

# Kwaliteit hyacint

Ontwikkeling van een dipstick-test om *Dickeya* aan te tonen.

Bestrijding van trips in hyacint door middel van een CATT-behandeling


Peter Vreeburg PPO PBBF, Jan Wichers FBR-WUR

© 2014 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

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

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

Projectnummer: 32 361724 00  
PT 14878

De bloemen- en plantensector investeert in dit project via het  Productschap **Tuinbouw**

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

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse  
: Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse  
Tel. : +31 252 462100  
Fax : +31 252 462100  
E-mail : [info.bollen.ppo@wur.nl](mailto:info.bollen.ppo@wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING .....	5
1 INLEIDING .....	7
2 ONTWIKKELING DIPSTICK-TEST OM <i>DICKEYA</i> AAN TE TONEN .....	9
2.1 Inleiding .....	9
2.2 Materiaal en methoden .....	10
2.3 Resultaten .....	11
2.4 Discussie .....	18
2.5 Conclusie .....	18
3 BESTRIJDING TRIPS IN HYACINT DOOR CATT .....	19
3.1 Inleiding .....	19
3.2 Materiaal en methode .....	19
3.3 Resultaten .....	20
3.4 Discussie en conclusie .....	22
4 COMMUNICATIE .....	23



## Samenvatting

In dit project, dat is gefinancierd vanuit het restant van het surplusfonds van de hyacintentelers, zijn twee onderwerpen opgenomen, namelijk: ontwikkeling van een snelle goedkope test om aan te tonen of een hyacint met snotsymptomen aangetast is door *Dickeya* (agressief snot) en een CATT behandeling tegen trips.

### **Dipstick-test**

In samenwerking met FBR WUR is een protocol met een dipstick ontwikkeld waarmee binnen een uur bekend is of de snotsymptomen van een hyacintenbol veroorzaakt worden door de *Dickeya*-bacterie. Als de test negatief is, is de oorzaak waarschijnlijk *Pectobacterium* (witsnot), maar dat geeft deze test niet aan. Dit protocol is nog niet geschikt om door een teler zelf uit te voeren, maar kan wel op PPO uitgevoerd worden voor de teler of exporteur. Deze toets is sneller en goedkoper dan de huidige PCR –toets. De test is iets minder gevoelig dan de PCR-toets, maar bij normale snotbollen zal de lagere gevoeligheid geen nadeel zijn. Voordat een teler de test op het eigen bedrijf kan uitvoeren is nog aanvullend onderzoek noodzakelijk. Hiervoor moet dan nog financiering worden gevonden.

### **Tripsbestrijding**

Binnen een PPS project “Met CATT maken wij producten duurzaam plaagvrij” wordt in samenwerking met andere partijen onderzocht of een CATT-behandeling (Controlled Atmosphere Temperature Treatment) in staat is tripsen in holbollen en leverbare bollen te bestrijden zonder schade te geven. De eerste voorlopige resultaten geven aan dat er een goede bestrijding mogelijk is, waarbij er effecten zijn van de duur en temperatuur van de behandeling en van de samenstelling van de lucht (gehalte O<sub>2</sub> en CO<sub>2</sub>). Er is geen schade gezien bij holbollen; of de leverbare bollen schade hebben ondervonden van de CATT-behandeling is nog niet bekend (afbroei februari). Dit onderzoek loopt nog door tot in 2016.



# 1 Inleiding

Het gewas hyacint heeft te maken met enkele grote uitdagingen om de kwaliteit en daarmee de marktpositie op peil te houden.

Om die reden wilde het bestuur van de productgroep Hyacint een extra impuls geven aan onderzoek om enerzijds de problemen met *Erwinia* te verminderen en anderzijds de organische stofproblematiek aan te pakken. Er was nog ruimte voor collectieve hyacintenactiviteiten binnen het zogenaamde "surplusfonds hyacint". Het uitgangspunt was dat het geld ook ingezet kan worden voor andere dan genoemde onderwerpen en dat de productgroep Hyacint de keuze zou maken.

De productgroep Hyacint heeft in de loop van 2013 besloten om met een deel van het budget een onderzoek te ondersteunen om tot een eenvoudige en snelle methode te komen om vast te stellen of een hyacintenbol met snotverschijnselen aangetast was door *Dickeya* (agressief snot) of niet (in dat geval is meestal witsnot de veroorzaker). Deze zogenaamde dipstick is een nieuwe ontwikkeling die ook voor andere ziekten is ontwikkeld. Dit onderzoek is in 2014 uitgevoerd door PPO en FBR (Wageningen UR en het project is binnen het IDC (Innovatie en Demo Centrum, Bollen & Vaste planten) in gang gezet.

In voorjaar 2014 is door de productgroep Hyacint het resterende budget bestemd voor inzet in een PPS "Met CATT maken wij producten duurzaam plaagvrij", een project van o.a. PPO AGV, PPO BBF, FBR en PRI, waarin diverse plagen worden bestreden en waarin de bestrijding van trips bij hyacint is ondergebracht. CATT (Controlled Atmosphere Temperature Treatment) is een celbehandeling waarin tijdsduur, temperatuur, laag zuurstofgehalte en hoog koolzuurgehalte worden gecombineerd.





## 2 Ontwikkeling dipstick-test om *Dickeya* aan te tonen

### 2.1 Inleiding

Het gewas hyacint heeft te maken met enkele grote uitdagingen om de kwaliteit en daarmee de marktpositie op peil te houden. Zo ontstaat er in de sector jaarlijks veel schade door *Erwinia*. *Erwinia*-bacteriën laten bollen verrotten, waarbij de bol leegloopt en waarbij veel stank optreedt. Om die reden wilde het bestuur van de productgroep Hyacint een extra impuls geven aan onderzoek om de problemen met *Erwinia* te verminderen, naast de vele maatregelen die momenteel al door het vak worden genomen om de aantasting te beperken.

Bij de hyacinten spelen twee types *Erwinia* (agressief snot= *Dickeya* en witsnot = *Pectobacterium*) die qua bestrijding en omvang van schade van elkaar verschillen. Visueel is het onderscheid veelal niet te maken. Voor een goed onderscheid tussen beide types is nu een tijdrovende (afhankelijk van beschikbare mankracht 1-3 dagen) en dure laboratoriumtest (ca. €225) noodzakelijk.

Er zijn 2 dipstickvarianten mogelijk, die verschillen in hetgeen ze aan kunnen tonen, in wijze van toepassing en in kosten.

Er is een eenvoudige (serologische) test die alleen *Dickeya* soorten aantoont en dus aangeeft of men met agressief snot te maken heeft. Een dipstick-test die aangeeft of *Dickeya* (agressief snot) verantwoordelijk is voor de rotting van de bol, zou door het bedrijf zelf kunnen worden uitgevoerd. Deze geeft snel (15 min - 1 uur) een uitslag en de kosten liggen veel lager (ca. €10 exclusief eventueel benodigde kit voor voorbereiding en exclusief arbeid). De eerste resultaten zijn veelbelovend, maar vragen nog het nodige onderzoek en uittesten op laboratorium en op bedrijven alvorens ze voor de praktijk beschikbaar zijn. Een ander type dipstick-test, gebaseerd op genomisch DNA, zou ook aan kunnen geven welke *Dickeya* aanwezig is en of er ook *Pectobacterium* bij de aantasting betrokken is. Deze dipstick-test is wel duurder. Welke *Dickeya* aanwezig is, is voor de ondernemer vaak van minder belang, maar kan wel van belang zijn bijvoorbeeld bij vraagstukken over de herkomst van een besmetting en geeft meer zekerheid over de oorzaak.

Doe-het-zelf test kits bestaan al geruime tijd, en niet alleen als zwangerschapstest zoals te koop bij de drogist. Er worden al jaren dipstick-testen verkocht om plantenziekten aan te tonen. Een recent voorbeeld is die, verkocht door PRIME Diagnostics om een bacterieziekte in Prunus (*Xanthomonas* (Xap) in laurierkers (figuur 1) aan te tonen: de Xap-LFD kit die ontwikkeld is in samenwerking met PPO. Deze tests zijn gebaseerd op zgn. antistoffen die specifiek het pathogeen herkennen.

Binnen dit project wordt nagegaan of het mogelijk is een Laterale Flow ImmunoAssay (LFIA) dipstick te ontwikkelen die betrouwbaar, snel en goedkoop aangeeft of *Dickeya* de oorzaak is van een snotbol, dus de eenvoudige serologische test.

Met deze dipstick-test kunnen ondernemers (telers, broeiers én handel) zelf bepalen, of snel laten bepalen, of *Dickeya* (agressief snot) aanwezig is. Vervolgens kan de ondernemer een bewuste keuze maken voor de maatregelen die genomen dienen te worden om de aantasting en daarmee de schade te voorkomen of te beperken. De uitslag kan voorkomen dat risicopartijen bijvoorbeeld de droogverkoop in gaan en bij de handel, winkel en consument terecht komen en daar mogelijk voor veel schade zorgen.

## De LFD zelf-test: hoe gaat dit in zijn werk?



- Stukje blad om het symptoom
- Schudden met gasparels in water
- Met pipetje in houder druppelen
- Specifiek antiserum herkent Xap
- Toont zich door extra streepje


**WAGENINGEN UR**  
For quality of life

Figuur 1. Schematische voorstelling van test die gemaakt is voor *Prunus* om *Xanthomonas* aan te tonen

## 2.2 Materiaal en methoden

De dipstick-test voor hyacint is ontwikkeld samen met Ir. J.H. Wichers van Wageningen UR Food & Biobased Research (FBR).

In het ontwikkelingstraject is een aantal stappen te onderscheiden:

1. Inventarisatie van de beschikbaarheid van een antistof voor de specifieke detectie van *Dickeya /vroegere Erwinia chrysanthemi*.
2. Het monstervoorbewerkingstraject. Vorming van (ongewenste) aggregaten tussen koolstof conjugaat en bacteriële cellen aan het begin van de strip minimaliseren: gebruik van kleine, disposable zgn. Potter-buisjes, al dan niet gecombineerd met het gebruik van een “size-exclusion” filter en het eventueel gebruik van additieven (b.v. surfactants).
3. Vaststellen van het te bemonsteren deel van de aangetaste bol om tot een optimaal testresultaat te komen (in samenspraak met PPO-Lisse)
4. Optimalisatie van de LFIA karakteristieken (pH controle, monstergrootte en eventuele monsterverduunningsstappen)
5. PPO-Lisse “valideert” de door WUR-FBR gegenereerde LFIA resultaten op bol materiaal m.b.v. een *Dickeya* specifieke PCR test
6. Demonstratie protocol / dipstick-test voor leden van productgroep Hyacint
7. Uittesten door leden van productgroep Hyacint

## 2.3 Resultaten

### Het antiserum.

Van het *Dickeya* antiserum dat verkrijgbaar is bij Prime-Diagnostics (Wageningen) onder de naam *Dickeya dianthicola* (*Erwinia chrysanthemi*) IPO-502, is meer dan voldoende op voorraad. Het antiserum is verkrijgbaar als caprylzuur gezuiverd IgG of als ruw antiserum. Bij de dipstick-test wordt voor zowel capture- als detector ligand het caprylzuur gezuiverde IgG gebruikt. Het is een oud antiserum dat veel breder werkt dan alleen *D. dianthicola*.

Bekend is ook dat er enkele *Pseudomonas fluorescens* species kunnen kruisreageren (J.M. van der Wolf en G.C. Gussenhoven 1991. Reaction of saprophytic bacteria from potato peel extracts and plant pathogenic bacteria in ELISA with antisera to *Erwinia chrysanthemi* (serogroup O1Ha). European Journal of Plant Pathology 12/1991; 98(1):33-44.).

### Ontwikkeling dipstick-test

Bij FBR is het protocol ontwikkeld waarbij uitgegaan wordt van meerdere stappen, te beginnen met het nemen van het monster bolweefsel en dit, na bewerking, testen met een dipstick-test waarbij wel (= *Dickeya*) of geen (= geen *Dickeya*) zwart bandje zichtbaar wordt, naast een controlebandje dat ALTIJD zichtbaar moet zijn.

### Monstername

Bij voorkeur wordt als monster rot bolweefsel genomen in de bol op de plaats waar de aantasting nog "vers" is. Op de grens van gezond en aangetast rot weefsel wordt het rotte weefsel gepakt met een schoon mes of iets dergelijks. De bewerking van het rotte bolweefsel bleek lastiger te zijn dan in het voorbeeld van figuur 1 met bladeren en *Xanthomonas*. De bewerking vereist daarom meer stappen om een goed testbaar extract te krijgen.

De hoeveelheden van zowel het rotte weefsel als van de toegevoegde materialen die worden genoemd, zijn belangrijk omdat bij andere hoeveelheden storingen in het systeem kunnen optreden, waardoor de dipstick-test uiteindelijk mogelijk geen juiste uitslag geeft.

### Protocol voor Laterale Flow ImmunoAssay voor de detectie van *Dickeya* (*o.a. solani*) (veroorzaker van "agressief snot") in bollen van hyacint.

Werkwijze:

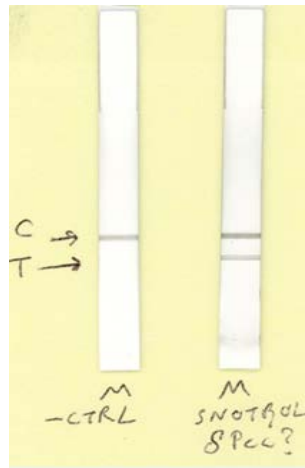
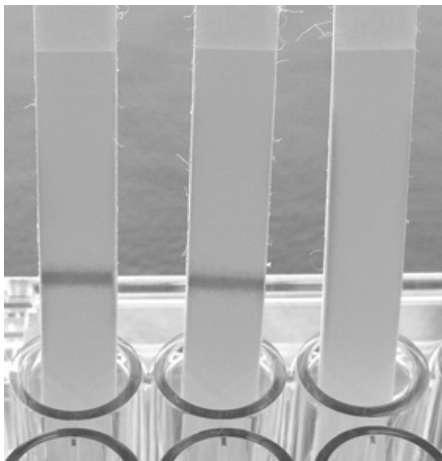
1. Verzamel ± 1 gram (aangetast/verdacht) Hyacintenbolweefsel en doe dit in het Bioreba zakje (Extraction bags «Universal» nr. 430100, 12 x 15 cm with synthetic intermediate layer for optimal filtration). Dit is een zakje met een tussenwand; doe het bolweefsel aan één kant.



2. Voeg aan het zakje met het bolweefsel 5 ml 1 x PBS-buffer toe; vouw zakje dicht en plet vervolgens de inhoud op een vlakke ondergrond door druk uit te oefenen met de hand, (rubber) hamer, etc.
3. Zuig met een weggooi-pipet uit de andere zijde van het Bioreba zakje dan waarin het bolmonster is gedaan, extract en doe dit in een plastic puntbuisje en wacht enkele minuten, zodat het grofste celmateriaal uitzakt.
4. Breng van het bovenste deel uit het puntbuisje 0.5 ml extract over naar een weggooi 1.5 ml micro-potter buis en mix inhoud gedurende 2 à 3 minuten m.b.v. de blender met conisch opzetstuk.



5. Breng in putje van microtiter plaat 95  $\mu$ l Running Buffer, 5  $\mu$ l extract en 1  $\mu$ l koolstof conjugaat; meng inhoud van putje en plaats teststrip.



Links: controle rechts: Dickeya

6. Wacht 10 à 15 minuten met aflezen van strip:

Alleen controle lijn: Geldige test, géén *Dickeya*  
 Controle lijn èn testlijn: Geldige test, *Dickeya* infectie  
 Alleen testlijn: Ongeldige test

Opmerking: ter voorkoming van kruisbesmetting tussen monsters moeten veel materialen na één keer gebruik worden weggegooid.

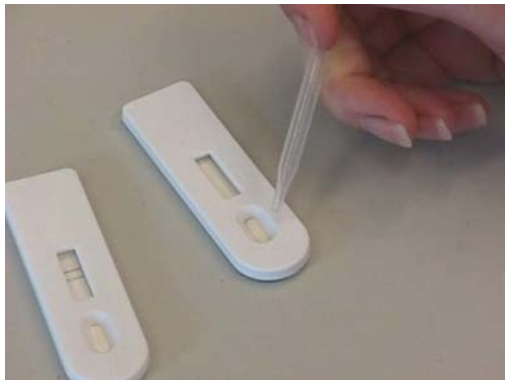
Bij het huidige protocol is het volgende nodig:

Voor éénmalig gebruik: Bioreba zakjes, micro potter buisjes, weggooi-opzetstukjes voor de blender, weggooi-pipetten en weggooi-minibuisjes

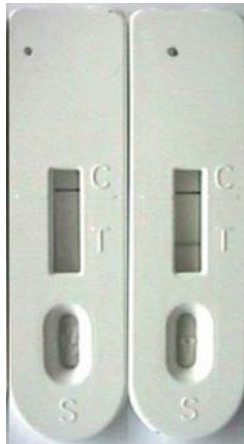
Voor meermalig gebruik: mini blender (werkend op batterijen) en goede pipetten die afgesteld zijn op verschillende hoeveelheden microliters

Voor gebruik: een hoeveelheid koolstof conjugaat, PBS-buffer en running-buffer.

Na verdere doorontwikkeling kan de dipstick-test vanaf stap 5 ook vereenvoudigd worden door het extract in het test vlakje te druppelen (zie foto), waarna het wachten is of er een streepje zichtbaar wordt bij de T. In dit geval zouden minder materialen nodig zijn en zou bijvoorbeeld een starterskit gemaakt kunnen worden met alle materialen voor 50 testen en een vervolg testkit voor 50 testen maar dan zonder de blender.



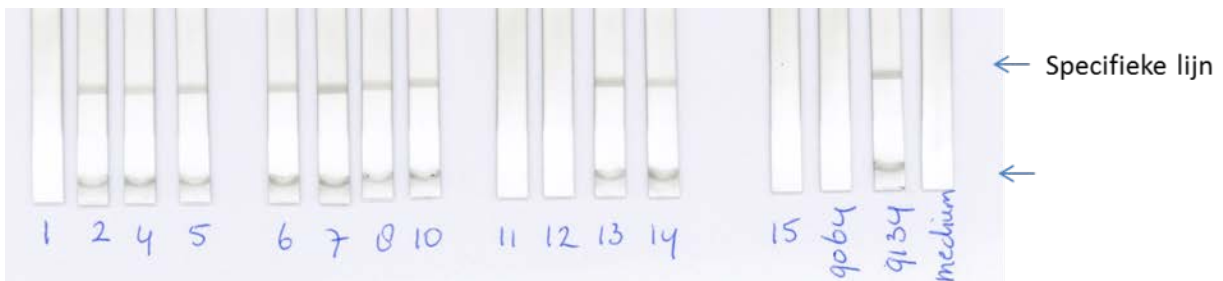
Aanbrengen te testen extract



Rechts positieve uitslag door zichtbaar streepje bij T  
*Voorbeeld van dipstickkit na verdere ontwikkeling.*

### Testen dipstick

In 2013 zijn de eerste stappen gezet waarin een aantal isolaten is getest om na te gaan of het beoogde antiserum bruikbaar was voor deze toepassing (figuur 2 en tabel 1). Daaruit bleek dat de uitslagen verkregen met de dipstick-test en die van PCR goed overeen kwamen. Alleen de negatieve uitslag van nr 9064 was niet verwacht. Deze is nog nagetrokken op PPO met PCR waarbij bleek dat de PCR wel positief was. Later is het zelfde isolaat 9064 opnieuw getest (zie tabel 2) waaruit bleek dat het deze keer wel werd aangetoond met de dipstick. Een verklaring waarom het de eerste keer afweek ontbreekt. Mogelijk dat er de eerste keer te weinig bacteriën aanwezig waren gezien de verschillen in gevoeligheid tussen de dipstick-test en PCR (zie tabel 3).



*Figuur 2. Opname van de dipsticks met specifieke lijn die aangeeft of Dickeya aanwezig is, hoort bij tabel 1.*

			herkomst hyacint	PCR	LFIA
1	D. differenbachia		nee	neg.	neg.
2	D. solani		ja	pos.	pos.
4	D. dadanti		onbekend	pos.	pos.
5	Dickeya spp.		ja	pos.	pos.
6	D. dadanti		nee	pos.	pos.
7	D. dianthicola		nee	pos.	pos.
8	D. solani		ja	pos.	pos.
10	D. dadanti		nee	pos.	pos.
11	Onbekend geen dickeya spp.		ja	neg.	neg.
12	Onbekend geen dickeya spp.		ja	neg.	neg.
13	D. dianthicola		nee	pos.	pos.
14	Dickeya spp.		nee	pos.	pos.
15	Pcc		nee	neg.	neg.
16	9064	D. dianthicola	PPO-stam		neg.
17	9134	D. solani	PPO-stam		pos

Tabel 1. Vergelijking van dipstick-test en PCR bij een aantal isolaten afkomstig van verschillende herkomsten. Zie ook figuur 2.

Voorjaar 2014 is wederom een aantal bacteriestammen en herkomsten getest (Tabel 2). Hieruit bleek dat de resultaten van PCR en dipstick-test geheel overeenkwamen.

PPO nr.	species	gewas	PCR	dipstick
			PCR Y1/Y2	
9094A	Pc odoriferum	Hyacint	pos. Pcc	neg.
9212	Pcc	hyacint	pos. Pcc	neg.
13045	Pcc	Paprika	pos. Pcc	neg.
			PCR pseudo	
15	Pseudomonas viridiflava	Zantedeschia	pos. pseudo	neg.
19	Pseudomonas marginalis	Iris	pos. pseudo	neg.
12A10	Pseudomonas putida	aardappel	pos. pseudo	neg.
			PCR Ade 1/Ade 2	
12016	Dickeya	hyacint	pos. dickeya	pos.
13027	D. diffenbachia	phalaenopsis	pos. dickeya	pos.
9226	D. dianthicola	sedum	pos. dickeya	pos.
9225	D. Solani	hyacint	pos. dickeya	pos.
9231	D. dadanti	narcis	pos. dickeya	pos.
12010	D. dianthicola	Dahlia	pos. dickeya	pos.
9134	D. solani	hyacint	pos. dickeya	pos.
9128	D. dadanti	hyacint	pos. dickeya	pos.
9064	D. dianthicola	Dahlia	pos. dickeya	pos.

Tabel 2. Testresultaten van de dipstick toegepast bij verschillende herkomsten van *Pectobacterium*, *Pseudomonas* en *Dickeya* die positief reageerden met PCR.

Om de gevoeligheid te testen is een verdunningsreeks gemaakt waarbij aangetast bolweefsel van een met *Dickeya* besmette bol (Figuur 3) werd verdund. De verdunning vond plaats met gezond bolweefsel of met door witsnot (*Pectobacterium*) aangetast weefsel.

De resultaten (Tabel 3 en figuren 4 t/m 7) gaven aan dat de PCR-toets zoals verwacht gevoeliger is dan de dipstick. Bij een verdunning van 1 op 10 was de besmetting na een korte tijd nog zichtbaar, bij een langere

wachttijd van 1 dag was dit nog bij 1 op 50 het geval. De PCR-toets was nog in staat *Dickeya* aan te tonen bij een verdunning van minimaal 1 op 500. Het maakte bij de dipstick-test en de PCR geen verschil of verdund werd met gezond bolweefsel of met door *Pectobacterium* verrot bolweefsel.



Bol met *Dickeya*

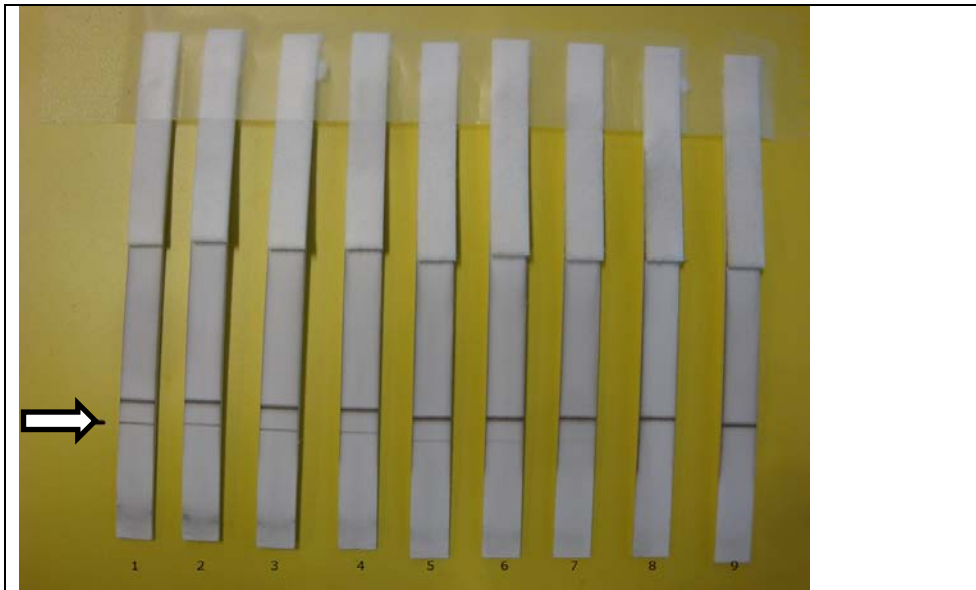
Bol met *Pectobacterium*

Figuur 3. Zieke bollen gebruikt als uitgangsmateriaal voor test met verdunningen

Preparaat	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Verdunning :	<b>1</b>	<b>1/2</b>	<b>1/5</b>	<b>1/10</b>	<b>1/20</b>	<b>1/50</b>	<b>1/100</b>	<b>1/500</b>	<b>0</b>
<b>Dipstick Fig. 3 en 4</b>									
1 Gezond + <i>Dickeya</i>	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
2 Pcc + <i>Dickeya</i>	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
<b>PCR Fig. 5 en 6</b>									
1 Gezond + <i>Dickeya</i>	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-
2 Pcc + <i>Dickeya</i>	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-

+: te zien na een dag incuberen.

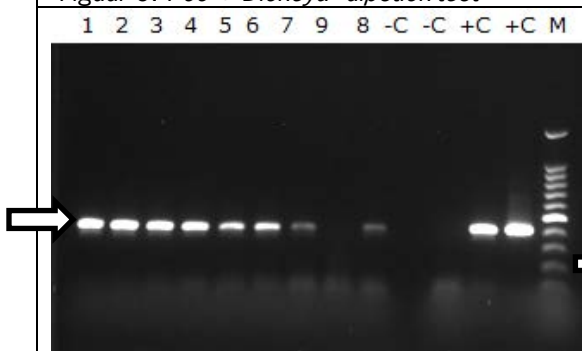
Tabel 3. Resultaten van verdunningen van het bolweefsel bij testen op *Dickeya* met de dipstick-test en met PCR. Vb. 1/10 wil zeggen: 1 deel monster + 9 delen buffer, dus 10x verdund.



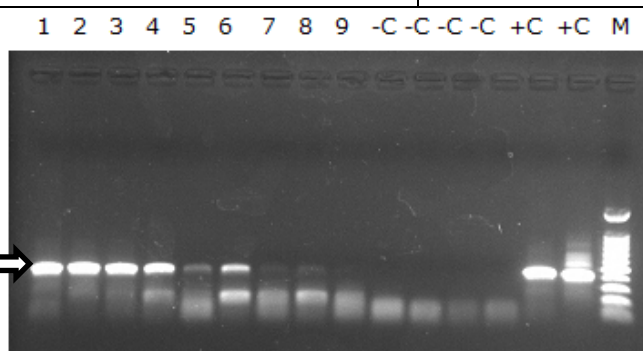
Figuur 4. Gezond + *Dickeya* dipstick-test



Figuur 5. *Pcc* + *Dickeya* dipstick-test



Figuur 6. Gezond + *Dickeya* PCR-*Dickeya*



Figuur 7. *Pcc* + *Dickeya* PCR-*Dickeya*

Figuur 4 en 5: Dipsticks met bij pijl het bandje voor *Dickeya*

Figuur 6 en 7: PCR opnames met bij pijl het bandje voor *Dickeya*.



Een aantal verzamelde hyacintenmonsters en monsters (voorbeeld zie tabel 4 ) die via de afdeling diagnostiek binnenkwamen met de vraag of de snotaantasting een gevolg was van agressief snot of witsnot, werden zowel met de dipstick-test als met PCR getoetst. In alle gevallen op één na waren de monsters die positief waren met PCR ook positief met de dipstick-test. Er was één hyacintenmonster waarvan de bollen al erg uitgedroogd waren en waarbij PCR een zwak positief signaal liet zien terwijl de dipstick-test niet positief was. De verklaring ligt waarschijnlijk in het geringe aantal *Dickeya* bacteriën, dat waarschijnlijk nog aanwezig was in de opgedroogde bol.

Er zijn ook een monster narcis en een monster Muscari getest en in beide werd *Dickeya* aangetoond met de dipstick-test. Met PCR werd *D. dadantii* in narcis en *D. solani* in Muscari vastgesteld.

Diagnostiek Nr. en cultivar hyacint	Symptoom	Dickeya Dip Stick	PCR op Dickeya (ADE1/ADE2)	PCR op Pcc (Y1/Y2)	Specifiek PCR
<b>44746</b>					
A	snot	pos	pos	neg	
<b>44751</b>					
B	snot	neg	neg	pos	
<b>XX</b>					
Narcis	rot	pos	pos	neg	D. dadantii
Narcis	rot	pos	pos	neg	D. dadantii
<b>44772</b>					
Muscari	snot	pos	pos	neg	D. solani
Muscari	snot	pos	pos	neg	D. solani
<b>44800</b>					
M (1)	snot	pos	pos	neg	
M (2)	gezond	neg	neg	neg	
BS (3)	snot	pos	pos	neg	
BS (4)	gezond	neg	neg	neg	
<b>44802</b>					
PS	snot	nos	pos	neg	
PS	snot	Pos	pos	neg	
<b>44805</b>					
D (1)	snot	pos	pos	neg	
D (2)	snot	pos	pos	neg	

Tabel 4. Enkele monsters van Diagnostiek waarbij snotbollen zijn getest op *Dickeya* met dipstick-test en PCR en met PCR op *Pectobacterium*.

## Demonstratie en testen door bedrijven

In juli is het prototype gedemonstreerd aan de bestuursleden van de productgroep Hyacint.

De conclusie was dat de dipstick-test werkt maar in deze vorm niet geschikt is om door de bedrijven zelf uit te voeren. Nagegaan moet worden wat de mogelijkheden en kosten zijn voor verdere ontwikkeling, waarbij deze test wel door de bedrijven kan worden uitgevoerd. Ook is aangegeven dat de dipstick-test in de periode daarna verder getest zou worden en dat de gevoeligheid zou worden nagegaan. (zie bij resultaten bij testen dipstick-test).

## Productie dipstick-test

FBR kan eventueel in samenwerking met Prime-Diagnostics de huidige dipstick-test leveren en mogelijk ook de verder nog te ontwikkelen test voor op de bedrijven. Voor de kosten hiervan zou dan nog financiering moeten worden gevonden.

## 2.4 Discussie

### Dipstick-test

Toetsing met de dipstick-test volgens het nu beschikbare protocol geeft snel en betrouwbaar aan of een snotbol door *Dickeya* aangetast is of niet. Het nu beschikbare protocol is goed bruikbaar voor bijvoorbeeld de afdeling Diagnostiek van PPO. De te berekenen kosten zouden voor de teler aanzienlijk lager zijn dan die van de huidige PCR-toets en de teler krijg ook (veel) sneller een betrouwbare uitslag. Het protocol vereist wel de benodigde laboratoriummaterialen en enige kennis/ervaring.

Voor ontwikkeling en toepassing op de bedrijven zal nog een aanvullend stuk moeten worden ontwikkeld en het is aan het vak of daar geld voor beschikbaar wordt gesteld. FBR levert daarvoor een offerte. Daarmee zal de discussie met de teelt en export worden gestart.

Indien uit kostenoverweging niet per bol maar met mengmonsters gewerkt gaat worden is van belang dat goed gemengd wordt en moet duidelijk zijn dat een positieve uitslag alleen aangeeft dat *Dickeya* aanwezig is en niets zegt over de mate waarin het voor komt.

Er zal wel een duidelijke instructie nodig zijn voor het nemen van het monster. Welk deel van de bol en de hoeveelheid zijn van belang.

Positief is dat de huidige test ook geschikt bleek voor Muscari en narcis, maar er is slechts van beide gewassen één monster getest.

## 2.5 Conclusie

### Dipstick-test

- Er is een protocol met een dipstick-test die na ca. 30 minuten betrouwbaar kan aantonen of een snotbol door *Dickeya* is aangetast.
- De dipstick is nog niet geschikt om door een teler zelf op het bedrijf uit te voeren.
- PPO afdeling Diagnostiek gaat de huidige dipstick- toets aanbieden tegen een aanzienlijk lager tarief dan nu geldt voor een PCR-toets.

FBR maakt een offerte voor vervolgonderzoek naar de stap naar toetsing op en door de bedrijven.

## 3 Bestrijding trips in hyacint door CATT

### 3.1 Inleiding

Trips in hyacint is een plaag die in de afgelopen jaren toenam zowel in de teelt als in de broei. Onderzoek op PPO leidde tot adviezen voor het gebruik van Admire als ontsmettingsmiddel en een hoge dosering Actellic als ruimtebehandeling. Beide zijn niet meer toegestaan. Bruikbare alternatieven zijn er nog niet. CATT (Controlled Atmosphere Temperature Treatment) is een ruimtebehandeling waarin hoge temperatuur, lage concentratie O<sub>2</sub> en hoge concentratie CO<sub>2</sub> worden gecombineerd gedurende een bepaalde periode. Er is al enige ervaring opgedaan door o.a. FBR/PRI waaruit blijkt dat met name insecten en mijten goed te bestrijden zijn door deze behandeling. Er is ook al ervaring met de bestrijding van Californische trips. In het voorliggende project is o.a. samengewerkt met Jan Verschoor (FBR Fresh Food and Chains) voor de CATT toepassing en Willem Jan de Kogel (PPO/PPRI Bio Interacties en Plantgezondheid) voor het ter beschikking stellen van de tripsen.

In voorjaar 2014 is door de productgroep Hyacint budget bestemd voor inzet in een PPS "Met CATT maken wij producten duurzaam plaagvrij" in 2014 en 2015, een project van o.a. PPO AGV, PPO BBF, FBR en PRI, waarin diverse plagen worden bestreden en waarin de bestrijding van trips bij hyacint is ondergebracht. De Projectleiding lag bij Yu Tong Qiu (PPO AGV/PRI).

In dit project is nagegaan wat de mogelijkheden zijn voor de bestrijding van tabaks trips bij hyacint en of de bollen (zowel holbollen als broeibollen) de behandeling zonder schade kunnen doorstaan.

### 3.2 Materiaal en methode

Het onderzoek naar de bestrijding is uitgevoerd met holbollen van de cultivar Pink Pearl, die besmet waren met gekweekte trips. Om na te gaan of de behandelingen schade geven, zijn tegelijkertijd niet besmette holbollen en leverbare bollen (Pink Pearl en Delft Blue) behandeld. De holbollen worden nageeteeld en de leverbare bollen worden afgebroeid ter beoordeling op mogelijke schade door de behandelingen.

#### **Besmetting en bewaring**

De holbollen zijn 13 augustus besmet met trips, die gekweekt waren op preibladeren. De holbollen zijn bewaard in plastic emmertjes waarvan de bodem en deksel voorzien waren van speciaal tripsgaas. Dit laat wel lucht door, maar tripsen kunnen er niet in of uit. Onderlinge besmetting kon gedurende de vele weken van de bewaring hierdoor worden voorkomen. De niet besmette holbollen zijn normaal bewaard in dezelfde bewaarcel in de holbakken van de leverancier van de holbollen. De bollen zijn gehold en gedroogd aangekocht en zijn na te zijn besmet nog 5 dagen bewaard bij 23°C en vervolgens een week bij 25°C. Na de CATT behandeling zijn de bollen bewaard bij 25°C en later bij 23°C tot eind november.



In de deksel van de emmer tripsgaas geplakt

Dozen van opzij gezien met 3 lagen bollen

*Figuur 8. Bewaring van de holbollen met een tripsbesmetting in plasticemmers met in de bodem en de deksel tripsgaas.*

### **CATT-behandeling**

De behandelingen zijn toegepast door FBR in Wageningen. Mogelijk worden door de behandeling meerdere gewassen en plagen tegelijkertijd bestreden. Details van de behandelingen zijn nog niet openbaar.

Er zijn 16 CATT- behandelingen (diverse combinaties van tijd , temperatuur en concentraties O<sub>2</sub> en CO<sub>2</sub>) uitgevoerd en er waren nog 2 controle behandelingen die op PPO zijn gebleven.

De CATT-behandeling vond plaats op 25 augustus in Wageningen; de bollen zijn na 3 dagen teruggebracht naar PPO in Lisse en daar verder bewaard tot beoordeling en planten in na half november.

### **Beoordeling**

Ten tijde van het schrijven van dit verslag moet de beoordeling nog plaatsvinden. De met trips besmette holbollen worden beoordeeld op de mate waarin de tripsen zijn bestreden en de schade die zij veroorzaakt hebben. De rokken van de bollen worden daarbij losgemaakt en enkele dagen in een Berlese trechter aan licht en warmte blootgesteld waardoor alle aanwezige tripsen vrijkomen en gevangen en geteld worden. De mate van schade aan de bolrokken en klisters door de tripsen wordt vastgelegd.

De niet besmette bollen worden beoordeeld op de mate van ontwikkeling van klisters en vervolgens opgeplant ter beoordeling van de ontwikkeling en groei van de nieuwe bolletjes. Te velde en na de oogst worden ze opnieuw beoordeeld op stand van het gewas respectievelijk op de opbrengst.

De leverbare bollen zijn eind november opgeplant en worden in februari beoordeeld op kwaliteit van gewas en bloem.

## **3.3 Resultaten**

De resultaten van de tripbestrijding zijn bij het maken van dit verslag nog niet bekend. Wel was door het tripsgaas en de doorzichtige emmertjes te zien dat de ontwikkeling van de bolletjes er bij ongeveer de helft van de behandelingen goed uit ziet en de bestrijding dus goed is geweest. Er zijn behandelingen waarbij weinig ontwikkeling te zien is en de kleur van de bolletjes bruin is door aantasting (figuur 9 ) en die vergelijkbaar zijn met de besmette controle .

Effecten van temperatuur, duur en CATT condities zijn zichtbaar.

De gezonde holbollen die behandeld zijn zagen er allemaal goed uit met veel aangelegde en goed ontwikkelde bolletjes, waarbij geen verschillen te zien waren tussen de behandelingen. Een voorbeeld is te zien in figuur 10 waarin 4 behandelingen zijn weergegeven.

De gegevens van de bestrijding en de gevolgen van de behandelingen voor groei en broeikwaliteit worden later aan dit verslag toegevoegd.



Figuur 9. Holbollen in november, met weinig ontwikkeling van knoppen door aantasting door trips.



Figuur 10. Het resultaat van 4 CATT-behandelingen van niet met trips besmette holbollen bij planten in november.

## 3.4 Discussie en conclusie

Omdat de resultaten op het moment van deze verslaggeving nog niet volledig bekend zijn, wordt volstaan met enkele eerste indrukken. De resultaten worden later aan het verslag toegevoegd.

- De definitieve resultaten van dit eerste jaar, van de bestrijding (december) en van de schade aan holbollen (zomer) en leverbare bollen in de boei (februari) worden later aan het verslag toegevoegd.
- Een aantal behandelingen lijkt de tripsen goed te hebben bestreden, waarbij er effecten zichtbaar zijn van de duur van de behandeling, de temperatuur en van de concentratie O<sub>2</sub> en CO<sub>2</sub>.
- De niet besmette holbollen hebben alle behandelingen goed doorstaan.

## 4 Communicatie

### **2013**

September KAVB productgroep Hyacint, Hillegom

### **2014**

Januari, mei en november KAVB productgroep Hyacint, Hillegom

20 maart, Jaarvergadering productgroep Hyacint, Keukenhof, Lisse

27 maart, studiegroep Hyacint, Lisse

11 en 27 april, ontbijtsessie HOBACHO, Lisse en 't Zand (alleen dipstick)

22 juli, demo dipstick voor het bestuur van de productgroep Hyacint, Lisse

19 november, Studiegroep telers de Zuid, Noordwijkerhout

BloembollenVisie 2014 nr 306 p. 71: Dipstick Dickeya perspectiefvol (Interview)

IDC (Informatie en Demo Centrum voor Bollen en Vaste planten: Op bloembollenweb.nl:  
(<http://bloembollenweb.nl/content/dipstick-voor-erwinia-hyacint>)

### **2015**

Gepland o.a.

Januari Mechanisatietentoonstelling, Vijfhuizen: info dipstick in stand van IDC.

Maart Toelichting toets bij de ledenvergadering van de productgroep Hyacint

Artikel voor BloembollenVisie.