

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

Auteurs Robert Dees, Wendy Martin en Joop van Doorn

© 2009 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: 32 340538 00 (PT 13061)

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 – 46 21 21

Fax : 0252 – 46 21 00

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
1.1 ACHTERGROND	7
1.2 DOELSTELLINGEN	8
1.3 GEBRUIKTE TERMEN EN AFKORTINGEN	8
2 MATERIAAL EN METHODEN	9
2.1 KWEK EN ANALYSE VAN <i>ERWINIA</i>	9
2.1.1 Gebruikte isolaten en bolmateriaal.....	9
2.1.2 Monsterverwerking en opkweek	9
2.1.3 Spiking met <i>Erwinia chrysanthemi</i> (Ech) in hyacint, Muscari, iris en Zantedeschia	9
2.1.4 PCR-analyse	9
2.1.5 DAS-ELISA voor <i>Erwinia chrysanthemi</i>	10
3 LOKALISATIE VAN <i>ERWINIA</i> IN HYACINTENBOLLEN	11
3.1 UITVOERING	11
3.2 RESULTATEN	11
3.3 CONCLUSIE & DISCUSSIE	12
4 VOORKWEK EN GEBRUIK VAN PECTINE	13
4.1 UITVOERING	13
4.2 RESULTATEN	14
4.3 CONCLUSIE EN DISCUSSIE	14
5 SPIKING VAN BOLSAP VAN HYACINT, ZANTEDESCHIA, MUSCARI EN IRIS MET <i>ERWINIA CHRYSANTHEMI</i>	15
5.1 OPTIMALISATIE DAS-ELISA MIDDELS SPIKING VAN BOLSAP VAN HYACINT MET ECH	15
5.1.1 Uitvoering	15
5.1.2 Resultaten.....	15
5.2 TOETSING VAN BOLSAP VAN HYACINT, ZANTEDESCHIA, MUSCARI EN IRIS MET ELISA EN PCR NA SPIKING MET ECH	17
5.2.1 Uitvoering	17
5.2.2 Resultaten.....	17
5.3 CONCLUSIES EN DISCUSSIE	18
6 PCR-TOETSING VAN DAHLIA OP DE AANWEZIGHEID VAN <i>E.CHRYSANTHEMI</i>	19
6.1 UITVOERING	19
6.2 RESULTATEN	19
6.3 CONCLUSIE EN DISCUSSIE	20
7 TOETSEN VAN PRAKTIJKMONSTERS OP <i>ERWINIA</i>: WERKBOLLEN VAN HYACINTENCULTIVARS	21
7.1 UITVOERING	21
7.2 RESULTATEN	21
7.3 CONCLUSIE EN DISCUSSIE	23
8 ALGEMENE CONCLUSIES EN DISCUSSIE	25
9 OVERLEG EN OUTPUT	27

10	LITERATUUR.....	29
11	BIJLAGE.....	31

Samenvatting

De problemen in de bloembollenteelt zijn de laatste tien jaar sterk toegenomen. Voorheen was de aanwezigheid van *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc, nu *Pectobacterium carotovorum*) als witsnot in vooral hyacint bekend, maar gaf vrijwel nooit grote uitval in de teelt. Er zijn momenteel geen middelen om deze zachtrotbacteriën te bestrijden. Preventie via toetsing van vooral uitgangsmateriaal is een van de mogelijkheden om infectie met *Erwinia* vroegtijdig vast te stellen en verdere verspreiding in de keten te beperken. Daarom is de vraag vanuit de praktijk (telers, handelshuizen) naar toetsing van vooral hyacintenbollen op aanwezigheid van een infectie van *Erwinia* groot. *Dickeya*-soorten, voorheen *Erwinia chrysanthemi* (Ech), de veroorzaker van agressief snot geven op dit moment de grootste problemen voor de hyacintenteelt.

Om vroegtijdig (latente) infecties met *Ech* te kunnen detecteren in bollen van hyacint, iris, Muscari, en knollen van *Zantedeschia* (en *Dahlia*) zijn protocollen opgesteld voor toetsing middels DAS-ELISA en PCR na een zg. voorkweekstap in semispecifiek groeimedium van verdacht materiaal.

Aspecten van de lokalisatie van *Erwinia* in de bol, het gebruik van verschillende verrijkmingsmedia, de incubatie- en voorkweekcondities, de gevoeligheid van de toets middels "spiking" (toevoeging van bekende aantallen bacteriën) en toetsing van praktijkmonsters zijn onderzocht voor een aantal bol- en knolgewassen welke vatbaar zijn voor *Erwinia*-infectie. Daarnaast is een grootschalig experiment betreffende toetsing van werkbollen van hyacint uitgevoerd om te zien in hoeverre het opgestelde protocol toepasbaar was.

Om dit te onderzoeken zijn enkele basistechnieken gebruikt zoals kweek van opgeslagen isolaten van diverse *Erwinia*-soorten (Ech, Ecc, Eca), het isoleren van *Erwinia* uit bolmateriaal, het toevoegen (spiking) van *Erwinia* aan bolmateriaal, opkweek van *Erwinia* op verschillende media, PCR-analyse van monstermateriaal en toepassing van serologische toetsing (DAS-ELISA).

Bij onderzoek naar de lokalisatie van *Erwinia* bleek, dat een latente infectie met *Ech* zich vooral in de bolneus bevindt en niet homogeen verspreid door de hele bol aanwezig is. Voor dit moment lijkt het bemonsteren van zowel de neus als de bolbodem het meest zeker. Om de hoeveelheid monstermateriaal te verminderen kan het middenstuk van de bol worden weggelaten. Door het nemen van een stukje bolmateriaal uit neus en bodem kunnen 5 bollen worden gepoold en tezamen worden geanalyseerd; dit bespaart tijd en kosten.

Om gericht op (zeer) kleine hoeveelheden *Erwinia* in bolmonsters te kunnen toetsen is een vermeerderingstap (verrijkingstap) noodzakelijk. Hiertoe is het vaststellen welk type pectine het beste te gebruiken is als enige C-bron in vloeibaar verrijkmingsmedium van belang. Belangrijk is dus de juiste (en commercieel beschikbare) pectine te kiezen om vooral *Erwinia* te selecteren. Een product van Sigma bleek het beste te zijn. Verder bleek een voorkweekstap van twee dagen het meest optimaal.

Zowel de DAS-ELISA als de PCR zijn gevoelige methoden voor het detecteren van een latente *Ech*-infectie in de bol of knol van hyacint, *Zantedeschia*, iris en Muscari. Het is gebleken, dat PCR bij direct testen (dus zonder DNA-isolatie) gevoelig is voor storende componenten in het plantsap. Isolatie van het DNA voor PCR heeft dan ook de voorkeur (concentreert monster, minder remmende componenten). Echter, hier kan een te hoge concentratie DNA tot een vals-negatief resultaat leiden. De DAS-ELISA lijkt wat dat betreft minder storingsgevoelig, maar is minder gevoelig en het antiserum kan in enkele gevallen een vals-positieve reactie geven.

Zowel knol- als stekmateriaal van *Dahlia* bleken goed toetsbaar met PCR op een latente infectie van *Ech*, waarbij het toetsen van stekken een beter resultaat opleverde dan knolmateriaal.

Om de ontwikkelde protocollen te testen zijn 8 partijen werkbollen getoetst op de aanwezigheid van Ech en Ecc via PCR en ELISA. Er was een redelijk goede correlatie tussen de toetsuitslagen (ELISA en PCR) enerzijds, en visuele analyse van deze partijen werkbollen anderzijds. De DAS-ELISA bleek daarbij minder gevoelig dan de PCR.

Dit project heeft gezorgd voor een belangrijke stap richting routinematige analyse van bloembolmonsters op *Erwinia* welke de komende tijd zal worden opgepakt door de keuringsdiensten.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Eind jaren '90 van de vorige eeuw vonden de eerste duidelijke gevallen van een nieuw zachtrot in bloembollen plaats. Het nieuwe zachtrot werd vooral bij hyacint gevonden, maar ook bij gewassen als Muscari en iris (Van Doorn *et al.*, 2005). Bij hyacint was voorheen witsnot bekend: deze werd veroorzaakt door *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc). Het verschil tussen dit "oude zachtrot" en het "nieuwe agressieve snot" (Ech) was enerzijds de grotere aantallen bollen die werden aangetast (hogere percentage uitval), anderzijds de grotere snelheid en mate van aantasting (agressiviteit). Ook werd geconstateerd, dat dit rot bij hogere temperaturen voorkwam dan dat veroorzaakt door Ecc.

De rotproblemen in de bloembollen, waarschijnlijk veroorzaakt door de bacterie *Erwinia chrysanthemi*, leidt tot grote schade in de hele keten. Zowel telers als de broeierijen en exporteurs worden getroffen. Ook de aardappelsector ondervindt grote economische schade door rot veroorzaakt door *Erwinia*. In de periode van 2003 tot 2007 werd 16% van de oppervlakte pootaardappelen gedeclasseerd of afgekeurd als gevolg van *Erwinia*. De totale schade over deze periode was gemiddeld 12 miljoen euro per jaar. In 2007 waren de totale kosten zelfs dubbel zo groot (Prins en Breukers, 2008). Cijfers voor de bollensector zijn niet voorhanden, daar er niet op *Erwinia* wordt gekeurd of getoetst; geschat wordt dat de schade (in de teelt en export) jaarlijks tussen de 4 en 8 miljoen euro bedraagt.

De problemen met *Erwinia* in hyacint zijn groot en zijn de afgelopen 10 jaar sterk toegenomen, hoewel onderhevig aan seizoensfluctuaties (warme, vochtige voorjaren zijn vaak voorbodes van een "Erwinia-jaar" zowel in de bollen als bij de aardappel). Kenmerkend zijn het leeglopen van de bollen tijdens de bewaring, de zogenaamde leeglopers. De uitval als gevolg van (agressief) rot was in 2007 aanzienlijk. In sommige gevallen gingen zelfs hele partijen verloren. De grootste uitval van bollen vindt hierbij plaats tijdens de bewaring, waarin *Ech* sneller en agressiever lijkt toe te slaan dan zijn al langer bekende broertje *Ecc*. Ook in andere bolgewassen is zachtrot een probleem. In het gewas Dahlia zijn er bewijzen dat *Erwinia* betrokken is bij het verschijnsel "ploffers" (natrot). In sommige partijen Dahlia's vielen hoge percentages knollen weg waardoor de stekproductie van deze soorten erg werd bemoeilijkt (PT-project 330793: ploffers in Dahlia).

Bij Zantedeschia is *Erwinia* al lang een probleem en kan soms tot 30% uitval geven in de teelt; ook bij export van partijen leidt *Erwinia*-aantasting tot aanzienlijke schade. Hier is met name *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) een probleem. In iris werd sinds enkele jaren dramatisch veel uitval door zachtrot geconstateerd. Er waren aanwijzingen dat een *Erwinia*-soort betrokken zou zijn bij dit "stinkend zachtrot" of zelfs hoofdveroorzaker zou zijn (PT project 330921). Pas de laatste jaren is zachtrot aangetroffen in de bewaring van irisbollen; ook bij het rooien werd dit gevonden.

In de voorjaarsbloeiër Muscari worden ook steeds grotere problemen geconstateerd met rotverschijnselen.

Uit onderzoek is gebleken, dat *Erwinia* waarschijnlijk aanwezig is het uitgangsmateriaal. Het is daarom van groot belang om met schoon uitgangsmateriaal (bijvoorbeeld holbollen) te starten. Om dit te bereiken moet er getoetst kunnen worden voor *Erwinia* op o.a. werkbollen, maar ook te exporteren partijen enz..

Technieken als kweken op voedingsbodem, serologische analyses zoals Luminex en ELISA, en vooral DNA-technieken als PCR en real-time PCR zijn methoden die in aanmerking komen om latente partijen te toetsen voor besmetting met *Erwinia*.

Dit onderzoek heeft zich met name gericht op de ontwikkeling van een toets voor de detectie van *Erwinia chrysanthemi* en *Erwinia carotovora* sp in hyacintebollen (maar ook in Muscari, Dahlia, iris en Zantedeschia) door middel van PCR en ELISA om in principe gebruikt te kunnen worden door de keuringsdiensten.

1.2 Doelstellingen

Als overkoepelde, algemene doelstelling van dit project is geformuleerd het opstellen van robuuste protocollen voor ELISA (*E. chrysanthemi*) en DNA-toetsing (*E. chrysanthemi*, *E. carotovora* sp.) voor de identificatie en detectie van *Erwinia* in bollen van hyacint, iris, Muscari, en knollen van Zantedeschia en Dahlia met als doel om niet-zichtbare (latente) infecties vroegtijdig te detecteren. Dit is opgedeeld in:

- Het optimaliseren en protocolleren van de behandeling (voorkweekstappen, lokalisatie van *Erwinia* in monsters, storende werking van bolsappen e.d.) van de verschillende bol- en knolmonsters (hyacint, iris, Muscari en Zantedeschia). Zie hoofdstuk 2, 3 en 4.
- Het toepassen van ELISA op monsters, verdacht van *E. chrysanthemi*: protocollering, welk deel monsters, gevoeligheid, controles enz.) in overleg met de BKD (hoofdstuk 5).
- Het toepassen en protocollering van PCRs op *E. chrysanthemi*, en op *E. carotovora* subsp. *carotovora* (i.o.m. BKD): hoofdstuk 6.
- Het testen van praktijkmonsters hyacint (werkbollen) middels de ontwikkelde protocollen (hoofdstuk 7).
- Evaluatie van de opgestelde protocollen en de mogelijkheden tot het beschikbaar maken van de protocollen voor het bedrijfsleven (keuringsdiensten) voor verdere implementatie (hoofdstuk 8).

1.3 Gebruikte termen en afkortingen

Cfu = kolonievormende eenheden: levende bacteriën geteld via het uitplaten van verdunningen op groeiplaten

Ech = *Erwinia chrysanthemi*. Volgens een nieuwe taxonomische indeling *Dickeya* spp, waar er momenteel een 6-tal van worden onderscheiden; in hyacint komen waarschijnlijk vooral *D. dadanthi* en *D. zaeae* voor.

Ec = De *Erwinia*-carotovora-groep (Eca en Ecc samen)

Eca = *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, volgens de nieuwe taxonomische indeling *Pectobacterium atrosepticum*. Deze komt nauwelijks voor in bolgewassen, hoewel dit niet uitgebreid onderzocht is.

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

ELISA = Serologische techniek om bv. bacteriën in plantmateriaal aan te tonen via een kleurreactie.

NA = nutriënt agar, algemeen voedingsmedium voor bacteriën.

OD = Optische dichtheid voor bepalen van de aantallen bacteriën in een cultuur door lichtmeting.

PBS = Fosfaatgebufferde zoutoplossing, waardoor bacteriën in goede conditie blijven

PCR = DNA-techniek, waarbij via een enzymreactie een klein stukje DNA, specifiek voor in dit geval *Erwinia*, wordt vermenigvuldigd, waardoor dit gevoelig en snel aantoonbaar wordt

Spiking = het toevoegen van bekende hoeveelheden bacteriën aan (in dit geval) plantmateriaal

VM = verrijkingsmedium of voorkweekmedium (een oplossing met een aantal zouten en het plantencelwandbestanddeel pectine) gebruikt voor semiselectieve groei van pectineafbrekende bacteriën (vooral *Erwinia*).

2 Materiaal en Methoden

In dit hoofdstuk worden de basistechnieken beschreven die gebruikt zijn voor het opzetten van toetsprotocollen. Voor de verklaring van gebruikte termen: zie de woordenlijst hierboven.

2.1 Kweek en analyse van *Erwinia*

2.1.1 Gebruikte isolaten en bolmateriaal

Voor het bepalen van de gevoeligheid van de PCR en DAS-ELISA werd bolmateriaal van de hyacinten cultivar "White Pearl" gespiked met een isolaat van *Dickeya chrysanthemi* (Ech 2804 (BCCM/LMG, Gent, België). Van hetzelfde isolaat is het DNA gebruikt als positieve controle in de PCR. DNA van *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LMG2408 (BCCM/LMG, Gent, België) is gebruikt als positieve controle in de PCR voor Ecc. Hyacintenbollen uit de praktijk werden getoetst op een latente infectie van Ech (cultivars "Carnegie", "Delft Blue", "Pink Pearl", "White Pearl" en "Purple sensation").

2.1.2 Monsterverwerking en opkweek

De huid van hyacintenbollen werd verwijderd, waarna de gepelde bollen werden ontsmet met 70 % ethanol en afgespoeld met kraanwater. De bodems en neuzen van 5 bollen werden gepooled en gehomogeniseerd 1:2 of 1:5 w/v met 1x PBS pH 7.4 in een blender gedurende 1,5 minuten. 50 ml van dit ruwe bolsap werd na blanderen via een steriele kaasdoek opgevangen. Na een centrifugestap van 10 minuten 3800 g werd het supernatant overgebracht naar een nieuwe buis en 12 minuten gecentrifugeerd bij 10.000 x g. Het pellet werd opgelost in 40 ml verrijkingsmedium met pH 7 (VM; De Boer en Kelman, 2001) en vervolgens 2 dagen bij 27 °C onder bijna anaerobe omstandigheden (in een gesloten 50 ml bluecap (Greiner Bio-one) zonder schudden) te incuberen.

2.1.3 Spiking met *Erwinia chrysanthemi* (Ech) in hyacint, Muscari, iris en Zantedeschia

Van hyacint, Muscari en iris werd 20 g bol/knolmateriaal verwerkt zoals beschreven in paragraaf 2.1.2. Na de stap met het steriele kaasdoek, werd de vloeibare fractie van het ruwe sap opgevangen in steriele erlenmeyers en gespiked met een o/n cultuur van *Dickeya chrysanthemi* LMG 2804 (OD_{660nm} van 0,1 (= 1×10^7 cfu) na afdraaien voor 10 minuten bij 13000 rpm en het oplossen van het pellet in 1x PBS (pH 7.4). Muscari, Zantedeschia en iris zijn gespiked met een 10^3 - en 10^5 -voudige verdunning van Ech. Hyacintensap is gespiked met een 10^{-3} , 10^{-5} en 10^{-6} verdunning van Ech. 1 ml van deze verdunningen in bolsap is toegevoegd aan 9 ml VM en voor 2 dagen te incuberen gezet bij 27 °C.

2.1.4 PCR-analyse

PCR op *Erwinia chrysanthemi* werd uitgevoerd met de primerset Ade1 en Ade2, specifiek voor het *peADE* gene cluster (Nassar *et al.*, 1996) of Y1 en Y2 (Darasse *et al.*, 1994) voor *Erwinia carotovora* spp. PCR werd uitgevoerd op 2.5 µl van een 5 x in PBS geconcentreerde verrijkingcultuur, of geïsoleerd DNA. DNA werd geïsoleerd met de Puregen Core kit A (Qiagen, GmbH, Hilden, Duitsland), waarvoor 1 ml van de

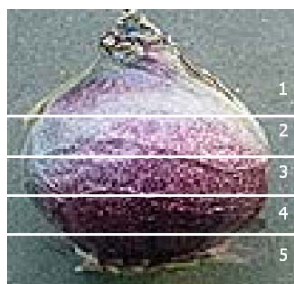
verrijkingcultuur werd gebruikt. DNA werd uiteindelijk opgenomen in 50 µl DNA hydratation solution en 2.5 µ van een 50 x verdunning gebruikt in PCR. Voor DNA amplificatie werd de PCR Master Mix van Promega (Madison, USA) gebruikt. De PCR condities zijn: 3 minuten 92 °C; 1 minuut 94 °C, 1 minuut 65 °C, 1.30 minuten 72 °C (36 cycli); 10 minuten 72 °C.

2.1.5 DAS-ELISA voor *Erwinia chrysanthemi*

Na 2 dagen verrijking in verrijkingmedium werd 1 ml monster afgedraaid bij 13000 rpm en opgenomen in 1 ml 1x PBS (pH 7.4). Na afdraaien voor 2 minuten bij 2000 rpm werd 200 µl van het supernatant overgebracht naar een PS microplate 96 wells (Greiner bio-one) gecoat met 1:1000 gamma-globuline (Ech (502); PrimeDiagnostics, Wageningen, Nederland). Platen werden o/n geïncubeerd bij 4 °C, gewassen met demiwater (ELx405 RS microplate washer, BioTek Instruments, Vermont, USA) en vervolgens 2 uur geïncubeerd met AP conjugate (1:4000; Ech (502); PrimeDiagnostics, Wageningen, Nederland) bij 37 °C. Platen zijn na 1 en 2 uur met substraat (PNPP) doorgemeten bij 405 nm.

3 Lokalisatie van *Erwinia* in hyacintenbollen

Het doel van lokalisatie-experimenten is om vaststellen waar *Erwinia* zich bevindt in (latent) geïnfecteerde hyacintenbollen: neus, rokken, bodem en spruit. Door vast te stellen waar *Erwinia* zich bevindt kan in de toekomst getoetst worden op goed gelokaliseerd (liefst kleine) hoeveelheden materiaal; dit biedt de mogelijkheid tot poolen van monsters om zo kosteneffectief te kunnen werken.



Figuur 1. Onderdelen van hyacint die getoetst zijn op *Erwinia*.

Hiervoor zijn visueel gezonde bollen uit zieke partijen gebruikt waardoor de kans op latent geïnfecteerde bollen aanwezig is. Deze bollen zijn in stukken verdeeld (Fig. 1) en onderzocht op *Erwinia*.

3.1 Uitvoering

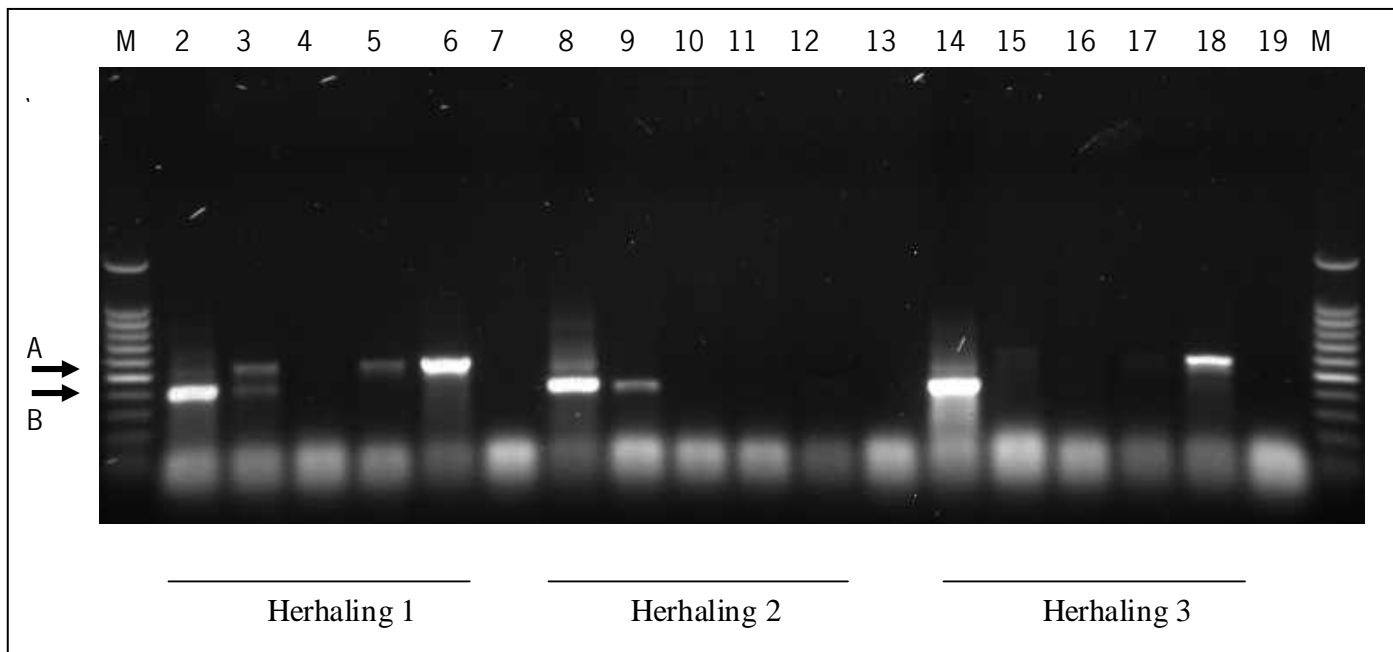
Bij deze proef werden 3 x 5 bollen uit een praktijkmonster van een latent geïnfecteerde partij van "Delft Blue" gebruikt, waarin eerder visueel snot was gezien.

Bollen werden na verwijdering van de huid en ontsmetting met 70 % ethanol per 5 gepooled en horizontaal in 5 stukken opgedeeld: de neus, 3 midden stukken en de bolbodem (Fig.1). De afzonderlijke delen werden gehomogeniseerd met de blender zoals beschreven in paragraaf 2.1.2, waarna 1 ml van het ruwe bolsap rechtstreeks aan 9 ml VM werd toegevoegd en voor 2 dagen werd weggezet, zonder schudden bij 27 °C. Na 2 dagen werd 1 ml van de verrijkingcultuur afgedraaid en 5x geconcentreerd in 1x PBS en getest in een PCR met de Ade1/Ade2 primerset (zie hoofdstuk 2).

3.2 Resultaten

Figuur 2 toont het resultaat van een PCR voor Ech op de verschillende boldelen. Ecc werd niet aangetroffen in deze partij. Naast de verwachte band grootte van 420 bp voor Ech, in vooral de bolneus van hyacint, wordt na PCR ook een fragment gevonden van ongeveer 600 bp. Dit fragment in figuur 2 aangegeven met de bovenste pijl, wordt vooral aangetoond in de bolbodem. Ook kunnen beide fragmenten samen voorkomen op dezelfde locatie in de bol. Verdere analyse door sequenzen laat zien dat het fragment van 600 bp op nucleotide-niveau over maximaal 482 nucleotiden voor 81-86 % identiek is met het helicase/SNF2 family-like domain protein gen van *Pseudomonas fluorescens* en *Pseudomonas syringae*.

Het lokalisatie-experiment is met hetzelfde resultaat herhaald met 10 individuele bollen uit dezelfde partij, waarbij de verschillende onderdelen fijn werden gesneden en rechtstreeks voor 2 dagen werden geïncubeerd bij 27 °C in VM (resultaten niet getoond).



Figuur 2. PCR met Ade1 en Ade2 op hyacintwerkbollen. PCR werd uitgevoerd in 3 herhalingen, waarbij per herhaling 5 bollen horizontaal werden opgedeeld in 5 stukken. 5 gelijke stukken afkomstig van 5 afzonderlijke bollen werden gepooled en gebruikt in een enkele PCR. Neus delen in de lanen 2, 8 en 14, bolbodems in lanen 6, 13 en 18. Laan 7, 13 en 19 = negatieve controle; M = 500 bp ladder.

3.3 Conclusie & discussie

Een latente infectie met Ech bevindt zich vooral in de bolneus en zit niet homogeen verspreid door de hele bol. Opmerkelijk is dat Ech niet werd aangetroffen in de bolbodem, ondanks dat in rotte bolbodems vaak Ech wordt aangetroffen. Dit was in een pilot experiment namelijk het geval (gegevens niet weergegeven). Dit kan te maken hebben met de gebruikte partij binnen dit experiment en het relatief beperkte aantal bollen dat voor toetsing binnen dit experiment is meegenomen. Voor het moment lijkt het bemonsteren van zowel de neus als de bolbodem dan ook noodzakelijk. Dit moet echter wel met (veel) meer bollen worden uitgevoerd ter bevestiging. Om de hoeveelheid monster te verminderen kan het middenstuk van de bol worden weggelaten.

De Ade1 primer kan een kruisreactie geven. Deze is gericht tegen het zg. pel-gen wat codeert voor een pectinase; ook andere bacteriën hebben dit gen en mogelijk ook homologe DNA-sequenties die hiervoor coderen. Bacteriën uit de groep *Pseudomonas* komen veel voor in grond, water en op planten en dieren. Naast dat een aantal *Pseudomonas*-soorten planten ziek kunnen maken, is van een aantal soorten juist bekend dat ze een antimicrobiële werking hebben tegen ziekteverwekkende bacteriën bij planten.

Pseudomonas fluorescens strain Pf-5 is hier een voorbeeld van en werkt o.a. tegen *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* (Paulsen *et al.*, 2006). Het is mogelijk, dat de 558 bp band op gel na PCR afkomstig is van bacteriën, die zich niet in de bol ophouden, maar in de grond die met de bol is meegekomen. Hoewel het materiaal vooraf wordt gewassen blijkt het soms lastig de bollen geheel vrij te maken van grond. Het 558 bp fragment komt ook voor in de neus. Deze waarneming spreekt tegen dat de bacterie met de grond is meegekomen. De vraag of niet alleen *Erwinia*, maar ook *Pseudomonas* rot kan veroorzaken bij de bolbodem van hyacint blijft hiermee open.

4 Voorkweek en gebruik van pectine

Om gericht op (zeer) kleine hoeveelheden *Erwinia* in bolmonsters te kunnen toetsen is een vermeerderingstap (verrijkingstap) noodzakelijk. Het doel: vaststellen welk pectine het beste te gebruiken is als substraat in vloeibaar verrijkingsmedium. Dit voorkweekmedium bevat pectine, een celwandpolymeer, als enige koolstofbron; enzymactiviteit (pectine-afbrekende enzymen) zijn noodzakelijk om koolstof vrij te maken om de bacterie te laten groeien. De C-bron-beperking geeft zo dit medium zijn semiselectieve karakter; bacteriën die deze enzymen niet hebben zullen niet groeien. Belangrijk is dus de juiste (en commercieel beschikbare) pectine te kiezen om vooral *Erwinia* te selecteren.

4.1 Uitvoering

Uit resultaten van De Boer en Kelman (2001) blijkt dat selectieve verrijking van *Erwinia* optreedt door voor te kweken in een arm medium met pectine.

In dit experiment zijn 6 verschillende pectines (Tabel 1) getest als substraat in verrijkingsmedium (VM) voor Ech LMG 2804 en Ecc LMG 2408 (BCCM/LMG, Gent, België). De pH van het VM werd gesteld op 6.

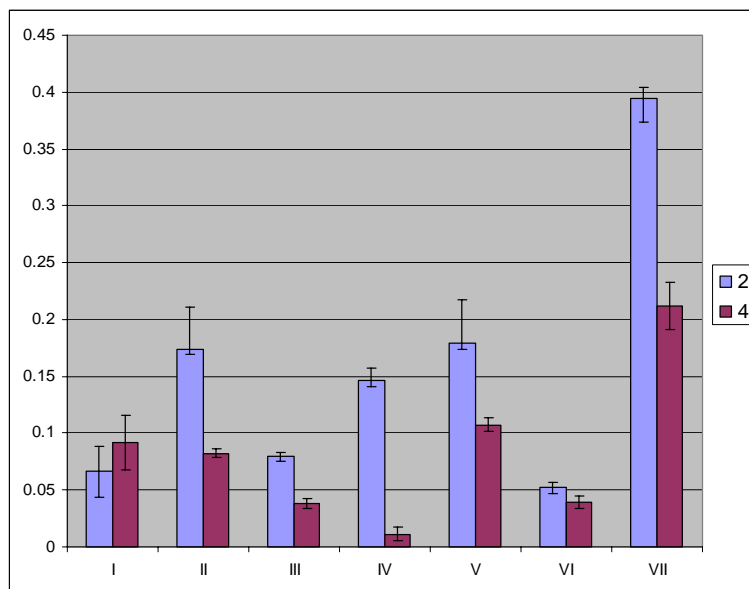
Bacteriën werden overnacht gegroeid in 3 ml Nutriënt Broth (Oxoid, Hampshire, UK) bij 27 °C. Voor de kweek met verschillende pectines zijn bacteriën verdund. Na kweek zijn de bacteriën gepelleterd door 5 minuten 3000 rpm te centrifugeren en vervolgens op te nemen in 1 x PBS met een eind OD_{600nm} van 0,05. 10 µl werd toegevoegd aan 5 ml VM, zodat een OD van 0,0001 werd verkregen. Het experiment werd in triplo uitgevoerd. Cultures werden weggezet voor 2 dagen, waarbij na 1 en 2 dagen de OD_{660nm} werd bepaald.

Tabel 1. Overzicht van geteste pectines.

I	Slendid R type 440 Low ester Pectin extract from citrus peel
II	Pectin Helias Frankrijk Sodium pectate, niet verder gespecificeerd
III	Herbstreith & Fox KG Pectin Classic AU 911
IV	Herbstreith & Fox KG Pectin Classic CU 902
V	Sigma Polygalacturonic acid P3850-100g sodium salt minimum 85% titration
VI	Sigma Pectin from citrus fruits P9135 [9000-69-5]

4.2 Resultaten

Fig. 3 toont de OD_{600nm} voor de verschillende pectines gemeten na 2 dagen in verrijkmingsmedium.



Figuur 3. OD_{600nm} voor de verschillende pectines na 2 dagen verrijking.

I = Slendid R type 440; II = Sodium pectate afkomstig van Helias; III = Pectin Classic AU 911; IV = Pectin Classic CU 902; V = Polygalacturonic acid P3850; VI = Pectin from citrus fruits P9135; VII nutrient agar (Oxoid, Hampshire UK); 2 = Ecc; 4 = Ech.

Over het algemeen groeit Ecc beter dan Ech. De hoogste OD's werden gemeten in het VM met het pectine van Helias (II), Pectin Classic CU 902 (IV) en Polygalacturonic acid P3850 (V). De groei van de bacteriën is duidelijk minder dan in Nutriënt Broth (VII).

Het experiment is herhaald. Oplossing IV liet hierin wederom een hogere dichtheid zien voor Ecc dan met Ech. Hetzelfde geldt voor oplossing V. Voor oplossing II was het resultaat echter tegenovergesteld. In beide experimenten doet *Erwinia* het slecht in oplossing I en VI.

4.3 Conclusie en Discussie

Het pectine afkomstig van Helias, P3850 van Sigma en Pectin Classic CU 902 van Herbstreith & Fox KG, geven een duidelijke toename van het aantal *Erwinia*-bacteriën in het verrijkmingsmedium. Het makkelijk commercieel verkrijgbare pectine van Sigma lijkt daarom de beste keuze. Het is een arm medium wat duidelijk blijkt uit het verschil in de dichtheid van de bacteriën gekweekt in Nutriënt Broth, maar is een veel betere keuze vanwege zijn selectiviteit. Op NA groeien namelijk veel soorten bacteriën, die *Erwinia* zouden kunnen overgroeien. Dit gebeurt niet bij kweek in het pectine-medium. Voor toepassing door keuringsdiensten kan het beste het pectine van Sigma gebruikt worden.

5 Spiking van bolsap van hyacint, Zantedeschia, Muscari en iris met *Erwinia chrysanthemi*

Het is van belang om de storende werking van bolmateriaal te meten, en de gevoeligheid van de toets te bepalen (drempelwaarden): welke aantallen *Erwinia*-bacteriën zijn nog meetbaar? Het doel van dit projectonderdeel is om vast te stellen wat de gevoeligheid van de ontwikkelde toetsen voor Ech is door spiking: het toevoegen van bekende hoeveelheden bacteriën aan plantmateriaal. Naast hyacint is onderzocht of in de gewassen Zantedeschia, Muscari en iris de ontwikkelde PCR- en ELISA voor Ech gevoelig en relatief storingsvrij werken.

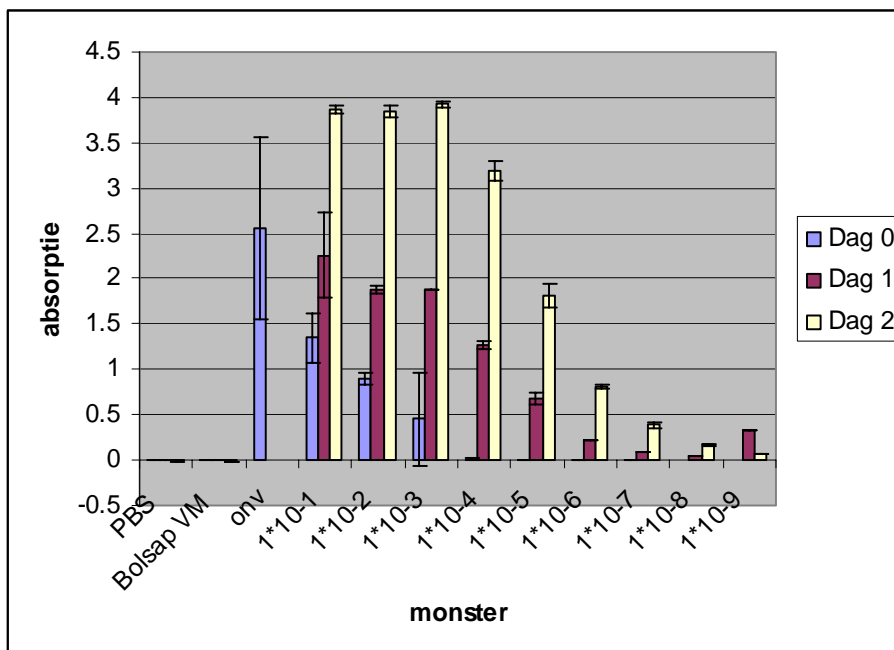
5.1 Optimalisatie DAS-ELISA middels spiking van bolsap van hyacint met Ech

5.1.1 Uitvoering

Het homogenaat, afkomstig van hyacintenbollen (paragraaf 2.1.2) werd in een verhouding van 1:5 met 1x PBS gemengd (dit mengsel is dan het bolsap). Na bezinking van de grove delen werd het bolsap gespiked met in bolsap doorverdunde verschillende concentraties van Ech 2804. De concentratie Ech in onverdund bolsap was 7.5×10^6 cfu. Eén deel bolsap werd toegevoegd aan 9 delen voorkweekmedium (VM) en vervolgens respectievelijk zonder voorkweek en na 1 en 2 dagen voorkweek bij 27 °C onder anaerobe condities bemonsterd. Het monster werd gecentrifugeerd en de pellet in een gelijk volume 1x PBS opgenomen. Uiteindelijk werd 200 µl van dit monster gebruikt in een DAS-ELISA (uitgevoerd in duplo).

5.1.2 Resultaten

Door verlenging van de incubatietijd verschuift de ondergrens voor de detectie van Ech in bolsap van 7.5×10^6 bacteriën per ml naar een enkele bacterie (Fig. 4). Dit laat zien dat verlenging van de incubatietijd een positief effect heeft op het detecteren van Ech in bolsap. Dit resultaat komt overeen met de resultaten verkregen uit de PCR (resultaten niet getoond). Een incubatietijd van 2 dagen verlaagt dus de detectiegrens.

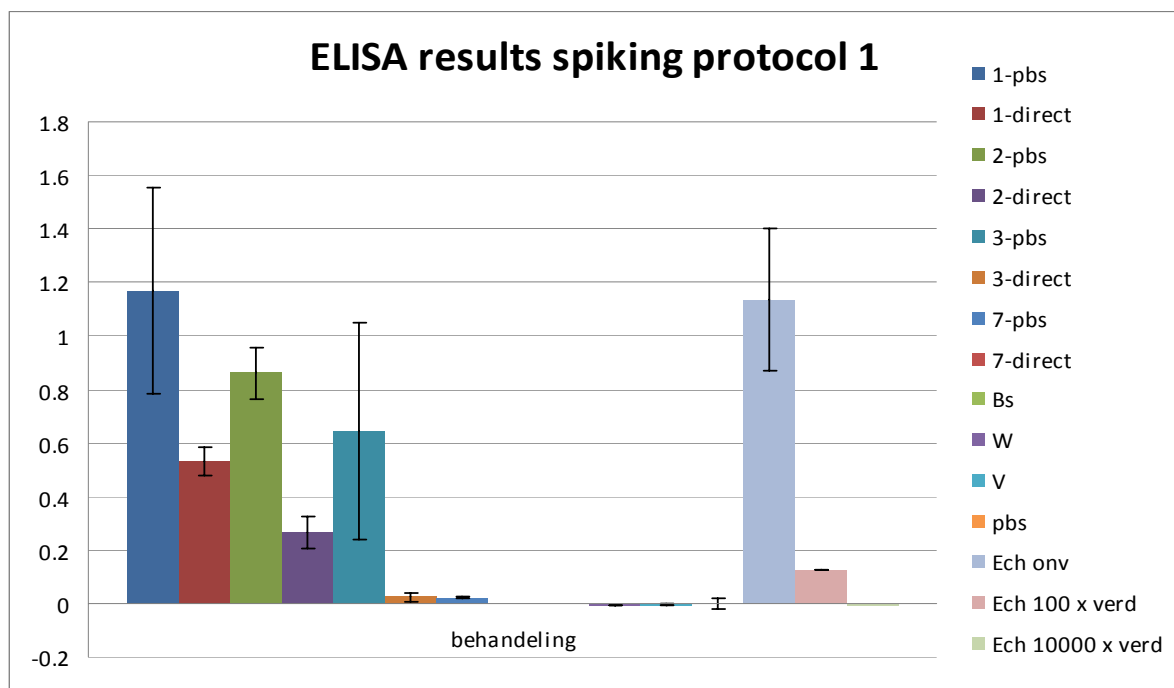


Figuur 4 Invloed van de incubatietijd (dagen) op de gemeten absorptiewaarden in de DAS-ELISA

Om te zien of het mogelijk was de voorkweekstap te combineren met de uitvoering van een DAS-ELISA werd het experiment tegelijkertijd uitgevoerd door ELISA-platen met het bolsap o/n bij 27 °C te plaatsen.

De absorptiewaarden met PBS als referentie zijn hoger in vergelijking met platen, die overnacht (o/n) zijn weggezet bij 4°C, maar de achtergrond neemt ook toe. In een tweede experiment, waarbij de ELISA werd ingezet bij 27 °C o/n na twee dagen voorkweek kwam de absorptiewaarde na 2 uur substraat bij 27 °C van niet-gespiked hyacint bolsap uit op 0.11.

Om te zien of gespiked hyacintenbolsap vanuit de voorkweek ook direct kon worden getoetst (zonder het eerst af te draaien en het pellet op te nemen in 1x PBS) is een ELISA ingezet en zijn de absorptiewaarden van deze twee opties met elkaar vergeleken in een DAS-ELISA. De resultaten staan weergegeven in figuur 5.2. Het experiment is uitgevoerd in duplo. Absorptiewaarden zijn weergegeven nadat de platen 2 uur zijn weggezet met substraat bij 27°C. Als referentiewaarde is 1 x PBS gebruikt. Het startinoculum bij behandelingen 1, 2, en 3 was respectievelijk 1.6×10^7 , 1.6×10^4 en 1.6×10^2 bacteriën per ml.



Figuur 5. Invloed van bolsap op het ELISA test resultaat in vergelijking met PBS. Nrs 1, 2 3 en 7 verwijzen naar het sample (bolsap: VM 1:9), dat direct is getoetst in een ELISA (= direct) dan wel is afgedraaid, waarna het pellet is opgenomen in PBS (= pbs). Bs = bolsap niet gespiked; W en V = negatieve controle van groeimedum (VM); PBS = negatieve controle van PBS. Ech onv = positieve contr. 1.6×10^7 bacteriën/ml; Ech 100x verd = positieve contr. 1.6×10^5 bacteriën/ml; Ech 100x verd = positieve contr. 1.6×10^3 bacteriën/ml.

De absorptiewaarden na opname van het pellet in PBS liggen hoger dan na het direct opbrengen van het voorkweekmedium op plaat. Er werden geen kruisreacties van het Ech antilichaam gezien met Ecc2408, Ecc2417 en Eca2392.

De ELISA's, uitgevoerd aan iris, Zantedeschia en Muscari zijn, samen met de resultaten van hyacint weergegeven in tabel 2.

5.2 Toetsing van bolsap van hyacint, Zantedeschia, Muscari en iris met ELISA en PCR na spiking met Ech

5.2.1 Uitvoering

Van belang is om te vergelijken hoe PCR en ELISA zich verhouden in de gspikede monsters. Daartoe zijn bol- en knolsap van hyacint, Muscari, iris en Zantedeschia verwerkt zoals beschreven in 2.1.2. Muscari, Zantedeschia en iris zijn gspiked met een 10^3 en 10^5 -voudige verdunning van een 1×10^7 cfu cultuur van Ech 2804. Hyacintensap werd gspiked met een 10^3 -, 10^5 - en 10^6 -voudige verdunning van dezelfde cultuur. Eén deel bolsap werd toegevoegd aan 9 delen VM en vervolgens na 2 dagen voorkweek bij 27 °C onder anaerobe condities bemonsterd. In dit experiment, uitgevoerd in duplo, is de gevoeligheid van de PCR (2.1.4) bekeken en vergeleken met de gevoeligheid van de DAS-ELISA procedure (2.1.5 Materiaal en Methode). Voor de PCRs werd het monster op de volgende manieren verwerkt:

- 1) 1 ml sample werd afgedraaid en het pellet opgenomen in 200 µl 1x PBS (pH 7.4). 2.5 µl werd direct gebruikt in een 25 µl PCR reactie met de Ade1/Ade2 primerset.
- 2) 1 ml monster werd ingevroren bij -20 C voor 1 dag. Na ontdooien werd monster afgedraaid en pellet opgenomen in 200 µl PBS 2.5 µl gebruikt in PCR.
- 3) 1 ml monster werd afgedraaid. Pellet werd verwerkt volgens het Qiagen protocol voor DNA-isolatie (zie 2.1.4). DNA werd opgenomen in 50 µl DNA hydration solution (kit); 2.5 µl van een 50x verdunning werd gebruikt in PCR.

5.2.2 Resultaten

Een overzicht van de uitkomsten van de PCR en ELISA is weergegeven in Tabel 2. De weergegeven aantallen bacteriën zijn de theoretische aantallen cfu (berekend n.a.v. de gebruikte verdunning) in het voorkweekmedium op $t=0$.

Tabel 2. PCR en DAS-ELISA analyse na spiking van bolsap van verschillende gewassen met Ech

	conc bact	ELISA	PCR	PCR	PCR 10dil	DNA isol
gewas	cfu/ml in VM	1 h	nf	af	af	nf
hyacint	3×10^3	+	- and +	- and +	+ and +	+ and +
	3×10^1	+	+ and +	+ and +	+ and +	- and +
	3×10^0	+	+ and -	+ and +	+ and +	+ and +
	-	-	-	-	-	-
Zantedeschia	3×10^3	+	-	-	-	+ and +
	3×10^1	+	+ and -	-	+	+ and +
	-	-	-	-	nd	-
iris	3×10^3	+	-	-	nd	+ and +
	3×10^1	+	-	-	nd	+ and +
	-	-	-	-	nd	-
Muscari	3×10^3	+	-	+ and +	nd	+ and +
	3×10^1	+	- and +	+ and +	nd	+ and +
	-	-	-	-	nd	-
+ undil	3×10^7	+	nd	nd	nd	nd
+ 100x	3×10^5	-/+	nd	nd	nd	nd
VM		-	-	-	-	-

Verklaring der tekens: nd = niet getest; nf = niet ingevroren materiaal; na = ingevroren materiaal; + = positief; - = negatief; PCR resultaten zijn resultaten van duplo-experimenten

De DAS-ELISA is voor alle samples met Ech positief. Dit geldt ook, m.u.v. 1 hyacinten monster, voor de PCR's op DNA gezuiverd uit de gespikte samples. Ech wordt wel aangetoond in de niet-ingevroren hyacinten-monsters, maar niet in de monsters van Zantedeschia en iris. Ook na invriezen van de Zantedeschia- en iris monsters wordt Ech met PCR niet aangetoond. De Muscari-samples zijn negatief, wanneer rechtstreeks getoetst in PCR. Na invriezen zijn dezelfde Muscari-samples wel positief.

5.3 Conclusies en discussie

Zowel de DAS-ELISA als de PCR zijn gevoelige methoden voor het detecteren van een latente Ech-infectie in de bol of knol van hyacint, Zantedeschia, iris en Muscari. Beide methoden zijn in staat een latente infectie van 3 cfu in 1 ml bolsap te detecteren. PCR lijkt bij direct testen (dus zonder DNA-isolatie) gevoelig voor storende componenten in het plantsap. Isolatie van het DNA voor PCR heeft dan ook de voorkeur (concentreert monster, minder remmende componenten). Echter, hier kan een te hoge concentratie DNA tot een vals-negatief resultaat leiden. De DAS-ELISA lijkt wat dat betreft minder storingsgevoelig. Een klein nadeel is dat het gebruikte antiserum in ELISA sporadisch een vals-positieve reactie kan geven (persoonlijke mededeling Dr. Jan van der Wolf PRI, WUR).

Invriezen van het sample heeft een positief effect op de verwerking bij een PCR "direct" op het monster; waarschijnlijk door het beter vrijkomen van DNA en het stukmaken van hoogmoleculaire polymere verbindingen (suikers e.d.) welke deel uitmaken van de in de bol of knol aanwezige reservestoffen. Voor Zantedeschia zou feitelijk met Ecc gewerkt moeten worden daar Ech daar nauwelijks of niet wordt aangetroffen; om praktische redenen en om de resultaten te kunnen vergelijken van de verschillende bolgewassen is dit niet uitgevoerd.

6 PCR-toetsing van Dahlia op de aanwezigheid van *E.chrysanthemii*

In Dahlia komen zg. ploffers voor: knollen die opzwellen en leeglopen door *Erwinia chrysanthemii*. Een specifiek probleem kan zijn dat er latent infectie met *Erwinia* kan zijn: symptoomloze besmetting met *E. chrysanthemii*. Voor telers is het van belang vanuit gezond uitgangs-en vermeerderingsmateriaal te kunnen telen.

Het doel van dit projectdeel is specifiek het aantonen van een (latente) infectie veroorzaakt door *Erwinia chrysanthemii* in symptoomloze Dahlia-stekken en -knollen. De aandacht richt zich op eventuele storende componenten in de PCR-toetsen.

6.1 Uitvoering

Stukjes blad en knol werden verzameld uit een gezonde partij Dahlia (nr. 17) en een aantal besmette partijen (nrs. 5, 9, 13 en 29) Dahlia. Stukjes blad en knol werden gewassen met kraanwater en aan de oppervlakte ontsmet met 70 % ethanol. De knol- en bladstukjes werden gehomogeniseerd (verhouding 1:10 w/v of 1:50 w/v in filter zakjes met 1 x PBS) in filterzakjes. Monsters werden verrijkt voor *Erwinia* door 1 ml homogenaat toe te voegen aan 9 ml VM en voor 1 of 2 dagen weg te zetten onder anaerobe omstandigheden bij 27 °C. Na 0, 1 en 2 dagen verrijking werden de monsters direct of na DNA-isolatie (zie 2.1.4) geanalyseerd met PCR.

6.2 Resultaten

Een overzicht van de resultaten is weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3. PCR analyse op Ech van Dahliaknollen en stekken afkomstig van verschillende partijen zonder of na 1 of 2 dagen verrijking.

partij	% ploffers	Verwerking	PCR Ech met Ade1/Ade2					
			zonder DNA isolatie (5x geconc)			met DNA isolatie (200 x geconc)		
			0 dpi	1 dpi	2 dpi	0 dpi	1 dpi	2 dpi
17	4%	1 knol 2 g 1:10	-	-	-	-	nd	-
		stek 2 g 1:10	-	-	-	-	nd	+/-
		2 knol 2 g 1:10	-	-	-	-	nd	-
		stek 2 g 1:10	-	-	-	-	nd	+/-
		3 knol 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	-
		stek 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	-
		4 knol 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	-
		stek 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	-
		5 knol 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	-
		stek 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	+/-
		6 knol 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	-
		stek 0,4 g 1:50	nd	-	-	-	-	-
29	70%	1 knol 2 g 1:10	-	+	+	nd	nd	nd
		stek 2 g 1:10	-	-	+	nd	nd	nd
		2 knol 2 g 1:10	-	+	+	nd	nd	nd
		stek 2 g 1:10	+	+	+	nd	nd	nd
		3 knol 2 g 1:10	-	+	+	nd	nd	nd
		stek 2 g 1:10	-	-	+	nd	nd	nd
13	31%	1 knol 2 g 1:10	-	-	+	+	nd	+
		stek 2 g 1:10	-	-	+	+	nd	+
		2 knol 2 g 1:10	-	+	+	-	nd	+
		stek 2 g 1:10	-	+	+	+	nd	+
		3 knol 2 g 1:10	-	+	+	nd	nd	nd
		stek 2 g 1:10	-	-	+	nd	nd	nd
9	18%	1 knol 0,4 g 1:50	nd	+	+	-	+	+
		stek 0,4 g 1:50	nd	+	+	-	+	+
		2 knol 0,4 g 1:50	nd	-	+	-	+	+
		stek 0,4 g 1:50	nd	-	-	+/-	+/-	+
5	16%	1 knol 0,4 g 1:50	nd	-	+	-	+	+
		stek 0,4 g 1:50	nd	+	+	-	+	+
		2 knol 0,4 g 1:50	nd	+	+	-	+	+
		stek 0,4 g 1:50	nd	+	+	+	+	+

Verklaring tekens en kleuren: (groen) = visueel gezonde knol/stek; (rood) = zieke knol/stek. % ploffers = % zieke knollen waargenomen in de partij. - = negatief in PCR; + = positief in PCR; +/- = zwak bandje op gel. nd = niet getest.

Partij 17 heeft een laag percentage ploffers. Na rechtstreekse toetsing met PCR zijn deze monsters negatief. Langere voorkweek (2 dagen) en DNA-isolatie uit de voorkweek laat in de PCR echter voor 3 van de 6 getoetste monsters een zwak bandje zien op een 1% agarose gel. Gezond knol- en bolmateriaal uit een besmette partij blijken voor alle geteste monsters besmet met Ech.

De partijen met een hoog percentage ploffers (5, 9, 13 en 29) geven alle in PCR een positieve reactie; bij 13 en 29 al zonder DNA-isolatie.

6.3 Conclusie en discussie

Zowel knol- als stekmateriaal van Dahlia zijn goed te toetsen met PCR op een latente infectie van Ech. Verrijking van het monster voor 2 dagen in VM heeft de voorkeur en leidt tot een hoger aantal positieven in de PCR. De detectiegrens wordt eveneens verhoogd door DNA te isoleren uit het monster. Dit kan te maken hebben met minder remmende stoffen in het uitgangsmateriaal voor de PCR. Een andere oorzaak kan zijn dat het monster met DNA isolatie 40 x meer geconcentreerd wordt dan bij een PCR rechtstreeks op het uitgangsmateriaal. Waarschijnlijk is het een combinatie van beide. Opvallend is, dat het stekmateriaal uit partij 17 zwak positief lijkt te zijn terwijl in de knol geen bacteriën worden aangetoond. Mogelijk gaat het om een tolerante cultivar met een lage hoeveelheid *Erwinia* in de knol. De bacterie groeit mogelijk mee met de stek, waar zij wel te detecteren is. Een en ander kan consequenties hebben voor de plek van monsternamen aan Dahlia-knollen: het toetsen van stekken kan daardoor gevoeliger zijn dan het toetsen van knollen.

7 Toetsen van praktijkmonsters op *Erwinia*: werkbollen van hyacintencultivars

De ontwikkelde procedures voor isolatie van monsters, voorkweekstap, DNA-isolatie enz. moeten nu toegepast worden op praktijkmonsters.

Het doel van dit projectonderdeel is het toetsen van praktijkmateriaal (werkbollen van diverse hyacintencultivars) met het ontwikkelde protocol zoals beschreven voor latente *Erwinia*-infecties in hyacintenbollen. De toetsresultaten zijn vervolgens vergeleken met een ander deel van dezelfde partij werkbollen die een “stress-behandeling” hebben ondergaan en daarna de typische symptomen van leeglopen vertoonden.

7.1 Uitvoering

In dit experiment zijn 25 tot 35 visueel gezonde bollen uit 8 partijen afkomstig van 5 verschillende bedrijven per 5 bollen getoetst met PCR volgens het ontwikkelde protocol (prep B) zoals beschreven in 2.1.2 en 2.1.4. Van vier van deze partijen was bekend dat hier rotte bollen in aangetroffen waren.

Uitzondering is partij 3 (zie tabel 4 prep A). Bij deze partij werd 1 ml van het bolsap rechtstreeks toegevoegd aan 9 ml VM en geïncubeerd bij 27 ° C voor 2 dagen. De PCR werd uitgevoerd rechtstreeks op 2.5 µl van het monster na afdraaien en opname van het pellet in PBS.

Als controle werd met 40 bollen uit dezelfde partijen een zg. stresstoets uitgevoerd. Hiervoor zijn bollen een aantal keren over een sorteermachine gebracht om te zien of door mechanische stress bollen met een latente *Erwinia*-infectie gingen rotten. De besmettingsgraad binnen een partij zou dan afgeleid kunnen worden uit het percentage zieke bollen.

7.2 Resultaten

Een overzicht van de resultaten van de toetsen is weergegeven in tabel 4.

Tabel 4. Overzicht van de resultaten van de ringtoets en valtoets uitgevoerd door PPO.

Batch/Partij	PCR				valtoets		
	prep A		prep B		# rot 6 dpi	PCR	
	Ecc	Ech	Ecc	Ech		Ecc	Ech
1. Carnegie			1//7	1//7	-		
2. Delft Blue			-	-	-		
3. Carnegie x	-	3//5			6//40		+
4. Pink Pearl			1//6	-	-		
5. White Pearl x			-	-	1//40		
6. Purple Sensation			-	-	-		
7. Splendid Comelia x			2//5	-	-		
8. Aiolos x	-	1//3	-	3//7	2//40		+

Verklaring der tekens: x//y => x = aantal monsters positief in PCR; y = aantal geteste monsters van 5 bollen. Prep A en B zijn twee verschillende toetsmethoden (zie 8.1)

Van de vier verdachte partijen (3, 5, 7 en 8, aangegeven met x) was partij 5 negatief in de PCR (Tabel 4). Waarschijnlijk zijn de zieke bollen er uitgezocht en bleken de andere gezond. In partij 8 werd Ech aangetoond, evenals in partij 3. De resultaten van partij 3 zijn echter verkregen met het alternatieve protocol A. In de valtoets lieten deze twee partijen een aantal rotte bollen zien na 6 dagen incubatie in een plastic zak (hoge luchtvochtigheid): 6 in partij 3 en 2 in partij 8. Partij 7 was positief voor Ec voor 1 van de 7 getoetste monsters; Ech was niet aanwezig. Na de valtoets gaven bollen uit deze partij geen symptomen. Dit klopt met het gegeven dat Ech agressiever is dan Ec. In partij 5 werd in de valtoets 1 rotte bol aangetroffen. Deze bleek echter negatief in een PCR met Ade1-Ade2 en Y1-Y2. Het meest waarschijnlijk is een aantasting door een ander pathogeen; mogelijk is dit *Pseudomonas* (hierop is niet getoetst). 1 uit de 7 respectievelijk en 6 geteste monsters van de niet verdachte partijen 1 en 6 was positief voor Ec. In partij 1 werd ook Ech aangetoond. Ecc als Ech werden niet gedetecteerd in de partijen 2 en 6; dit komt goed overeen met de valtoets, waar geen rotte bollen in gevonden werden. Een aantal monsters uit de partijen 1, 3, 4, 5, 6, 7 en 8 zijn ook getoetst met een DAS-ELISA op een latente Ech infectie. Het doel hiervan was om eventuele missers in PCR (hoewel niet waarschijnlijk) te verifiëren. De resultaten hiervan zijn weergegeven in tabel 5.

Tabel 5 Overzicht van toetsing van verschillende monsters met PCR voor *Erwinia chrysanthemi* (Ech) en *Erwinia carotovora* spp. (Ec) en DAS-ELISA.

monster	PCR Ec	PCR Ech	ELISA-Ech
1.1	-	-/+	+
1.2	-	-	-
1.3	-	+	-
1.5	+	-	-
3.1	-	-	-
3.2	-	+	+
3.3	-	+ faint	-
4.1	-	-	-
4.2	-	-	-
4.6	+	-	-
5.1	-	-	-
5.2	-	-	-
6.1	-	-	-
6.2	-	-	-
7.1	-	-	-
7.2	+	-	-
7.3	-	-	-
8.1	-	+	-
8.2	-	+	+
8.3	-	-	-

+ = aangetoond; - = niet aangetoond; + faint = zwakke band op gel; -/+ = negatief in 1^e test, positief na hertoetsing.

De resultaten van de DAS-ELISA komen niet altijd overeen met de resultaten uit de PCR. De PCR lijkt gevoeliger. Uitzondering is het resultaat van monster 1.1 met een negatief resultaat in de PCR en een positief resultaat in de DAS-ELISA. Hertoetsing van dit sample leidde echter ook in de PCR tot een positief resultaat.

7.3 Conclusie en discussie

Het is mogelijk praktijkmonsters te testen op de latente aanwezigheid van Ech en/of Ec. De DAS-ELISA blijkt daarbij minder gevoelig dan de PCR. Om de betrouwbaarheid van de PCR-resultaten te verifiëren zullen grotere aantallen monsters getoetst moeten worden volgens identieke protocollen. Hierbij dient de incubatiestap beperkt te worden tot 2 dagen (langere incubatie vergroot de concurrentie met andere bacteriesoorten en leidt mogelijk tot vermindering van de vitaliteit van vooral Ech) en moet voor alle samples een DNA-isolatie plaatsvinden.

Door de Bloembollenkeuringsdienst zijn van deze partijen ook een aantal monsters getest; de gegevens hieruit verschiden in een aantal gevallen van die van PPO. De reden is waarschijnlijk dat een ander protocol is gebruikt en dat de voorkweekstap vaak langer dan twee dagen bedroeg; dit laatste verhoogt de kans op groei van andere bacteriën die dan de eventueel aanwezige Ech of Ec kunnen wegdrücken.

De resultaten zijn afhankelijk van de grootte van de genomen steekproef; feitelijk dienen (veel) meer bollen getoetst te worden om een grotere zekerheid van het vinden van eventuele *Erwinia*-besmetting te verkrijgen.

Ook zal het protocol zo robuust moeten zijn dat uitvoering op verschillende plekken geen andere uitkomsten kan geven.

8 Algemene conclusies en discussie

Het doel van dit project was, om een praktijkklaar protocol voor toepassing door keuringsdiensten te ontwikkelen. Dit is vooral voor hyacint uitgekristalliseerd. PCR en ELISA zijn goed bruikbaar; ook de gevoeligheid met kunstmatig besmette monsters (spiking) is goed. Enige terughoudendheid is nog wel op zijn plaats. Er zijn nog een aantal zaken die verder uitgezocht moeten worden.

Problemen met betrekking tot verwerking van het bolsap, lokalisatie van Erwinia en opschaling in hyacint.

Het bolmateriaal zelf is vanwege de reservestoffen lastig materiaal om te verwerken.

Tijdens het blenderen begint het bolsap enorm te schuimen. Dit gebeurt vooral met verse bollen. Mogelijk is het niet nodig de gehele bol fijn te malen in een blender (sowieso moeilijk toepasbaar in de praktijk), maar kan het worden beperkt door kleine delen uit de bol te snijden en te homogeniseren in een filterzakje. Dit vermindert de hoeveelheid zetmeel en suikers die vrijkomt uit de bol. Wellicht is inzet van fructaanafbrekende enzymen ook een mogelijkheid om de polymere suikers kwijt te raken. Hiermee vervalt ook de eerste centrifugeerstep na het kaasdoek, dat naast het afdraaien van storend bolmateriaal ook leidt tot een groot verlies aan bacteriën en daarmee een verminderde gevoeligheid van de toets.

Verder kan op dit moment slechts een laag aantal bollen binnen één submonster worden getoetst. Dat is een belemmering voor de opschaling van de gehele procedure. Verdere lokalisatiestudies met grotere aantallen latent geïnfecteerde bollen zijn dan ook noodzakelijk. Meer duidelijkheid over de lokalisatie van *Erwinia* in de bol zorgt ervoor dat de hoeveelheid bolmateriaal gebruikt in de toets verder geminimaliseerd kan worden.

Naar aanleiding van discussie tijdens de begeleidingscommissievergadering op 2 december 2008 is aangemerkt, dat de lokalisatie van *Erwinia* in monsters van hyacinten grootschaliger uitgezocht dient te worden. Dit is in dit onderzoek voor ongeveer 15 hyacintebollen uitgezocht, maar belangrijk is om te weten of alleen met de bolneus volstaan kan worden, en zo ja, welk deel hiervan.

Toetsing van andere bolgewassen: Dahlia, Muscari, Zantedeschia en iris.

Toetsing van iris, Muscari en Zantedeschia op *Erwinia chrysanthemi* via DAS-ELISA is gevoelig. Wanneer slechts enkele tientallen bacteriën in voorkweekmedium worden toegevoegd, laat de ELISA toch een duidelijk positieve uitslag zien na twee dagen. In Zantedeschia komt normaal nauwelijks of geen Ech voor; Het betreft hier dan spiking-experimenten waar kunstmatig bacteriën aan bol- of knolmateriaal zijn toegevoegd.

Het toetsen van praktijkmonsters met PCR en DAS-ELISA is mogelijk voor hyacint, Dahlia en fresia (van de laatste resultaten niet getoond). Resultaten zijn echter niet altijd even eenduidig. Hiervoor zullen meer monsters op gelijke wijze getoetst dienen te worden.

Toetsing met PCR of DAS-ELISA vereist wel een voorkweek van 2 dagen om zeker te zijn dat minimale of latente infecties kunnen worden aangetoond. Er zijn berichten dat het antiserum in ELISA kan kruisreageren; ook gezien de hogere gevoeligheid en het gegeven dat Ecc niet in een ELISA aan te tonen valt heeft een (multiplex) PCR de voorkeur bij toetsing.

DNA-isolatie heeft voorkeur boven een directe PCR (zonder DNA-isolatie); invriezen van het monster heeft een positief effect op de detectie bij PCR direct op het bolsap. Hierbij moet rekening gehouden worden met het feit dat PCR gevoelig kan zijn voor storende componenten of te hoge concentraties bacteriën (vals-negatieven).

Het voorkomen van vals-negatieven en/of vals-positieven

Enkele toetsen zijn samen met de BKD uitgevoerd (niet vermeld in dit verslag). De resultaten binnen en tussen de praktijktoetsen uitgevoerd door PPO en de BKD lieten niet altijd eenduidige resultaten zien. Dit was grotendeels te wijten aan veranderingen in de procedures (o.a. langere voorkweekstappen, gebruikt door de BKD). Dit benadrukt de noodzaak tot verder onderzoek naar het gebruik van een interne controle en het verder afstellen van de gevolgde procedure.

Een belangrijk punt hierbij is ook de logistiek van het verwerken van monsters en de spreiding van *Erwinia*-zieke bollen of knollen in een partij. Wat is het effect van het langer laten liggen van monsters? Worden alle

knollen met (latent) *Erwinia* wel ziek, m.a.w.: wat is de correlatie tussen een in PCR positief bevonden monster en het uiteindelijk ziek worden van de bol of knol in de bewaring of in de verpakking?

Andere rotveroorzakende bacteriën

De focus bij dit onderzoek naar protocollering lag vooral op Ech. Dit is verantwoord vanwege de grote incidentie enerzijds en de vraag vanuit de praktijk om vooral deze bacterieziekte aan te pakken. Toch kan Ecc ook problemen veroorzaken; in de aardappelsector onderscheidt men ook virulente en niet-virulente Ecc. Hoewel er in eerder onderzoek geen aanwijzingen voor zijn gevonden, is het mogelijk dat ook Eca (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) in hyacint en andere bolgewassen aanwezig is. Hier is in dit onderzoek niet op gelet; de PCR die gebruikt is, toont de hele *E. carotovora*-groep (Ec) aan. Ook zijn er aanwijzingen dat andere organismen rot kunnen veroorzaken. Pseudomonaden zijn hier toe in staat, hoewel deze andere typen pectinolytische enzymen hebben. Onduidelijk is echter, of deze groep bacteriën zelf rot kunnen veroorzaken, of na *Erwinia* toeslaan en de beginbesmetting door *Erwinia* maskeren. Hier zal nader onderzoek voor moeten worden opgezet, bv. ecologisch onderzoek met mengbesmettingen.

Samenvattend leidt dit tot de volgende aanbevelingen en richtingen voor vervolgonderzoek.

- Uitbreiding onderzoek naar de lokalisatie van *Erwinia* in de bol/knol.
- Onderzoek naar alternatieven voor verwerking van het bolsap. Hier zal onderzoek naar uitgevoerd worden binnen een FES-project perceel “extractie moeilijke substraten”.
- Toetsen van het beschikbare protocol door de NAK. Dit zal, in overleg met BKD en PPO in 2009 in het late voorjaar en najaar uitgevoerd worden, mede afhankelijk van de honorering van een projectvoorstel.
- Vereenvoudigen van het DNA-isolatie-protocol en gebruik van de Kingfisher (een geautomatiseerd nucleïnezuurisolatie apparaat) voor standaardisering en opschaling van de DNA-isolatie.
- Verder valideren van de toets en het voorkomen van vals negatieven/positieven door het toetsen van nieuwe praktijkmonsters en onderzoek naar en het gebruik van een interne controle in de PCR en verwerking.
- Onderzoek naar de correlatie tussen een latente infectie of versmering enerzijds en symptoomontwikkeling anderzijds. Dit zal deels plaatsvinden binnen het project praktijktoetsen op rot, snot en bolrot (PT 13373).
- Toetsing middels Real-time PCR. Hier zijn al ervaringen mee, maar niet voor routinematige toetsing. Dit zal worden opgepakt door de NAK, in samenwerking met BKD en PPO.

9 Overleg en output

Bijeenkomsten begeleidingscommissie

- Begeleidingscommissie 2 december 2008, NAK-AGRO, Emmeloord
- Werkoverleg met deel van de begeleidingscommissie (29 januari 2009)

Poster

- Poster Kennismiddag PPO, 13 februari 2009, Lisse (zie bijlage)

Vakbladartikel

- Toets op Erwinia in hyacint bijna praktijkklaar, BloembollenVisie, 24 april 2008
- Bedrijfspraktijktoets op Erwinia in hyacint: geef de bol stress! (BloembollenVisie: april 2009)

Toetsen

- protocollen voor PCR (Ech, Ec/Ecc) en ELISA (Ech) op praktijkmateriaal van hyacint, Muscari, iris, Dahlia, Zantedeschia

10 Literatuur

- Prins, H., en A. Breukers (2008). *Erwinia* berokkent pootgoedsector vele miljoenen schade, LEI Agrimonitor.
- Van Doorn, J., T. Hollinger, P. Vreeburg, P. van Leeuwen, M Bredeveld, J. van der Wolf, A. Speksnijder (2005). *Erwinia chrysanthemi* veel aangetroffen. *BloembollenVisie*, 53: 22-23.
- Nassar, A., A. Darrasse, M. Lemattre, A. Kotoujansky, C. Dervin, R. Vedel, Y Bertheau (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by Pectinolytic Isozyme Polymorphism and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments of *pel* Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2228–2235.
- Darasse A., S. Priou, A. Kotoujansky, Y. Berthau (1994). PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism of a *pel* Gene as a Tool To Identify *Erwinia carotovora* in relation to Potato Diseases. *Applied And Environm. Microbiol.* 60: 1437-1443
- De Boer, S. H., & Kelman, A. (2001). *Erwinia* soft rot group. In N. W. Schaad, J. B. Jones, & W. Chun (Eds.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3rd ed., pp. 56–72). St. Paul MN: American Phytopathological Society.
- Paulsen et al., (2006). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol.* Apr; 24 (4):466.

11 Bijlage

Poster Kennismiddag PPO, 13 februari 2009, Lisse



Ontwikkeling van toetsen op *Erwinia*

Robert Dees, Wendy Martin, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen en Joop van Doorn
Joop.vandoorn@wur.nl

Erwinia in bolgewassen

- Agressief rot (*Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya*) en witsnot (*Erwinia carotovora*, *Pectobacterium*) groot probleem in o.a. hyacint, Muscari, iris, Dahlia en Zantedeschia
- Om in partijen bollen op *Erwinia* te testen zijn laboratoriumtoetsen (ELISA, PCR) nodig
- Om op het bedrijf zelf partijen te beoordelen wordt gewerkt aan zg. stresstoetsen om eventuele *Erwinia* snel zichtbaar te maken

Stresstoetsen

- Partijen hyacintenbollen lopen sneller leeg na stress (vallen, herhaalde malen sorteren) (Fig.1).
- Vochtig wegleggen bij 30 °C bevordert dit proces
- Met deze methode, die verder ontwikkeld wordt, kan men percentages ziek in partijen vaststellen op eigen bedrijf



Fig. 1. Voorbeeld van een stresstoets: de valtoets

Laboratoriumtoetsen

- Bolmateriaal toetsen via antiserum (ELISA) (Fig. 2) of met DNA-technieken (PCR)
- Van belang is de zg. voorweek van bolmateriaal in een speciaal groeimedium waar vooral *Erwinia*'s goed in groeien
- Onder laboratoriumomstandigheden lukt dit voor hyacint, Dahlia, Zantedeschia (*E. carotovora*) iris en Muscari
- Momenteel duurt zo'n toets ongeveer 4-5 dagen

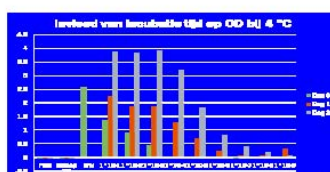


Fig. 2. ELISA werkt pas goed na twee dagen voorweeken van verdacht bolmateriaal op *Erwinia chrysanthemi*

Problemen

- Waar zit *Erwinia* in de bol? Zie fig. 3.
- Worden bollen met *Erwinia* altijd ziek?
- Opschalen van de toetsen: kosten!
- Voor het oude witsnot (*E. carotovora*) bestaat geen antiserum



Fig. 3: waar zit *Erwinia* in de bol?

Samenwerking

- Om toetsingen op *Erwinia* aan te kunnen pakken gaan PPO, BKD met de NAK samenwerken
- NAK heeft veel ervaring met grootschalige toetsing op *Erwinia*'s in pootdappelen
- Dit voorjaar worden proeven gedaan met partijen hyacinten, samen met de NAK

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Prof. van Slogterenweg 2
2161 DW Lisse
Tel.: 0252-462121
Internet: www.ppo.wur.nl

