

Proefstation voor de Bloemisterij
Linnaeuslaan 2a
1431 JV Aalsmeer
Tel. 02977-26151

211131

BACTERIEZIEKTE BIJ BEGONIA

Vergelijking van detectietechnieken

Intern verslag nr. 4

Projectnr. 591

juli 1985

juli 1985
Ing. J. Schuuring
Dr. G.W.L. van Vuurde
Ir. H. Rattink

Prijs f. 5,--

Interne verslagen zijn te bestellen door overmaking van de kosten op giro-rekening 174855 ten name van Proefstation voor de Bloemisterij, Aalsmeer.

2200262

BACTERIEZIEKTE BIJ BEGONIA

Het onderzoek werd volgens het opgestelde schema (zie bijlage A) uitgevoerd. De inoculatie gebeurde door op een stengel aan de basis een druppel van de bacteriesuspensie aan te brengen en met een naald door de druppel heen in de stengel te prikken tot aan de vaatbundel(s). De bacteriesuspensie werd naar binnen gezogen. Per plant werden 8-10 stengels geïnoculeerd. Bij de verwerking van de monsters na 15 dagen na inoculatie werd naast de SX-bodem ook een special pepton + CaCl₂-bodem gebruikt. 44 dagen na inoculatie werd nogmaals een serie monsters bekeken.

Resultaten

Bij de 3e monstername (15 dagen na inoculatie) waren bij enkele planten van de behandeling, waarbij met 10⁹ sporen per ml was geïnoculeerd, de eerste bladsymptomen te zien. Daarna werden geleidelijk aan bij de andere behandelingen, gecorreleerd aan de hoeveelheid inoculum, symptomen zichtbaar. Bij de laatste monstername na 44 dagen waren bij alle behandelingen symptomen te zien. Op dat moment werden ook bij planten, die niet geïnoculeerd waren, enkele bladeren met symptomen gevonden.

ELISA

De waarden van ELISA, uitgevoerd bij de NAK-S (Bijlage 1) en op het IPO (Bijlage 2), zijn te gelijkmatig om betrouwbare conclusies te kunnen maken. Meestal was ook de achtergrondkleuring te sterk.

Immunofluorescentie

Met de IF-techniek werd bij de monsters, genomen na 2 dagen na inoculatie, nog niet *X.begoniae* aangetoond (Bijlage 3). Na 8 dagen na inoculatie werden positieve reacties gevonden, vooral na 28 uur schudden bij 26°C in een verrijkmingsmedium. De meest betrouwbare reacties werden gevonden bij de monsters na 15 dagen na inoculatie, die gedurende 4 uur bij 4°C in een gewone buffer waren geschud.

Met de IF-techniek werd ook regelmatig de bacterie aangetoond in monsters van de niet geïnoculeerde planten. In monsters van planten, die met 10⁹ bacteriën per ml waren geïnoculeerd, werd de bacterie sneller en in grotere hoeveelheden gevonden.

Selectieve bodems

In monsters genomen na 2 of 8 dagen na inoculatie, werd met de SX-bodem en via dubbeldiffusie de bacterie niet aangetoond (Bijlage 4). Na 15 dagen na inoculatie werd alleen bij de hoogste concentratie de bacterie gevonden. Met de special pepton + CaCl₂-bodem bleek algemeen eerder en vaker de bacterie aan te tonen te zijn, ook bij lagere inoculum-hoeveelheden. Bij de monstername na 44 dagen na inoculatie werd een goede correlatie gevonden tussen de resultaten van de IF-techniek en de special pepton + CaCl₂-bodem.

Conclusie

Het vergelijkende onderzoek heeft aangetoond, dat ELISA momenteel niet bruikbaar is om routinematig grote hoeveelheden bladmonsters van Begoniaplanten te onderzoeken op de aanwezigheid van geringe hoeveelheden *X.begoniae*. Hetzelfde geldt voor de SX-bodem. Wel bruikbaar lijkt de special-pepton + CaCl₂-bodem. De resultaten met de IF-techniek zijn goed. Schudden in een verrijkmingsmedium geeft bij monsters, die kortere tijd na inoculatie zijn genomen meer positieve reacties dan schudden in een normale buffer. De beste resultaten (meeste positieve reacties) werden verkregen na korte tijd schudden (4 uur) bij lage temperatuur (4°C).

Aanbevelingen

Voor routinematige onderzoek van Begoniaplanten op de aanwezigheid van *X.begoniae* kan gebruik worden gemaakt van de IF-techniek. Om aspecifieke reacties te voorkomen lijkt schudden in een normale buffer bij lage temperatuur (4°C) de beste methode, waarbij de tijdsduur bijvoorbeeld ca. 15 uur bedraagt. Monsters, positief bevonden met IF, kunnen nagechecked worden, op de special pepton + CaCl₂-bodem (Ca-oxalaat - kristalvorming), eventueel gevolgd door dubbel-diffusie en eventueel nogmaals IF.

- Tijdens praktische toepassing van de IF-techniek zal voortdurend aandacht besteed moeten worden aan de specificiteit van het te gebruiken anti-serum.
- Vervolmaking van de special pepton + CaCl₂-bodem is noodzakelijk.
- De mogelijkheden om met behulp van ELISA routinetoetsingen uit te voeren moeten verder onderzocht worden
- Ontwikkeling van een toetsmethode m.b.t. de techniek van monoclonale anti-bodies is zeer wenselijk.

juli 1985
Ing. J. Schuurring
Dr. G.W.L. van Vuurde
Ir. H. Rattink

Uitgangsmateriaal

Begonia-planten (cv. 'Schwabenland') uit meristeeencultuur, 4-5 maanden oud, één herkomst.

Inoculatie:

Inoculeren met *X. begoniae*, afkomstig van IPO, Concentraties: 0 (Water), $10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ bacteriën/ml en controle (=seincultuur)
Per behandeling 10 planten. Bladeren verwonden met carborundumpoeder.
Suspensies vernevelen. Na inoculatie planten onder plastic tent.

Monstername:

Na 2,8 en 15 dagen per behandeling 75 bladponsjes van 1 cm diameter.
Ponsjes mengen; 15 ponsjes uit behandeling $0, 10, 10^2$ en controle naar F.A. Hakkaart; 4 x 15 ponsjes bewerken.

Schema:

Mengmonster A: via buffer (water) (60 ponsjes)	(2 x 15 ponsjes)	1. 4 ^u schudden bij 4°C - IF (15 ponsjes)	ELISA SX-bodem
		2. 24 ^u schudden bij 26°C - IF (15 ponsjes)	ELISA SX-bodem
		48 ^u schudden bij 26°C - IF	ELISA SX-bodem
B: via NBG (2 x 15 ponsjes)		3. 4 ^u schudden bij 4°C - IF (15 ponsjes)	ELISA SX-bodem
		4. 24 ^u schudden bij 26°C - IF (15 ponsjes)	ELISA
		48 ^u schudden bij 26°C - IF	ELISA SX-bodem

Werkverdeling

Inoculatie + monstername : PBA
Uitvoering technieken : NAK-S + PBA in Roelofarendsveen
Beoordeling ELISA : NAK-S, IPO
Beoordeling SX : NAK-S + PBA
Beoordeling IF: IPO + NAK-S.

Tijdschema :

21 april 1985 : inoculatie
23 april 1985 : 1e monstername(2d)
29 april 1985 : 2e monstername(8d)
6 mei 1985 : 3e monstername(15d)

NBG

8 dagen na inoculatie

minuten	4 uur 4° C				28 uur 26° C				52 uur 26° C												
	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹					
5	0	0	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	1	3	2	2	2	1	1
10	9	11	12	12	11	14	12	11	0	4	0	5	0	0	0	2	2	0	0	0	0
15	14	17	17	17	16	23	17	19	4	13	0	10	0	0	1	2	2	0	0	0	0
35	31	36	31	31	33	44	37	39	7	26	8	19	2	2	2	2	3	0	0	0	0
55	38	40	42	42	37	59	47	47	16	42	18	28	10	10	3	6	3	2	2	1	2
95	-	-	-	-	-	-	-	-	2	38	7	25	1	1	2	7	4	3	3	2	1

Buffer

minuten	4 uur 4° C				28 uur 26° C				52 uur 26° C												
	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹					
5	0	1	3	0	2	2	2	2	3	1	2	0	6	2	2	2	1	1	2	1	2
10	18	10	17	15	10	12	12	10	11	8	6	2	8	8	3	4	0	0	0	0	0
15	30	15	27	24	13	20	19	15	22	24	14	4	14	17	7	7	3	0	0	0	3
35	56	30	49	46	22	36	34	31	48	54	34	9	23	35	12	8	7	0	0	0	5
55	66	40	60	59	23	46	43	39	73	79	53	14	36	55	21	15	14	7	0	0	4
95	-	-	-	-	-	-	-	-	68	73	61	12	41	64	35	7	17	10	0	0	6

15 dagen na inoculatie

NBG

minuten	4 uur 4°C									28 uur 26°C									52 uur 26°C								
	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹			
5	2	3	3	3	3	2	3	7	0	1	9	0	1	7	3	19	0	0	12	0	0	0	0	1			
10	3	4	4	5	2	2	3	23	1	4	26	2	2	25	5	35	3	1	40	1	2	0	0	6			
15	7	9	13	8	13	10	7	61	1	4	68	4	1	68	8	91	2	0	68	0	1	0	5	15			
35	0	3	4	11	8	14	5	142	5	13	141	10	6	138	21	191	4	1	119	0	3	1	16	38			
55	0	7	8	18	11	21	7	> (80)	5	17	152	14	0	151	19	185	5	0	149	0	1	0	22	62			
95	0	6	0	23	1	21	1	>	6	26	>	20	6	>	41	>	27	17	176	14	17	14	53	113			

Buffer

minuten	4 uur 4°C									28 uur 26°C									52 uur 26°C								
	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹			
5	3	2	1	3	2	0	2	2	4	2	3	3	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4			
10	2	2	2	1	3	1	2	2	7	4	6	7	6	6	6	6	6	1	1	0	2	0	1	14			
15	6	9	10	7	9	8	6	11	11	4	9	9	7	9	6	5	7	8	5	0	3	0	0	23			
35	4	13	15	17	6	13	6	19	25	11	19	20	16	15	12	16	19	22	14	6	10	1	3	53			
55	6	19	21	23	11	20	11	26	26	8	20	25	14	10	7	14	20	28	14	0	10	0	0	74			
95	2	19	19	24	2	18	4	29	43	15	39	40	29	24	18	25	47	62	35	2	28	4	10	121			

(37/60)

ELISA-waarden (IPO)

2 dagen na inoculatie

	NBC		Buffer	
	52 h	26°C	52 h	26°C
0	0		3	
102	1		6	
103	4		2	
104	7		14	
105	0		12	
106	1		7	
109	1		63	
10	1		10	

8 dagen na inoculatie

	NBC		Buffer					
	4°	4h	26°	52h	4°	4h	26°	52h
0	2		2		5		16	
102	2		2		14		22	
103	3		5		22		15	
104	1		2		8		19	
105	3		3		16		10	
106	2		2		14		40	
109	3		2		9		24	
10	2		1		14		16	

15 dagen na inoculatie

	NBC		Buffer					
	4°	4h	26°	52h	4°	4h	26°	52h
0	3		10		14		8	
102	3		0		34		39	
103	1		112		12		47	
104	7		2		22		4	
105	3		9		19		9	
106	2		4		15		37	
109	5		4		18		31	
10	77		57		25		40	

NBG	2 dagen inoculatie		8 dagen inoculatie		15 dagen inoculatie	
	4h 4°C	28h 26°C	4h 4°C	28h 26°C	4h 4°C	28h 26°C
RC verd.						
0	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	+	-	-
10 ²	-	-	+	+	+	+
10 ³	-	-	-	-	+	-
10 ⁴	-	-	-	-	+	-
10 ⁵	-	-	-	+	-	-
10 ⁶	-	-	-	-	-	+
10 ⁹	-	-	+	+	+	+

Buffer	2 dagen inoculatie		8 dagen inoculatie		15 dagen inoculatie	
	4h 4°C	28h 26°C	4h 4°C	28h 26°C	4h 4°C	28h 26°C
RC verd.						
0	-	-	-	-	+	-
10	-	-	-	+	-	+
10 ²	-	-	-	-	+	-
10 ³	-	-	-	-	+	-
10 ⁴	-	-	-	-	+	+
10 ⁵	-	-	-	-	+	+
10 ⁶	-	-	-	-	+	-
10 ⁹	-	-	-	-	+	+

- = geen bacteriën
 + = enige bacteriën
 ++ = meer dan 10
 +++ = meer dan 100
 +++ = zeer veel

2 dagen na inoculatie

- S X platen negatief, behalve reïncultuur

8 dagen na inoculatie

- S X platen negatief, behalve reïncultuur

15 dagen na inoculatie

1) 4 uur 4°C

	NBG				Buffer			
	JKJ	zetmeel- vorming	DDD	CaCl ₂ vorming	JKJ	zetmeel- vorming	DDD	CaCl ₂ vorming
0	as?	-	-	+	as?	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ²	+	-	-	+	-	-	-	+
10 ³	-	-	-	++	-	-	-	-
10 ⁴	as?	-	-	+	as?	-	-	+
10 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁹	+++	+	-	++	+	+	+	++

2) 24 uur 26°C

	NBG				Buffer			
	JKJ	zetmeel- vorming	DDD	CaCl ₂ vorming	JKJ	zetmeel- vorming	DDD	CaCl ₂ vorming
0	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³	-	-	-	-	-	-	-	+
10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁵	-	-	-	+	-	-	-	-
10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁹	+++	+	+	++	+++	+	+	++

Vervolg Bijlage 4

15 dagen na inoculatie

3) 52 uur 26°C

	NBG				Buffer			
	JKJ	zetmeel- vorming	DDD	CaCl2 vorming	JKJ	zetmeel vorming	DDD	CaCl2 vorming
0	-	-	-	-	+	-	+	++
10	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	++
10 ⁵	-	-	-	-	-	-	+	-
10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁹	-	-	+	++++	-	-	+	+++

44 dagen na inoculatie

	NBG					
	4°C			26°C		
	DDD	CaCl2	IF	DDD	CaCl2	IF
0	-	++	-	-	+ (+)	+ (+)
10	+	++	+++	-	+++	++
10 ²	-	++	++	-	+	++
10 ³	-	+	+	-	+	++ (+)
10 ⁴	-	+	+++	-	+	+
10 ⁵	+	+++	++	+	++	+++
10 ⁶	+	+++	+++	+	++	+++
10 ⁹	+	+++	++	+	+	-

ELISA-NAKS BIJLAGE I

2 dagen na inoculatie

NBG

minuten	4 uur 4° C					28 uur 26° C					52 uur 26° C														
	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	
5	04	3	1	3	1	1	4	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
10	8	8	4	8	4	5	8	1	24	3	3	1	1	5	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	80	16	12	13	12	10	13	2	52	8	4	1	8	15	0	0	2	0	4	2	1	0	0	0	0
35	110	28	30	21	33	31	32	2	75	9	9	0	11	26	0	3	0	7	2	1	0	0	1	0	0
55	150	30	26	13	29	33	31	4	104	14	14	1	21	37	0	4	0	9	1	0	0	0	0	0	0
95	180	59	55	36	65	70	62	7	137	22	17	0	31	52	1	15	8	27	8	13	0	0	12	3	3

Buffer

minuten	4 uur 4° C					28 uur 26° C					52 uur 26° C														
	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁹	
5	2	2	2	1	2	1	2	1	1	2	5	5	4	4	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
10	6	7	8	7	6	6	6	0	10	7	22	9	15	13	1	2	1	1	3	1	1	0	2	0	0
15	10	15	12	15	11	13	10	3	20	7	44	14	20	27	14	7	4	3	7	2	0	3	4	4	4
35	29	34	35	43	28	32	24	4	27	3	67	19	26	42	17	10	8	3	13	0	0	6	6	6	6
55	31	42	45	56	22	37	21	6	42	4	99	26	39	54	28	15	9	4	15	0	0	6	7	7	7
95	64	78	82	98	62	71	46	10	63	4	124	37	57	75	42	18	8	9	18	0	0	12	4	4	4