Lelystad 1 of 2 keer behandeld met ozon (ca. 500 ppm). Ook werden petrischalen met *Erwinia* meebehandeld. Ozon kan perspectieven bieden (Van den Brink *et al.* 2004).

In 2006 zijn twee series proeven uitgevoerd (eind augustus en begin oktober) met besmette partijen Carnegie. In 2007 is het onderzoek begin september uitgevoerd met een besmet partij Woodstock dat vooraf nog extra is bespoten met *Erwinia chrysanthemi*.

Voorafgaand aan de dompeling of ruimtebehandeling werden de bollen, inclusief de zieke bollen, gesorteerd over 8 planten ter verspreiding van de aanwezige besmetting. Bij het opvangen van de bollen werden de aangetaste bollen eruit gehaald en werden direct daarna behandelingen uitgevoerd. Na een dompeling werden de bollen teruggedroogd. Na enige tijd bewaring bij 30°C werd op aantasting beoordeeld.

In ander lopend onderzoek werd ook naar vervangende middelen voor formaline gezocht en daarbij werd ook gelet op de werking tegen *Erwinia*.

13.2 Resultaten

In 2005 werd geen aantasting van betekenis verkregen in het onderzoek met de dompelmiddelen zodat geen uitspraak over de werking gedaan kon worden.

In het kleine onderzoek met ozon werd wel aantasting verkregen maar ozon gaf geen vermindering van de aantasting. De *Erwinia* in de schalen werd ook niet bestreden.

De resultaten van 2006 en 2007 staan in Tabel 13.1. Beschadiging gevolgd door water gaf de meeste aantasting. Zonder beschadiging en zelfs met een bespuiting van *Erwinia* gaf de laagste aantasting in 2007. Het toevoegen van middelen ter voorkoming van verspreiding werkte maar deels. In 2006 beperkten de toegevoegde middelen de aantasting ofschoon er wel een tendens was dat veel middelen toch nog iets meer snotbollen gaven dan de droge beschadigde controle. In 2007 viel op dat de dompelmiddelen de

aantasting globaal halveerde (van 8.8 naar ca. 4) maar de aantasting lag wel hoger dan zonder dompeling (0.3%). De ruimtebehandelingen met G gaven minder aantasting dan de dompelbehandelingen maar waren vergelijkbaar met de droge beschadigde controle, waarmee niet duidelijk werd of het middel wel werkte. Ook in 2006 lag de aantasting na de ruimtetoepassing van G op gelijke hoogte met de controle.

Tabel 13.1 Effecten van middelen op % besmetting met *Erwinia*

behandeling bollen beschadigd en gedompeld, tenzij anders aangegeven	% snotbollen		2007
	2006		
	1ste serie	2de serie	
controle droog, niet beschadigd	nt	nt	0.0
controle droog, beschadigd	5.7	1.7	0.3
controle water	36.0	1.3	8.8
1% formaline	5.3	3.0	4.0
0,125% Dipper	9.0	0.7	4.0 !)
A	7.7	nt	nt
B	7.0	nt	nt
A+B	9.3	nt	nt
E	8.7	nt	nt
F 5%	1.7	1.7	nt
F 2%	nt	nt	4.2 !)
F 1%	nt	0.0	2.8
G	nt	1.7	nt
G ruimte	nt	1.3	0.3
G ruimte 2x	nt	nt	1.8
Betrouwbaarheid LSD 95%	ns *)	ns	3.2

ns = niet significant

*) uitgez controle water

nt = niet toegepast

!) in 1 van de 4 herhalingen zat zéér veel (62 -76%) aantasting, deze uitschieters zijn niet in de cijfers opgenomen

13.3 Conclusie en discussie

- De bollen zo snel mogelijk drogen lijkt de beste wijze om een besmetting te voorkomen die bij de verwerking optreedt.
- Als bollen gedompeld moeten worden is het noodzakelijk om een middel toe te voegen dat de verspreiding in het bad tegengaat.
- Van de toegepaste ruimtebehandelingen werd geen effect gezien.

In de praktijk en uit onderzoek zijn veel ervaringen bekend van de boldompeling vooraf aan de heetstook tegen roet (inclusief formaline). Hiermee werd het roet goed bestreden maar nam de aantasting door *Erwinia* toe. Ook bollen die voor het verwerken nat gemaakt werden tegen de jeuk hebben soms meer aantasting door *Erwinia* laten zien. Tenslotte is ook van spoelen na rooien bekend dat de aantasting dan sterk kan toenemen.

Door verwerking van bollen treedt beschadiging en vocht op en ontstaat kans op verspreiding, besmetting en infectie. De roep om een middel toe om dit te voorkomen is groot. De toegelaten middelen lijken hoogstens in staat verspreiding te voorkomen in het bad. Maar de proefresultaten en de andere ervaringen lijken ook aan te geven dat er mogelijk toch meer aantasting optreedt door hetzij onvoldoende bestrijding van de verspreiding of door extra uitbraak van aanwezige latente infecties door de aanwezigheid van het water.

In de praktijk wordt een ruimtebehandelingsmiddel toegepast waarover de meningen met betrekking tot de bestrijding verdeeld zijn. Van het middel wordt ook aangegeven dat een *Erwinia*-aantasting eerder zou

stoppen en opdrogen (minder druipen) en dat het de stankoverlast door aangetaste bollen zou beperken. In dit onderzoek is geen bevestiging van die praktijkmeningen gevonden. Voorlopig is wel duidelijk dat naast goed drogen alleen een ruimtebehandeling mogelijkheden zou bieden omdat daardoor de bollen niet nat worden. De beperkte ervaringen met ozon waren niet hoopvol. De mogelijkheden van UV lijken ook beperkt omdat alleen hetgeen direct bestraald wordt ook bestreden wordt. Veel beschadiging zit echter verscholen onder de buitenste gedroogde, vliezige bolrokken.

14 Algemene conclusies en discussie

Erwinia staat sterk in de belangstelling vanwege de ongrijpbaarheid van deze ziekte. Bedrijven die nooit last hebben, krijgen plotseling problemen. Er is veel publiciteit gegeven aan deze rottingsziekte via artikelen in BloembollenVisie (Dwarswaard 2005, 2006, e.a.) en door de uitgifte van een poster.

Uit de enquête (vooral bedoeld voor de bijzondere bolgewassen) bleek, dat vooral in de gewassen Zantedeschia, Muscari, Dahlia, hyacint en Hollandse Iris men problemen heeft met zachtrot. Naar aanleiding van deze enquête zijn monsters onderzocht van gewassen waarin nog niet eerder aantasting door bacterieziektes zijn vastgesteld. Een aantal daarvan bleken inderdaad te zijn aangetast door *Erwinia*. Vanuit de praktijk wordt duidelijk een verband gelegd tussen spoelen en bacterieziektes. Men ziet een toename door beregenen, niet snel genoeg drogen na rooien en grootschalig rooien en verwerken.

Om problemen te laten afnemen ziet men vooral mogelijkheden in snel drogen, ruimere vruchtwisseling, goede partijen aanhouden - selectie - besmette partijen opruimen, niet spoelen en toename landhuur/verhuur.

Van groot belang zijn betrouwbare en vooral gevoelige toetsen. Van groot belang is daarbij om een correlatie te vinden tussen enerzijds de aanwezigheid van *Erwinia* en anderzijds de kans op symptoomontwikkeling. In de aardappelsector is bekend dat in een zwaar besmette partij slechts één procent symptomen ontwikkelt (Charkowski *et al.* 2006). Belangrijk is daarbij hoe om te gaan met een besmette partij (wanneer bevordert de symptoomontwikkeling?). Bij hyacint is bekend dat de kans op symptoomontwikkeling afneemt naarmate de bewaartijd toeneemt.

Echter, toetsing op *Erwinia* is nog niet sluitend. Bovendien is er nog geen goed beeld van enerzijds het aantonen van Ech in bollen en anderzijds de schadedrempel. Net zoals in aardappel kan een partij zwaar besmet zijn (bv. 30-40% Ech) maar geen visuele symptomen geven (Charkowski *et al.* 2006). Dit geeft de verandering in taxonomie en de nieuwe indeling in *Dickeya* (Ech) en *Pectobacterium* (*E. carotovora*) al aan. Het lijkt erop, dat vooral de *Dickeya*-soorten wel eens waardplantvoorkeur kunnen hebben. Ook lijkt er variatie op te treden in de sequenties, zoals gevonden voor o.a. het 16 S rDNA. Hierop wordt ingespeeld door ook andere genen te gebruiken voor indeling van deze soorten.

De isolaten uit bloembolgewassen zijn vergeleken met een pannel van isolaten uit andere gewassen. Deze vallen onder een aparte groep waarin ook buitenlandse aardappelstammen zitten (Israel en Finland) en een aantal Nederlandse aardappelstammen. Deze resultaten zijn bevestigd met verschillende gensequenties. Het lijkt een aparte groep welke in toekomstig onderzoek nader gekarakteriseerd moet worden om bv. betere identificatie en mogelijke waardplantspecificiteit te ontdekken.

Wat betreft detectie en beheersing van *Erwinia*'s vormt vooral Ecc een diverse groep die voor kort niet goed detecteerbaar was. Ook bleek uit onderzoek van PPO, dat niet in alle gevallen *Erwinia* in rotsymptomen van hyacint aantoonbaar was. Dit kan echter ook betekenen, dat (naast het niet goed uitvoeren van de toets) er nog andere organismen zijn die rot veroorzaken. Toch werd in ongeveer 30% van de monsters met zachtrot geen *Erwinia* aangetroffen. In een aantal gevallen werd *Pseudomonas* gevonden; in nieuw onderzoek moet blijken of deze bacteriesoort inderdaad zelfstandig rot kan veroorzaken of een "trendvolger" is die in aangetast plantenweefsel toeslaat. Een verschil is dat *Pseudomonas* andere typen pectinasen maakt en aeroobe omstandigheden nodig heeft om zich te handhaven.

Ecc geeft waarschijnlijk een mildere aantasting als Ech. In isolaten uit hyacintenmonsters, afkomstig van Frankrijk zaten zowel Ecc als Ech. Ecc kan ook schade geven, maar kan ook als nietpathogeen aan de buitenkant van een plant aanwezig zijn. Toch moet de rol van Ecc niet onderschat worden. Bijzonder is, dat in Zantedeschia voornamelijk Ecc een rol speelt bij zachtrot. Echter, in een recente publikatie (Lee *et al.* 2006) zijn in Taiwan in witbloemige Calla's Ech gevonden, die op grond van een afwijkende virulentie en verschillen in DNA tot een apart pathotype zouden kunnen behoren.

Mechanische of stresstoetsen zijn ontwikkeld om op eenvoudige wijze een praktisch bruikbare toets voor

telers en exporteurs te ontwikkelen. Deze zijn gebaseerd op het toebrengen van stress door schade aan de bollen binnen een partij (steekproef) en is voornamelijk getest op hyacinten, maar ook op Dahlia en Zantedeschia (prikproeven). Om te testen of de symptomen door *Erwinia* komen, wordt meestal een PCR uitgevoerd. Protocolontwikkeling tbv. de bloembollenkeuringsdienst om *Erwinia*-soorten betrouwbaar te kunnen aantonen en de toetsen te valideren wordt uitgevoerd binnen project PT13061 ("protocollering detectie *Erwinia*").

Niet-destructieve technieken zoals MIPS en röntgenstraling (zuurscheider) om zachtrot aan te tonen in hyacint zijn momenteel niet voorhanden. De laatste echter verdient een tweede kans daar er een exporteur is die wel resultaten lijkt te boeken met een dergelijke machine.

De mogelijkheden om materiaal te testen met de verschillende toetsen is weergegeven in Tabel 15.1. PCR en de valtoets zijn in combinatie het meest veelbelovend; wanneer alleen op Ech getest moet worden is ELISA ook een optie. Een valtoets, gevolgd door inpakken in plastic om optimale condities voor *Erwinia* te creëren heeft als nadeel dat schimmelziekten bevorderd worden zoals roet.

Tabel 14.1. Mate van toepassing van ontwikkelde en nog te ontwikkelen toetsen op *Erwinia*-soorten en hun gevoeligheid. Voor routinematige toepassing is een validatietraject noodzakelijk

toets	<i>Erwinia</i> -soort	gewas	gevoeligheid	arbeid bij de toetsuitvoering	toepasbaarheid
kweek	Ech,Ecc	alle	hoog	+	ja
ELISA ¹	Ech, Eca	hyacint, iris, Muscari	gemiddeld/hoog	+	ja
Luminex ¹	Ech, Eca	Hyacint*	gemiddeld/hoog	+	ja, mits apparaat beschikbaar
PCR ¹	Ech, Ecc, Eca	alle	hoog	++	ja
valtest	Ech, Ecc	hyacint	laag	+/-	toepasbaar
invriestoets	Ech, Ecc	hyacint	?	+/-	waarschijnlijk niet
vacuumtoets	Ech, Ecc	hyacint	?	+	niet verder onderzocht

¹ = na voorkweek van verdacht monstermateriaal in kweekmedium gedurende 2 dagen (verrijkingsstap)

* = alleen uitgevoerd aan hyacint; waarschijnlijk goed toepasbaar in andere gewassen

Over de aanwezigheid en ecologie van *Erwinia* te velde is voor bloembolgewassen weinig bekend. Gedurende één groeiseizoen heeft op het veld een hoog percentage (meer dan 30%) overdracht van *Erwinia chrysanthemi* plaatsgevonden bij Dahlia. In een andere proef zijn stekken 'Serena' van dezelfde partij geplant waarin later 0% ploffers bleken te zitten.

Deze proef geeft niet aan hoe de overdracht van *E. chrysanthemi* heeft plaatsgevonden, via de grond, het maaien of op een ander wijze; de stekken afkomstig van ploffers leken echter wel een hoger percentage knollen (maar niet statistisch significant) met ploffers op te leveren.

Extra toediening van K, Ca, N, Mn, Se, sporenmix en stalmest leidde niet tot een vermindering van de aantasting door *Erwinia*. Calcium zou zachtrot in Zantedeschia (Ecc) inperken (Funnell *et al.* 1999); dit effect (versterking van celwanden) is echter niet vastgesteld in de experimenten met bolgewassen.

De aantasting leek vooral gebonden aan de in de partij aanwezige (latente) besmetting en de omstandigheden na rooien. Voorkomen van deze latente besmetting verdient de hoogste aandacht.

De impact van *Erwinia* in de keten vanaf rooien is afhankelijk van een groot aantal factoren.

De risico's op aantasting door *Erwinia* nemen toe door hogere temperatuur tijdens drogen en verwerken en door beschadiging als gevolg van handelingen zoals schonen, sorteren en kleinverpakken. Voorwaarde is

wel dat een besmetting met *Erwinia* aanwezig moet zijn. Temperatuur heeft invloed op de mate van agressiviteit van *Erwinia*'s (Latour *et al.* 2007). Overigens moet niet de indruk bestaan dat *Erwinia* altijd beschadigingen nodig heeft om een waardplant binnen te dringen; er zijn voorbeelden waarbij deze bacterie dit op natuurlijke wijze kan zoals in Cyclamen (Romero *et al.* 2005).

Niet alle partijen lijken besmet met *Erwinia*; dit wijst naar een mogelijke latente besmetting.

De mate van aantasting wordt beïnvloed door de klimaatomstandigheden rond en na rooien en tijdens de verwerkingsperiode; een voorbeeld hiervan is de relatief koele zomer in 2004. Duidelijk is, dat omstandigheden bij teler en exporteur belangrijk zijn in het ontstaan van aantastingen.

Dat een besmet partij laat in het seizoen minder snel wordt aangetast komt overeen met veel praktijkervaring.

Erwinia chrysanthemi blijkt de veroorzaker te zijn van ploffers in Dahlia. Van deze bacterie was al langer bekend dat die bacterieverwelkingsziekte kon veroorzaken. De bacterie blijkt nu twee verschillende symptomen te kunnen veroorzaken. Infectie van knollen met de bacterie leidde direct tot ploffers terwijl infectie van stekken leidde tot knollen die gingen ploffen. Uit deze knollen kon de bacterie weer geïsoleerd worden.

Infectie via de grond, door stekken op grond te planten waar doorheen ploffers waren verwerkt, was mogelijk maar leverde een laag percentage zieke knollen op. De overdracht verliep veel sneller (30% in één jaar) door gezonde en besmette stekken naast elkaar op het veld te planten. Het is niet duidelijk of de overdracht op het veld via de grond, wortels, via het maaien van het gewas of op een andere wijze heeft plaatsgevonden. Op basis van dit onderzoek lijkt besmetting vanuit de eigen partij (zieke plant naast een gezonde plant) het meest gemakkelijk te verlopen. Ziektevrij uitgangsmateriaal om het probleem te verkleinen is daarvoor zeer belangrijk.

Het meest lastige onderdeel van onderzoek naar *Erwinia*-aantasting is de beheersing: preventie en resistentie. Preventie lijkt te liggen in het zo droog mogelijk houden van bollen. Vooral na het rooien is het wegwerken van waterfilms van groot belang om eventueel aanwezige *Erwinia*'s veel minder kans te geven. Toekomstig onderzoek zal zich bezighouden met "supersnel" drogen. Verder is schoon uitgangsmateriaal een stap in de richting van een *Erwinia*-arme teelt. Hiertoe moeten werkbollen zo mogelijk *Erwinia*-vrij zijn. Door voor de verschillende bloembolgewassen die gevoelig zijn voor *Erwinia* een keuringssysteem op te zetten kan hier aan voldaan worden.

De bollen zo snel mogelijk drogen lijkt de beste wijze om een besmetting die bij de verwerking optreedt te voorkomen.

Als bollen gedompeld moeten worden is het noodzakelijk om een middel toe te voegen dat de verspreiding in het bad tegengaat. Van de toegepaste ruimtebehandelingen werd geen effect gezien.

Er zijn momenteel weinig aanwijzingen voor de aanwezigheid van resistente cultivars in het sortiment bij hyacint. Alleen bij Dahlia en mogelijk *Zantedeschia* zijn wat aanwijzingen hiervoor. Inbouw van resistentiegenen of meerdere kopieën van eenzelfde (eigen) gen inbouwen kan werken, maar is verboden (Yip *et al.* 2007). Er wordt onderzoek gedaan naar resistentie tegen Ecc; door inbouw van een ferredoxine-achtig eiwit kan een verhoogde weerstand opgewekt worden in zg. transgene *Zantedeschia*'s (Yip *et al.* 2004).

Een andere mogelijkheid is om te zorgen dat *Erwinia* niet in zijn "agressieve fase" geraakt door de interne trigger (celdichtheid) te voorkomen. Deze trigger is het oplopen van een bepaalde stof (N-acyl homoserine lactonen). Door deze quorum sensing te verhinderen ("quorum quensing") zal *Erwinia* mogelijk als latente endofyt of als veel minder agressieve bacterie in de gewassen aanwezig zijn. Soortgelijke bevindingen zijn gedaan bij de medisch gevaarlijke bacteriën, maar ook bij bacteriesoorten als *Burholderia* (Wopperer *et al.* 2006). Er zijn mogelijkheden om dit te doen via quorum sensing-afbrekende enzymen die geproduceerd worden door antagonistische bacteriën. Voorbeelden hiervan zijn bepaalde pseudomonaden. Toediening in bv. spoelwater lijkt niet zinvol; opname van dergelijke bacteriën (die vaak antibiotica-achtige verbindingen maken) door de plant is waarschijnlijk verboden (GGO-wetgeving) en het is nog maar de vraag of deze bacteriën de remmende werking goed kunnen uitvoeren.

Een goede aanpak zou zijn om componenten, die quorum sensing verstoren, toe te dienen aan de plant.

Dergelijke stoffen zijn bekend (Castang *et al.* 2006; DeAngelis *et al.* 2007; Ishida *et al.* 2007, Fray 2002), ook uit de medische sector (Hentzer *et al.* 2003). Ook kan wellicht de plant zelf meer weerstand opwekken tegen deze plantpathogenen (Zhang 2003). Wat de haalbaarheid hiervan is moet onderzocht worden. *Erwinia*'s zijn zeer goed toegerust om schade te berokkenen aan gewassen. Er zijn zelfs berichten dat *Erwinia* (analoog aan wat zijn broertje *E.coli* kan bij de mens) een pathogeen is voor een cicade (Grenier *et al.* 2006). Dit geeft aan dat er nog veel aspecten zijn van deze bacteriesoort die onbekend zijn; de grote diversiteit, vooral bij *Ecc* (dus veel verschillende typen met mogelijk andere eigenschappen) maakt onderzoek lastig.

De toekomstige aanpak van het *Erwinia*-probleem zal erop gericht zijn, een betrouwbare (PCR-) toets beschikbaar te maken om werkbollen voor hyacint en ander *Erwinia*-gevoelig uitgangsmateriaal bij de keuringsdienst te kunnen laten toetsen. Op deze wijze zullen op termijn veel meer gezonde partijen bollen geteeld kunnen worden. Of dit materiaal gezond blijft zal gecontroleerd worden door het en toetsen van uitgangsmateriaal. Tijdens de verwerking van bolmateriaal zal de nadruk op hygiëne gelegd worden en handelingen te voorkomen die zachtrot bevorderen (spoelen, beschadigingen).

15 Communicatie

15.1 Vakbladartikelen

BBV 2005 nr 53 (22-23): Erwinia chrysanthemi veel aangetroffen (Joop van Doorn, Trees Hollinger, Peter Vreeburg en Paul van Leeuwen, Marcel Bredeveld, Jan van der Wolf en Arjen Speksnijder)

BBV 2005 nr 54 (24-25): 2004: minder Erwinia in hyacint, maar aandacht blijft nodig (Peter Vreeburg, Andre Korsuize, Joop van Doorn, Trees Hollinger en Paul van Leeuwen)

BBV 2005 nr.56 (22-23): Erwinia ook in bijzondere bolgewassen (Paul van Leeuwen, John Trompert, Joop van Doorn, Trees Hollinger, en Peter Vreeburg)

BBV 2005 nr 73 (21): Erwinia slaat weer toe; PPO werkt aan oplossing. (Arie Dwarswaard)

BBV 2006 nr 87 (22-23): snelle toetsen op Erwinia geven steeds beter zicht op aantasting (Joop van Doorn, Trees Hollinger, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen, Jan van der Wolf en Arjen Speksnijder)

BBV 2006 nr 88: Voorkom agressief snot (20-21). Telen met toekomst

BBV 2006 nr. 90 (24-25): Gezond plantgoedbelangrijkste stap tegen Erwinia (Peter Vreeburg, Andre Korsuize, Paul van Leeuwen, Elaine Vlaming, Joop van Doorn en Trees Hollinger)

BBV 2006 nr. 91 (32): Erwinia breed aangepakt (Arie Dwarswaard)

BBV 2006 nr. 97 (20-21): Erwinia chrysanthemi ook bij ploffers in Dahlia boosdoener (Paul van Leeuwen,, John Trompert, Joop van Doorn, Trees Hollinger en Peter Vreeburg)

BBV 2007 nr 115 (20-21): Overleving van Erwinia in grond en op materialen onderzocht (Joop van Doorn, Danielle van Kampen, Trees Hollinger, Patricia van der Zouwen, Arjen Speksnijder en Jan van der Wolf)

BBV 2007 nr 116 (20-21): Toetsen om Erwinia in bloembollen aan te tonen (Joop van Doorn, Trees Hollinger, Danielle van Kampen, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen, Jan van der Wolf)

BBV 2007 nr.117 (20-21): Erwinia besmetting hyacint: hollen veiliger dan snijden (Peter Vreeburg, Andre Korsuize, Joop van Doorn, Trees Hollinger, Paul van Leeuwen en John Trompert)

BBV 2007 nr 118 (20-21): Grondbesmetting en voeding spelen minder grote rol bij Erwinia besmetting (Peter Vreeburg, Joop van Doorn, Paul van Leeuwen, Andre Korsuize, John Trompert)

BBV 2008 nr 143 (28-29): Erwinia-onderzoek 2007: Hoe beperk je de risico's? (Peter Vreeburg, Andre Korsuize, Joop van Doorn en Robert Dees)

BBV 2008 nr 143 (30-31): Verwerking hyacinten veroorzaakt meer schade dan verwacht (Peter Vreeburg en André Korsuize)

15.2 Posters

- Poster 2004 (zie hoofdstuk enquête en poster)
- Zo voorkom je een Erwinia-aantasting (Peter Vreeburg en Joop van Doorn)
- Toetsen op Erwinia in bolgewassen (Joop van Doorn, Trees Hollinger, Danielle van Kampen, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen (PPO); Jan van der Wolf, Arjen Speksnijder (PRI) Open Dagen febr. 2007
- Erwinia in Dahlia en Zantedeschia. Paul van Leeuwen, Joop van Doorn, Peter Vreeburg en John Trompert
- Voorkomen van Erwinia bij hyacint vereist bewuste keuze voor uitgangsmateriaal en verwerking. Peter vreeburg, Joop van Doorn, Paul van Leeuwen, Andre Korsuize en Trees Hollinger
- ICPPB 2006 (Edinburgh). Soft rot in flower bulbs, caused by pectinolytic Erwinia spp in the Netherlands (Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen, Arjen Speksnijder and Jan van der Wolf
- ICPPB 2006 (Edinburgh) An enrichment Luminex assay for immunodetection of Eca and Echr (J.M. van der Wolf, J. Peters, W. Sledz, J. van Doorn, J.H.M. Bergervoet).
- Possibility for biological control of pectinolytic erwinias in hyacinth using antagonistic bacterial isolates. (S. Jafra, J. Przysowa, J. van Doorn and J.M. van der Wolf) Zie bijlage 1. Congres te Darmstadt 2006 (onderwerp: antagonist).

15.3 Brochures

“Praktische tips om de kans op snot te verkleinen” verspreid op onder andere open dagen en te downloaden van: <http://www.ppo.wur.nl/NL/publicaties/PPO+rapporten/Bloembollen/>.

“Zo voorkom je beschadiging van bloembollen”, informatie uit dit onderzoek is ook opgenomen in de Telen met toekomst brochure die gemaakt is samen met en verspreid wordt door Alb. Groot BV. De brochure is ook te downloaden op de websites van Telen met toekomst (<http://www.telenmettoekomst.nl/?page=telen&telen=bollenteelt>) en PPO (<http://www.ppo.wur.nl/NL/publicaties/PPO+rapporten/Bloembollen/>)

15.4 Congressen, lezingen

Dahlia, Zantedeschia:

- 12 dec 2006 lezing voor groep Dahliakwekers, 20 personen (Erwinia chrysanthemi als veroorzaker van ploffers)
- 1 feb 2007 lezing op jaarvergadering KAVB productgroep Dahlia over Erwinia chry als veroorzaker van ploffers. 40 personen.
- 6 april 2005: Lezing Bollensoos 't Zand: Bacterieziekten in bijzondere bolgewassen, resultaten van enquête. 30 bezoekers.

Hyacint:

2004:

- 2 februari studiegroep T&P Lisse
- 4 februari Bollensoos BollenNoord 't Zand
- 10 februari studiegroep De Noord JW vd Meer Breezand
- 23 februari Kring KAVB De Zuid Lisse
- 25 februari studiegroep Breezand
- 17 maart studiegroep Hyacint De Zuid Zwaanshoek
- 29 maart KAVB ledenvergadering Hyacint Lisse
- 26 september studiegroep Atlantic Anna Paulowna
- 28 november studiegroep Tulp De Zuid Lisse
- 14 december T&P ledenvergadering Lisse

2005:

- 31 januari studiegroep T&P Lisse
- 29 maart KAVB ledenvergadering Hyacint Lisse
- 12 april studiegroep Schuurbazen export Lisse

2006:

- 18 januari studiegroep hyacint De Zuid Noorwijkerhout
- 30 januari studiegroep T&P Lisse
- 1 febr TMT Erwinia Breezand

2007 (lezingen soms in combinatie een ander Erwinia project PPO 3236044200) :

- 16 januari AJK Duin en Bollenstreek Noordwijkerhout
- 19 maart Studie groep T&P Lisse
- 23 maart Studiegroep Julianadorp Julianadorp
- 26 maart KAVB Hyacint ledenvergadering Keukenhof Lisse
- 19 april Erwinia groep De Noord Breezand
- 8 mei Erwinia avond met inbreng van uit de aardappelsector Lisse

21 mei Tmt de Zuid Lisse
7 november 2007 Bollensoos op BolleNoord in 't Zand.
22 november 2007 studiegroep Hyacint De Zuid in Noordwijkerhout.
12 december 2007 Telen met toekomst groep Kennemerland in Castricum.

2008 (lezingen veelal in combinatie een ander Erwinia project PPO 3236044200)
8 januari leden van Anthos in Lisse.
10 en 11 januari veel fabrikanten gesproken over relatie met mechanisatie op de Mechanisatie Show in Lisse
8 februari open dag van PPO Bollen, Bomen & Fruit in Lisse: 2 lezingen en een demonstratie van het elektronisch ei door DLV.
25 maart ledenvergadering van de KAVB Productgroep Hyacint op Keukenhof.
31 maart studiegroep T&P in Lisse.

2007: KNPV-meeting: Erwinia: rot voor de teler (Wageningen).
2008: Xth International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials
April 20-24, 2008 Lisse, the Netherlands: lezing "Soft rot in flower bulbs, caused by Dickeya and Pectobacterium (Erwinia) strains, in the Netherlands"

15.5 Open dagen

Open dagen PPO Lisse (winter en voorjaar) per keer verschillende aspecten :
10-11 februari 2005; 27 mei 2005; 31 mei 2006; 8 februari 2007; 24 april 2008 bedrijvendag incl. demo door DLV; 30 mei 2008 besmetting bij vermeerdering, beschadiging
14 september 2007: Open Dag CNB/PPO Posters ("Erwinia in Dahlia en Zantedeschia, Toetsen op Erwinia en Overleving van Erwinia")

16 Literatuur

1. Aertsen A *et al.* 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 263-273.
2. Brink, L van den *et al.* 2004. Perspectieven van ozonbehandelingen ter bestrijding van schadelijke organismen op plantaardig uitgangsmateriaal. Rapport 510477 van PPO-AGV.
3. Bdliya BS *et al.* 2004. A modified crystal violet pectate (CVP) medium for detection and isolation of soft rot *Erwinia* spp. from plant materials. *J. Plant Dis. And Protection* 111: 506-515
4. Castang S *et al.* 2006. Direct evidence for the modulation of the activity of the *Erwinia chrysanthemi* quorum-sensing regulator ExpR by acylhomoserine lactone pheromone. *J. Biol. Chemistry* 281: 29972-29987.
5. Charkowski AO. 2006. The soft rot *Erwinia*. In: *Plant-associated bacteria* (423-505) S.S.Gnanamanickam (eds.) Springer.
6. Cother, E.I. *et al.* (1980): Laboratory-scale preparation of sodium polypectate for use in selective media for pectolytic *Erwinia* spp. *Plant Disease* 64: 1086-1087.
7. Darasse A. *et al.* 1994. Isolation by genomic subtraction of DNA probes, specific for *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Appl. Environm. Microbiol.* 60: 298-306.
8. DeAngelis KM *et al.* 2007. Sensitive whole-cell biosensor suitable for detecting a variety of N-acyl Homoserine Lactones in intact rhizosphere microbial communities. *Appl. Environm. Microbiol.* 73: 3724-3727.
9. De Boer SM *et al.* 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potatoe tissue. *Phytopathol.* 85: 854-858
10. Doorn van, J *et al.* 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*: cause of yellow disease in *Hyacinthus*. In: *Xanthomonas* (eds J.G. Swings and E.L. Civerolo, chapter 1.17 (the hosts of *Xanthomonas*), p.83-91. Chapman and Hall, London.
11. Doorn van, J *et al.* De groene PCR: toepassingen in de sierteelt, hoofdstuk 17 (p.261-275). In: *Moleculaire diagnostiek* (eds. E. van pelt-Verkuil, M.F. van Berlo, A. van Belkum en H.G.M. Niesters, Heron reeks, Bohn Stafleu van Loghum, Houten/Diegem 2001.
12. Doorn van J. *et al.* 2005. Is *Erwinia* te beheersen? Rapport PPO-BBF nr. 320966
13. Doorn van J. *et al.* 2005. *Erwinia chrysanthemi* veel aangetroffen. *BloembollenVisie* 53:22-23
14. Doorn van J. *et al.* 2006. Snelle toetsen op *Erwinia* geven steeds beter zicht op aantasting. *BloembollenVisie* 87:22-23
15. Doorn van J. *et al.* 2007. Overleving van *Erwinia* in grond en op materialen onderzocht. *BloembollenVisie* 115: 20-21
16. Doorn van J. *et al.* 2007. Toetsen om *Erwinia* in bloembollen aan te tonen. *BloembollenVisie* 116: 20-21
17. Dwarswaard A 2005. *Erwinia* slaat weer toe; PPO werkt aan oplossing. *BloembollenVisie* 73: 21
18. Dwarswaard A 2006. *Erwinia* breed aangepakt. *BloembollenVisie* 91: 32
19. Fray RG 2002. Altering Plant-Microbe Interactions through artificially manipulating bacterial quorum sensing. *Annals of Botany* 89: 245-253
20. Funnell KA *et al.* 1999. Directions and challenge of the New Zeland Calla industry, and the use of calcium to control soft rot. *Symposium Taiwan*, 30-44.
21. Gardan L *et al.* 2003. Elevation of three subies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int. J. Systematic and Evol. Microbiol.* 53: 381-391.
22. Grenier A-M *et al.* 2006. The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Appl. Environm. Microbiol.* 72: 1956-1965.
23. Hentzer M *et al.* 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J.of Clinical Invest.* 112: 1300-1307.

24. Ishida T *et al.* 2007. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-acyl cyclopentylamides. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3183-3188.
25. Kang HW. *et al.* 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* 52: 127-133.
26. Latour X. *et al.* 2007. Thermoregulation of N-acyl homoserine lactone-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4078-4081
27. Lee Y-A *et al.* 2006. Characterization of *Erwinia chrysanthemi*, the soft rot pathogen of white-flowered calla lily, based on pathogenicity and PCR-RFLP and PFGE analyses. *Plant Pathol.* 55: 530-536.
28. Lee Y-A *et al.* 2006. A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *J. Microbiol. Methods* 64: 200-206
29. Leeuwen van PJ *et al.* 2005. *Erwinia* ook in bijzondere bolgewassen. *BloembollenVisie* 56:22-23
30. Leeuwen van PJ *et al.* 2006. *Erwinia chrysanthemi* ook bij ploffers in *Dahlia* boosdoener. *BloembollenVisie* 97:20-21
31. Ma B. *et al.* 2007. Host range and molecular phylogenetics of the soft rot enterobacterial genera *pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathol.* 97: 1150-1163.
32. Nassar A. *et al.* 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.* 62:2228-2235.
33. Niesters HGM. 2001. Kwantitatieve moleculaire technieken (p. 115-125). In: Moleculaire diagnostiek (hoofdstuk 7) (eds. E. van Pelt-Verkuil, M.F. van Berlo, A. van Belkum en H.G.M. Niesters, Heron reeks, Bohn Stafleu van Loghum, Houten/Diegem 2001).
34. Ochial A. *et al.* 2007. Plant cell wall degradation by saprophytic *Bacillus subtilis* strains: gene clusters responsible for rhamnogalacturonan depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3803-3813.
35. Peters J. *et al.* 2007. An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. *Europ. J. Plant pathol.* 117: 97-107.
36. Perombelon MCB. *et al.* 1985 A rapid method for identifying and quantifying soft rot *erwinias* directly from plant material based on their temperature tolerances and sensitivity to erythromycin. *Journal of Applied Bacteriology* 60, 61-66 ref erythromycine
37. Prins H. *et al.* 2008. In de puree? De gevolgen van aantasting door *Erwinia* voor de pootaardappelsector in kaart gebracht. Rapport LEI, Den Haag nr. 40684.
38. Romero AM *et al.* 2005. Cyclamen soft rot caused by *Erwinia chrysanthemi* in Argentina. *Australian Plant Pathology* 34: 279-280.
39. Santos R *et al.* 2001. Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *MPMI* 14: 758-767.
40. Samson R. *et al.* 2004. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner *et al.* 1973) Hauben *et al.* 1998 and *Brennia paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov. and *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* 55, 1415-1427.
41. Schapendonk, A.H.C.M *et al.* 2002. Early detection of *Phytophthora* by chlorophyll fluorescence. in *Plant Spectrofluorometry: Applications and basic research.* (O. van Kooten and J. Snel Eds) p 69-73.
42. Smadja B *et al.* 2004. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Can. J. Microbiol.* 50: 19-27
43. Smid EJ *et al.* 1995. Detecting *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathol.* 44: 1058-1069
44. Snijder *et al.* 2002. Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp. (Araceae) to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Europ. J. Plant Pathol.* 108: 565-571
45. Toth IK *et al.* 1999. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subspp. *atroseptica*. *J. Appl. Microbiol.* 87: 770-781.
46. Vreeburg PJM *et al.* 2004. Minder *Erwinia* in hyacint, maar aandacht blijft nodig. *BloembollenVisie* 54: 24-25
47. Vreeburg PJM *et al.* 2006. Gezond plantgoed belangrijkste stap tegen *Erwinia*. *BloembollenVisie* 90: 24-25

48. Vreeburg PJM. *et al.* 2007a. Erwiniabesmetting hyacint: hollen veiliger dan snijden. BloembollenVisie 117: 20-21
49. Vreeburg PJM. *et al.* 2007b. Grondbesmetting en voeding spelen minder grote rol bij Erwinia-besmetting, BloembollenVisie 118: 20-21
50. Waleron M. *et al.* 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment . Microbiology 148: 583-595
51. Wolf vander JM. *et al.* 2006. Fysische, chemische en biologische bestrijding van pectinolytische Erwinia's. Noya 424, Plant Reserach Int.
52. Wopperer J. *et al.* 2006. A quorum-quencing approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the Burkholderia cepacia complex. Appl. Environm. Microbiol. 72: 1579-1587.
53. Yap M-N *et al.* 2006. Harpin mediates cell aggregation in Erwinia chrysanthemi 3937. J. Bacteriol. 188: 2280-2284. (pellicleforming)
54. Yap M-N *et al.* 2004. Genomic diversity of Erwinia carotovora subsp. carotovora and its correlation with virulence. Appl. Environm. Microbiol. 70: 3013-3023.
55. Yip MK *et al.* 2007. Production of soft rot resistant calla lily by expressing a ferredoxin-like protein gene (pflp) in transgenic plants. Plant Cell Reports 26: 449-457.
56. Zhang L-H. 2003. Quorum quenching and proactive host defense. Trends in Plant Sciences 8: 238-244.

Bijlage 1



DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
& BIOTECHNOLOGY

INTERCOLLEGIATE FACULTY OF BIOTECHNOLOGY
UNIVERSITY OF GDANSK & MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

Possibility for biological control of pectinolytic erwinias in hyacinth using antagonistic bacterial isolates.

S. Jafra^{1,2}, J. Przysowa¹, J. Van Doorn³, J. M. van der Wolf³

Introduction

Production of flower bulbs such, as tulips, hyacinth, freesia and zantedeschia is one of the major economically successful activities in The Netherlands. The pectinolytic *Erwinia* species, *Erwinia chrysanthemi* (Ech) and *Erwinia carotovora* (Ecc) are plant pathogenic bacteria responsible for soft rot disease among many important crops including flower bulbs (Fig. 1). Spread and development of the disease can be controlled only by application of an integrated strategy comprising of testing of propagation material, hygienic measures and use of chemical, physical and biological control agents. Within this study, the possibilities to control pectinolytic erwinias with antagonistic microorganisms have been explored.

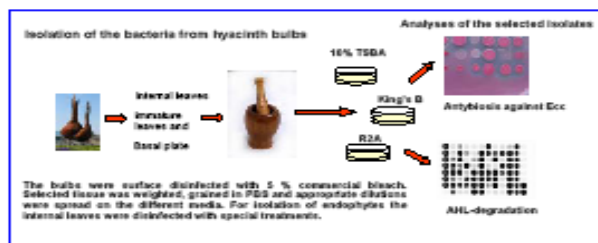


Fig. 1. Rotting hyacinth bulbs during storage.

Isolation of the potential *Ec* antagonists from the hyacinth bulbs

Three bulbs of two different cultivars of hyacinths were used for the bacteria isolation – Aiolas and Delft Blauw. The bacteria were isolated from 3 different parts of the hyacinth bulb: basal petal and the roots, the internal leaves and the immature flowers. The endophytes were isolated from the internal leaves sample. Obtained isolates were tested for their antagonistic activity against Ecc2015 and Ech2019 previously isolated from hyacinth bulbs. The isolates were tested for their capacity of degrading of the synthetic acyl-homoserine lactones (AHLs) signaling molecules. Selected isolates were taxonomically classified.

Scheme of the bacteria isolation from the hyacinth bulbs

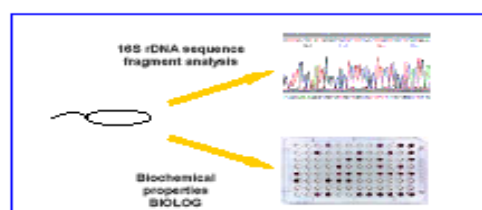


Results

From the tested hyacinth bulb tissues, 657 bacterial isolates were isolated and tested for their antagonistic activity against Ecc2015 and Ech2019.

- Fifty two isolates indicated ability to degrade AHL and inhibit growth of Ech and/or Ecc, from them:
 - 40 isolates inhibited growth of Ech and/or Ecc
 - 22 isolates were able to degrade synthetic AHL

Identification of the isolates



- Selected isolates, on the basis of 16S rDNA analyses, were classified to 7 genera: *Bacillus*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rahnella* and *Serratia*

Characteristic of the isolates selected for *in planta* test on the hyacinth bulbs

No.	16S rDNA	BIOLOG	AHL DEGRADATION				ANTIBIOSIS	
			OHHL	HL	OOHL	HL	Ecc	Ech
360	<i>Erwinia persici</i>	<i>P. agglomerans</i>	-	+	-	+		
364	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>P. dispersa</i>	+	+	+	+		
369	<i>Serratia marcescens</i>	<i>S. rubida</i>	-	-	-	-	+++	++
480	<i>E. persici</i>	<i>S. rubida</i>	+	+	+	+	++	++
565	<i>Serratia rubida</i>	<i>S. rubida</i>	+	+	+	+	+++	+++
620	<i>Bacillus simplex</i>		-	-	-	-	++	+
645	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	+	+	+	+	++	+
650	<i>Pseudomonas</i> sp.						+++	+++
651	<i>P. gribneri</i>	<i>P. agglomerans</i>					+++	+++
655	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ps. fluorescence</i>					+++	+++

"-" - lack of activity, "+" - good activity, "++" - very good activity, "+++"- very strong activity

- The isolates 650 (*Pseudomonas* sp.), 651 (*Pseudomonas gribneri*), 656 (*Pseudomonas fluorescence*) were able to protect hyacinth bulbs against Ecc and Ech in biological assay.

Conclusion

The flower bulb endophytes and bulb-associated bacteria offer a possibility for biocontrol of soft rot erwinias.

¹Intercollegiate Faculty of Biotechnology University of Gdansk & Medical University of Gdansk, Department of Plant Protection and Biotechnology, Kościelna 24, 80-822 Gdansk, Poland
Tel.: +4858 3012241 int. 331
Fax: +4858 3012807
E-mail: jafra@biotech.umcg.edu.pl

²Plant Research International, Plant en Omgeving, Sector Flower bulbs, P. O. Box 85 2180 AB Lisse, The Netherlands

³Plant Research International B.V. Biodiversity and Identity Business Unit, P.O. Box 16, 87 00AA, Wageningen, The Netherlands
Tel.: +31 317 478024
Fax: +31 317 410113
E-mail: jan.vandeen@wur.nl