

Ontwikkeling van praktijktoetsen voor zuur, snot en bolrot

Peter Vreeburg, Joop van Doorn, Martin van Dam, Henk Gude, Roselinde Duijvesteijn, Khanh Pham en Maarten de Kock


Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
Onderdeel van Wageningen UR
Sector Bloembollen
PPO nr. 32340716 00/ PT nr. 13373
Maart 2013

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving / Plant Research International, Business Unit Bomen, Bollen & Fruit.

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

De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

PT Projectnummer: 13373
PPO Projectnummer 3234071600

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

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 - 462121
Fax : 0252 - 462100
E-mail : info.bollen@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INTRODUCTIE.....	7
1.1 Aanleiding van project.....	7
1.2 Doelstelling.....	8
1.3 Projectstructuur.....	8
2 PRAKTIJKTOETS EN LABTOETSEN VOOR SNOT IN HYACINT.....	11
2.1 Inleiding.....	11
2.2 Materialen en methoden.....	12
2.2.1 PCR toetsen.....	12
2.2.2 Toetsing door de NAK.....	12
2.2.3 Standaard uitvoering thuistoets.....	14
2.2.4 Praktijktoets: uitvoering in 2008.....	14
2.2.5 Praktijktoets: uitvoering in 2009.....	15
2.2.6 Praktijktoets: uitvoering in 2010.....	15
2.2.7 Praktijktoets: uitvoering in 2011.....	16
2.2.8 Praktijktoets uitvoering in 2012.....	17
2.3 Resultaten.....	18
2.3.1 Resultaten thuistoets 2008.....	18
2.3.2 Resultaten thuistoets 2009.....	19
2.3.3 Resultaten thuistoets 2010.....	21
2.3.4 Resultaten thuistoets 2011.....	22
2.3.5 Resultaten thuistoets 2012.....	23
2.4 Discussie.....	23
2.5 Conclusies thuistoets hyacint.....	25
2.5.1 Protocol sorteerthuistoets.....	25
2.5.2 Protocol schudthuistoets.....	25
2.5.3 Protocol NAK-toets.....	25
2.6 Output.....	26
2.6.1 Vakbladartikelen.....	26
2.6.2 Lezingen, posters en Open Dagen.....	26
2.7 Literatuur.....	27
3 PRAKTIJKTOETS EN LABTOETSEN VOOR ZUUR IN TULP.....	29
3.1 Introductie.....	29
3.2 Materiaal en methode van de praktijktoets.....	29
3.2.1 2009 - eerste proef.....	29
3.2.2 2009 - tweede proef.....	30
3.2.3 2010 - eerste proef, praktijkpartijen.....	31
3.2.4 2010 - tweede proef, praktijkpartijen kunstmatig geïnfecteerd.....	31
3.2.5 Statistiek.....	31
3.3 Resultaten praktijktoetsen.....	32
3.3.1 Resultaat van de eerste proef in 2009.....	32
3.3.2 Resultaat van de tweede proef in 2009.....	33
3.3.3 Resultaat van de eerste proef in 2010 (praktijkpartijen).....	33
3.3.4 Resultaat 2 ^e proef 2010.....	35
3.4 Fusariumdetectie met behulp van labtoetsen.....	36
3.4.1 Ontwikkeling van de labtoets.....	36
3.4.2 Vaststellen zuurpercentages op onbehandelde bollen met moleculaire technieken.....	37

3.4.3	Vaststellen zuurpercentages op resterende gezonde bollen na de uitziekttoets.....	38
3.5	Discussie	40
3.6	Conclusie	42
3.6.1	Praktijktoets:	42
3.6.2	Het protocol praktijktoets zuur in tulp:	42
3.6.3	Laboratorium en PCR toetsen.	42
4	PRAKTIJKTOETS VOOR BOLROT IN NARCIS	43
4.1	Introductie.....	43
4.2	Materiaal en methode.....	43
4.2.1	Thuisoets	43
4.2.2	Vroegrooitoets	44
4.3	Resultaten ontwikkeling praktijktoets	44
4.3.1	Ontwikkeling van de thuisoets	44
4.3.2	Optimalisatie praktijktoets: voorkomen van kruisbesmetting	45
4.3.3	Vroegrooien	47
4.4	Conclusie en discussie praktijktoets bolrot.....	48
4.4.1	Protocol praktijkproef.....	48
4.4.2	Kosten praktijkproef.....	48
5	<i>FUSARIUM</i> OPWEKTOETSEN MET BEHULP VAN ZIEKE-BOLETRACTEN	49
6	NARCIS: HOE EFFECTIEF IS HET GEÏNDUCEERDE UITZIEKEN?	53

Samenvatting

Tijdens de handel van bloembollen leiden latente (niet-zichtbare) infecties tot handelsdiscussies en grote verliezen. Om deze handelsdiscussies voor te zijn en verliezen tijdens handel te voorkomen, is het noodzakelijk om latente infecties in een vroeg stadium in de keten te detecteren. Daarom bestaat er behoefte aan een betrouwbare, praktische en vooral snelle toetsmethode om na te kunnen gaan of bepaalde ziekten of ziektekiemen in een partij bloembollen onzichtbaar (latent) aanwezig zijn. Deze toetsmethode is niet alleen toepasbaar voorafgaand aan de verkoop van partijen. De toetsmethode kan ook ingezet worden gedurende de teelt van plantmateriaal waardoor latent-zieke partijen vroegtijdig herkend kunnen worden, waardoor met passende maatregelen verdere verspreiding van de ziekte voorkomen kan worden.

Dit project heeft voor *Erwinia* bij hyacint (snot) en *Fusarium* spp. bij tulp en narcis (zuur resp. bolrot) zogenaamde praktijktoetsen ontwikkeld waarmee het mogelijk moet zijn om op het bedrijf op een eenvoudige manier latente infecties vroegtijdig aan te tonen. Tevens zijn laboratoriumtoetsen ontwikkeld om latente infecties aan te kunnen tonen.

Een latente besmetting met *Erwinia* (*Dickeya* – agressief snot en *Pectobacterium* – witsnot) kan op het bedrijf in een week tijd goed zichtbaar gemaakt worden door het uitvoeren van een thuistoets, die gebruik maakt van mechanische stress door sorteren van in plastic zakjes verpakte bollen.

De thuistoets moet bij voorkeur tussen juni en september worden uitgevoerd. Er zijn aanwijzingen dat de toets niet werkt bij lang bewaard en/of heetgestookt bolmateriaal in september/oktober en het is niet bekend of de toets werkt voor kleine plantgoedmaten (pluis).

Een eenvoudiger uit te voeren, hiervan afgeleide toets is de schudtoets, maar deze is minder gevoelig, en langzamer in symptoomontwikkeling en een nieuwe besmetting kan optreden via versmering.

De NAK-toets (PCR) gaf een goede correlatie aan met de resultaten, behaald in de thuistoets.

Het definitieve protocol voor de thuistoets is:

- *Neem een monster van 200 op het oog gezonde bollen, goed verdeeld over de hele partij*
- *Verpak de bollen per bol in een plastic boterhamzakje (knijp de lucht eruit bij dichtknopen en knoop dicht bij de bol)*
- *Sorteer de bollen 3x over 8 sorteerplaten, met een kleinere maat dan de bollen, vang deze telkens opgevangen in een houten gaasbak*
- *Bewaar na het sorteren de gaasbak met bollen bij 25-30°C*
- *Beoordeel na 6-10 dagen de bollen op rotting, door te kijken en te knijpen door de zakjes heen. Beoordeel de bollen eventueel na een week nogmaals*
- *Het % rotte bollen geeft een maat voor de aanwezige latente besmetting met agressief snot én witsnot*
- *Laat bij twijfel over de oorzaak (witsnot of agressief snot) snotbollen toetsen op Dickeya*

De kosten voor de thuistoets bedragen ca 2,5 uur aan arbeid, 200 bollen en € 0,60 aan boterhamzakjes.

Voor zuur in tulp is een protocol voor een praktijktoets ontwikkeld dat op bedrijven uitgevoerd kan worden. Helaas was het protocol nu nog onvoldoende betrouwbaar om aansluitend op het rooien en verwerken van tulpenbollen ingezet te worden. Pas vanaf oktober zijn binnen twee weken na het uitvoeren van de praktijktoets goede indicaties te krijgen over de aanwezigheid van latente infecties met *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*. Dit is voor toepassing in de praktijk te laat.

Voor bolrot bij narcis is een protocol voor een praktijktoets ontwikkeld dat op bedrijven uitgevoerd kan worden. De praktijktoets geeft echter pas na 3-6 weken een enigszins indicatief resultaat. Deze lange wachttijd is voor de praktijk te lang. De betrouwbaarheid van de praktijktoets moet daarnaast nog verbeterd worden.

De specifieke labtoets die voor *Fusarium oxysporum* is ontwikkeld, kan specifiek f. sp. *tulipae* en specifiek f. sp. *narcissus* aantonen. Het is gebleken dat de labtoets ook een positief resultaat oplevert bij uitwendige aanwezigheid van *Fusarium* zonder dat er van een latente of zichtbare infectie sprake is.

De toets kan dus geen onderscheid maken tussen een besmetting met *Fusarium* en latente infecties met *Fusarium*. Daarmee is de PCR-toets voor de praktijk te gevoelig en ongeschikt om in de praktijk te implementeren.

De ontwikkeling van de praktijktoetsen voor zuur in tulp en bolrot in narcis is door de begeleidingscommissie vroegtijdig beëindigd, waardoor het niet mogelijk is geweest de sub-optimale praktijktoetsen verder te ontwikkelen.

1 Introductie

1.1 Aanleiding van project




Er is sprake van ernstige ziekteproblemen bij belangrijke bloembolgewassen zoals zuur in tulpen, agressief rot in hyacinten, en bolrot in narcissen. Ogenschijnlijk gezonde partijen bloembollen blijken vaak besmet dan wel latent te zijn aangetast door de ziekteverwekker. We spreken van besmetting als er uitwendig ziektekiemen aanwezig zijn die eventueel via ontsmetting met gewasbeschermingsmiddelen verwijderd kunnen worden. Bij latente infecties is de ziekteveroorzaker al de bol binnengedrongen, maar is de ziekteontwikkeling (tijdelijk) gestopt. Latente infecties veroorzaken vroeg na het rooien geen zichtbare symptomen en zijn niet of nauwelijks met gewasbeschermingsmiddelen te bestrijden. Vanwege deze twee aspecten resulteren latente infecties vaak alsnog op later moment in de keten tot onverwachte ziekte-explosies.

In de handel en transport manifesteren ziekteproblemen zich onverwacht zodat veel bloembollen onverhandelbaar worden of verloren gaan. Hierdoor ontstaan ongewenste handelsdiscussies en zien afnemers zich genoodzaakt om kosten te maken om geleverde partijen bloembollen extra te controleren op aanwezigheid van ziekteproblemen. In 2008 heeft dit naar schatting 4 MEuro extra aan uitzoekkosten voor de handel betekend. Uiteindelijk worden ook consumenten geconfronteerd met een slechte kwaliteit van de bollen waardoor er grote imagoschade optreedt voor de gehele bollensector. Snotproblemen in hyacint hebben bij sommige buitenlandse Retail bedrijven al geleid tot verwijderen van bloembollen uit het assortiment.

Ook tijdens de teelt van bloembollen veroorzaken latente infecties grote verliezen doordat er besmet of latent geïnfecteerd plantgoed wordt gebruikt voor vervolgteelten. De ziekte verspreidt zich dan vanuit het plantgoed waardoor aanzienlijke oogstverliezen en besmetting van de teeltgrond het gevolg zijn. Het planten van 1% besmet plantgoed kan leiden tot 20% besmette bollen bij de oogst (van Dam, 2004).

Wil de sector niet jaarlijks vele miljoenen Euro's verlies lijden in de teelt en handel van bloembollen, dan is het noodzakelijk om niet-zichtbare besmettingen en latente infecties in een vroeg stadium in de keten te detecteren. Daarom bestaat er behoefte aan een betrouwbare, praktische en vooral snelle toets methode om na te kunnen gaan of bepaalde ziekten of ziektekiemen in een partij bloembollen aanwezig zijn. Deze toets methode is niet alleen toepasbaar voorafgaand aan handel en transport van partijen. De toets methode kan ook ingezet worden gedurende de teelt van plantmateriaal. Wanneer besmetting en latente infecties vroegtijdig aangetoond kunnen worden, is het mogelijk om de risico's op schade en verdere verspreiding van de ziekten te voorkomen.

Dit project richt zich op drie belangrijk ziekteveroorzakers:

Ziekteverschijnsel en naam van ziektebeeld			
	Zuur Tulp	Agressief snot en witsnot Hyacint	Bolrot Narcis
Gewas			
Betrokken pathogeen	<i>Fusarium oxysporum</i> forma specialis <i>tulipae</i>	<i>Dickeya solani</i> , <i>D. dadantii</i> en <i>D. dianthicola</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> forma specialis <i>narcissus</i>

Latente infecties gaan vaak over in zichtbare infecties wanneer de omstandigheden voor de ziekteverwekker (*Dickeya* spp/*Pectobacterium* spp. respectievelijk *Fusarium* spp.) in de keten ineens gunstig zijn. Er wordt daarom verwacht dat kunstmatige toepassing van omstandigheden die gunstig zijn voor de ziekteverwekker juist na het rooien van de bollen de latente infecties activeert waarna binnen korte tijd zichtbaar zieke bollen ontstaan. Een dergelijke toepassing van gunstige omstandigheden om latente infectie versneld zichtbaar te maken, wordt een praktijktoets genoemd.

1.2 Doelstelling

Doelstelling 1: De ontwikkeling van praktijktoetsen voor het aantonen van latente infecties van *Dickeya/Pectobacterium* en *Fusarium*, waarbij met eenvoudige bolbehandelingen (mechanische stress, temperatuur, Relatieve Luchtvochtigheid, RV) en/of eenvoudig toe te dienen chemische of biologische stimuli latente infecties worden geactiveerd tot eenvoudig waar te nemen ziektebeelden. De bolbehandelingen zijn eenvoudig op een teelt- of handelsbedrijf uit te voeren. Er wordt naar gestreefd dat het zichtbaar worden van latente infectie bij hyacint maximaal 5 dagen duurt, en bij tulp maximaal 10 dagen. Omdat er weinig ervaring is de ziekteontwikkeling van *Fusarium* bij narcis, wordt er vooraf geen criterium gesteld voor het termijn van een zichtbare reactie bij narcis. Het streven is om dit zo kort mogelijk te houden, maar in ieder geval inpasbaar in de reguliere planning van teelt en handel. De ontwikkelde praktijktoets geeft een goede indicatie van de aanwezigheid van latente infecties, maar is geen alternatief voor (gevalideerde) laboratoriumtoetsen.

Doelstelling 2: De ontwikkeling van een labtoets voor het aantonen van latente infecties. Via voorweek van bolmateriaal op een optimaal voedingsmedium worden latent aanwezige ziekteverwekkers vermeerderd waarna specifieke detectie van de ziekteverwekker m.b.v. PCR of ELISA plaatsvindt. De ontwikkelde voorweek- en labtoets is (theoretisch) betrouwbaarder dan de praktijktoets op het bedrijf.

1.3 Projectstructuur

Dit project heeft zich gericht op de ontwikkeling van praktijk- en voorweektoetsen voor latente infecties bij drie verschillende bolgewassen. Omdat op voorhand niet duidelijk was of elk van de drie ontwikkelingstrajecten even succesvol zou zijn, is er een projectstructuur aangebracht. Deze projectstructuur voorziet in:

- een budgetverdeling over de drie gewassen:
 - o tulp 40% van het budget
 - o hyacint 40% van het budget
 - o narcis 20% van het budget
- een tussentijdse beoordeling de voortgang
- eventuele vroegtijdige stopzetting van een niet-haalbaar ontwikkelingstraject

Globaal waren de volgende activiteiten voor een vier-jarig ontwikkelingstraject voorzien. In dit schema zijn tevens de Go/No-go beslismomenten aangegeven voor continuering of stopzetting van deelprojecten.

Fase 1 – 2008	<ul style="list-style-type: none">- Verzamelen van zieke partijen- Opzetten voorkweek, en visuele toetsen- Analyse van enkele snot en zuurpartijen
<hr/>	
Fase 1 – 2009	<ul style="list-style-type: none">- Optimaliseren van praktijktoetsen- Optimaliseren van voorkweektoetsen- Validatie met uitziekttoetsen en DNA/ELISA toetsen
<hr/>	
Go/No-go beslismoment	
<hr/>	
Fase 2 – 2010	<ul style="list-style-type: none">- Herhalen van activiteiten 2010- Vaststellen van betrouwbare protocollen
<hr/>	
Go/No-go beslismoment	
<hr/>	
Fase 3 – 2011 & 2012	<ul style="list-style-type: none">- Toepassing van ontwikkelde toetsen op praktijkmateriaal- Validatie met uitzoektoetsen en DNA/ELISA toetsen

In dit rapport worden de onderzoeksactiviteiten en verkregen resultaten van elk van de drie ontwikkelingstrajecten afzonderlijk beschreven. Ontwikkeling van de praktijktoetsen voor 'zuur in tulp' en 'bolrot in narcis' is vanwege het niet kunnen voldoen aan de vooraf gestelde criteria niet gecontinueerd na fase 2.

2 Praktijktoets en labtoetsen voor snot in hyacint

2.1 Inleiding

De belangrijkste groep bacteriën die die een hyacintenbol kunnen laten rotten zijn *Erwinia*s: *Dickeya*-soorten (“agressief snot”) en *Pectobacterium carotovorum subspecies carotovorum* (Pcc): witsnot. *Dickeya* is vanaf ongeveer het jaar 2000 een enorm probleem geworden waarbij de hyacintenbollen in enkele dagen tijd volledig kunnen verrotten (rapport PPO 3232096600/PT11863: Beheersing van *Erwinia* in bolgewassen, 2008).

Pectobacterium is al ruim honderd jaar bekend als veroorzaker van het witsnot. Witsnot kan op het veld voor een zware gewasaantasting zorgen met specifieke symptomen, in tegenstelling tot *Dickeya*-aantasting die qua symptomen niet of nauwelijks in het veld te herkennen zijn. De verrotting van de bol gaat in het geval van *Pectobacterium* wat langzamer en er vindt minder verspreiding plaats tijdens de verwerking in de schuur.

Dickeya lijkt vooral tijdens de verwerking verspreid te worden via versmering van aangetaste bollen en gaat dan tot aantasting over tijdens de bewaring of verpakken van de bollen. De maatregelen om beide te voorkomen of ten minste beperken zijn lastig en moeten vooral in preventie gezocht worden.

Vooraf *Dickeya* leidt jaarlijks tot grote verliezen. Bollen kunnen al bij het rooien zijn aangetast maar worden veelal pas besmet en aangetast tijdens en na de verwerking vanaf het rooien. Ogenscheinlijk gezonde bollen kunnen latent zijn besmet en deze besmetting kan later tijdens de bewaring in enkele dagen tijd leiden tot een volledige verrotting van de bollen. De bollen lopen helemaal leeg, waardoor ook andere bollen worden besmeurd. Dit gaat bovendien gepaard met een enorme stank. Informatie over de verschillende *Dickeya*-soorten, toetsmethoden en beheersing zijn onderzocht binnen de projecten Beheersing van *Erwinia* in bolgewassen (PT 11863), Protocollering van toetsen op *Erwinia* (PT13061) en Pilot toetsing op *Erwinia* in hyacint (PT13771).

Het doel van dit onderdeel van het project “Snelle Toetsontwikkeling” is, om een praktijktoets om *Erwinia* in hyacintenbollen te ontwikkelen. Hiermee moet het mogelijk worden om op de bedrijfslocatie het percentage latente *Erwinia* van een partij hyacinten vast te stellen. Dit geeft de teler, handelaar of exporteur meer inzicht in de partij hyacintenbollen op grond waarvan beslissingen genomen kunnen worden voor vervolghandelingen. Voor het uitvoeren van een dergelijke proef is het noodzakelijk dat

- a. er alleen technieken gebruikt worden die de doelgroep (de hyacintentelers) beschikbaar heeft en
- b. dat de uitvoering van de proef gemakkelijk, goedkoop, snel en betrouwbaar is.

Het principe van deze praktijktoets voor hyacint is gebaseerd op het versneld zichtbaar maken van een eventuele latente infectie van *Erwinia* door de bol zo te behandelen dat de latente infectie eerder uitgroeit zodat de symptomen sneller waargenomen kunnen worden. Voor het opzetten van de praktijktoets zijn de bollen behandeld door deze te beschadigen en warm en vochtig weg te leggen. Dit beschadigen en bewaren is op verschillende wijzen uitgevoerd, uitgaande van mechanische en/of temperatuurstress. Na enkele dagen tot ongeveer 3 weken na deze temperatuur- en mechanische behandeling zijn de percentages aangetaste bollen vastgesteld en vergeleken met het percentages snot in de bollen die op de normale wijze bewaard zijn en vergeleken met PCR toetsen uitgevoerd door PPO en/of door de NAK te Emmeloord (zie paragraaf 1.2: Materiaal en Methoden).

Belangrijk is te weten dat snotbollen door zowel *Dickeya* als door *Pectobacterium* veroorzaakt kan worden. Bij de PCR toets wordt getoetst op aanwezigheid van *Dickeya* en soms ook op *Pectobacterium*. Onderzoek in het project Beheersing van *Erwinia* in bolgewassen (Van Doorn et al. 2008) heeft ten grondslag gelegen aan de verdere optimalisatie van de stresstoets in dit project.

2.2 Materialen en methoden

Er zijn een aantal standaard testen gebruikt, die onder dit hoofdstuk kort worden toegelicht. Tevens is de gang van zaken per onderzoeksjaar (2008-2012) beschreven.

2.2.1 PCR toetsen

Deze DNA-toetsen berusten op de herkenning en vermenigvuldiging van speciale stukjes DNA, uniek voor de *Pectobacterium*-groep waartoe *Pcc* behoort, en *Dickeya*-soorten (Tabel 1). In enkele gevallen zijn voor *Dickeya*-isolaten nog specifiekere PCR-toetsen gebruikt. Deze zijn ontwikkeld door PRI, en kunnen de verschillende soorten *Dickeya* (*D. solani*, *D. dianthicola*, *D. dadantii*, *D. zea*, *D. chrysanthemi*) onderscheiden. Deze zijn binnen dit project niet toegepast, wel de zg. generieke PCR-toets die *Dickeya* als soort kan onderscheiden. De PCR-toets welke *Pcc* kan onderscheiden, herkent ook *Pectobacterium atrosepticum*. Deze *Erwinia* komt echter niet voor in bloembolgewassen. De gebruikte PCRs zijn beschreven in rapport PPO nr.3234053800 (protocollering van toetsen op *Erwinia*, april 2009).

Tabel 1. *Erwinia*-soorten in bloembolgewassen

<i>Erwinia</i>-soort (vroegere benaming)	Huidige benaming	Bijzonderheden	ziekte
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Heel diverse soort, lijkt nu verder uit te splitsen	(oud) Witsnot
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Dickeya</i> spp.:		
	<i>D. dianthicola</i> , <i>D. solani</i> , <i>D. dadantii</i> (<i>D. zea</i> ?)	Vooraf <i>D. solani</i> komt veel voor	"agressief snot"

2.2.2 Toetsing door de NAK.

In 2009 en 2010 is in samenwerking met de Bloembollenkeuringsdienst en NAK onderzocht in hoeverre een door de NAK ontwikkelde toets om *Erwinia*'s in poot aardappelen (Fig. 2) te kunnen aantonen, geschikt is om met name *Dickeya* (agressief snot) in hyacint aan te tonen. Dit is beschreven in het PPO rapport 3234096000 (PT13771: pilot toetsing op *Erwinia* in hyacint). Deze toets berust op een zg. TaqMan PCR die verschillende stukjes gen tegelijkertijd kan meten (Bioplex PCR). Uit dit onderzoek is een protocol afgeleid voor hyacint. Van 200 bollen wordt een klein stukje bolneus en bolbodem (Fig.1) genomen, en tot 20 submonsters bijeengebracht. Na bewerking wordt hier DNA van geïsoleerd en getest in de Bioplex PCR. Van deze 20 uitslagen in totaal wordt het percentage besmetting door *Dickeya* vastgesteld.



Fig. 1. Door agressief snot aangetaste bolbodem.



ONDERZOEK OP AGRESSIEF SNOT IN HYACINT

Telers ondervinden in toenemende mate problemen met Agressief Snot in hyacinten. Agressief Snot wordt in hyacinten veroorzaakt door bacteriën uit de *Dickeya*-groep (voorheen *Erwinia chrysanthemi*). In korte tijd worden de bollen hierdoor zeer ernstig aangetast. Dit levert grote financiële schade op voor de teler en vormt een ernstige bedreiging voor de handel.

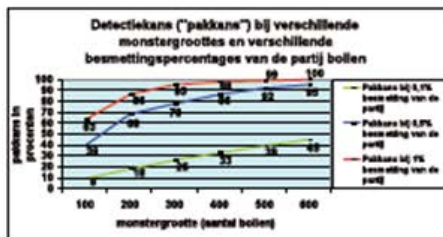
NAK AGRO biedt een onderzoek aan dat alle bekende *Dickeya*-soorten in hyacinten aantoonst en zeer geschikt is om teler, kweker, verpakker en commissionair te helpen bij de besluitvorming over partijen hyacintebollen. Het onderzoek wordt in het bijzonder geadviseerd voorafgaande aan de beslissing om de partij hyacintebollen te gebruiken voor verdere vermeerdering (snijden, hollen). Een andere toepassingsmogelijkheid is de inschatting van risico's met handelspartijen (leeglopers).

Het onderzoek richt zich op het aantonen van Agressief Snot. Het oude witsnot, veroorzaakt door de bacterie *Pectobacterium (Erwinia) carotovorum* subsp. *carotovorum*, wordt niet aangetoond.

Monstergrootte

De betrouwbaarheid van de uitslag is afhankelijk van de gekozen monstergrootte. De 'pakkans' van het onderzoek neemt toe naarmate het monster groter is. De grafiek laat zien dat, bij een monstergrootte van 200 bollen, de kans dat een besmetting van 1% zieke bollen wordt aangetoond, 86% is. Bij een monstergrootte van 400 bollen is die 'pakkans' van een partij met 1% besmette bollen al 98%.

De monstergrootte in dit hyacintenonderzoek wordt, in stappen van 200 bollen, bepaald door de inzender zelf. De minimum monstergrootte is 200 bollen.



Monsters

U kunt zelf een monster insturen naar:

NAK AGRO
t.a.v. monsterontvangst
Randweg 14
8304 AS Emmeloord.

De monsters moeten worden verpakt in papieren zakken. Voor een betrouwbare uitslag is het belangrijk dat er een homogeen monster uit de partij wordt genomen. Indien gewenst, is het ook mogelijk een officieel monster door de Bloembollenkeuringsdienst te laten nemen. Neem hierover contact op met de BKD in Lisse. Onderzoek en uitslagverstrekking vinden altijd plaats door NAK AGRO aan de inzender.

Aanvraag speciale labels

Ten behoeve van dit onderzoek verstrekt NAK AGRO speciale labels. Deze dienen aan het begin van het seizoen te worden aangevraagd bij afdeling monsterontvangst via monsterontvangst@NAKAGRO.nl of tel. +31 (0)527 63 57 84. U kunt dan de rest van het seizoen zoveel monsters inzenden als u zelf wilt.

Kosten

De kosten bedragen € 360,00 per 200 bollen. De administratiekosten per inzending tot vijf monsters bedragen: € 15,90, per monster extra € 0,90. De prijzen zijn exclusief BTW en zijn geldig tot 31 december 2010.

Serviceniveau

Ingezonden monsters worden alleen op donderdag in behandeling genomen. Levert u donderdag voor 08.00 uur bij NAK AGRO aan, dan ontvangt u de volgende donderdag voor 17.00 uur (per e-mail) een uitslag.

Onderzoekuitslag

De uitslag van het onderzoek wordt weergegeven in een percentage van het aantal besmette bollen in het monster. Omdat niet alle bollen individueel getoetst worden, maar in samengevoegde eenheden (clusters) van tien bollen, is het afgegeven uitslagpercentage het meest waarschijnlijke. Dit wordt op het uitslagformulier verder verduidelijkt via een spreidingspercentage rond de uitslag.

01-03-2010

Randweg 14 - Postbus 1115 - 8300 BC Emmeloord
Klantenservice: tel.: 0527 63 54 09 - Fax: 0527 63 54 11
E-mail: klantenservice@nakagro.nl

WWW.NAKAGRO.NL

Fig. 2. Beschrijving van de toets op agressief snot in hyacint door de NAK.

2.2.3 Standaard uitvoering thuistoets

Zoals per jaar beschreven (zie verder) is voor het toedienen van stress een sorteerband met sorteerplaat (Fig.3) gebruikt, een gaasbak (Fig.4) en stoven/cellen op verschillende temperaturen. Fig.3 laat de gebruikte sorteerplaat zien.

Fig. 3. Sorteerband met in plastic verpakte hyacintenbollen
Om onderlinge versmering te voorkomen en voor een extra hoge RV te zorgen



2.2.4 Praktijktoets: uitvoering in 2008

In 2009 zijn verschillende wijzen van mechanische stress vergeleken bij twee temperaturen. Door bollen individueel in te pakken in plastic zakjes is verspreiding via het sorteren voorkomen. Door het verpakken wordt tevens een beter inzicht in de aanwezige latente besmetting verkregen.

Een partij Aiolos waarvan bekend was dat deze besmet was, grootte 16cm, is begin augustus behandeld volgens het hier beschreven protocol:

- De bollen werden individueel ingepakt in een plastic boterhamzakje en 1 of 3 x over 8 sorteerplaten gesorteerd, dan wel 3 x van 1,5 meter hoog op een betonnen vloer gedropt of 10 x in een houten gaasbak stevig heen en weer geschud
- Bollen, niet ingepakt, zijn 3 x over 8 sorteerplaten gesorteerd
- Controle behandeling: niet verwerken, niet inpakken
- Bewaring bij 25 of 30°C

Per behandeling zijn 50 op het oog gezonde bollen gebruikt.

De bollen zijn na 3, 6, 10 en 24 dagen visueel beoordeeld op rotting of leeglopen.

Er is ook een stresstoets uitgevoerd aan 8 partijen plantgoed (bolmaat 12 cm) bestemd voor werkbollen (4 cultivars van twee telers) en aan een besmette controle partij (Aiolos) met twee variabelen:

- a) controle (25°C)
- b) 3 x sorteren over 8 planten van de sorteermachine en bewaring bij 30°C.

Per behandelingen werden 100 bollen gebruikt.

Visuele beoordeling vond plaats na 5 dagen en 2 weken.

2.2.5 Praktijktoets: uitvoering in 2009

In 2009 is onderzocht of met name temperatuurstress mogelijkheden biedt, omdat het individueel inpakken in plastic zakjes tijdrovend is. Verschillende partijen zijn op twee tijdstippen getest op aantasting (Tabel 2): een partij Pink Pearl (19cm) en van één partij Carnegie (14-16 cm) waarvan één helft besmet, zijn getest bij verschillende temperatuurregimes, na wel of niet beschadigen. Hierbij zijn zowel relatief zeer hoge temperaturen toegepast waarvan bekend is dat deze veel stress geven (vergelijk de heetstook tegen geelziek), als combinaties van zeer lage en hoge temperatuur.

Tabel 2. Stressbehandelingen , uitgevoerd op bollen van Pink Pearl en Carnegie in 2009

behandeling	temperatuur						
	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5	dag 6	daarna
start op 24 juli							
controle	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	30°C	30°C
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
bol in plastic, 3x sorteren	38°C	38°C	38°C	38°C	38°C	30°C	30°C
niet verpakken én niet sorteren	20°C	30°C	20°C	30°C	30°C	30°C	30°C
	20°C	34°C	20°C	34°C	30°C	30°C	30°C
	20°C	38°C	20°C	38°C	30°C	30°C	30°C
	30°C	9°C	30°C	9°C	30°C	30°C	30°C
	38°C	9°C	38°C	9°C	30°C	30°C	30°C
1x sorteren, niet verpakt	30°C	20°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
	38°C	9°C	38°C	30°C	30°C	30°C	30°C
start op 19 augustus							
controle	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	30°C	30°C
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
bol in plastic, 3x sorteren	38°C	38°C	38°C	38°C	38°C	30°C	30°C
bol in plastic	38°C	38°C	38°C	38°C	38°C	30°C	30°C
3x sorteren	38°C	38°C	38°C	38°C	38°C	30°C	30°C
niet verpakken en niet sorteren	38°C	38°C	38°C	38°C	38°C	30°C	30°C
niet verpakken en niet sorteren	9°C	9°C	9°C	9°C	38°C	38°C	30°C

Per behandelingen zijn 3 herhalingen á 65 bollen gebruikt. Eventueel aanwezige snotbollen zijn bij de start verwijderd.

2.2.6 Praktijktoets: uitvoering in 2010

Dit jaar werd een aantal van de behandelingen (thuisoetsing via stress en temperatuur) op twee bedrijven uitgevoerd. Omdat op de bedrijven kort na rooien nog geen 30°C-cellen aanwezig zijn, zijn bollen op de bedrijven bij 25°C bewaard, maar ook op PPO bij 30 tot 38°C (Tabel 3). Ter controle werden 200 bollen door de NAK getoetst. Per stressbehandeling werden 200 bollen gebruikt. Bij de start zijn alle snotbollen verwijderd. De gebruikte partijen staan vermeld in Tabel 4.

Tabel 3. Getoetste partijen hyacintenbollen in 2010 bij 2 bedrijven

bedrijf	cultivar	Erwinia verwachting	bolmaat	snot bij klaar maken	start stresstoets
A	Carnegie	verdacht	16 cm	< 0,5%	21 juni
A	Carnegie	verdacht	16 cm	< 0,5%	22 juli
A	Carnegie	gezond	ca 16cm	0%	12 juli
B	Sky Jacket	verdacht	ca 16 cm	0%	28 juli
B	Delft Blue	ziek	ca 16 cm	7%	17 augustus
B	Splendid Cornelia	gezond	ca 17cm	0%	2 juli

Tabel 4. Stressbehandelingen, uitgevoerd in 2010.

4 dagen 25°C + 30°C (controle)
op bedrijf sorteren en bewaren bij 25°C
op bedrijf sorteren en op PPO bewaren bij 30°C
4 dagen 25°C, sorteren en bewaren bij 30°C
4 dagen 25°C, sorteren en bewaren bij 34°C
4 dagen 25°C, sorteren en bewaren bij 38°C *)
4 dagen 30°C, sorteren en bewaren bij 30°C *)

Behandelingen *) niet bij start in 22 juli en 17 augustus

Per behandeling zijn 200 bollen gebruikt en ter controle zijn ook 200 bollen door de NAK getoetst op aanwezigheid van *Dickeya*. Bij sorteren werden de bollen voor sorteren per bol in plastic boterhamzakje verpakt en daarna 3 x over 8 sorteerplaten gesorteerd. Beoordeling vond plaats na 1 week en na 10 dagen.

2.2.7 Praktijktoets: uitvoering in 2011

In 2011 zijn op vier bedrijven thuistoetsen uitgevoerd en ter controle een sorteertoets op PPO uitgevoerd en zijn bollen door de NAK getoetst op aanwezigheid van *Dickeya* (Tabel 5). Als een versimpelde stresstoets is een schudtoets uitgevoerd. Hierbij worden bollen niet ingepakt in plasticzakjes maar stevig heen en weer geschud in een houten gaasbak.

Tabel 5. Behandelingen zoals uitgevoerd in 2011 op hyacintenpartijen.

Behnr.	behandeling
1	controle 25°C
2	sorteertoets op bedrijf
3	schudtoets op bedrijf
4	sorteertoets op PPO
5	monster voor NAK

Bij de sorteer (thuis-) toets zijn 200 bollen in plastic boterhamzakjes verpakt, 3 x over 8 sorteerplaten gesorteerd en bij 25°C bewaard.

Bij de schudtoets (Fig.4) zijn 200 bollen in een houten gaasbak 10x stevig heen en weer geschud en bij 25°C bewaard. Bij grote maten zijn 100 bollen tegelijk geschud, maar bewaring daarna was met 200 bollen per bak.

Beoordeling op rotte bollen vond plaats na 1 week (en ter controle nogmaals na ong.1 week).

In Tabel 6 staan de getoetste partijen vermeld. Aan bedrijven was bewust om gezonde of verdachte partijen gevraagd. Bij de start zijn de snotbollen verwijderd.



Fig. 4. De schudtoets, uitgevoerd met een gaasbak.

Tabel 6. Getoetste partijen hyacintenbollen in 2011

bedrijf	partij	cultivar	maat cm	% snot bij start	startdatum
A	1	Pink Pearl	17/-	0	7 juli
	2	Pink Pearl	17/-	0	
	3	White Pearl	17/-	0	
	4	White Pearl	17/-	0	
B	5	Carnegie	ca 14	0,5	12 juli
	6	Delft blue	ca 15	0	
	7	China Pink	ca 16	0	
C	8	Anna Marie	16	0,2	19 juli
	9	Blue Jacket	17/19	1,5	
	10	Carnegie	16/19	1,5	
D	11	Pink Pearl	ca 17	0,5	15 juli

2.2.8 Praktijktoets uitvoering in 2012

In 2012 lag het accent op de afronding van het project en de toepassing van de thuistoets op kleinere bolmaten.

Door de gaasbak na het sorteren/schudden in plastic te pakken kan meer aantasting verkregen worden door de hogere luchtvochtigheid welke aantasting door *Erwinia* bevordert. Met een aantal partijen hyacintenbollen met een verschillende herkomst en achtergrond zijn verschillende behandelingen uitgevoerd (Tabel 7). De partijen zijn gekozen op basis van informatie van de telers en/of van eerdere vastgestelde besmettingen na stress- of NAK-toetsen. De partijen 1 t/m 6 stonden bij de telers en zijn eerst heetgestookt (standaard behandeling tegen geelziek: 3-4 weken 30°C + 2 weken 38°C + 3 dagen 44°C) en dus pas laat in oktober 2012 getoetst.

Tabel 7. Thuisoets behandelingen, zoals uitgevoerd in 2012 en toegelicht in de legenda

Behandelingen per 200 bollen	1 en 2	3 en 4	5 en 6	7 en 8
geen	x	x	x	x
sorteertoets		x		x
sorteren en bewaring in gaasbak in plastic zak	x			
schudtoets en bewaring in gaasbak	x	x		
schudtoets en bewaring in gaasbak in plastic zak	x	x	x	
NAK - toets	x	x	x	

- Sorteertoets: bollen individueel in een plastic boterhamzakje, 3x sorteren over 8 sorteerplaten en daarna bewaren bij 25-30°C
- Sorteren en bewaren in gaasbak in plastic zak: bollen worden niet apart in plasticzakjes verpakt.
- Schudtoets: bollen 10x flink heen en weer schudden in houten gaasbak. Bij grote maten 100 bollen tegelijk schudden, maar per 200 stuks bij elkaar bewaren.
- NAK-toets 200 bollen door de NAK getoetst middels multiplex PCR op aanwezigheid van *Dickeya*.

2.3 Resultaten

2.3.1 Resultaten thuisoets 2008

Vanaf 3 dagen na de behandeling werden de eerste rotsymptomen gezien (Tabel 7) : veelal lichte snotsymptomen in de neus. Na 6 dagen werden de eerste volledig rotte bollen gezien. Vanaf 10 dagen waren alle bollen volledig rot. Na bewaring bij 30°C verliep de rotting ook sneller en werden meer bollen aangetast dan na bewaring bij 25°C. De meeste rotting trad op na 3 x sorteren. Tussen wel en niet inpakken in plastic zakjes was geen eenduidig verschil op te merken. De val van 1,5 m gaf iets minder rotte bollen dan 3 x sorteren en het schudden gaf net als 1x sorteren wel meer rotting dan de controle, maar veel minder dan de andere behandelingen. Opvallend was, dat alleen bij bewaring bij 25°C er meer aantasting was door het niet inpakken van de bollen.

Tabel 8. Percentage snotbollen in de loop van de tijd (van 3 tot 24 dagen) als gevolg van verschillende wijze van beschadiging en temperatuur, bij besmet partij Aiolos, 16cm, in augustus.

behandeling	bol in plastic zakje	% bollen met Erwinia							
		bewaarduur (dagen) na sorteren bij 25 of 30°C							
		25°C				30°C			
		3 d	6 d	10 d	24 d	3 d	6 d	10 d	24 d
controle	nee	0	0	0	0	0	2	2	2
1x sorteerlijn	ja	0	6	12	12	0	6	6	6
3x sorteerlijn	ja	4	18	22	22	20	34	34	34
3x sorteerlijn	nee	0	28	28	30	8	30	30	32
3x val 1,5m	ja	4	12	16	16	20	22	20	22
10x schudden	ja	0	2	4	4	2	6	6	8

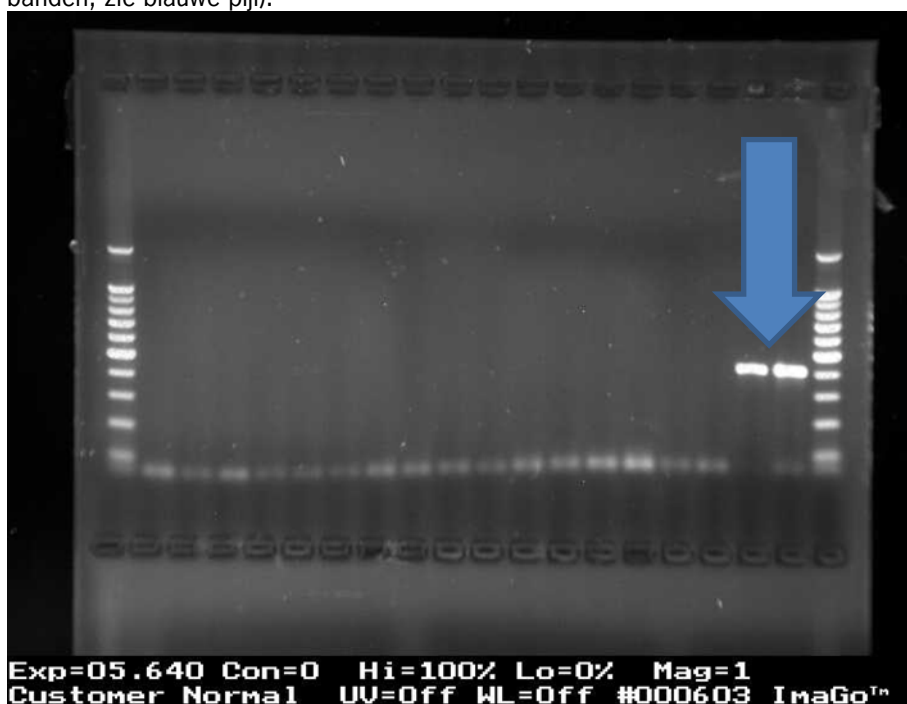
Bij 8 partijen die voor werkbollen waren opgeplant, werd na de stresstoets geen aantasting waargenomen (Tabel 9). Alleen in de besmette controle partij werd weer een zware aantasting geconstateerd.

Tabel 9. Percentage snotbollen bij 9 plantgoed partijen, 12cm, na stresstoets (ingepakt en 3x over 8 sorteerplaten) eind september. Controle: bewaring bij 25°C geen aantasting.

cultivar	teler	% snot
Blue Star	A	0
Delft Blue	A	0
Pink Pearl	A	0
Aiolos	A	0
Pink Pearl	B	0
White Pearl	B	0
Carnegie	B	0
Fondant	B	0
Aiolos	C	20

Van alle partijen werden 2x 5 op het oog gezonde bollen getest met PCR; alleen bij Aiolos werd *Dickeya* vastgesteld (zie pijl in Fig.5).

Fig. 5. PCR-analyse op een gel met hierop zichtbaar twee positieve reacties (*Dickeya* in Aiolos, witte banden, zie blauwe pijl).



2.3.2 Resultaten thuistoets 2009

Bij Carnegie werden alleen rotte bollen gevonden na inpakken, sorteren en gevolgd door 38°C (Tabel 10). Deze lage besmetting was onverwacht omdat van deze cultivar in ander onderzoek gebleken was dat die partij zwaar was besmet (26%). Bij navraag bij de teler bleek dat we nu een ander deel van de partij hadden gehad. Voor de latere test in augustus zijn bollen uit het eerder ontvangen, besmette deel gebruikt. Bij Pink Pearl gaf inpakken en sorteren, en bij 30°C bewaren meer snotbollen dan de controle, maar bewaren bij 38°C gaf een zeer sterke toename. Zonder inpakken en sorteren gaf stress door zeer hoge of afwisselend hoge en lage temperatuur geen toename van de aantasting te zien. De aantasting was na 4 dagen te zien, maar het percentage nam soms nog toe na langer wachten met het beoordelen.

Tabel 10. Percentage snotbollen als gevolg van stress door verschillende combinaties van beschadigen en temperatuur bij Carnegie 14-16cm en Pink Pearl 19cm, op 24 juli 2009.

Carnegie 1		gemid % snotbollen		totaal % na
behandeling 24/7	temperatuurbehandeling	4 dagen	12 dagen	12 dagen
controle	5d 25°C + 30°C	0	0	0
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	0	0	0
bol in plastic, 3x sorteren	5d38°C + 30°C	2.0	0.5	2.5
niet verpakken en niet meer sorteren	4d 20/30/20/30°C + 30°C	0	0	0
	4d 20/34/20/34°C + 30°C	0	0	0
	4d 20/38/20/38°C + 30°C	0	0	0
	4d 30/9/30/9°C + 30°C	0	0	0
1x sorteren, niet verpakt	3d 30/20/30°C +30°C	0	0	0
	3d 30/9/30°C +30°C	0	0	0
Pink Pearl 1				
behandeling 24/7	temperatuurbehandeling	4 dagen	12 dagen	12 dagen
controle	5d 25°C + 30°C	1.5	0	1.5
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	2.0	2	4.0
bol in plastic, 3x sorteren	5d38°C + 30°C	15.0	18	33.0
niet verpakken én niet sorteren	4d 20/30/20/30°C + 30°C	0	0	0
	4d 20/34/20/34°C + 30°C	1.5	0	1.5
	4d 20/38/20/38°C + 30°C	1.0	0	1.0
	4d 30/9/30/9°C + 30°C	0	0	0
1x sorteren, niet verpakt	3d 30/20/30°C +30°C	0	0	0
	3d 30/9/30°C +30°C	0	0	0

Bij de uitvoering van de toets in augustus met het besmette deel van de partij Carnegie bleek, dat dit ook duidelijk besmet was (Tabel 11). De partij Pink Pearl gaf in augustus hogere aantallen rotte bollen dan in juli. Bij beide cultivars gaf inpakken, 3x sorteren en bewaring bij 38°C de meeste rotte bollen. Zonder inpakken met hoge temperatuur gaven ongeveer eenzelfde percentage als ingepakt 3x sorteren en bewaring bij 30°C. De andere behandelingen gaven weinig of geen rotte bollen en gaven daarmee niet goed aan wat er aan latente besmetting in zit. Ook nu bleek dat na 4 dagen te zien was in welke behandelingen rotting optrad, maar er was langer nodig om het totale percentage goed te kunnen zien.

Tabel 11. Percentage snotbollen als gevolg van stress door verschillende combinaties van beschadigen en temperatuur bij Carnegie 14-16cm en Pink Pearl 19cm, op 19 of 20 augustus.

Carnegie 2		gemid % snotbollen		totaal % na
behandeling 20/8	temperatuurbehandeling	6 dagen	13 dagen	13 dagen
controle	5d 25°C + 30°C	0	0	0
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	9.7	0.5	10.3
bol in plastic, 3x sorteren	5d38°C + 30°C	22.6	15.9	38.5
bol in plastic	5d38°C + 30°C	1.0	0.5	1.5
3x sorteren	5d38°C + 30°C	7.2	6.7	13.8
niet verpakken en sorteren	5d38°C + 30°C	0.5	0	0.5
niet verpakken en sorteren	4d9°C + 2d38°C + 30°C	0	0	0
Pink Pearl 1				
behandeling 19/8	temperatuurbehandeling	6 dagen	13 dagen	13 dagen
controle	5d 25°C + 30°C	0	0.0	0
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	2.6	4.6	7.2
bol in plastic, 3x sorteren	5d38°C + 30°C	46.7	18.5	65.1
bol in plastic	5d38°C + 30°C	1.0	0.0	1.0
3x sorteren	5d38°C + 30°C	2.1	5.6	7.7
niet verpakken en niet sorteren	5d38°C + 30°C	0	0.0	0
niet verpakken en niet sorteren	4d9°C + 2d38°C + 30°C	0	0.0	0

Bij rotte bollen was niet altijd duidelijk te zien of het wel veroorzaakt is door *Erwinia* danwel door welke *Erwinia* (*Dickeya* of *Pcc*) Bij sommige bollen die na bewaring bij 38°C gingen rotten werd geen *Erwinia* aangetoond (Tabel 11). Ook trad er aantasting op door *Aspergillus niger* ("roet") en een bepaalde vorm van

glazigheid. Als deze vormen van uitval herkenbaar waren is dat niet in de berekening meegenomen. Mogelijk is, dat hier een andere bacterie een rol speelde ("glazigheid") of een fysiologische reactie. Als *Erwinia* rot niet goed te onderscheiden is van bijvoorbeeld glazigheid kan bij toepassing van een hoge temperatuur *Erwinia* onterecht als oorzaak gezien worden.

Tabel 12. PCR toets op aantal rotte bollen van stresstoets 19 of 20 augustus. Een '+' betekent een positieve herkenning in PCR.

behandeling	temperatuurbehandeling	bolnr	Dickeya	Pectobacterium
Carnegie 2				
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	1	+	+
bol in plastic, 3x sorteren	5d38°C + 30°C	1	-	+
		2	-	+
		3	-	+
bol in plastic	5d 38°C	1	+	+
3x sorteren	5d38°C + 30°C	1	+	-
		2	+	-
		3	+	-
Pink Pearl 1				
bol in plastic, 3x sorteren	30°C	1	+	+
		2	+	-
bol in plastic, 3x sorteren	5d38°C + 30°C	1	+	+
		2	-	-
3x sorteren	5d38°C + 30°C	1	-	-
		2	-	-
		3	-	+

2.3.3 Resultaten thuistoets 2010

Bij beoordeling bleek dat er na behandeling zoals beschreven in Tabel 4 een week alleen nog veel rotte bollen bijkwamen bij de behandelingen met 38°C. Er was er geen duidelijk verschil tussen de behandelingen op de bedrijven A en B of bij PPO en ook niet tussen bewaring bij 25, 30 en 34°C. In Tabel 13 zijn die resultaten dan ook niet meer weergegeven en is alleen een onderscheid gemaakt tussen alle behandelingen zonder en behandelingen met 38°C. Bewaring bij 38°C veroorzaakte veel rotverschijnselen dat niet veroorzaakt werd door *Erwinia*. Bij Sky Jacket was dit zo ernstig dat alle bollen deze zg. verstokingverschijnselen te zien gaven. Bewaring bij 38°C is daarom minder of niet geschikt als stressbehandeling om een latente besmetting vast te stellen.

De uitslagen van de NAK en de gemiddelden van de stresstesten kwamen goed overeen. Tussen de verwachting van de teler voor het rooien (toen de afspraken voor het gebruik van de toetsen op de bedrijven werden gemaakt) en de uiteindelijk gebruikte bollen en de uitslagen van de stresstoetsen zitten kleine verschillen. De verschillen tussen de verdachte en gezonde partij Carnegie waren klein, maar wel volgens de verwachting. De partij een maand later toetsen gaf bij de NAK een gelijk beeld, maar in de stresstoets was de aantasting iets lager. De partij Sky Jacket bleek gezonder dan verwacht en is voor de tweede datum omgeruild voor een besmette partij (Delft Blue) die ook duidelijk als besmet uit de toetsen kwam. De volgens verwachting gezonde partijen Carnegie en Splendid Cornelia bleken beide uit de NAK-toets toch een lichte besmetting met *Dickeya* te hebben. Ook in de stresstoets werd een lichte aantasting gevonden. Dit bewijst, dat ogenschijnlijk symptoomvrije partijen toch (mogelijk slechts een gering percentage) latent zieke bollen kunnen bevatten.

Tabel 13. Percentage snotbollen als gevolg van stress door verschillende combinaties van beschadigen en temperatuur behandelingen bij diverse partijen en op verschillende data.

Cultivar	Besmettingsvewachting	snot bij klaar maken	datum stresstoets	NAK-toets % Dickeya	% snotbollen			
					controle	stressbehandelingen		38°C
						excl. 38°C gemiddeld	variatie in %	
Carnegie	verdacht	< 0,5%	21 juni	1	0	2	0.5 - 3	46
Carnegie	verdacht	< 0,5%	22 juli	1	0	0.5	0 - 1	nvt
Carnegie	gezond	0%	12 juli	0.5	0	0.5	0 - 2	45
Sky Jacket	verdacht	0%	28 juli	0	0	0	0	verstookt
Delft Blue	ziek	7%	17 augustus	100	7	31.5	23 - 36	nvt
Splendid Cornelia	gezond	0%	2 juli	0.5	0.5	0.7	0 - 1.5	45

2.3.4 Resultaten thuistoets 2011

Na 1 week was de rotting van de bollen goed te beoordelen na behandeling zoals aangegeven in Tabel 5. Bij bedrijf A werd in geen van de vier partijen een besmetting gevonden (Tabel 14).

Bij bedrijf B werd slechts 1 snotbol gevonden na de stressbehandelingen. De NAK-toets toonde geen *Dickeya* aan en die ene snotbol werd op PPO onderzocht met PCR en daaruit bleek het *Pectobacterium* (witsnot) te zijn.

Bedrijf C was gevraagd om verdachte partijen te laten toetsen en dat bleek er bij de toetsen ook uit te komen. De percentages van partij 8 tussen de stresstoetsen en de NAK komen goed overeen. Bij partij 9 is de uitslag van de schudtoets duidelijk later dan die van de sorteertoetsen en die van de NAK. Bij partij 10 geeft de schudtoets een iets lager % dan de sorteertoetsen, maar opvallend is dat er bij de NAK niets gevonden wordt. In de rotte bollen is op PPO wel *Dickeya* aangetoond.

Van bedrijf D was bekend dat er in een deel van een partij een besmetting met *Dickeya* was gevonden en bollen van dat deel van de partij zijn in dit onderzoek gebruikt. Ook nu weer werd de besmetting in de op het oog gezonde bollen, zowel door de stresstoetsen als door de NAK gevonden in een percentage dat de tussen de 1 (schudtoets weer het laagste percentage) en 2,5% in lag.

Tabel 14. Resultaten van stresstoetsen en de NAK-toets bij een aantal partijen op verschillende bedrijven in 2011.

Bedrijf	controle	sorteertoets		schudtoets met gaasbak	NAK DNA toets	% snot bij start
		op bedrijf	op PPO			
Bedrijf A						
partij 1	0	0	0	0	0	0
partij 2	0	0	0	0	0	0
partij 3	0	0	0	0	0	0
partij 4	0	0	0	0	0	0
Bedrijf B						
partij 5	0	0	0	0	0	0,5
partij 6	0	0	0	0	0	0
partij 7	0	0	1	0	0	0
Bedrijf C						
partij 8	0	4	3.5	2.5	3	0,2
partij 9	2	21	26	5.5	20	1,5
partij 10	0	3	1.5	0.5	0	1,5
Bedrijf D						
partij 11	0	2	2.5	1	1.5	besmet

Pcc op PPO aangetoond
Dickeya op PPO aangetoond
Dickeya door NAK niet aangetoond
Dickeya door NAK wel aangetoond

2.3.5 Resultaten thuistoets 2012

Gebleken is dat de stresstoetsen goed werken bij grote bolmaten. De vraag is of de stresstoets ook bij kleine maten werkt. De schudtoets is makkelijker en kost veel minder tijd omdat de bollen niet individueel verpakt worden in plasticzakjes (Tabel 7). De gevoeligheid is echter minder én er kan een besmetting optreden via versmering waardoor de aanwezige latente besmetting minder nauwkeurig wordt weergegeven. Mogelijk is ook dat de rotting minder is doordat de bollen in de gaasbak sneller drogen en de omstandigheden daardoor minder gunstig zijn om een aantasting te krijgen.

Bij de beoordeling bleek dat er helemaal geen rotting van bollen was opgetreden, ook niet na langer wachten dan 10-14 dagen. Bij het toetsen van de partijen door de NAK bleek dat alleen bij één van de pluiscapsoorten White Pearl een 0,5% besmetting met *Dickeya* werd gevonden.

Hierdoor kan geen uitspraak gedaan worden over het wel of niet goed kunnen toetsen van kleine maten, door de bestaande of een aangepaste stresstoets. Het is ook niet duidelijk geworden of de schudtoets verbeterd kan worden door de bollen in plastic te bewaren, waardoor het langer vochtig blijft. Wel is waargenomen dat de bollen vochtig werden als gevolg van het inpakken omdat er op de in plastic bewaarde bollen na verloop van tijd schimmelvorming optrad.

Deze uitslag met vrijwel geen rotting door *Erwinia* was onverwacht, omdat eerdere uitslagen of de historie van de partijen wel (en soms veel) besmetting hadden laten zien. Bij de partijen 10 en 11 was op het veld veel witsnot te zien (*Pectobacterium*) en is een groot deel van de partij in de schuur na het rooien wegge gevallen. Blijkbaar zijn de overgebleven bollen gezond. Partij 3 met 7,5% besmetting in juli werd nu ook als gezond getoetst. Deze resultaten zijn moeilijk te verklaren.

2.4 Discussie

Bij hyacint blijkt uit de behaalde onderzoeksresultaten het mogelijk op het bedrijf van een partij hyacinten in ongeveer een week tijd een goed beeld te krijgen van de latente besmetting met *Erwinia*. De beste methode is het inpakken van 200 bollen in een plastic boterhamzakje en de bollen 3 x te sorteren en daarna weg te zetten bij 25 -30°C en na ca 1 week te beoordelen hoeveel rotte bollen er in de zakjes zitten. De vermoedelijk beste periode is juli en augustus.

De kosten blijven beperkt tot ca. 2,5 uur arbeid (monster nemen, inpakken, sorteren, bewaren en nakijken), 200 bollen en €0,60 voor de 200 plastic boterhamzakjes. Het inpakken neemt ca. de helft van de tijd in en het beoordelen gaat erg snel. Het is ook schoon werk omdat de rotting in de zakjes blijft.

Bij de samenwerking met de bedrijven is wel duidelijk geworden dat het voor de bedrijven in die tijd erg druk is en daarom lastig is in te passen. Er moet een man voor vrij gemaakt worden en er moet een sorteermachine beschikbaar zijn. Bedrijven die aangaven dat het nuttig was en het overwogen te gaan doen, bleken het achteraf toch te zijn vergeten.

De stresstoets geeft een goed beeld van wat er aan latente besmetting in het monster zit. Als de bollen goed verdeeld over de hele partij zijn genomen kan het ook een goed beeld geven van de partij. Hierbij moet wel worden bedacht dat de grootte van het monster ten opzichte van de partijgrootte bepalend is voor de betrouwbaarheid van de uitslag van het monster. Als er maar een laag percentage in de partij zit is de pakkans voor een monster van 200 bollen gering en zal een laag % dus niet altijd aanwezig zijn in het monster

Ter illustratie het volgende voorbeeld: Een bollenbewaarcel met stapels gaasbakken met 200 bollen, waarin per bak 1 leegloper te zien is, betekent dit een aantasting van 0,5%. Als je echter door een aantal stapels heen kijkt en je ziet één druiper per bak zie je overal druipeers en lijkt het een enorme besmetting terwijl het "maar" 0,5% is.

Bijkomend probleem voor het bemonsteren is dat, ook gedurende dit onderzoek, regelmatig gebleken dat de besmetting niet egaal door de partij zit.

Bij de NAK-toets geeft bij 200 bollen een kans van 99,9 % om 5% aan te tonen, 85% om 1% aan te tonen en 68% om 0,5% aan te tonen. Bij 300 bollen zou je de betrouwbaarheid verder verbeteren, namelijk respectievelijk op 100, 95 en 78%.

De stresstoets maakt geen onderscheid tussen agressief snot en witsnot. Als je specifiek wilt weten of er agressief snot in de partij zit is een toets door de NAK een goed alternatief. Deze geeft een uitslag op aanwezigheid van *Dickeya* (agressief snot) en dan mis je de eventuele latente besmetting van *Pectobacterium* (witsnot). De NAK-kosten zijn ca €365. De toets duurt een week.

De eenvoudiger uit te voeren schudtoets was minder gevoelig en de rotting verloopt minder snel, maar kan ook een goede indicatie geven dat de partij besmet is. De benodigde tijd is ongeveer 1 uur (monster nemen, schudden, bewaren en nakijken).

Er is ook een kans dat in sommige gevallen een andere bacteriesoort verantwoordelijk is voor rot. Dit is uit eerder onderzoek gebleken: *Pseudomonas* of *Bacillus* zijn bacteriesoorten die ook celwand afbrekende enzymen produceren. Extra toetsen om dit te controleren zijn niet uitgevoerd.

In dit onderzoek werd verwacht dat een hogere temperatuur voor de ontwikkeling van vooral agressief snot gunstig zou zijn. Gebleken is dat bewaring bij 25°C niet veel onderdoet voor 30°C of 34°C. Bewaring bij 38°C veroorzaakte te veel "heetstookschade" en was niet bruikbaar evenals afwisselend lage en hoge temperatuur. Dit is een eenvoudiger methode dan de mechanische stress maar nadeel is dat deze temperaturen in juli augustus lang niet op alle teelt- en exportbedrijven beschikbaar zijn.

Opvallend waren de resultaten in het laatste jaar dat er bij toetsing in oktober en voor plantgoed na de heetstook vrijwel geen besmetting kon worden aangetoond. Zowel de NAK-toets als de mechanische stresstoetsen gaven geen besmetting terwijl er voldoende redenen waren dat een aantal partijen wel besmet waren. Is door uitdroging van bolrokken ook besmetting verdwenen of is de besmetting op een zeer laag niveau gekomen en kon die daarom niet meer worden aangetoond door de NAK-toets of geactiveerd door de stresstoets? Feit is dat het sorteren van besmette hyacinten kort na rooien veel meer verspreiding en aantasting veroorzaakt, dan sorteren na lang bewaren en heetstoken. Of dit veroorzaakt wordt door de lagere besmettingsdruk, als gevolg van lang bewaren en/of door de mindere beschadiging die optreedt, waarbij ook veel minder celvocht vrijkomt, is niet bekend. Ook bij *Zantedeschia* en aardappel worden na lang bewaren minder bacteriën aangetoond.

In het project "Aanzet keuring *Dickeya* werkbollen Delft Blue" zijn een aantal partijen plantgoed die voor werkbollenteelt bestemd waren, eind september na de heetstook met de NAK-toets getoetst en daarbij werd in 30% van de partijen een besmetting met *Dickeya* aangetoond. Of de gevonden latente besmetting ook leidt tot leeglopende bollen is geheel afhankelijk van hoe met de bollen wordt omgegaan. Als je van de bollen afblijft of de bollen verwerkt onder voor *Erwinia* ongunstige omstandigheden kan de besmetting latent en de bol gezond blijven.

Helaas is nu het laatste jaar geen duidelijkheid verkregen of de stresstoets ook voor kleine maten geschikt is en of de schudtoets door vochtiger bewaring verbeterd kan worden. Vooralsnog mag worden aangenomen dat als de bollen na het schudden warm en vochtig weeg gezet worden de resultaten eerder beter dan slechter zullen worden.

Aanbevelingen voor verder onderzoek:

- Nagaan of de stresstoetsen ook werken op kleine maten (onder 12cm)
- Kan de schudtoets verbeterd worden door vochtiger te bewaren?
- Werken de toetsen (stress en NAK) ook voldoende aan het eind van de bewaring en na de heetstook?
- Is de latente besmetting aan het eind van de bewaring veel lager en daardoor niet aan te tonen of zelfs weg?
- Als de besmetting lager is aan het eind van de bewaring, is de kans op aantasting in het volgende jaar dan ook kleiner of is het besmetting niveau onder andere omstandigheden weer snel op een hoog niveau terug?
- Welke andere bacteriesoorten zijn nu aanwezig in rot-symptomen, naast *erwinia's*, en wat is hun rol (kunnen zij de aanwezigheid van *erwinia's* maskeren?).
- Zijn er alternatieve toetsen mogelijk, zoals toepassing van een vacuüm methode?

2.5 Conclusies thuistoets hyacint

- Een latente besmetting met *Erwinia (Dickeya)* – agressief snot en *Pectobacterium* – witsnot kan op het bedrijf in een week tijd goed zichtbaar gemaakt worden door het uitvoeren van een thuistoets, die gebruik maakt van mechanische stress door sorteren van in plastic zakjes verpakte bollen (zie protocol).
- De thuistoets moet bij voorkeur tussen juni en september worden uitgevoerd. Er zijn aanwijzingen dat de toets niet werkt bij lang bewaard en/of heetgestookt bolmateriaal in september/oktober.
- Een eenvoudiger uit te voeren thuistoets is de schudtoets (zie protocol), maar deze is minder gevoelig, langzamer in symptoomontwikkeling en hierbij kan ook nog een nieuwe besmetting zijn optreden.
- Alternatief voor de thuistoets is de NAK-toets (PCR), maar waar de thuistoets geen onderscheid maakt tussen agressief snot en witsnot, toont de NAK-toets alleen agressief snot aan.
- Laat bij twijfel over de oorzaak (witsnot of agressief snot) snotbollen toetsen op *Dickeya*

2.5.1 Protocol sorteerthuistoets

- **Neem een monster van 200 op het oog gezonde bollen, goed verdeeld over de hele partij**
- **De bollen worden per bol in een plastic boterhamzakje verpakt (knijp de lucht eruit bij dichtknopen en knoop dicht bij de bol)**
- **De bollen worden 3x gesorteerd over 8 sorteerplaten, met een kleinere maat dan de bollen, en telkens opgevangen in een houten gaasbak**
- **Na het sorteren de gaasbak met bollen bewaren bij 25-30°C**
- **Na 6-10 dagen de bollen beoordelen op rotting, door te kijken en te knijpen door de zakjes heen. De bollen eventueel na een week nogmaals beoordelen**
- **Het % rotte bollen geeft een maat voor de aanwezige latente besmetting met agressief snot én witsnot**
- **Laat bij twijfel over de oorzaak (witsnot of agressief snot) snotbollen toetsen op *Dickeya***

Kosten : ca 2,5 uur arbeid, 200 bollen en € 0,60 aan boterhamzakjes

2.5.2 Protocol schudthuistoets

(eenvoudiger maar minder goed dan de sorteertoets)

- Neem een monster van 200 op het oog gezonde bollen, goed verdeeld over de hele partij
- De bollen worden in een houten gaasbak 10 x stevig heen en weer geschud. Bij grote bollen 100 bollen per bak schudden
- De bollen per 200 stuks in de houten gaasbak bewaren bij 25-30°C
- De bak eventueel in een grote plastic zak verpakken
- Na 7-10 dagen de bollen beoordelen op rotting, door te kijken en te knijpen. Als ze in een plastic zak zitten de zak open maken. De bollen eventueel na een week nogmaals beoordelen
- Het % rotte bollen geeft een maat voor de aanwezige latente besmetting met agressief snot én witsnot

Kosten: ca. 1 uur arbeid + 200 bollen

2.5.3 Protocol NAK-toets

(alleen agressief snot)

- Neem vooraf contact op met de NAK te Emmeloord ivm. de aanvraag van labels om de monsters te kunnen traceren, kosten (mogelijk minimum aantal monsters), aanleverdatum, uitslagdatum en transport

- Neem een monster van 200 op het oog gezonde bollen, goed verdeeld over de hele partij
- Verpak ze in een doos of zak met luchtgaten en label deze
- Transport naar Emmeloord
- Uitslag na ca. 1 week (afhankelijk van gemaakte afspraak)

2.6 Output

2.6.1 Vakbladartikelen

- Bedrijfspraktijktoets op *Erwinia* in hyacint: geef de bol stress!
BloembollenVisie 164 (2009), p 22-23
Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Robert Dees, Wendy Martin, Paul van Leeuwen en Andre Korsuize
- Toets thuis hyacintenbollen op *Erwinia*: sorteren en warm bewaren
BloembollenVisie 192 (2010), p 24-25
Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Robert Dees, Wendy Martin, Andre Korsuize, Maarten de Kock
- Thuisoets agressief snot bij hyacint: klaar voor algemeen gebruik
BloembollenVisie 223 (2011) p18-19
Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Andre Korsuize, Robert Dees, Wendy Martin

2.6.2 Lezingen, posters en Open Dagen

Peter Vreeburg:
2008

8 januari Anthos: Bolrot, *Erwinia* en zuur
8 februari Kennisdag PPO: zuur, snot en bolrot in de keten
16 januari Studiegroep Bollenstreek Noord: Snot en bolrot
19 februari Schuurbazen van exportbedrijven De Zuid: *Erwinia*
8 mei hyacint Studiegroep De Zuid: *Erwinia*
15 december Studiegroep T&P de Zuid: o.a. *Erwinia*

2009

13 februari Kennisdag broei PPO
23 maart Ledenvergadering KAVB hyacint Keukenhof: o.a. *Erwinia*
16 april Studiegroep hyacint De Zuid: o.a. *Erwinia*

2010

12 februari Kennisdag PPO
22 maart Ledenvergadering KAVB hyacint Keukenhof: o.a. *Erwinia*

2011

11 februari Kennisdag PPO
24 maart Studiegroep De Zuid Hyacint: o.a. *Erwinia*
28 maart Ledenvergadering KAVB hyacint Keukenhof: o.a. *Erwinia*
1 april Ontbijtsessie HOBACHO op Keukenhof: *Erwinia* in hyacint

2012

10 februari Kennisdag PPO
22 maart Studieclub hyacint PPO Lisse o.a. *Erwinia*
26 maart KAVB jaarvergadering productgroep Hyacint: o.a. *Erwinia*

2 april Studiegroep T&P o.a. Erwinia
27 april Ontbijtsessie HOBAHO: Erwinia
15 mei Open dag PPO: o.a. Erwinia hyacint

Lezingen en begeleidingscommissies
Joop van Doorn:

2008
Begeleidingscommissie Deltaplan Erwinia (7 april 2008)

2009
Begeleidingscommissie Deltaplan Erwinia (febr. 2009)
Begeleidingscommissie toetsen snot, rot en bolrot (1/12/2009)

2010
Begeleidingscommissie Deltaplan Erwinia (febr. 2010)
Begeleidingscommissie Snelle toetsen rot, snot en bolrot (jan.2010)
Overleg Deltaplan C aardappelsector: HZPC (11 okt.2010)

2011
Begeleidingscommissie Deltaplan Erwinia (11 febr.2011)
Begeleidingscommissie Snelle toetsen rot, snot en bolrot (27-1-2011)
Bijeenkomst potato research Emmeloord 10-11 nov. 2010: Erwinia problems in hyacint bulbs

2012
Begeleidingscommissie Snelle toetsen rot, snot en bolrot (23-1-2012)
Deltaplan Erwinia (9 mei 2012)
Begeleidingscommissie en onderzoekscommissie Deltaplan Erwinia aardappelsector
(12 december 2012)

2.7 Literatuur

Pilot toetsing op Erwinia in hyacint: evaluatie van toetsing op agressief snot bij de NAK. Joop van Doorn, Peter Vreeburg en Wendy Marin. 2010. PPO 3234096000/PT nr. 13771

Protocollering van toetsen op Erwinia: PCR- en ELISA toetsontwikkeling op Erwinia chrysanthemi (Dickeya spp.) en Erwinia carotovora subsp. carotovora (Pectobacterium) in hyacint, Dahlia, Zantedeschia, iris en Muscari. 2009. Robert Dees, Wendy Martin en Joop van Doorn. PPO nr. 3234053800/PT nr.13061

Beheersing van Erwinia in bolgewassen: agressief snot en witsnot in hyacint, Zantedeschia, Dahlia en andere bolgewassen. 2008. Joop van Doorn, Peter Vreeburg en Paul van Leeuwen. PPO rapport 3232096600/PT 11863).

3 Praktijktoets en labtoetsen voor Zuur in tulp

3.1 Introductie

Met een praktijktoets voor zuur is het mogelijk om op de bedrijfslocatie het percentage zuur van een partij tulpen vast te stellen. Dit geeft de teler, handelaar of exporteur meer inzicht in de partij waarop vervolg handelingen/beslissingen genomen kunnen worden. Voor het uitvoeren van een dergelijke proef is het noodzakelijk dat er alleen middelen gebruikt worden die de doelgroep beschikbaar heeft. Daarnaast is het belangrijk dat de uitvoering van de proef gemakkelijk, goedkoop, snel en betrouwbaar is.

In 2009 en in 2010 zijn proeven uitgevoerd met de bedoeling een protocol te ontwikkelen voor een praktijktoets zuur in tulp. Met een praktijktoets wordt bedoeld de bollen op een dusdanige wijze te behandelen en te bewaren dat versneld een indruk kan worden verkregen van de aanwezige besmetting (sporen) en latente infectie in een partij.

Het eerste jaar (2009) waren de proeven erop gericht om te achterhalen of en in welke mate bollen in een stresssituatie moeten worden gebracht om latent zuur op te wekken. Het aanbrengen van beschadigen en blootstelling aan ethyleen zijn factoren die daarbij gevarieerd zijn. Voor het opwekken werden de bollen daarna vochtig opgeslagen bij verschillende temperaturen gedurende korte en langere tijd.

In het tweede jaar van onderzoek (2010) werd een voorlopig protocol voor een praktijktoets voor zuur in tulp uitgetest op een aantal praktijkpartijen.

In 2009 is er een PCR-toets ontwikkeld voor de specifieke detectie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae* (Fot) en *narcissii* (Fon) (H.4). Diverse partijen die in 2009 en 2010 gebruikt zijn voor de ontwikkeling van de praktijktoets, zijn tevens gebruikt voor analyse met de PCR-toets.

3.2 Materiaal en methode van de praktijktoets

3.2.1 2009 - eerste proef

Uitvoering:

Als uitgangspunt werd een zuurvrije partij tulpen gebruikt (cultivar 'Leen van der Mark'). Deze werd direct na het rooien (half juli) gedroogd en gepeld en vervolgens kunstmatig besmet en latent zuur gemaakt. De besmetting van de bollen en het latent zuur maken verliep volgens een gangbare en bewezen functionele werkwijze met een mengsel van drie *Fusarium* isolaten. De schimmelsporen waren afkomstig van een schimmelkweek in vloeibaar medium van drie goed gekarakteriseerde isolaten, variërend in mate van agressiviteit.

Begin september werden de latent geïnfecteerde bollen beschadigd en/of met ethyleen behandeld om een stressreactie te creëren, waardoor latent zuur sneller kan worden opgewekt. Het beschadigen gebeurde door de bollen een aantal keer te laten vallen van een hoogte van 1 meter op een harde ondergrond. De behandeling met ethyleen bestond uit een blootstelling van de bollen gedurende 48 uur aan een ethyleenconcentratie van 10 ppm.

Na de voorbehandeling (beschadigen en/of ethyleenblootstelling) werden de kisten met bollen op stapels ingepakt in plastic, waarbij vochtige doeken mee werden ingepakt (niet in contact met de bollen). Hierdoor ontstond een stapeling bollen met hoge luchtvochtigheid, waarbij latent zuur kan worden opgewekt tot een zichtbare zuuraantasting (incubatie). De bollen bleven bij 20° of bij 25°C bij hoge relatieve vochtigheid, gedurende 2, 4 of 6 dagen staan, waarna ze werden beoordeeld op zuur.

Waarnemingen:

Van de bollen werd het percentage zuur vastgesteld op 3 momenten: op de dag van uithalen (na 2, 4 of 6 dagen incuberen) en na 10 en 20 dagen.

Tabel 1. Behandelschema bij de eerste proef in 2009; stressfactoren en incubatieomstandigheden.

Stressfactoren		Conditie om zuur op te wekken (incubatie)	
Ethyleen blootstelling	Beschadiging	Temperatuur	Tijdsduur
+	+	25 °C	2, 4 of 6 dagen
+	+	20 °C	2, 4 of 6 dagen
+	-	25 °C	2, 4 of 6 dagen
+	-	20 °C	2, 4 of 6 dagen
-	+	25 °C	2, 4 of 6 dagen
-	+	20 °C	2, 4 of 6 dagen
-	-	25 °C	2, 4 of 6 dagen
-	-	20 °C	2, 4 of 6 dagen

3.2.2 2009 - tweede proef

Uit de praktijk werden 2 partijtjes bollen gekocht waarin volgens de leverancier steeds maar weer nieuw zuur ontstond. Het ging om de cultivars Dynasty en Strong Gold.

Van elke cultivar werden op 2 november 1000 bollen uitgezocht op zuur. De partij werd verdeeld in porties van 100 bollen. Een deel van de bollen werd ontsmet in Formaline en weer gedroogd. Alle bollen werden daarna beschadigd en de helft van de ontsmette plus de helft van de niet ontsmette bollen werd blootgesteld aan ethyleen (24 uur, 10 ppm).

De ontsmetting met formaline had als doel de aanwezige uitwendige sporen te doden, zodat alleen latent zuur kon worden opgewekt en er geen nieuwe infecties konden ontstaan. Bij het uitzielen kan dan aan de hand van de niet uitwendig ontsmette bollen worden bepaald wanneer er sprake is van zuur door nieuwe infecties. De toegepaste combinaties staan in Tabel 2.

Tabel 2. Behandelingsschema bij de tweede proef in 2009; praktijkpartijen

Nr.	Cultivar	Ontsmet	Beschadiging	ethyleen
1	Dynasty	Formaline	Ja	ja
2	Dynasty	Formaline	Ja	nee
3	Dynasty	geen	Ja	ja
4	Dynasty	geen	Ja	nee
5	Strong Gold	Formaline	Ja	ja
6	Strong Gold	Formaline	Ja	nee
7	Strong Gold	geen	Ja	ja
8	Strong Gold	geen	Ja	nee

De bollen werden geïncubeerd door ze vochtig (95 tot 100% RV) bij 25 °C op te slaan in een klimaatkast. De bollen werden tot 10 dagen daarna beoordeeld op zuur.

3.2.3 2010 - eerste proef, praktijkpartijen

In 2010 werd een voorlopig protocol voor een praktijktoets voor zuur in tulp uitgetest op een aantal praktijkpartijen. De partijen waren afkomstig uit verschillende teeltgebieden. Het betrof acht partijen tulpen; 5x Leen van der Mark en 3x Christmas Dream. Deze bollen werden eerst behandeld om een stressreactie op te roepen. De behandelingen waren:

- a) blootstelling aan ethyleen
- b) beschadiging d.m.v. vallen
- c) een combinatie van beschadiging en ethyleenblootstelling.
- d) + e): controles

De bollen werden daarna in gaasbakken ingepakt in folie en voorzien van een kist met een laag water onder de stapeling, zodat er een hoge RV ontstond. Vervolgens werden ze bij 25°C en 100% RV bewaard. Controles waren d) onbehandelde bollen die ook werden ingepakt (natte controle) en e) onbehandelde bollen die droog (niet ingepakt) werden bewaard (droge controle). Na een periode van bewaren werden de bollen beoordeeld op het zuurpercentage. De uitvoering van de ethyleenbehandeling, het beschadigen en de opslag bij hoge RV vond plaats vanaf 17 augustus. De behandelingen werden daarna aaneensluitend uitgevoerd.

3.2.4 2010 - tweede proef, praktijkpartijen kunstmatig geïnfecteerd

Bollen van dezelfde 8 partijen als gebruikt in de voorgaande proef 1 in 2010, werden extra besmet volgens gangbare en bewezen functionele werkwijze. Dit latent ziek maken gebeurde met een mengsel van drie *Fusarium* isolaten. De schimmelsporen waren afkomstig van een schimmelkweek in vloeibaar medium van drie goed gekarakteriseerde isolaten, variërend in mate van agressiviteit. De besmetting vond plaats in augustus, hetgeen laat is.

Met deze bollen werd een 'praktijktoets' uitgevoerd in oktober (start van behandeling en bewaring op 12 oktober). Er waren 3 behandelingen: "schade", "natte controle" en "droge controle". Een derde deel van de bollen werd beschadigd en vochtig bewaard gedurende 1 week bij 100% RV en 25 °C. Ter controle werden onbeschadigde bollen eveneens vochtig bewaard (natte controle) en werd een derde deel van de bollen droog opgeslagen (droge controle). Twee dagen na de vochtige opslag (incubatie) werden de bollen de eerste maal beoordeeld op zuur. De volgende beoordelingsmomenten waren na 1, 2 en 4 weken na het uithalen.

3.2.5 Statistiek

De gegevens werden statistisch geanalyseerd met behulp van het ANOVA ($P \leq 0.05$), van het programma GenStat (12th en 13th Edition).

3.3 Resultaten praktijktoetsen

3.3.1 Resultaat van de eerste proef in 2009.

In Tabel 3 en Tabel 4 staan de resultaten van de eerste proef in 2009. De bollen hebben in deze proef 2, 4 of 6 dagen bij hoge relatieve vochtigheid gestaan (incubatie), om latent zuur op te wekken tot zichtbaar zuur. Van behandeling 1 t/m 24 werd op dag 0 (de dag dat de bollen uit de incubatie kwamen) tussen 0 en 8% zuur aangetroffen, met een gemiddelde van 1,8%. Op dag 4 was het gemiddelde opgelopen tot 2,8% en op dag 10 was dit 3,3%. De maxima liepen daarbij op van 8 tot 9,3%. In Tabel 4 staat hiervan een overzicht.

In Tabel 3 staan de zuurpercentages gemiddeld over de 3 herhalingen per behandeling. Minimum en maximum waarden hieruit staan ook vermeld in Tabel 4. De gevonden waarden zijn alle vrij laag. Normaal worden in een dergelijke incubatieproef waarden tot wel 80% aangetroffen, terwijl hier maar enkele procenten zuur werden gevonden. Door de lage waarden en de grote spreiding tussen de herhalingen kunnen hieruit weinig statistisch harde conclusies worden getrokken.

Er zijn bollen teruggeplaatst in de vochtige bewaring waarbij de incubatietijd tot 10 dagen werd verlengd. Hierbij kwam iets meer zuur vrij (maximaal 13 á 14%). De stressbehandelingen "verwonding" en "ethyleen" hadden echter ook daarbij geen betrouwbaar effect op de gevonden zuurpercentages.

Tabel 3. Resultaten van de 1^e proef in 2009. Zuurpercentages geteld op de dag van uithalen (= dag 0) dagen incuberen) en 4 en 10 dagen daarna (dag 4 en dag10).

Nr.	Stressfactoren		Incubatie bij		Percentage zuur geteld op dag ... na incubatie:		
	Ethyleen	Verwonden	temperatuur	gedurende	Dag 0	Dag 4	Dag 10
1	ja	Ja	25 °C	2 dagen	0.4%	2.2%	3.1%
2	ja	Ja	25	4	3.6%	3.6%	4.0%
3	ja	Ja	25	6	0.4%	1.8%	1.8%
4	ja	Ja	20	2	0.9%	3.6%	3.6%
5	ja	Ja	20	4	3.6%	3.6%	4.0%
6	ja	Ja	20	6	2.2%	3.1%	4.0%
7	ja	Nee	25	2	0.4%	1.3%	1.8%
8	ja	Nee	25	4	2.7%	2.7%	4.9%
9	ja	Nee	25	6	1.8%	4.0%	4.4%
10	ja	Nee	20	2	2.7%	4.0%	4.0%
11	ja	Nee	20	4	1.8%	2.2%	3.1%
12	ja	Nee	20	6	1.8%	2.2%	2.2%
13	nee	Ja	25	2	0.9%	3.1%	3.1%
14	nee	Ja	25	4	2.7%	2.7%	4.4%
15	nee	Ja	25	6	4.0%	4.4%	4.4%
16	nee	Ja	20	2	0.4%	2.7%	2.7%
17	nee	Ja	20	4	3.1%	5.3%	5.3%
18	nee	Ja	20	6	3.6%	3.6%	3.6%
19	nee	Nee	25	2	0.0%	1.3%	1.8%
20	nee	Nee	25	4	3.1%	3.1%	3.6%
21	nee	Nee	25	6	1.3%	1.8%	2.7%
22	nee	Nee	20	2	0.0%	0.4%	0.4%
23	nee	Nee	20	4	0.0%	1.8%	2.2%
24	nee	Nee	20	6	1.8%	2.2%	3.1%

Tabel 4. Gemiddelde, minimum en maximum zuurpercentages, op dag 0, dag 4 en dag 10 na incubatie.

	Dag 0	Dag 4	Dag 10
Gemiddeld	1,8%	2,8%	3,3%
Minimum	0%	0,4%	0,4%
Maximum	4,0%	5,3%	5,3%

3.3.2 Resultaat van de tweede proef in 2009.

In Tabel 5 staat een overzicht van de resultaten per behandeling. Bij deze proef ontstond na 1 week incubatie slechts een geringe hoeveelheid zuur. Gemiddeld over alle behandelingen was er slechts 1,4% zuur (2,2% in Dynasty en 0,5% in Strong Gold). Hier kwam later nauwelijks meer zuur bij. De uitslagen zijn daardoor niet bruikbaar voor een analyse; de functionaliteit van de praktijktoets was nog onvoldoende. Op basis van deze ervaringen werd de werkwijze van de praktijktoets in 2010 verder geoptimaliseerd.

Tabel 5. Zuurpercentages waargenomen bij de verschillende behandelcombinaties van twee praktijkpartijen (2^e proef in 2009).

Nr.	Cultivar	ontsmet	ethyleen	gem % zuur
1	Dynasty	Formaline	ja	4.7%
2	Dynasty	Formaline	nee	1.1%
3	Dynasty	geen	ja	1.1%
4	Dynasty	geen	nee	2.1%
5	Strong Gold	Formaline	ja	0.5%
6	Strong Gold	Formaline	nee	0.5%
7	Strong Gold	geen	ja	1.0%
8	Strong Gold	geen	nee	0.0%

3.3.3 Resultaat van de eerste proef in 2010 (praktijkpartijen)

De uitvoering van de praktijktoets op zuur in tulp liep uit bij de eerste proef. De oorspronkelijke opzet was om de bollen vanaf 4 dagen bij de vochtige bewaring te controleren op aanwezigheid van zuur. Omdat er geen zuur ontstond werd de vochtige bewaring met 8 dagen voortgezet. Uiteindelijk werden de bollen na 12 dagen weer in de droge bewaring gezet. Er was toen nog nauwelijks zuur ontstaan. Wel werd er een aantasting door *Aspergillus niger* (roet) aangetroffen op een deel van de bollen. Dit was uiteindelijk de reden om de vochtige bewaring te staken. De bollen zijn de daaropvolgende anderhalve week nog enkele keren beoordeeld. Ook toen werd weinig zuur aangetroffen. Omdat het resultaat uitbleef en in ieder geval te lang duurde, voldoet de praktijktoets zuur daarmee niet aan de gestelde eisen (zie §1.2). Voor een goede toets zou het zuurpercentage dat normaal gedurende 2 à 3 maanden bewaring ontstaat al zichtbaar moeten zijn binnen 10 à 12 dagen.

Omdat er later toch nog zuur ontstond werden de bollen 4 weken na de vochtige opslag alsnog op zuur beoordeeld. De toen gevonden aantastingpercentages bleken soms onverwacht vrij hoog. Hoewel de resultaten niet voldeden aan de criteria voor een snelle toets konden toch enkele conclusies worden getrokken. In Tabel 6 staat een overzicht van de zuurpercentages. De behandelingen: droge controle, natte controle, beschadiging, ethyleen en combi (=beschadiging +ethyleen) zijn gekleurd om sneller een beeld te krijgen welke behandeling een hoog of laag percentage zuur veroorzaakte.

De conclusies zijn:

- Behandelingen met beschadiging (beschadiging en combi) gaven in 7 van de 8 partijen de hoogste zuurpercentages variërend van 26 tot 83%. De behandelingen "schade" en "combi" gaven beide een hoger zuurpercentage dan de behandelingen "natte controle", "droge controle" en " ethyleen".
- Er bleek weinig effect te zijn van de behandeling met alleen ethyleen. Hiervan was het percentage gemiddeld (12,7%) gelijk aan de natte controles (gemiddeld 12,0%) en hoger dan de droge controle (gemiddeld 7,0%).
- Leen van der Mark had gemiddeld over alle behandelingen een hoger zuurpercentage (32%) dan Christmas Dream (22%).

Tabel 6. Overzicht van de in de bewaring waargenomen zuurpercentages per partij-behandeling combinatie, in volgorde van oplopend zuurpercentage (beoordeling 4 weken na inzetten). Elke behandeling heeft een eigen kleur in de tabel.

Cultivar/ Bedrijf	behandeling	zuurpercentage
LvdMark - 3	droge controle	0.0%
LvdMark - 2	droge controle	1.3%
LvdMark - 2	ethyleen	1.3%
Chr.Dream - 8	ethyleen	2.0%
Chr.Dream - 8	droge controle	2.1%
LvdMark - 2	natte controle	2.3%
LvdMark - 3	ethyleen	2.7%
Chr.Dream - 8	natte controle	3.0%
LvdMark - 3	natte controle	4.0%
LvdMark - 5	droge controle	5.3%
Chr.Dream - 6	ethyleen	5.7%
Chr.Dream - 6	droge controle	5.9%
Chr.Dream - 7	droge controle	7.3%
LvdMark - 5	natte controle	7.7%
Chr.Dream - 6	natte controle	8.7%
LvdMark - 5	ethyleen	10.0%
LvdMark - 1	droge controle	11.7%
LvdMark - 1	natte controle	18.7%
LvdMark - 4	droge controle	22.6%
LvdMark - 4	ethyleen	23.7%
LvdMark - 4	natte controle	24.3%
LvdMark - 1	ethyleen	24.7%
Chr.Dream - 6	schade	26.3%
Chr.Dream - 7	schade	27.0%
Chr.Dream - 7	natte controle	27.3%
Chr.Dream - 7	ethyleen	31.3%
Chr.Dream - 8	schade	38.0%
Chr.Dream - 8	combi	38.0%
LvdMark - 4	combi	45.4%
Chr.Dream - 7	combi	49.6%
LvdMark - 2	schade	51.0%
LvdMark - 3	combi	52.0%
Chr.Dream - 6	combi	54.3%
LvdMark - 3	schade	55.7%
LvdMark - 5	combi	65.9%
LvdMark - 4	schade	69.7%
LvdMark - 2	combi	70.9%
LvdMark - 1	schade	71.7%
LvdMark - 5	schade	73.3%
LvdMark - 1	combi	82.8%

3.3.4 Resultaat 2^e proef 2010

Bij de meeste partijen en behandelingen bleek een toename van het zuurpercentage bij elk volgende meetmoment. Soms waren er plotseling sterke toenames. De zuurpercentages van de 8 partijen, bij de laatste beoordeling (na 4 weken) varieerden bij de droog bewaarde bollen van 2 tot 11%, met een gemiddelde van 7%. Ter vergelijking: de droge controle in de eerste proef varieerde van 0 tot 23% zuur, maar ook met een gemiddelde van 7%, omdat er 1 hoge uitschieter (23%) was. De zuurpercentages staan vermeld in Tabel 7, per partij en per datum van waarneming.

Tabel 7. Zuurpercentages bij de verschillende combinaties van partijen en behandeling, waargenomen op 4 datums, beginnend 2 dagen na incubatie op 21 oktober.

Cultivar-Bedrijf	behandeling	Zuurpercentage geteld op:			
		21-okt	26-okt	2-nov	16-nov
LvdMark - 1	schade	10.0%	15.0%	18.3%	22.2%
LvdMark - 1	natte controle	10.6%	15.6%	15.6%	16.7%
LvdMark - 1	droge controle		6.1%	7.2%	8.9%
LvdMark - 2	schade	5.3%	6.2%	8.9%	12.9%
LvdMark - 2	natte controle	7.6%	9.8%	9.8%	12.9%
LvdMark - 2	droge controle		4.9%	5.8%	8.0%
LvdMark - 3	schade	5.8%	7.9%	8.3%	25.0%
LvdMark - 3	natte controle	4.2%	4.6%	4.6%	11.7%
LvdMark - 3	droge controle		7.1%	7.5%	10.0%
LvdMark - 4	schade	3.3%	4.6%	7.1%	13.8%
LvdMark - 4	natte controle	4.2%	5.4%	6.3%	10.4%
LvdMark - 4	droge controle		1.7%	4.6%	5.8%
LvdMark - 5	schade	4.2%	4.2%	4.2%	8.8%
LvdMark - 5	natte controle	1.7%	2.5%	3.8%	3.8%
LvdMark - 5	droge controle		2.5%	2.5%	3.3%
Chr.Dream - 6	schade	4.6%	5.8%	6.3%	9.2%
Chr.Dream - 6	natte controle	2.5%	4.6%	4.6%	5.4%
Chr.Dream - 6	droge controle		0.4%	1.7%	1.7%
Chr.Dream - 7	schade	10.0%	11.9%	12.4%	12.9%
Chr.Dream - 7	natte controle	10.0%	14.3%	15.7%	18.1%
Chr.Dream - 7	droge controle		4.8%	9.0%	10.5%
Chr.Dream - 8	schade	6.3%	8.8%	8.8%	10.8%
Chr.Dream - 8	natte controle	7.9%	10.0%	12.1%	12.9%
Chr.Dream - 8	droogcontrole		5.0%	7.1%	8.3%
					I.s.d. = 5,9%

Voor een bruikbare praktijktoets is het wenselijk dat het percentage zuur op het 1^e meetmoment na de vochtige bewaring, al dan niet beschadigd (groen gemarkeerd in de tabel), een indicatie geeft van het percentage zuur dat later zal ontstaan (in dit geval na 4 weken) bij de normaal, droog bewaarde bollen (geel gemarkeerd). Statistisch bleek deze bewering op te gaan voor alle afzonderlijke partijen in deze proef.

Beschadigde bollen en onbeschadigde bollen die 1 week vochtig werden bewaard gaven bij een beoordeling na 2 dagen een zuurpercentage dat vergelijkbaar was met dat van droog bewaarde bollen op een later tijdstip (4 weken later). Voor een verschil is een minimaal verschil (I.s.d.) van 5,9% nodig tussen de groen en geel gemarkeerde waarden.

In de praktijk wordt een partij gekeurd voor acceptatie en afkeuring op zuur vindt plaats bij percentages hoger dan 2%. Het percentage zuur op basis van de praktijktoets (groen gearceerd) zou moeten overeenkomen met het percentage zuur na uitzieken (geel gearceerd) van die partij. In 6 van de 8 gevallen komt de praktijktoets overeen met de uitziekttoets: een percentage hoger dan 2% dus afkeuring van de partij. Bij LvdMark-5 resulteert één van de twee praktijktoetsmethoden in een percentage lager dan 2%. In dit geval ontstaat er twijfel over wel of niet afkeuren.

Bij Chr.Dream-6 wordt de partij afgekeurd volgens de praktijktoets, maar blijkt het percentage volgens uitzieken lager dan 2%.

Blijkbaar is de geoptimaliseerde praktijktoets nog steeds onvoldoende informatief. Implementatie in de praktijk is daarom nog niet mogelijk.

3.4 Fusariumdetectie met behulp van labtoetsen

De tweede doelstelling van dit project was de ontwikkeling van een labtoets waarmee het percentage latent zuur en bolrot van een partij vast te stellen is. Hiervoor was het noodzakelijk een toets te ontwikkelen die het mogelijk maakte de twee *Fusarium oxysporum* soorten namelijk f.sp. *tulipae* (Fot) en f.sp. *narcissii* (Fon) te onderscheiden.

Toen dit eenmaal mogelijk was (zie §3.4.1) bleek dat het percentage bollen waarop *Fusarium* met behulp van DNA technieken aangetoond kon worden veel hoger lag dan het percentage gevonden in de praktijktoets. Deze discrepantie is onderzocht door eerst in onbehandelde bollen vast te stellen wat het percentage bolrot was met behulp van DNA technieken. Aan het begin van het seizoen zijn bollen bemonsterd uit 8 praktijkpartijen (onbehandelde). Daarna zijn deze percentages vergeleken met de percentages die “opgewekt” konden worden met de praktijktoets (§3.4.2). Tevens zijn bollen uit de praktijkpartijen zonder behandeling aan het einde van het seizoen nogmaals getest op aanwezigheid van *Fusarium* met behulp van de specifieke labtoets.

Vervolgens is gekeken of de bollen die de behandeling ondergaan hebben en geen symptomen ontwikkeld hebben ook negatief uit de labtoets kwamen. Op deze manier was het mogelijk de efficiëntie van de praktijktoets te testen (§3.4.3).

3.4.1 Ontwikkeling van de labtoets

Bij de PCR-detectie van *Fusarium* kan de lage dichtheid aan (latent) aanwezige sporen tot vals-negatieve resultaten leiden. Een voorkweekstap via uitplaten op voedingsmedium kan een belangrijke tussenstap zijn om de schimmel-massa te verhogen waarna specifieke detectie van *Fusarium* kan plaatsvinden.

Kleinschalige experimenten zijn uitgevoerd om de haalbaarheid van het uitplaten op voedingsmedium aan te tonen. Daartoe zijn tulpenbollen van een latent geïnfecteerde partij een nacht gewassen in water. Tijdens deze wasprocedure moeten de aanwezige schimmelsporen vrijkomen in de vloeistof. Diverse verdunningen van dit water zijn uitgeplaat op voedingsmedium waarna ze 3 dagen werden geïncubeerd. Het is de algemene ervaring dat na drie dagen incubatie op voedingsmedium er veel schimmelgroei plaatsvindt. Uit morfologische analyse van schimmelstructuren blijkt dat er zeer veel andere schimmels op het voedingsmedium groeien waardoor competitie met *Fusarium* zal plaatsvinden. Op basis van deze ervaringen is onderzocht of PCR-technieken gevoelig genoeg zijn voor de directe detectie van *Fusarium* op bolmateriaal zonder voorkweekstap.

Detectie van *Fusarium* kan plaats vinden met behulp van PCR-toetsen. White et al (1990)¹ hebben een PCR-toets ontwikkeld die schimmels detecteert (waaronder dus ook *Fusarium*). Misra et al (2003)² hebben een PCR-toets ontwikkeld waarmee specifiek *Fusarium* kan worden gedetecteerd (Tabel 8). Nadeel van deze toetsen is dat met deze toetsen geen onderscheid gemaakt kan worden tussen verschillende *forma specialis*.

Op basis van beschikbare sequenties van *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae* (Fot) en f.sp. *narcissii* (Fon) is in dit project een derde PCR-toets ontwikkeld waarmee Fot en Fon gedetecteerd kunnen worden. De primers zijn gebaseerd op *Fusarium*-specifieke 28S sequenties (Tabel 8). Wanneer het verkregen PCR-

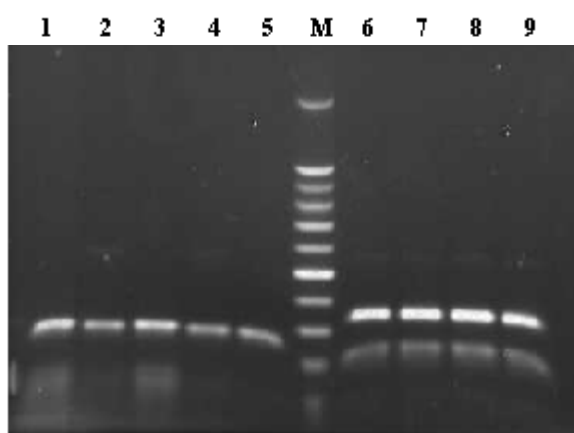
¹ White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. San Diego, USA: Academic Press, 315-322.

² Mishra, P.K., Fox, R.T.V. and Culham, A. (2003) Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. FEMS Microbiol Lett 218, 329–332.

product geknipt wordt met het restrictie-enzym HpyCh4V, dan ontstaat er, na gelelectroforese, een specifiek patroon van DNA-fragmenten waarmee Fot en Fon te onderscheiden zijn (Figuur 1).

Tabel 8. Overzicht van PCR-toetsen voor detectie van *Fusarium*

Referentie	Primernaam	Sequentie (5'-3')	Tm	Amplicon grootte
White et al (1990)	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	72	Variabel
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	66	
Misra et al (2003)	FOF1	ACA TAC CAC TTG TTG CCT CG	68	340 bp
	FOR1	CGC CAA TCA ATT TGA GGA ACG	69	
Dit project	CAPSFoxF1	ATG GGT TCT CCG GAT TTC TG	60	609 bp
	CAPSFoxR1	CGC AAA ATTCAA TAG TAC GG	56	



Figuur 1. Restrictie-analyse van CAPSFoxF1/R1 PCR-producten met HpyCh4V van 9 verschillende *F. oxysporum* isolaten. Laan 1 t/m5: *Fusarium oxysporum* f.sp. *narcissii* isolaten N2, N10, N11, N12 en N13 en, laan 6 t/m 9: *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae* isolaten T40, T47, T58 en T67. M: 100 bp lader (Promega).

Monsternamen is een belangrijke stap voor betrouwbare detectie. Daarom is bij een partij tulpen met een latente infectie met *Fusarium* onderzocht welke onderdelen van de bol te gebruiken zijn voor de PCR-detectie van *Fusarium*. Het is gebleken dat *F.oxysporum* duidelijk aan te tonen is in de buitenste rokken en bolschijf. Daarentegen werd *Fusarium* minder frequent gedetecteerd in de huid en binnenste rokken. Voor een betrouwbare bemonstering voor *Fusarium* detectie met PCR, wordt geadviseerd de bolbodem en buitenste rokken te bemonsteren en deze fijn te malen in water. Na bezinking van de grove plantdelen wordt de waterige fase gebruikt voor DNA-extractie.

3.4.2 Vaststellen zuurpercentages op onbehandelde bollen met moleculaire technieken

Voor het vast stellen van het percentage zuur met behulp van een labtoets gebaseerd op DNA technieken (§3.4.1), zijn bolbodems van de bollen bemonsterd aan het begin van het seizoen (Tabel 9).

De partijen met de hoogste (83%) en het laagste (38%) zuurpercentages zijn bemonsterd. Alleen voor de praktijkpartijen LvdMark-1 en Chr.Dream-8 zijn aan het einde van het seizoen nogmaals de onbehandelde bollen bemonsterd. Het blijkt dat aan het einde van de proef (5 à 6 weken later) het percentage zuur vastgesteld met behulp van PCR hoger ligt dan aan het begin werd vastgesteld was. In het geval van LvdMark-1 gaf aan het begin 50% en aan het einde 83% een *Fusarium* specifiek bandje. De laatste is gelijk aan het maximaal gevonden percentage in de behandelingen (Tabel 9).

Met partij Chr.Dream-8 was dit niet het geval; daar was het maximaal gevonden percentage uit de uitziektoets 38%, terwijl met de labtoets aan het einde 66% werd gevonden. Verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat het uitzieken niet optimaal is verlopen. Ook kan de weerstand van de bol hoger zijn zodat bij uitzieken niet alle latente infecties tot symptomen leiden. Dit was ook al een conclusie van Bergman in 1970. Zuur-ongevoelige bollen/partijen/cultivars kunnen wel latent geïnfecteerd raken, maar worden

daardoor in mindere mate ziek.

Ook kan er herbesmetting zijn opgetreden tijdens de proef waarbij op deze nieuw geïnfecteerde bollen nog geen zuursymptomen zijn ontwikkeld.

Tabel 9. Overzicht van zuurpercentages in de verschillende praktijkpartijen na uitzielen en het percentage besmette bollen gevonden met behulp van DNA technieken. Met PCR- en restrictieanalyse is aangetoond dat de verkregen PCR-producten specifiek voor *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae* waren.

Cultivar	Percentage zuur door uitzielen (4 wk)					Percentage besmet (PCR)	
	Standaard		Ethyleen	Verwonding	Ethyleen & verwonding	Start proef*	Einde proef**
	Droog	Nat					
LvdMark-1	12	19	25	72	83	50	83
LvdMark-2	1	2	1	51	71	20	
LvdMark-3	0	4	3	56	52	10	
LvdMark-4	23	24	24	70	45	20	
LvdMark-5	5	8	10	73	66	0	
Chr.Dream-6	6	9	6	26	54	30	
Chr.Dream-7	7	27	31	27	50	0	
Chr.Dream-8	2	3	2	38	38	10	66

*Begin oktober, Bolbodems ingevroren (10 stuks), ontsmet met formaline, gedroogd (3 dg bij 80°C), fijngeslagen en DNA geïsoleerd.

** Begin november, Bolbodems (24 stuks), fijngeslagen en DNA geïsoleerd. Hier zijn uit 2 partijen gezonde bollen gehaald. Daar zaten inmiddels ook wel wat zieke bollen bij, maar in een heel laag percentage.

Algemeen kan geconcludeerd worden dat het percentage besmette bollen vastgesteld met PCR aan het begin van de proef niet overeenkomt met de percentages gevonden na uitzielen.

In het geval van de partij Chr.Dream-8 kan een mogelijke verklaring zijn dat PCR meer aantoont dan de uitzieltoets laat zien als de bol meer weerstand heeft. In die gevallen geeft PCR dus geen goede voorspelling van het mogelijk percentage zuur. Het is dan nog wel een indicatie van de mate van besmetting (onder voorbehoud van verificatie van de gevonden resultaten).

In het geval van de partij LvdMark-1 bleek het mogelijk bij een zwaar zieke partij het percentage zuur te voorspellen met behulp van DNA technieken. Het lijkt er echter op dat moleculaire technieken voor het bepalen van zuurpercentage nog niet geoptimaliseerd zijn. Momenteel detecteert de PCR-toets ook bollen die wel besmet zijn met *Fusarium*, maar niet geïnfecteerd zijn en/of zuursymptomen zullen ontwikkelen. De PCR-toets is daarmee te gevoelig voor de zuurproblemen die in de praktijk zullen ontstaan. Een te gevoelige PCR-toets is niet wenselijk.

3.4.3 Vaststellen zuurpercentages op resterende gezonde bollen na de uitzieltoets

Het hoogste percentage zuur in de proef met de praktijkpartijen in 2010 was gevonden in een partij Leen van de Mark in combinatie met de behandelingen ethyleen en verwonding. Het betrof partij LvdMark-1 met 83% zuur. Het bleek niet mogelijk de overgebleven gezonde bollen van deze behandeling voor de PCR te gebruiken omdat ze te zwaar beschadigd waren (opzettelijk 3 x laten vallen van 1 meter hoogte op harde ondergrond). Bovendien was een groot deel van deze bollen met *Aspergillus* geïnfecteerd. Voor de PCR-toets zijn daarom in plaats daarvan bolbodems van 24 gezond-ogende bollen geselecteerd uit de behandeling met ethyleen. Hierin was eerder al (proef 1, 2010) 25% zuur "opgewekt". Van deze overgebleven gezonde bollen was 75% positief voor *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*. In totaal kwam daarmee het percentage zuur + latent besmet op ±81%. Met deze uitslag lijkt het er op dat het mogelijk is om het percentage latent besmette bollen vast te stellen met behulp van PCR. Er zouden echter meer

partijen getest moeten worden om de betrouwbaarheid van deze methode vast te stellen.

Tabel 10. Overzicht van zuur percentages bij Leen van de Mark bij uitzieken en bepaling percentage zuur op basis van PCR-analyse.

Cultivar	Partij	Behandeling	Zuur (%)	Besmet deel van de resterende bollen (%)	Maximaal zuur % berekend ^{*1}	Maximaal zuur % gevonden met uitziektoets ^{*2}
Leen v d Mark	LvdMark-1	+ ethyleen	25%	75%	81%	83%

^{*1} Met PCR is vastgesteld dat van de niet zure bollen 75% besmet was. Dus van de 75% op het oog gezonde bollen blijkt 75% besmet te zijn. Dit is omgerekend 56% ($0,75 * 75$). De zure bollen en de besmette, niet zuur geworden bollen vormen samen ($25\% + 56\% =$) 81%.

^{*2} Uitziektoets: behandeling met ethyleen en verwonding

Conclusie

Het lijkt er op dat het mogelijk was om het percentage zuur dat niet ziek is geworden in de toets toch met behulp van PCR nog vastgesteld kon worden. Echter meer gezonde bollen van uitgezichte partijen zullen getest moeten worden om de betrouwbaarheid van deze methode vast te stellen (=verificatie).

Ook zou het wenselijk zijn als met deze toets op een **eerder** tijdstip het aantal besmette of latent geïnfecteerde bollen kan worden bepaald. Een mogelijk probleem hierbij is dat de schimmelmassa dan nog niet zo groot is en mogelijk onder de detectiegrens ligt. Het percentage detecteerbaar besmette bollen is dan lager dan werkelijk het geval is.

3.5 Discussie

Uitblijven van zuur in geïnfecteerde bollen

In de beide praktijktoets-proeven van 2009 (§ 2.2.1 en 2.2.2) ontstond slechts weinig zuur, waardoor het niet mogelijk bleek hieruit bruikbare conclusies te trekken.

Een reden voor een laag slagingspercentage van het opwekken van zuur in het onderzoek zou de werkwijze bij het bereiden van de sporensuspensie kunnen zijn. Deze was iets anders dan in voorgaande jaren. De werkwijze is getoetst door het opnieuw besmetten van tulpenbollen op exact dezelfde manier als in vorige jaren is gedaan. De methodes zijn vergeleken. Ook in de opnieuw besmette bollen kon nauwelijks zuur worden opgewekt, zodat geconcludeerd kan worden dat het verschil met voorgaande jaren niet veroorzaakt is door een verschil in besmettingsmethoden.

Er bleek dat jaar ook veel minder uitbraak van *Fusarium*/zuur in de praktijk voor te komen. Blijkbaar zijn andere externe omstandigheden hierop van invloed geweest; een exacte reden is daarvoor niet aan te geven.

2010 - correlatie zuurpercentages praktijktoets en PCR-toetsen

De discrepantie tussen de zuurpercentages van de uitziektoets in 2010 en de percentages gevonden met PCR is onderzocht. Er is niet gekozen voor het op de plaat uitleggen van stukjes bolmateriaal. Door de vele verschillende schimmels die uit het materiaal groeien is het lastig, zo niet onmogelijk, te beoordelen wat de infectiegraad met *Fusarium* is. In plaats daarvan is met een PCR-toets het zuurpercentage in onbehandelde bollen vastgesteld. Dit percentage is vergeleken met het zuurpercentage vastgesteld op basis van de praktijktoets. Voor de PCR-toets is de bolbodem bemonsterd.

Daarnaast is met de PCR-toets gekeken of de overgebleven gezonde bollen vanuit de praktijktoets (dus nadat ze met de praktijktoets behandeld zijn), daadwerkelijk vrij waren van *Fusarium*. Hiermee wordt de vraag beantwoord of de overgebleven gezonde bollen uitsluitend uitwendig besmet zijn met *Fusarium* zonder dat er sprake is van een latente infectie.

Als dit het geval is, dan zou dat dus een verklaring kunnen zijn voor de eerder gevonden discrepantie tussen de gevonden percentages uit de praktijktoets en de PCR resultaten.

Vaststellen zuurpercentages op onbehandelde bollen met moleculaire technieken

Monsters van de partijen (praktijkpartijen in 2010) met de hoogste (83%) en het laagste (38%) zuurpercentages zijn getoetst op *Fusarium* met een PCR-toets bemonsterd. Het bleek dat met PCR 83% van de onbehandelde bollen uit de partij met het hoogste percentage, een *Fusarium* specifiek bandje gaf. Dit kwam overeen met het hoogste percentage in de uitziectoets.

Voor de partij met het laagste zuurpercentage (38%) was echter ten opzichte van de uitziectoets een hoger percentage (66%) van de bollen positief. Verklaringen hiervoor zouden kunnen zijn dat het uitzieken niet optimaal is verlopen. Ook kan de weerstand tegen het uitbreken van latent zuur van de bol hoger zijn zodat bij uitzieken niet alle latente infecties tot symptomen leiden. Dit was ook al een conclusie van Bergman³. Volgens Bergman kunnen zuur-ongevoelige bollen/partijen/cultivars wel latent geïnfecteerd raken, maar worden daardoor in mindere mate ziek. Ook kan er herbesmetting zijn opgetreden tijdens de proef waarbij op deze nieuw geïnfecteerde bollen nog geen zuursymptomen zijn ontwikkeld. Het lijkt erop dat moleculaire technieken voor het bepalen van zuurpercentage nog niet voldoende geoptimaliseerd zijn. Momenteel detecteert de PCR-toets ook bollen die wel besmet zijn met *Fusarium*, maar niet (latent) geïnfecteerd zijn en/of zuursymptomen zullen ontwikkelen. De PCR-toets is daarom te gevoelig als toetsmethode voor zuurproblematiek in de praktijk.

³ Bergman, B. H. H. & Beijersbergen, J. C. M., 1971. A possible explanation of variations in susceptibility of tulip bulbs to infection by *Fusarium oxysporum*. Acta Hort. 23: 225–229.

3.6 Conclusie

3.6.1 Praktijktoets:

- In de ontwikkelingsfase van de praktijktoets (eerste jaar van onderzoek, 2009) konden geen conclusies worden getrokken wat betreft de bruikbaarheid van de praktijktoets. De reden hiervoor was gelegen in de zeer lage percentages door zuur aangetaste bollen.
- Als stress-factor voor het opwekken van zuur is beschadiging voldoende effectief. Een ethyleenbehandeling, al dan niet gecombineerd met beschadiging, geeft geen beter resultaat.
- Een vroeg in het seizoen uitgevoerde praktijktoets bleek geen tijdige indicatie op te leveren voor de besmetting van een partij.
- Een laat in het seizoen uitgevoerde praktijktoets leverde na 1 week incubatie onder vochtige omstandigheden + 2 dagen uitzieken een indicatie voor zuur zoals dat 4 weken later zou ontstaan bij droge bewaring. Het resultaat is voor de praktijk echter nog onvoldoende informatief om op het gewenste moment als instrument te worden ingezet.

Aanbeveling: Voor de praktijktoets is een protocol opgezet dat op bedrijven kan worden uitgevoerd met normaal aanwezige middelen en zonder toevoeging van ethyleen. Het protocol moet voor wat betreft het moment van uitvoeren verder worden geoptimaliseerd.

3.6.2 Het protocol praktijktoets zuur in tulp:

- Van een partij wordt een monster getrokken van 300 bollen.
- De bollen worden in netzakjes gedaan en licht beschadigd door ze 3x vanaf 1 meter hoogte te laten vallen (niet gooien) op een harde ondergrond zoals een vloer.
- De zakjes worden in bakken gelegd en ingepakt met plastic folie (zijanten en bovenkant dicht), waarbij in de onderste krat in een bak druiptnatte doeken worden gelegd. Hierdoor ontstaat na het inpakken in de stapel een RV van bijna 100%.
- De bollen worden gedurende minimaal 4 tot 8 dagen in een bewaarcel bij 25°C gezet (er moet zuur zijn ontstaan, dit moet men waarnemen door af en toe te ruiken).
- Vervolgens wordt het folie en de bak met natte doeken verwijderd en worden de bollen droog bij 20°C opgeslagen.
- Na 2 à 3 dagen na de vochtige bewaring worden de bollen beoordeeld op het zuurpercentage. Eventueel wordt de beoordeling 5-7 dagen later opnieuw uitgevoerd.

3.6.3 Laboratorium en PCR toetsen.

- Er is aangetoond dat de PCR-toets onderscheid maakt tussen diverse formae specialis (subsoorten) van *Fusarium* die specifiek zijn voor narcis of voor tulp
- Met de PCR-toets kan in sommige gevallen het zuurpercentage na bewaring goed worden voorspeld.
- De PCR-toets reageert in sommige gevallen ook positief als bollen besmet zijn met *Fusarium*, maar niet geïnfecteerd zijn en/of zuursymptomen zullen ontwikkelen. De uitslag is dan vals positief. Hierdoor is de PCR-toets niet betrouwbaar om te worden gebruikt als voorspellend instrument voor eventuele zuurproblemen die later tijdens de bewaring of in de praktijk zullen ontstaan.

Aanbeveling: Het lijkt mogelijk om het percentage latent besmette bollen vast te stellen met behulp van PCR. Verificatie met een groot aantal partijen tulpen is nodig om de toets bruikbaar en betrouwbaar te maken.

4 Praktijktoets voor bolrot in narcis

4.1 Introductie

Met een praktijktoets voor bolrot is het mogelijk om op de bedrijfslocatie het percentage bolrot van een partij narcissen vast te stellen. Dit geeft de teler, handelaar of exporteur meer inzicht in de partij waarop vervolg handelingen/beslissingen genomen kunnen worden. Voor het uitvoeren van een dergelijke proef is het noodzakelijk dat er alleen middelen gebruikt worden die de doelgroep beschikbaar heeft. Daarnaast is het belangrijk dat de uitvoering van de proef gemakkelijk, goedkoop, snel en betrouwbaar is.

Bolrot in narcissen wordt veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi* en leidt jaarlijks tot grote verliezen. Tijdens het oogsten van narcissen is het gemakkelijk de door *Fusarium* aangetaste bollen te selecteren omdat deze bollen volledig zijn uitgedroogd en verhard (zogenaamde bokkies). Echter, narcissen kunnen tijdens de bewaring ook bolrot ontwikkelen. Dit komt omdat de *Fusarium* schimmel latent aanwezig kan zijn waardoor de geïnfecteerde bollen niet opgemerkt worden vlak na het rooien. Tijdens de bewaring kan dan de ziekte zich ontwikkelen met als gevolg dat wanneer de partij geplant moet worden een deel van de partij verloren is. Dit noemt men het zogenaamde uitzieken van een partij en standaard staat hier 12 weken voor.

Het principe van de praktijktoets is gebaseerd op het eerder zichtbaar maken van de latente infecties: d.w.z. door de bol zo te behandelen dat de latente infectie eerder uitgroeit zodat de symptomen sneller waargenomen kunnen worden dan de standaard 12 weken uitzieken. Voor het opzetten van de praktijktoets zijn de bollen behandeld door ze vochtig weg te leggen, te kneuzen of te prikken in een prikkak (mechanische stress) of een combinatie van deze twee behandelingen. Na drie, zes en twaalf weken zijn de percentages aangetaste bollen vastgesteld en vergeleken met het percentages bolrot in de bollen die op de normale wijze uitgeziekt zijn.

4.2 Materiaal en methode

Twee verschillende proeven zijn uitgevoerd om de praktijktoets op te zetten (2009 en 2010). In de hierna volgende paragrafen staan de materiaal en methode van deze proeven per jaar uitgewerkt.

4.2.1 Thuistoets

Voor de eerste bio-toets (2009) zijn voornamelijk dubbelneuzen van de cultivar Dutch Master gebruikt. De partij was volgens de teler besmet. Drie weken na het rooien zijn de bollen van het veld gehaald en is er op het oog gescoord op het aantal zieke bollen (3%). Gezond uitzierende bollen zijn vervolgens geselecteerd voor de proef.

Voor het ontwikkelen van de thuistoets zijn 70 bollen per behandeling (in triplo) in gaasbakken verzameld. De volgende bolbehandelingen zijn uitgevoerd:

1 Stressbehandeling. Hiervoor zijn bollen geknakt (dubbelneuzen) of gekneusd/geslagen op een hard oppervlak (enkelneuzen en dubbelneuzen met vastzittende neuzen)

2 Vochtbehandeling. Hiervoor zijn de bollen bespoten met een plantenspuit en verpakt (gesealed) in plastic voor 3 weken. Daarna is het plastic verwijderd

3 Vocht- en Stressbehandeling. Combinatie van hierboven beschreven behandelingen

4 Controle. Bollen zijn niet behandeld en op normale wijze bewaard in gaasbakken

De bollen zijn na drie, zes en twaalf weken driemaal doorgesneden met een mes. Het percentage bolrot is bepaald door het totaal aantal bollen te delen door aantal zieke bollen.

Voor de optimalisatie van de praktijktoets (2010) zijn dezelfde behandelingen uitgevoerd zoals beschreven voor de eerste proef (2009) met de volgende aanpassingen: dezelfde cultivar is gebruikt als in 2009 en ook hier ging het volgens de teler om een besmette partij. Maar voorafgaand aan de bolbehandelingen zijn de bollen in reinigingsmiddel gedompeld om kruisbesmetting tijdens de behandeling te voorkomen. Ook is er gebruik van de tulpenprikbak zodat kruisbesmetting tussen de bollen, zelf tijdens de bewaring voorkomen werd. Er zijn per behandeling 94 bollen (triplo) gebruikt die telkens over twee tulpenprikbakken werden verdeeld. De stressbehandeling is uitgevoerd door de bollen in de tulpenbakken te prikken. De overige behandelingen zijn uitgevoerd zoals eerder beschreven. En de bollen zonder stress behandeling werden tussen de prikkers van de bakken gelegd.

4.2.2 Vroegrooitoets

Een partij met een bolrothistorie werd zes weken eerder geroid dan het normale rooitijdstip (2010). De bollen werden met een reinigingsmiddel behandeld zodat kruisbesmetting tijdens de behandeling voorkomen werd. De bollen werden niet behandeld of alleen een vocht- en stressbehandeling gegeven. Scoren werd na drie, zes en twaalf weken gedaan door de bollen door te snijden en het percentage zieke bollen te bepalen.

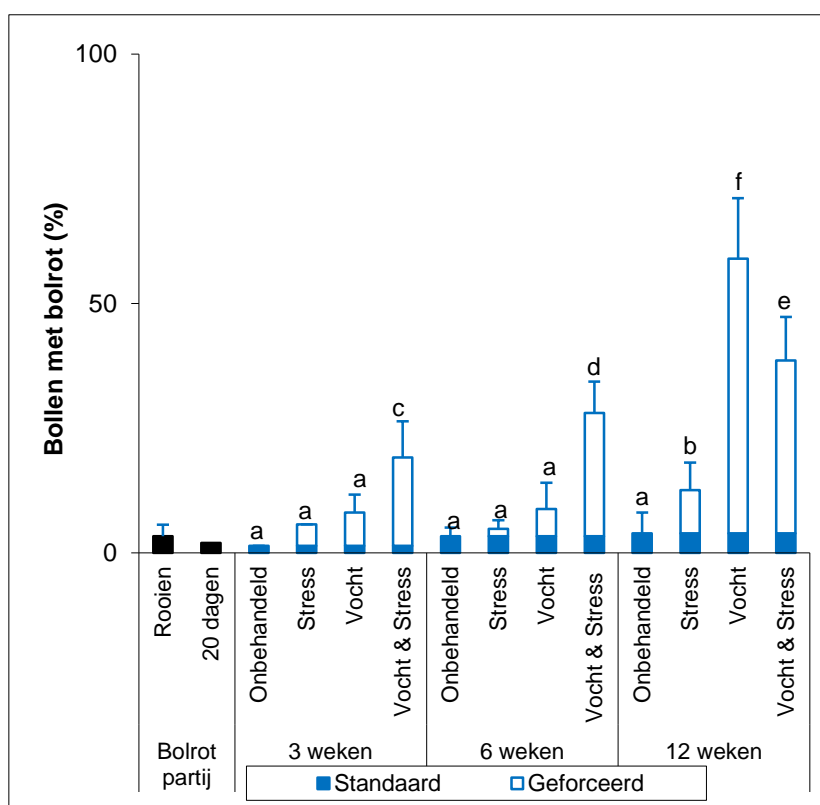
4.3 Resultaten ontwikkeling praktijktoets

De resultaten van de ontwikkeling van de praktijktoets staan hieronder beschreven. Er is gekeken naar verschillende behandelingen en naar optimalisatie van de toets door kruisbesmetting te voorkomen en rooitijdstippen te variëren.

4.3.1 Ontwikkeling van de thuistoets

Voor het ontwikkelen van een thuistoets zijn gezond uitzijende bollen vochtig bewaard, gestresst door mechanische beschadiging of met een combinatie van deze twee behandeld. Na drie weken bleek het percentage zieke bollen in de onbehandelde controle laag (1%) te zijn (Figuur 2). Het percentage zieke bollen die een stressbehandeling hadden ondergaan en daarna vochtig waren weggelegd was het hoogst (19%). Na zes weken was het percentage bollen met bolrot in de onbehandelde controle 3%. De combinatie van de vocht- en stressbehandeling leverde het hoogste percentage bolrot op (28%). Na de gebruikelijke tijd voor uitzieken (12 weken), werd maar 4% bolrot in de onbehandelde controle geconstateerd. Echter, in de combinatiebehandeling van vocht en stress, was 39% van de bollen ziek. Een nog hoger percentage bolrot werd gevonden in de bollen die alleen de vochtbehandeling hadden ondergaan (59%).

Een verklaring voor de hoge percentages bolrot in de behandelde bollen zou kunnen zijn dat tijdens de behandeling zelf meer bollen geïnfecteerd werden. Deze zogenaamde kruisbesmetting zal verder moeten worden onderzocht.



Figuur 2. Percentage bollen met bolrot na drie, zes en twaalf weken. Voor het opwekken van de latente bolrotinfecties zijn de bollen vochtig weggelegd (vocht), mechanische gestrest (stress) of kregen ze een combinatie van deze twee behandelingen (vocht & stress). De bolrotpercentages door het standaard uitzieken zijn weergegeven als dichte balken. De bolrotpercentages die mogelijk geforceerd zijn door de behandeling zijn weergegeven als open balken. Tevens is weergegeven het percentage bolrot in de bolrotpartij vlak na en 20 dagen na het rooien. Verticale lijnen boven de kolommen drukken de grootte van de standaarddeviaties uit. Verschillende letters drukken significante verschillen uit (ANOVA, $P=0.05$).

4.3.2 Optimalisatie praktijktoets: voorkomen van kruisbesmetting

Uit de vorige proef bleek dat een veel hoger percentage bolrot gevonden werd in de monsters met een behandeling (stress, vocht of een combinatie) ten opzichte van de onbehandelde controle. Een mogelijke verklaring hiervoor was dat dit veroorzaakt werd door kruisbesmetting. Daarom zijn in een vervolgproef de bollen met een reinigingsmiddel behandeld en apart gehouden door ze in tulpen prikbakken (voor de tulpenbroeierij) te leggen.

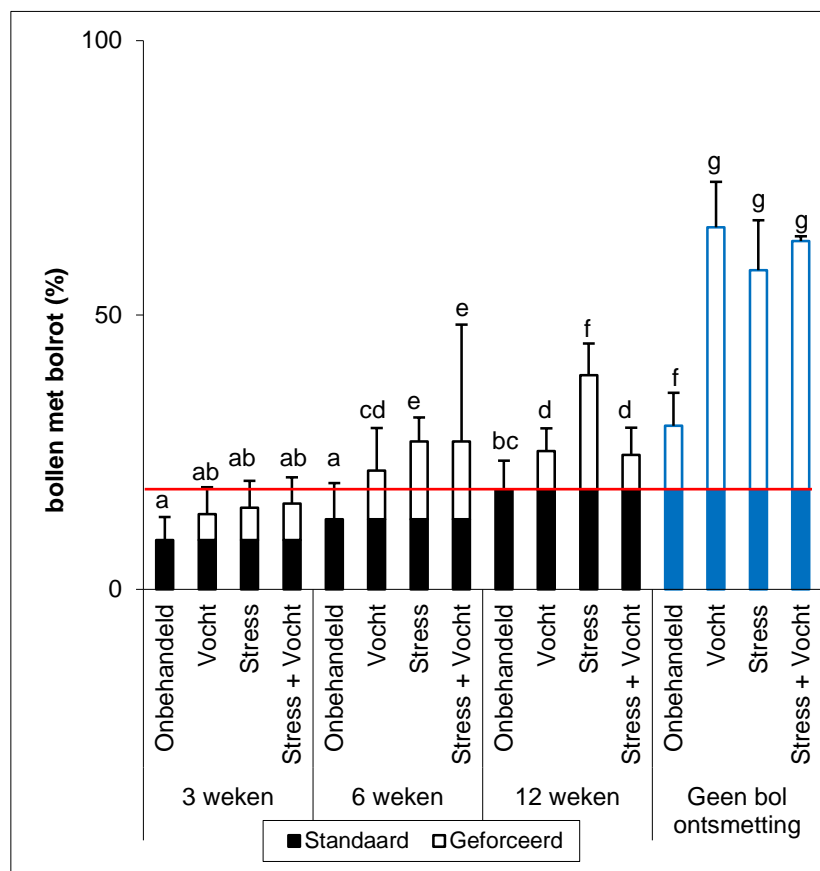
Drie weken na het inzetten van de toets werd voor de eerste keer het percentage bolrot vastgesteld (Figuur 3). De controle (onbehandeld) bevatte toen 9%, terwijl er in de overige behandelingen tussen de 14 en 16% bolrot gevonden werd. Na 6 weken werd wederom het bolrot percentage vastgesteld. De onbehandelde controle had 13% bolrot. De bolrot percentages van de behandelingen waren 22% (vocht) en 25% (stress en de combinatie van de behandelingen). Na 12 weken werd er 18% in de onbehandelde controle gevonden, terwijl er in de behandelingen 25% (vocht en stress & vocht) en 39% bolrot (stress) gevonden werd. Het blijkt dat de percentages bolrot met het standaard 12 weken (rode lijn in Figuur 3) uitzieken tevens worden behaald na zes weken en een bolbehandeling.

Hoger percentage bolrot dan normaal uitzieken

Uit de resultaten blijkt dat het niet ontsmetten van de bollen voorafgaand aan de proef heeft geresulteerd in hogere bolrotpercentages. In monsters zonder deze behandeling lagen de bolrotpercentages tussen de 30% en 66% (Figuur 2, blauwe balken). Hieruit mag opgemaakt worden dat in de eerste biotoets (Figuur 2) het percentage bolrot beïnvloed is door kruisbesmetting tijdens de behandelingen.

Conclusie

Uit de proeven blijkt dat het mogelijk is het percentage bolrot tenminste 6 weken eerder te bepalen dan het normale uitziektermijn van 12 weken. Om meer inzicht te krijgen in de relatie tussen het percentage bolrot na 6 weken (of 3 wk) uit de behandelingen en het uiteindelijke percentage bolrot is het noodzakelijk meerdere praktijkpartijen te toetsen. Op deze manier wordt dan duidelijk hoeveel het gevonden percentage na 6 weken (of na 3 weken) structureel hoger is dan het uiteindelijke percentage met het op natuurlijke wijze uitzieken van de partij. Op deze manier is het dan voor de teler mogelijk om het percentage bolrot te voorspellen.



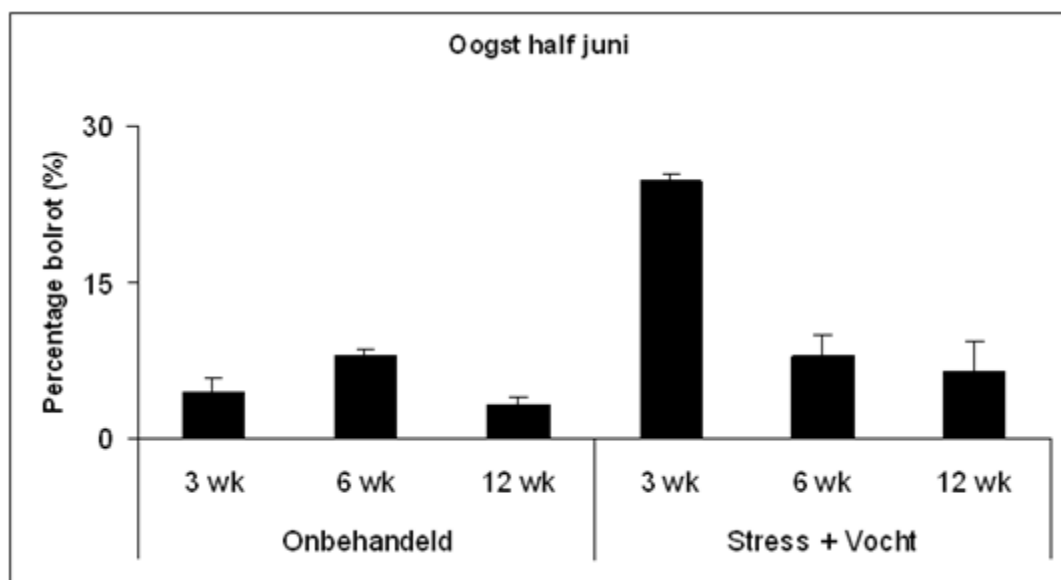
Figuur 3. Percentage bollen met bolrot na drie, zes en twaalf weken waarbij wel of geen kruisbesmetting opgetreden is. Voor het opwekken van de latente bolrotinfecties zijn de bollen vochtig weggelegd (vocht), mechanische gestrest (stress) of een combinatie van deze twee behandelingen (vocht& stress). De bolrot percentages door het standaard uitzieken (per tijdstip) zijn weergegeven als dichte balken. De bolrot percentages die mogelijk geforceerd zijn door de behandeling zijn weergegeven als open balken. De rode lijn geeft het percentage bolrot in de partij weer ontstaan door twaalf weken standaard uitzieken. Tevens is weergegeven het percentage bolrot van bollen die niet van te voren ontsmet waren met een ontsmettingsmiddel om kruisbesmetting te voorkomen (blauwe balken). Lijnen drukken standaard deviaties uit. Verschillende letters drukken significante verschillen uit (ANOVA, P=0.05).

4.3.3 Vroegrooien

In overleg met een narcissenteler bleek dat voor een optimale toepassing van de toets de uitslag voor 5 augustus (de uiterste exportdatum) bekend zou moeten zijn. Hiervoor is het noodzakelijk zes weken voor deze datum de toets te starten. Dit betekent dat de gebruikte bollen vervroegd geroid worden, dus voor de normale rooidatum. De bollen zijn behandeld door ze vochtig weg te leggen en te prikken op een tulpenprikbak (mechanische stress). Na drie, zes en twaalf weken werd het bolrot percentage vastgesteld. De resultaten laten zien dat geen toenemend percentage bolrot werd gevonden tussen de opeenvolgende beoordelingsmomenten (Figuur 4). Zo werd er in de onbehandelde controle 4, 7 en 3 % bolrot gevonden na respectievelijk 3, 6 en 12 weken. De bollen die de behandeling ondergaan hadden, hadden met uitzondering van de score na 3 weken geen hogere percentages bolrot dan de controle.

Conclusie

Het vervroegd rooien van de bollen zodat de praktijktoets voor de uiterste exportdatum uitgevoerd kan worden, werkte in deze proefopzet niet. Mogelijk geeft een steekproef met een grotere opgezet meer duidelijkheid.



Figuur 4. Percentage bolrot van narcissen die vervroegd geroid zijn en al dan niet behandeld zijn om de latende bolrot infecties te laten uitgroeien. Na 3, 6 en 12 weken is het percentage bolrot bepaald. Lijnen drukken standaarddeviaties uit.

4.4 Conclusie en discussie praktijktoets bolrot

- Na zes weken is het mogelijk een indicatie van het percentage bolrot voor standaard uitzieken te voorspellen. Dit kan zo mogelijk ook al na drie weken. Het is noodzakelijk de relatie tussen de behandelingen en het daarmee voorspelde percentage bolrot te koppelen aan het standaard uitzieken. Dit kan door meerdere onafhankelijke praktijkpartijen te testen.
- Het percentage bolrot ligt hoger in de bollen die vooraf niet ontsmet zijn. Het ontsmetten van de bollen voorkomt kruisbesmetting waardoor de ontstane bolrot tijdens de proef alleen te wijten is aan de uitgroei van latente bolrotinfecties.
- In de tweede proef vallen de bolrotpercentages in de monsters die behandeld zijn ten opzichte van de onbehandelde monsters hoger uit. Kruisbesmetting is grotendeels uitgesloten omdat de bollen vooraf ontsmet zijn. Een verklaring voor het hoger uitvallen van de percentages zou kunnen zijn dat het standaard uitzieken niet optimaal is verlopen.
- Het vroeger rooien van de bollen zodat de uitslag van de proef bekend is voor de uiterste exportdatum (5 augustus), werkte met deze proefopzet niet.

4.4.1 Protocol praktijkproef

Het volgende protocol is ontwikkeld om het voor de teler/handelaar/exporteur zelf mogelijk te maken het percentage bolrot in te schatten van een partij.

- Selecteer random 300 narcisbollen en behandel deze met een reinigingsmiddel
- Prik de bollen op een tulpenprikbak om kruisbesmetting te voorkomen.
- Verpak de tulpenprikbak in plastic nadat de bollen met de plantenspuit vochtig zijn gemaakt. Verwijder na 3 weken het plastic.
- Snij na 6 weken de bollen door, tel het aantal zieke bollen en bereken het bolrotpercentage.

4.4.2 Kosten praktijkproef

Een praktijktoets moet eenvoudig uitvoerbaar zijn en de kosten moeten beperkt blijven. Hiervoor is gevraagd om een kostenraming te maken voor het uitvoeren van een praktijktoets (tabel 1). Voor het uitvoeren van de proef zijn tulpenprikbakken nodig. Deze zijn niet meegenomen in de kostenberaming omdat deze voorradig geacht worden en herbruikbaar zijn.

Overzicht van geschatte tijd voor het inzetten en scoren van de praktijktoets bolrot in narcissen

Handeling/materiaal	tijd	geld
Bollen		Cultivar afhankelijk
Nemen van bollenmonster	30 minuten	
Bolbehandeling	Max. 1 uur	
Score van bollen	2 uur	

5 *Fusarium* opwektoetsen met behulp van zieke-bolextracten

Het is tot nu toe onbekend wat precies een latente infectie bij bolrot inhoudt. De schimmel groeit dan langzaam of helemaal niet. Of misschien is zo'n latente infectie alleen maar één spore die later in de tijd kiemt en een infectie veroorzaakt. Het is tot nu toe niet mogelijk de latente infectie op te wekken door bijvoorbeeld de bollen te dompelen in een bepaald groei-stimulerend stofje. Dit zou namelijk perspectief bieden voor het eerder opsporen van latente infecties. In dit onderdeel is geprobeerd de *Fusarium* infectie op te wekken door bollen te dompelen in een extract gemaakt van zieke bollen. Het idee hier achter was dat de schimmel in de zieke bol volop groeit wat mogelijk een stimulans zou kunnen zijn voor de schimmel die latent aanwezig is in de bol.

Een verkennende proef

In een eerste kleine proef zijn gezond uitziende bollen gedompeld in een extract van zieke bollen. Deze zieke bollen waren ingevroren, ontdooid en daarna vermalen in de blender (3 minuten). De verse bollen zijn in het extract gedompeld en daarna warm weggelegd (20°C). Na 3 weken bleek dat alle bollen aangetast waren. Het was niet duidelijk of alle bollen van te voren besmet waren of dat mogelijk de *Fusarium*-sporen het invriezen hebben overleefd waardoor alle bollen dus door het dompelen besmet werden.

Fusarium ontwikkeling op voedingsbodem met bolextract

Naar aanleiding van het eerste experiment zijn bolextracten door de voedingsbodems van *Fusarium* gemengd. Op deze manier is het mogelijk te zien of de bolextracten daadwerkelijk de groei van *Fusarium* beïnvloeden en mogelijk zelfs stimuleren.

De bolextracten (bevroren, ontdooid en fijngemalen) zijn gemaakt van zieke tulpen- of narcissenbollen. Vervolgens zijn de extracten door twee verschillende voedingsbodems gemengd. Capex Dox Agar is een relatief arme voedingsbodem voor schimmels. Water-Agar is een voedingsbodem uitsluitend uit Agar en is daarmee de meest arme voedingsbron. Op de platen werden *Fusarium*-isolaten specifiek voor tulp (Tu 67) en narcis (Na 11) in het midden aangebracht. De schimmelgroei is visueel beoordeeld na 4 dagen groei bij 24°C.

De resultaten staan beschreven in

Tabel 11. Op een minder rijke voedingsbodem heeft een schimmelkolonie een ijle groei met weinig luchtmycelium. Op rijkere voedingsbodems produceert de schimmel juist meer luchtmycelium met sporen. Het is duidelijk dat de bolextracten van narcis geen groei stimulerend effect hadden op de verschillende Fusarium isolaten. Wel lijkt het er op dat het tulpenextract een stimulerend effect had op beide Fusarium isolaten. Echter, dit bleek niet zo zeer uit de groeisnelheid maar uit het feit dat de koloniestructuur anders was. De effecten waren in zijn totaliteit niet overtuigend genoeg om dit onderdeel verder uit te diepen.

Conclusie

Het stimuleren van latente infecties door middel van zieke bolextracten lijkt niet te werken.

Tabel 11. Beschrijving de visuele beoordeling van de koloniegroei van verschillende fusariumisolaten specifiek voor narcis en tulp op twee verschillende voedingsbodems waar zieke boleextracten van tulp of narcis aan toegevoegd zijn.

voedingsbodem	Extract	Fusarium isolaat	
		Narcis (Na 11)	Tulp (Tu 67)
Capex Dox agar	Geen	normale groei	Normale groei
	Tulp	Rijkere groei Stimulering?	Rijkere groei Stimulering?
	Narcis	Normale groei	Mindere groei Remming?
Water-Agar	Geen	IJle groei	IJle groei
	Tulp	Rijkere groei Stimulering?	Rijkere groei Stimulering?
	Narcis	Mindere groei Remming?	Mindere groei Remming?

6 Narcis: hoe effectief is het geïnduceerde uitzielen?

Wanneer een partij een geschiedenis kent met bolrot, hoeveel bollen zijn er dan besmet? Kan met een vocht- en stressbehandeling al het latent aanwezige bolrot worden opgewekt? Het antwoord op deze vragen is gezocht in het testen van de aanwezigheid van Fusarium op bollen die een behandeling hebben ondergaan in de praktijktoets. Bolbodems van gezond ogende bollen uit de stress- en vochtbehandeling zijn gebruikt voor een PCR toets (25% van de bollen uit deze toets hadden bolrot). Van de gezond ogende bollen (de overige 75%) bleek op basis van de PCR-toets 83% besmet te zijn met Fusarium. Omgerekend betekent dit dat er in totaal 87% van de bollen besmet zijn (25% bolrot uit de praktijktoets plus 62% uit de PCR-toets ($83 \cdot (75/100) = 62\%$). Hieruit blijkt dat het er een groot verschil is tussen het daadwerkelijk bolrot ontwikkelen en besmet zijn (er is wel Fusarium aanwezig/detecteerbaar, maar de bollen worden niet rot tijdens de praktijktoets). De PCR toets maakt op dit moment geen onderscheid tussen deze twee vormen van aanwezigheid van Fusarium. Mogelijk komt er in de toekomst een PCR toets waarbij dit wel onderscheid mogelijk is. Tot die tijd is een PCR-toets niet geschikt om het bolrotpercentage van een partij vast te stellen.