



Bronnenonderzoek Agrobacterium in Aster

J.P. Wubben, A. Hazendonk, C. Lanser – PPO Glastuinbouw
R. Hooftman – Naktuinbouw

© 2003  eningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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

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

PPO Publicatie

Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw.

Projectnummer: 4110 3163

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Glastuinbouw

Adres : Linnaeuslaan 2a
: 1431 JV Aalsmeer
Tel. : 0297 352525
Fax : 0297 352270
E-mail : info@ppo.dlo.nl ???
Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	4
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODEN	7
2.1 Onderdelen vermeerdering van aster.....	7
2.2 Bronnenonderzoek.....	7
2.2.1 Eerste bemonstering.....	7
2.2.2 Tweede bemonstering.....	8
2.3 Infectieproeven.....	8
3 RESULTATEN	11
3.1 Onderdelen vermeerdering van aster.....	11
3.2 Bronnenonderzoek.....	12
3.2.1 Eerste bemonstering.....	12
3.2.2 Tweede bemonstering.....	12
3.3 Infectieproeven.....	13
4 DISCUSSIE	17
4.1 Bronnenonderzoek.....	17
4.2 Infectieproeven.....	17
5 HYGIËNEPROTOCOL	19
6 CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	21
BIJLAGE 1 GEDETAILLEERDE UITSLAG VAN DE BEMONSTERINGEN.....	23

Samenvatting

De wortelknobbelbacterie *Agrobacterium tumefaciens* vormt een belangrijk probleem in zowel de vermeerdering als de teelt van Aster. De *Agrobacterium*-bacterie kan de plant binnendringen via wondjes. Vervolgens wordt op deze plaats een tumor gevormd omdat de plantencellen onbeperkt gaan delen. In jonge tumoren kunnen grote hoeveelheden *Agrobacterium* aanwezig zijn. Door de tumor raakt de plant misvormd en treden groeiremmingen op. Bestrijding van de bacterie is lastig. Chemische middelen zijn nauwelijks effectief of niet toegelaten. Voorkomen dat aantasting kan optreden door preventieve maatregelen is een eerste vereiste. In opdracht van het Productschap Tuinbouw heeft PPO samen met Naktuinbouw onderzoek verricht naar besmettingsbronnen van *Agrobacterium* in de vermeerdering. Daarnaast is door middel van infectieproeven onderzocht hoe de planten in de vermeerdering besmet kunnen raken en hoeveel bacteriën hiervoor noodzakelijk zijn.

Besmettingsbronnen

Agrobacterium kon in diverse onderdelen van de vermeerdering aangetoond worden. Voorbeelden hiervan zijn stekmesjes, bewortelde stek en retourwater van de beworteling. Er werd geen *Agrobacterium* aangetoond in het uitgangsmateriaal afkomstig van de weefselkweek. Aan de hand van deze resultaten is een hygiëne-advies opgesteld om de besmettingsbronnen aan te pakken. Het risico voor ontstaan van aantasting en verspreiding van de ziekte in de vermeerdering en teelt moet hiermee afnemen tot een acceptabel niveau.

Infectieproeven

De aantasting van Aster door *Agrobacterium* vindt plaats na verwonding en besmetting. Na besmetting met ongeveer 1000 bacteriën per plant werd aantasting gevonden. De meeste aantasting ontstond wanneer de planten met een besmet mesje getopt werden. Ook wanneer getopte planten besmet werden via de grond of boven in de plant ontstond aantasting. Er ontstond geen aantasting wanneer de planten niet verwond waren. Dit betekent dat er een groot risico voor ontstaan van aantasting is wanneer bijvoorbeeld de stekken gesneden worden met mesjes die besmet zijn met *Agrobacterium* of wanneer het voedingswater van vers gesneden stek besmet is. Wanneer er geen wondjes op de plant aanwezig zijn, is de kans op aantasting kleiner.

Hygiëneprotocol

Aan de hand van de inventarisatie van de besmettingsbronnen en het onderzoek met infectieproeven is een hygiëneprotocol opgezet wat als leidraad kan dienen om het teeltsysteem effectief te ontsmetten en om besmetting van het plantmateriaal tijdens de vermeerdering te voorkomen. Het protocol is met name gericht op het nemen van preventieve maatregelen.

1 Inleiding

Wortelknobbel veroorzaakt door *Agrobacterium tumefaciens* is een belangrijk probleem in de Asterteelt. In 1984 is deze teelt in Nederland geïntroduceerd. Een aantal jaren na de introductie van asters in Nederland heeft *A. tumefaciens* zich met stekmateriaal vanuit Israël op de Nederlandse vermeerderingsbedrijven gevestigd. Sinds deze introductie is wortelknobbel een steeds terugkerend probleem in de asterteelt. Hoewel het uitgangsmateriaal voor de moerplanten afkomstig is uit weefselkweek lijkt het probleem moeilijk beheersbaar. Na het opzetten van de nieuwe moerplanten in de vermeerdering treedt soms al na vier weken wortelknobbel op in de moerplanten. De knobbels bevinden zich op het bovengrondse materiaal op een snijvlak. De aangetaste partij kan niet meer gebruikt worden voor vermeerdering om risico van verspreiding door stek te voorkomen. Een partij moerplanten moet daarom sneller vervangen worden. De schade in de teeltfase lijkt beperkt tot incidentele partijen, maar het risico van aantasting blijft aanwezig. Indien besmetting in de teeltfase optreedt dan kan dit een verminderde bloemproductie tot gevolg hebben. Curatieve bestrijding van wortelknobbel is nauwelijks mogelijk. Wanneer knobbels gevormd worden, kunnen ze onbeperkt doorgroeien ook in afwezigheid van levende bacteriën. Zelfs wanneer de bacteriën succesvol bestreden worden, is het resultaat slechts dat verspreiding van aantasting wordt voorkomen. Het is dus altijd zaak om besmetting en aantasting te voorkomen.

De doelstelling van het project was door middel van bronnenonderzoek in de vermeerdering van aster te bepalen waar de risico's voor het optreden van besmetting liggen. Een tweede doelstelling was het toetsen van een gevoelige detectiemethode voor *Agrobacterium tumefaciens* op symptoomloos materiaal uit de vermeerdering van aster.

Het onderzoek is uitgevoerd in drie onderdelen. Het eerste onderdeel was de oriëntatiefase, waarin de productieprocessen in kaart werden gebracht. Aan de hand hiervan werd bepaald welke monsters genomen moeten worden, en werd de BioPCR voor het aantonen van *Agrobacterium* in aster gevalideerd. In het tweede onderdeel zijn het bronnenonderzoek en de infectietoetsen uitgevoerd. In het bronnenonderzoek werd bepaald waar in het productieproces van uitgangsmateriaal besmetting met *Agrobacterium* optreedt. In de infectietoetsen is getoetst welke *Agrobacterium* isolaten aantasting van aster geven. Daarnaast is bepaald welke concentratie besmettelijk is, wat de incubatietijd is en onder welke omstandigheden aantasting ontstaat.

Het derde onderdeel bestond uit evaluatie, verslaglegging en praktijkvertaling. Hierin werden de resultaten samengevat in een verslag, dat besproken is met de vermeerderingsbedrijven (weefselkweek en stekleverancier).

In dit rapport staan de resultaten van bovengenoemde activiteiten beschreven met uitzondering van de validatietoets door Naktuinbouw.

2 Materiaal en methoden

2.1 Onderdelen vermeerdering van aster

Alvorens een onderzoek naar besmettingsbronnen van *A. tumefaciens* in de vermeerdering van aster uitgevoerd kon worden, is middels gesprekken met betrokken bedrijven vertegenwoordigd in de begeleidingscommissie (weefselkweek bedrijf en vermeerderaar) vastgesteld uit welke onderdelen de vermeerdering van aster bestaat.

2.2 Bronnenonderzoek

Aan de hand van de verschillende stappen die voor de vermeerdering van aster uitgevoerd worden, is vastgesteld welke onderdelen in een bronnenonderzoek bemonsterd zouden moeten worden. Op 11 juli 2002 is een eerste bemonstering uitgevoerd. Op 19 september 2002 volgde een tweede serie.

2.2.1 Eerste bemonstering

De 1^e monsters zijn op 11 juli 2002 (week 28) genomen bij het vermeerderingsbedrijf en bij het weefselkweekbedrijf. Niet alle gewenste monsters waren tijdens deze eerste bemonsteringsserie beschikbaar. In Tabel 1 is in een overzicht weergegeven welke monster gepland waren en welke uiteindelijk daadwerkelijk genomen zijn.

Tabel 1 Overzicht van monsters in de 1^e bemonstering.

Monster	Gepland Aantal	Genomen Aantal	Type	Opmerking
Stek voor de weefselkweek	5	0	plant	Niet beschikbaar.
Stek van moerplanten van verschillende leeftijd en van verschillende cultivars	10	15	plant	Symptoomloos.
Beworteld stek van verschillende leeftijd en van verschillende cultivars	10	10	plant	Symptoomloos.
Druppelwater uit de stekers bij moerplanten	5	3	water	Van moerplanten van verschillende leeftijd/ verschillende bedden
Basinwater	1	2	water	Bij de inlaat.
Drainwater van eb-vloed vloer	1	1	water	Uit de silo
Drainwater van grondteelt	0	1	water	Uit de silo
Slootwater	0	1	water	
Librabakken	2	2	veeg	Met een nat wattenstokje
Schuifbakken, waarin stek wordt geleverd	2	2	veeg	Met een nat wattenstokje
Mesjes	2	2	veeg	Met een nat wattenstokje/ Mesjes in gebruik
Handen	2	2	veeg	Met een nat wattenstokje / Bezig met steksnijden
Afleverbare planten uit de weefselkweek	5	10	plant	2 rassen
Uitgevallen planten in de weefselkweek	5	0	plant	Niet beschikbaar

- Stekken zijn geplukt met een plastic zakje. Het zakje werd binnenstebuiten om een hand gedaan, het stek werd geplukt en het zakje omgedraaid en dichtgeknoopt.
- Van een watermonster was bij voorkeur 500 ml nodig. Het water werd verzameld in plastic flessen.
- Een veegmonster werd genomen met een nat wattenstokje. Het stokje werd nat gemaakt met millipore water. Na het bemonsteren is het stokje in een reageerbuis gedaan.

Alle monsters, op de weefselweekplantjes na, zijn afkomstig van het vermeerderingsbedrijf. Nadat de monsters verzameld waren, zijn ze dezelfde dag naar de Naktuinbouw gebracht. De monsters zijn op code aangeleverd. Naktuinbouw heeft de monsters geanalyseerd op aanwezigheid van *A. tumefaciens* met behulp van BioPCR.

2.2.2 Tweede bemonstering

De 2^e serie monsters zijn op 19 september 2002 (week 38) genomen bij het vermeerderingsbedrijf en bij het weefselweekbedrijf. In Tabel 2 is in een overzicht weergegeven welke monster gepland waren en welke uiteindelijk daadwerkelijk genomen zijn.

Tabel 2 Overzicht van monsters in de 2^e bemonstering

Monster	Geplande Monsters	Genomen Aantal	Type	Opmerking
Stek van moerplanten van verschillende leeftijd en van verschillende cultivars	10	10	plant	Symptoomloos.
Beworteld stek van verschillende leeftijd en van verschillende cultivars	10	10	plant	Symptoomloos.
Druppelwater bij moerplanten	5	3	water	Van moerplanten van verschillende leeftijd / verschillende bedden
Stekers bij moerplanten	0	3	veeg	
Basinwater	1	1	water	Bij de inlaat.
Water van eb vloed vloer tijdens watergift	0	1	water	
Drainwater van eb-vloed vloer	1	1	water	Uit de silo
Drainwater van grondteelt	1	1	water	Uit de silo
Slootwater	0	1	water	
Librabakken	2	2	veeg	Met een nat wattenstokje
Schuifbakken, waarin stek wordt geleverd	2	3	veeg	Met een nat wattenstokje
Mesjes	2	2	veeg	Met een nat wattenstokje / mesjes niet in gebruik
Handen	2	2	veeg	Met een nat wattenstokje / bezig met steksteken
Afleverbare planten uit de weefselweek	5	20	plant	2 rassen, van beide 2 inzettingen
Uitgevallen planten in de weefselweek	5	0	plant	Niet beschikbaar

De monsters zijn op dezelfde manier genomen als bij de eerste bemonstering. Alle monsters, op de weefselweekplantjes na, zijn afkomstig van het vermeerderingsbedrijf.

Nadat de monsters verzameld waren, zijn ze dezelfde dag naar de Naktuinbouw gebracht. De monsters zijn op code aangeleverd. Naktuinbouw heeft de monsters geanalyseerd op aanwezigheid van *A. tumefaciens* met behulp van BioPCR.

2.3 Infectieproeven

Als onderdeel van de oriëntatiefase is door Naktuinbouw een drietal isolaten van *A. tumefaciens* uit aangetast plantmateriaal van aster geïsoleerd. Deze isolaten zijn voor de infectieproeven gebruikt. De isolaten waren geïsoleerd uit cv 'Cassy' (isolaat A en B) en 'Cindy Dark' (isolaat C en D). Beworteld stek van Aster, cultivar Celesta, is op 19 september geleverd door Moerplant en op 20 september opgepot in 9 cm plastic plantenspotten met potgrond (EGO Flush fijn, 15 % perliet). Planten zijn in 18 gaats plantentray geplaatst waarbij drainwatercontact tussen de planten onderling vermeden werd. Plantentrays met planten zijn overgebracht naar een klimaatcel, waarbij in twee lagen van 20 trays geteeld werd. Totaal stonden er 40 trays x 18 planten = 720 stuks in de klimaatcel. De ingestelde en gerealiseerde temperatuur was 20°C, en de relatieve luchtvochtigheid was ingesteld op een vochtdeficiet van 3,5 g/kg Per teeltlaag werden 4 TL buizen (Osram, L36W/21-840) ongeveer 50 cm boven het gewas geplaatst welke van 6.00 tot 20.00 uur

aan stonden. Planten kregen bovendoor voedingsoplossing.

In week 40 werden de planten besmet door inoculatie met verschillende hoeveelheden *A. tumefaciens* en verschillende methoden van besmetten.

Hiertoe zijn op 30 september *Agrobacterium* culturen aangeënt en deze zijn 48 uur gekweekt bij 28°C in een schudwaterbad.

Op 2 oktober werden de planten op 5 verschillende manieren besmet.

- I. stek wordt gesneden met een mesje dat vooraf in een suspensie met *A. tumefaciens* gedoopt is.
- II. stek wordt gesneden en de grond van deze plant wordt besmet door 1 ml suspensie van *A. tumefaciens* op de grond te pipetteren (niet over de plant).
- III. stek wordt gesneden en de wond van de plant wordt besmet door 1 ml suspensie van *A. tumefaciens* op de wond te pipetteren.
- IV. er wordt geen stek gesneden en de grond van de plant wordt besmet door 1 ml suspensie van *A. tumefaciens* op de grond te pipetteren
- V. er wordt geen stek gesneden en de plant wordt besmet door 1 ml suspensie van *A. tumefaciens* op de plant te pipetteren.

Per plantentray van 18 planten werd één besmettingsmethode gebruikt. Iedere tray bestaat uit 3 rijen van 6 planten. De drie isolaten die voor deze proef gebruikt zijn werden over deze drie rijen verloot. Binnen een rij van zes planten werden een oplopende of aflopende concentratie van de bacterie gebruikt voor de besmettingen. De concentratiereeks van de bacterie liep van 0, 1, 10^2 , 10^4 , 10^6 tot 10^8 bacteriën per ml (= per plant). De proef is totaal uitgevoerd in 8 herhalingen. Binnen een blok van vijf trays werd de besmettingsmethode verloot. In alle gevallen werd eenmalig besmet.

Het optreden van wortelknobbel is wekelijks visueel waargenomen. Planten met zichtbare wortelknobbelvorming kregen de score 1 terwijl planten zonder zichtbare symptomen score 0 hielden. Na afloop van de proef is van alle planten het versgewicht bepaald. Dit geeft een indicatie omtrent eventuele groeiremming als gevolg van de *A. tumefaciens* besmetting.

Overzicht van de proefopzet is te zien in Fig. 1.



Figuur 1. Overzichtopname van inrichting infectieproef.

3 Resultaten

3.1 Onderdelen vermeerdering van aster.

De vermeerdering is onderverdeeld in drie onderdelen;

I Uitgangsmateriaal voor de weefselkweek,

II, Weefselkweek,

III Moerplanten en vermeerdering/beworteling.

Deze drie onderdelen staan hieronder globaal beschreven met de stand van zaken omtrent ontsmetting zoals deze uitgevoerd werd bij aanvang van het project.

I Uitgangsmateriaal voor de weefselkweek.

Ieder jaar wordt door het weefselkweeklaboratorium het sortiment asters uitgeleverd. Het gaat om 50 planten per soort. Het materiaal dat gebruikt wordt voor de opzet van de weefselkweek is afkomstig van verschillende soorten plantmateriaal. Allereerst kan uit de partij van 50 geleverde planten uit de weefselkweek één plant geselecteerd worden die de stek levert voor de productie van weefselkweekplanten voor een volgende partij. Daarnaast worden ook stekken van zaailingen, van productieplanten op het vermeerderingsbedrijf of van planten op een productiebedrijf gebruikt. Het gaat hierbij om stek van planten, die goede groeiers zijn. Deze planten worden algemeen in de volle grond geteeld. Bij teeltwisselingen wordt de kasopstand schoongespoten. De grond wordt niet voor elke teelt ontsmet. Er bestaat dus een kans dat dit uitgangsmateriaal voor de weefselkweek besmet is met *A. tumefaciens*.

Het stek wordt met een mesje gesneden, in een plastic zakje gedaan en naar het weefselkweeklab gestuurd. Het mes wordt ontsmet met 100% alcohol; de handen waarmee de stek wordt gepakt, zijn niet ontsmet.

II Weefselkweek.

Voor de weefselkweek wordt materiaal ingezet uit kleine groeipunten van de stekken. Er wordt geen meristeemcultuur toegepast. De stukjes worden eerst ontsmet met chloor en alcohol. Het weefselstukje wordt driemaal getoetst op bacterie-medium om te controleren dat bacteriën afwezig zijn. Voor de productie van het uitgangsmateriaal (de moerplanten voor de vermeerdering) wordt een stock opgezet van 50 buizen.

III Moerplanten en vermeerdering.

De moerplanten worden geteeld in perspotten op steenwol in librabakken. Voordat de planten in de kas komen, wordt de kasopstand schoongespoten met water. De librabakken zijn gestoomd of ontsmet met Menno ter Forte of Jet 5. In de bakken ligt nieuwe of gestoomde steenwol. De steenwol wordt volgedruppeld met leidingwater; de slangen en de stekers zijn alleen aan de buitenkant ontsmet met Menno ter Forte of Jet 5.

Op de steenwolmatten komen perspotten (niet ontsmette grond) met weefselkweekplantjes te staan. De perspotten komen in hergebruikte, niet ontsmette, schuifbakken aan.

Na drie weken wordt de kop eruit gehaald met een mesje. Ook het stek wordt met mesjes gesneden. De mesjes worden per tafel per snijbeurt ontsmet door ze af te sproeien met 100% alcohol. Het stek wordt met de hand gepakt; de handen zijn niet ontsmet. Het stek wordt in plastic zakjes in de koelcel opgeslagen. Na een verblijf in de koelcel (één tot vijf dagen) wordt het stek met de hand gestoken in perspotjes. De handen worden hierbij niet ontsmet. Stek wordt afgegoten met niet ontsmet basinwater om de perspotjes dicht te laten lopen. Er wordt een chemische bestrijding tegen schimmels uitgevoerd. Hierna worden de stekken afgedekt met nieuw plastic.

Na acht à negen dagen gaat het plastic eraf. Na twee à drie weken zijn de stekken afleverbaar. In de zomer wordt er water gegeven met een eb-vloed systeem. Het water wordt gerecirculeerd en wordt niet ontsmet. In de winter wordt geen water gegeven. Vanaf stek steken tot het afleveren wordt het stek niet meer

aangeraakt. De eb-vloed vloer wordt éénmaal per jaar ontsmet met Menno ter Forte.

3.2 Bronnenonderzoek

3.2.1 Eerste bemonstering

De monsters uit het bronnenonderzoek zijn door Naktuinbouw geanalyseerd op de aanwezigheid van *A. tumefaciens*. In 13 van de 51 monsters is de bacterie aangetoond (zie Tabel 3). Het gaat hierbij om 3 monsters van stekken van moerplanten en om 6 monsters van beworteld stek. Ook in het watermonster uit de silo, waarin het retourwater van de eb en vloed vloer wordt opgevangen, is *A. tumefaciens* gevonden. Tenslotte is 2 keer in veegmonsters van de mesjes *A. tumefaciens* aangetoond. Een samenvatting van de resultaten staat vermeld in Tabel 3. In Bijlage 1 staan alle monsters apart vermeld.

Tabel 3 Uitslag 1^e bemonstering, positief betekent *Agrobacterium* aangetoond.

Monsternr	Type	Herkomst	Aantal genomen monsters	Aantal positieve monsters
1 t/m 15	plant	Stek van moerplant	15	3
16 t/m 25	plant	Beworteld stek	10	6
26	water	Basin buiten	1	0
27	water	Basinwater uit kraan binnen	1	0
28	water	Silo drainwater van de grondteelt	1	0
29	water	Silo drainwater van eb-vloed vloer	1	1
30 t/m 32	water	Druppelwater	3	1
33	water	Leiding waar slootwater mee binnen komt	1	0
34 t/m 35	veeg	Librabakken	2	0
36 t/m 37	veeg	Mesjes in gebruik	2	2
38 t/m 39	veeg	Handen	2	0
40 t/m 41	veeg	Schuifbakken	2	0
42 t/m 51	plant	Weefselkweek	10	0

3.2.2 Tweede bemonstering

De BioPCR-analyse gaf in voor de tweede bemonstering 6 positieve reacties waarmee *A. tumefaciens* in het monster aangetoond werd. Het gaat hierbij in alle gevallen om beworteld stek. De veeg- en watermonsters zijn van beide bemonsteringen nogmaals met een extra gevoelige toets (nested-PCR) onderzocht. Hierbij werd bij de tweede bemonstering nog eens extra 3 positieve monsters gevonden. Het ging hierbij om water van de eb en vloed vloer tijdens de watergift, retourwater uit de silo voor eb en vloed en een veegmonster van een librabak. De resultaten staan ook vermeld in Tabel 4. In Bijlage 1 staan alle monsters apart vermeld.

Tabel 4 Uitslag 2^e bemonstering, positief betekent Agrobacterium aangetoond.

Monsternr	Type	Herkomst monster	Totaal aantal monsters	Aantal positieve monsters
1	Water	Eb vloed vloer	1	1
2	Water	Druppelleiding	3	0
5	Water	Basin	1	0
6	Water	Silo drainwater van de grondteelt	1	0
7	Water	Silo drainwater van de eb vloed vloer	1	1
8	Water	Waterput, boezemwater	1	0
9 t/m 18	Plant	Beworteld stek	10	6
19 t/m 28	Plant	Stek van moerplant	10	0
29 t/m 30	Veeg	Librabakken	2	1
31 t/m 32	Veeg	Mesjes niet in gebruik	2	0
33 t/m 35	Veeg	Stekers	3	0
36 t/m 37	Veeg	Handen	2	0
38 t/m 40	Veeg	Schuifbakken	3	0
41 t/m 60	Plant	Weefselkweek	20	0

3.3 Infectieproeven

De infectieproeven zijn ingezet op 2 oktober. Op 16 oktober, 14 dagen na het inzetten van de proef werden de eerste knobbels op de planten waargenomen. Vervolgens werd gedurende 4 weken de ontwikkeling van de aantasting waargenomen. Voorbeelden van plantentrays met verschillende besmettingsmethoden (met en zonder snijden van de top) staan weergegeven in Figuur 2. Het grote verschil in groei van de planten in tray A ten opzichte van tray B wordt veroorzaakt door de behandeling waarbij de hoofdscheut van de stek verwijderd is (B).

Twee weken na het inzetten van de besmettingsproef werden eerste ziektesymptomen zichtbaar. Uiteindelijk groeiden deze kleine knobbels uit tot knobbels van 0,5 tot 1,0 cm (Figuur 3). De knobbels werden in alle gevallen gevormd op het snijvlak van de plant waar de scheut verwijderd was.



A



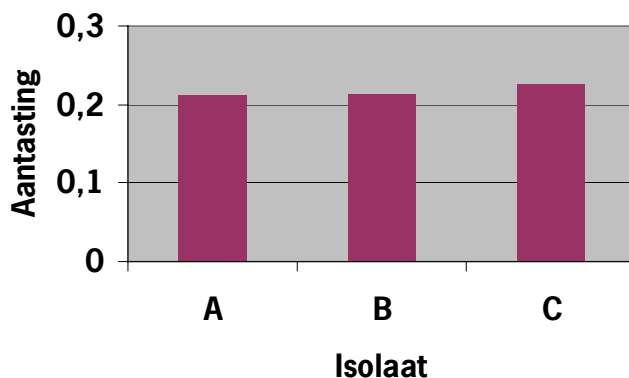
B

Figuur 2. Voorbeeld van een plantentray met Asters besmet volgens methode V (A; zonder de top te verwijderen en besmetten van de planten) en methode II (B; top verwijderen en planten besmetten door aangieten van de bacterie op de grond).



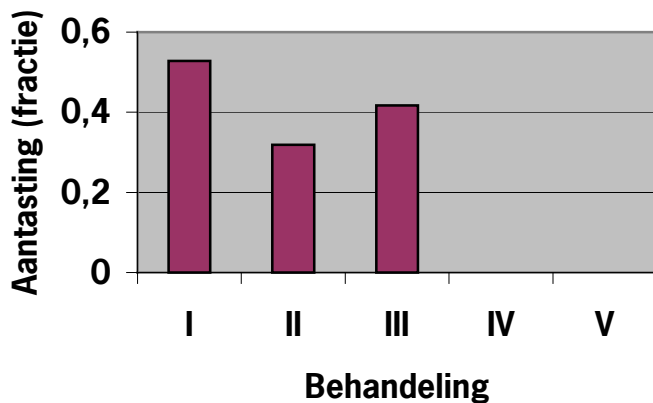
Figuur 3. Ziektebeeld van *A. tumefaciens* op aster. Duidelijk vorming van tumoren op het oorspronkelijke snijvlak waar de top verwijderd was.

Er zijn geen verschillen gevonden in aantastingsniveau tussen de drie verschillende isolaten die getoetst zijn. De fractie planten met aantasting na besmetting met de verschillende isolaten staat weergegeven in Figuur 4. Aantasting is waargenomen met een score 0 (geen aantasting) of 1 (aantasting). De gemiddelde aantasting geeft aan de fractie planten per behandeling met zichtbare *A. tumefaciens*.



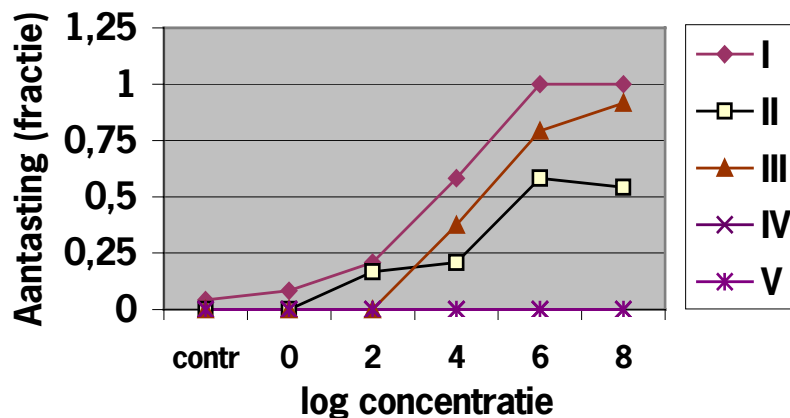
Figuur 4. Effect van isolaat op de tumorvorming van aster na besmetting met *Agrobacterium tumefaciens*. Weergegeven is de fractie planten met zichtbare aantasting op 25/10/2002.

De fractie aantasting welke gevonden is bij de verschillende besmettingsmethoden is weergegeven in Figuur 5. De besmettingsmethode leverde zeer duidelijke verschillen in aantallen planten met aantasting. Behandelingen I, II en III leveren allen duidelijke tumorvorming bij de besmette planten terwijl in geen enkel geval voor behandeling IV en V (zonder verwonding) tumorvorming gevonden werd. De meeste tumours zijn gevonden bij de planten die aangesneden waren met een besmet mesje (behandeling I). Planten die na verwonding besmet waren door aangieten van bacteriën op de plant (III) of op de grond (II) gaven betrouwbaar minder aantasting. Binnen de proefperiode zijn geen planten met tumours gevonden wanneer de planten niet verwond waren door aansnijden.



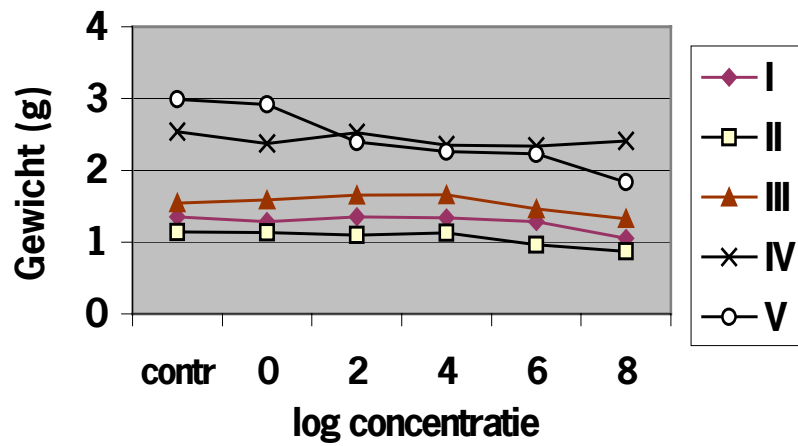
Figuur 5. Effect van besmettingsmethode op de tumorvorming van aster na besmetting met *Agrobacterium tumefaciens*. Weergegeven is gemiddelde aantasting van planten waargenomen op 25/10/2002. De betekenis van behandeling I t/m V staat weergegeven in hoofdstuk 2.3.

Vanaf een concentratie van 10^0 - 10^2 bacteriën (1-100) per plant zien we een toename van het aantal planten met tumours (Figuur 6). Dit betekent dat minder dan 100 bacteriën per plant voldoende zijn om aantasting te geven. Tot een concentratie van 10^6 bacteriën per plant vindt een bijna lineaire toename van aantasting plaats. Bij besmetting met besmette mesjes zijn bij die concentratie alle planten aangetast. Bij behandeling II zien we dat maximaal iets meer dan de helft van de planten zichtbaar aangetast zijn, ook bij de hoogste *Agrobacterium* concentratie.



Figuur 6. Effect van bacterieconcentratie en besmettingsmethode op de tumorvorming van aster na besmetting met *Agrobacterium tumefaciens*. Weergegeven is de gemiddelde aantasting op 25/10/2002. 1 = 100 % aantasting. De betekenis van behandeling I t/m V staat weergegeven in hoofdstuk 2.3.

Het versgewicht van de planten is bepaald aan het einde van de proef (figuur 7). Bij behandeling I, II en III werd een lichte maar significante afname in het versgewicht van de planten gevonden bij de hoogste concentratie *Agrobacterium* besmetting. Dit zou betekenen dat de aanwezigheid van de tumor de groei van de plant zou remmen. Opvallend is ook dat bij behandeling V, waarbij geen zichtbare aantasting geconstateerd is, wel een significante afname in het versgewicht van de planten gevonden is. Hierbij is de bacterie direct op de plant aangebracht zonder verwonding.



Figuur 7. Effect van bacterieconcentratie en besmettingsmethode op de versgewicht van aster na besmetting met *Agrobacterium tumefaciens*. Weergegeven is het versgewicht op 06-11-2002. De betekenis van behandeling I t/m V staat weergegeven in hoofdstuk 2.3.

4 Discussie

4.1 Bronnenonderzoek

Op het bemonsterde bedrijf komt in de vermeerdering van Aster *Agrobacterium* voor. De oorspronkelijke bron, waarmee de ziekte op het bedrijf is geïntroduceerd, is niet meer te achterhalen. Hoogst waarschijnlijk is *A. tumefaciens* geïntroduceerd met besmet plantmateriaal. De meeste besmetting kon aangetoond worden in stek van moerplanten en in beworteld stek. Dit was symptoomloos materiaal. Naast besmet plantmateriaal werden in de vermeerdering diverse andere potentiële besmettingsbronnen aangetoond. Een belangrijke en gevaarlijke besmettingsbron zijn de **mesjes** waarmee de stekken van de moerplanten gesneden worden. Bij de bemonstering waren beide mesjes die gebruikt werden positief getoetst voor *Agrobacterium*. Bij de tweede bemonstering werd geen *Agrobacterium* op mesjes aangetoond die niet in gebruik waren. **Voedingswater** en **retourwater** in de **silo** van de eb-vloed vloer gaven zowel bij de eerste bemonstering als bij de tweede bemonstering een positief resultaat. Daarnaast werd ook een besmetting aangetoond in het **voedingswater van de moerplanten**. Hierbij valt niet met zekerheid te zeggen of het water zelf besmet was of dat de besmetting middels **druppelaar** in het monster is terecht gekomen. Verspreiding van aantasting met het voedingswater is gezien de resultaten van het bronnenonderzoek een reële mogelijkheid. Bij de tweede bemonstering is ook een besmetting aangetoond in een **librabak** welke voor de moerplantenteelt gebruikt wordt. Deze moeten bij teeltwisselingen absoluut ontsmet worden. Aantasting in de moerplanten wordt reeds enkele weken na de opzet van nieuwe moerplanten gevonden. Gezien de resultaten van het bronnenonderzoek zou deze besmetting afkomstig kunnen zijn van stekmesjes, librabakken of voedingswater. In geen geval werd aantasting in plantmateriaal afkomstig van de weefselkweek gevonden. Aangenomen mag worden dat deze plantjes ziektevrij zijn en geen *A. tumefaciens* dragen.

Wanneer mesjes een belangrijke besmettingsbron zijn dan kunnen deze voor zeer snelle verspreiding van aantasting in de moerplanten zorgen. Dit is mede aangetoond bij de infectieproeven die op PPO glastuinbouw uitgevoerd zijn. Wanneer na het steksnijden en steksteken de planten in perskluitjes in steekbakken op de eb-vloed vloer geplaatst worden dan zal het voedingswater het belangrijkste medium voor verspreiding van aantasting zijn. Echter aantasting zal alleen zichtbaar optreden wanneer een verse wond bij de stekken aanwezig is bijvoorbeeld als gevolg van beschadiging.

4.2 Infectieproeven

De infectieproeven leverden voor een deel een bevestiging van informatie die reeds over *Agrobacterium* bekend was. Allereerst werd geen verschil in aantasting tussen de verschillende *A. tumefaciens* isolaten van Aster gevonden. Verder trad zichtbare aantasting alleen op wanneer een verse snijwond op de plant aanwezig was. Het is bekend dat *A. tumefaciens* uitsluitend aantasting geeft wanneer de plant verwond is. De plant produceert in de wond een stofje (acetosyringone) welke de bacterie aanzet om tot infectie te komen. Omstandigheden voor ontstaan van infectie bleken het meest gunstig wanneer de planten aangesneden werden met een mesje dat eerder in een *Agrobacterium* suspensie gedoopt was (behandeling I). Besmetting van verwonde planten middels aangieten van de bacterie op de grond of op de plant resulteerde in minder aantasting. Zichtbare aantasting werd waargenomen bij een concentratie vanaf 100 bacteriën per plant. Bij planten zonder wond was een concentratie van 10^8 bacteriën per plant nog niet voldoende om een zichtbare aantasting te geven.

Als we dit vertalen naar de praktijk dan is het besmettingsgevaar van de planten het grootste wanneer de planten verwond of beschadigde worden in de aanwezigheid van *A. tumefaciens*. Deze situatie lijkt met name tijdens het stek snijden voor de komen. Er wordt een verse wond geproduceerd en in een aantal

gevallen is aangetoond dat de mesjes besmet kunnen zijn met *A. tumefaciens*.

5 Hygiëneprotocol

Aan de hand van bovenstaande resultaten is bepaald waar de grootste risico's voor verspreiding van besmetting liggen en welke maatregelen genomen moeten worden om dit te voorkomen. Dit is schematisch weergegeven in de volgende tabel 5.

Tabel 5 Potentiële bronnen voor *Agrobacterium* en maatregelen om het probleem aan te pakken.

Onderdeel	Potentiële bron	Maatregel
Plantmateriaal uit weefselkweek	Nee	Geen
Perspotten	Nee (niet getoetst)	Geen
Schuifbakken	Nee	Geen
Steenwol (hergebruik)	Ja	Vervangen of stomen voor hergebruik
Librabak (hergebruik)	Ja	Vervangen of ontsmetten voor hergebruik
Druppelwater, retourwater of basinwater	Ja	Ontsmetten voor gebruik (UV of verhitting)
Slangen, stekers	Ja	Vervangen of ontsmetten (van binnen en van buiten)
Drainwater (niet opvangen, spettert op de vloer)	Ja	Opvangen en bij hergebruik ontsmetten
Vaste waterleidingnet	Ja	Schoonmaken en ontsmetten
Stekmesjes	Ja	Ontsmetten met 70% alcohol Moerplanten voor de werkzaamheden in blokken verdelen
Verwijderen aangetast materiaal	Ja	In een aparte rondgang met andere mesjes dan de stekmesjes
Stek	Ja	Handen ontsmetten bij het stek steken In blokken werken
Stekbakken	Ja	Bakken bij hergebruik uit de asterteelt ontsmetten
Perspotje	Nee (niet getoetst)	Geen
Basinwater	Ja	Ontsmetten
Betonvloer	Ja	Schoonmaken, ontsmetten als een vak leeg is
Gietwater tijdens eb vloed beurt (=drainwater uit de silo)	Ja	Ontsmetten Compartimentalisatie van de watergift; kleine vakken tegelijk water geven en ontsmetten voordat het water naar de volgende vakken gaat.
Silo voor het drainwater eb vloed	Ja	Schoonmaken, ontsmetten, vullen met ontsmet water (ontsmetter ervoor)
Silo voor het drainwater grond	Ja (negatief getoetst)	Ontsmetten, <i>Agrobacterium</i> komt ook in de grondteelt voor. Waterstromen teelt en de vermeerdering gescheiden houden.
Grond op de paden tussen de bedden	Ja	Opruimen; er mag geen grond liggen.
Schoeisel	Ja	Ontsmetten van grondteelt naar vermeerdering en andersom; van moerplanten naar beworteld stek en andersom.
Water uit overlopende goten op de (moer)planten	Ja	Goten repareren.
Transportband gebruikt bij het uitzetten van de stekbakken	Ja	Ontsmetten

Veel maatregelen die van belang zijn voor ontsmetting van recirculerende teeltsystemen zijn recentelijk beschreven in een rapport uitgebracht door PPO in samenwerking met DLV. Dit rapport (PP0571) is te bestellen via het de internetsite van PPO (www.ppo.dlo.nl)

6 Conclusie en aanbevelingen

A. tumefaciens is een groot probleem in de vermeerdering van aster. Besmettingsbronnen voor de aantasting lijken met name structureel op het vermeerderingsbedrijf zelf aanwezig te zijn. Dit blijkt uit het onderzoek dat in het kader van dit project uitgevoerd is. De vermeerderingsmethode die gehanteerd wordt behelst een groot risico voor het ontstaan van nieuwe aantastingen omdat stekken gesneden worden en zowel de mesjes als het voedingswater besmet kunnen zijn. De infectieproeven laten zien dat zelfs bij lage aantallen van de bacterie al aantasting kan ontstaan. Op mesjes die voor het steksnijden in de praktijk gebruikt worden is *A. tumefaciens* aangetoond bij dit onderzoek.

A. tumefaciens is een bacterie die gemakkelijk kan overleven in grond en waarschijnlijk ook in water. Aantasting van de plant door de bacterie is alleen effectief te bestrijden wanneer de bacterie bestreden wordt voordat deze de plant kan besmetten (preventief).

Beheersing van aantasting vraagt een tweeledige aanpak:

1. Door middel van bedrijfshygiëne moet gestreefd worden naar een vermeerdering waarbij *A. tumefaciens* geen kans krijgt. Het hygiëneprotocol en zoals in hoofdstuk 5 weergegeven kan hiervoor een belangrijk uitgangspunt zijn. Uitgebreide informatie met betrekking tot ontsmetting van teeltsystemen is beschreven in het PPO rapport 571 (ontsmetting van teeltsystemen bij potplanten)
2. Preventieve bestrijding van de bacterie. Op dit moment zijn geen effectieve producten toegelaten voor de bestrijding van *A. tumefaciens* in aster. Mogelijkheden liggen er in de hoek van biologische bestrijders (effectiviteitonderzoek en aanvraag van toelating product) en bactericiden met een toelating voor ander toepassingen (effectiviteitonderzoek en derdenuitbreiding toelating aanvragen).

Het heeft geen zin om onderdeel twee uit te voeren zonder dat veel energie gestopt wordt in een zeer grondige aanpak van de bedrijfshygiëne.

Bijlage 1 Gedetailleerde uitslag van de bemonsteringen

Uitslag 1^e bemonstering, negatief staat voor geen Agrobacterium aangetoond, positief voor wel Agrobacterium aangetoond.

Monsternr	Type	Herkomst monster	Opm (cv, leeftijd etc)	Uitslag
1	plant	Stek van moerplant	Cassy, gepland w46, tafel 11, partij 1	negatief
2	plant	Stek van moerplant	Cassy, gepland w46, tafel 11, partij 1	positief
3	plant	Stek van moerplant	Cassy, gepland w46, tafel 11, partij 1	positief
4	plant	Stek van moerplant	Cassy, gepland w11, tafel 4, partij 2	negatief
5	plant	Stek van moerplant	Cassy, gepland w11, tafel 4, partij 2	negatief
6	plant	Stek van moerplant	Cassy, gepland w11, tafel 4, partij 2	negatief
7	plant	Stek van moerplant	Amor, gepland w 12, tafel 1	negatief
8	plant	Stek van moerplant	Amor, gepland w 12, tafel 1	negatief
9	plant	Stek van moerplant	Amor, gepland w 41, tafel 1	negatief
10	plant	Stek van moerplant	Amor, gepland w 41, tafel 1	positief
11	plant	Stek van moerplant	Cindy sp pink, gepland w 48, tafel 12	negatief
12	plant	Stek van moerplant	Cindy sp pink, gepland w 15, tafel 1	negatief
13	plant	Stek van moerplant	Catharina, gepland w 15, tafel 1	negatief
14	plant	Stek van moerplant	Cirina dark, gepland w 18, tafel 15	negatief
15	plant	Stek van moerplant	Cindy, gepland w 19, tafel 16	negatief
16	Plant	Beworteld stek	Cassy gestoken w26, dag 5, stek 0 dgn bewaard, afkomstig van partij 2	positief
17	Plant	Beworteld stek	Cassy gestoken w24, dag 2, stek 5 dgn bewaard, afkomstig van partij 1	negatief
18	Plant	Beworteld stek	Claudia elite gestoken w26, dag 2, stek 7 dgn bewaard	negatief
19	Plant	Beworteld stek	Claudia elite gestoken w27, dag 2, stek 11 dgn bewaard	negatief
20	Plant	Beworteld stek	Cindy sp gestoken w27, dag 1, stek 10 dgn bewaard	positief
21	Plant	Beworteld stek	Cindy sp gestoken w28, dag 2, stek 6 dgn bewaard	positief
22	Plant	Beworteld stek	Cassandra gestoken w28, dag 1, stek 10 dgn bewaard	positief
23	Plant	Beworteld stek	Cassandra gestoken w27, dag 1, stek 7 dgn bewaard	positief
24	Plant	Beworteld stek	Celesta gestoken w27, dag 2, stek 11 dgn bewaard	positief
25	Plant	Beworteld stek	Celesta gestoken w27, dag 5, stek 9 dgn bewaard	negatief
26	water	basin	Buiten	negatief
27	water	Basin / Leiding van basin naar binnen	Kraan in stekdeel	negatief
28	water	Drain uit de grond	Uit de drainsilo (er zit kroos in)	negatief
29	water	Drain van eb-vloed vloer	Uit silo	positief
30	water	druppelwater	Cassy, w11, tafel 4, partij 2 (P0201)	positief
31	water	druppelwater	3035, w24, tafel 2	negatief
32	water	druppelwater	Caroline Blue, w15 (P0201), tafel 1	negatief
33	Water	Sloot	Uit leiding waar slootwater mee binnen	negatief

			komt.	
34	Veeg	librabak	Cassy, w46, tafel 11, P0101	negatief
35	veeg	librabak	Cassy, w11, tafel 4, P0201	negatief
36	veeg	Mes	Cassy, tafel 4	positief
37	veeg	Mes	Cassy, tafel 4	positief
38	veeg	hand	Cassy, tafel 4	negatief
39	veeg	hand	Cassy, tafel 4	negatief
40	Veeg	schuifbak	In de schuur	negatief
41	Veeg	schuifbak	Andere bak in de schuur	negatief
42	plant	weefselkweek	01103, Cirina white	negatief
43	plant	weefselkweek	01103, Cirina white	negatief
44	plant	weefselkweek	01103, Cirina white	negatief
45	plant	weefselkweek	01103, Cirina white	negatief
46	plant	weefselkweek	01103, Cirina white	negatief
47	plant	weefselkweek	91404, Claudia	negatief
48	plant	weefselkweek	91404, Claudia	negatief
49	plant	weefselkweek	91404, Claudia	negatief
50	plant	weefselkweek	91404, Claudia	negatief
51	plant	weefselkweek	91404, Claudia	negatief

Uitslag 2^e bemonstering, negatief staat voor geen Agrobacterium aangetoond, positief voor wel Agrobacterium aangetoond.

Monsternr	Type	Herkomst monster	Opm (cv, leeftijd etc)	Uitslag
1	Water	Eb vloed vloer	Kas 2 links, tijdens de watergift	Positief
2	Water	Druppelleiding	Amor w36 P0202 tafel 1	negatief
3	Water	Druppelleiding	Cassy w 11 P0201 tafel 4	negatief
4	Water	Druppelleiding	Cassy w37 P0202 tafel 8	negatief
5	Water	Basin	Buiten	negatief
6	Water	Silo / drainwater	Uit silo voor grondteelt	negatief
7	Water	Silo / drainwater	Uit silo voor eb vloed teelt	Positief
8	Water	Waterput	Boezemwater uit de Lee	Negatief
9	Plant	Beworteld stek	Restpartij Celesta bak 1 w36	Positief
10	Plant	Beworteld stek	Restpartij Celesta bak 1 w36	Negatief
11	Plant	Beworteld stek	Restpartij Celesta bak 2 w36	Negatief
12	Plant	Beworteld stek	Cassy w36 P0201	Negatief
13	Plant	Beworteld stek	Cassy w36 P0201	Positief
14	Plant	Beworteld stek	Claudia E1CR 3601 3606	Positief
15	Plant	Beworteld stek	Claudia E1CR 3601 3606	Positief
16	Plant	Beworteld stek	Claudia CR 3604 3609	Positief
17	Plant	Beworteld stek	Cassy 3605 02	Positief
18	Plant	Beworteld stek	Cassy 3605 02	negatief
19	Plant	Stek van moerplant	Cassy w37 P0202 tafel 8, geen symptomen	negatief
20	Plant	Stek van moerplant	Cassy w37 P0202 tafel 8, geen symptomen	negatief
21	Plant	Stek van moerplant	Cassy w37 P0202 tafel 8, geen symptomen	negatief
22	Plant	Stek van moerplant	Cassy w 11 P0201 tafel 4, veel symptomen	negatief
23	Plant	Stek van moerplant	Cassy w 11 P0201 tafel 4, veel	negatief

			symptomen	
24	Plant	Stek van moerplant	Cassy w 11 P0201 tafel 4, veel symptomen	negatief
25	Plant	Stek van moerplant	Amor w36 P0202 tafel 1, geen symptomen	negatief
26	Plant	Stek van moerplant	Cassandra w36 P0201 tafel 1, geen symptomen	negatief
27	Plant	Stek van moerplant	Cassandra w36 P0201 tafel 1, geen symptomen	negatief
28	Plant	Stek van moerplant	Cassandra w36 P0201 tafel 1, geen symptomen	negatief
29	Veeg	Librabakken	Cassy w11 P0201 bak met planten	negatief
30	Veeg	Librabakken	Cassy w11 P0201 bak met planten	positief
31	Veeg	Mesjes	Liggen aan het begin van een bed, nu niet gebruikt	negatief
32	Veeg	Mesjes	Liggen aan het begin van een bed, nu niet gebruikt	negatief
33	Veeg	Stekers	Cassy w37 P0202 tafel 8	negatief
34	Veeg	Stekers	Cassy w 11 P0201 tafel 4	negatief
35	Veeg	Stekers	Cassandra w36 P0201 tafel 1	negatief
36	Veeg	Handen	Stek steken	negatief
37	Veeg	Handen	Stek steken	negatief
38	Veeg	Schuifbakken	Met grondkluitjes	negatief
39	Veeg	Schuifbakken	Met grondkluitjes	negatief
40	Veeg	Schuifbakken	Met grondkluitjes	negatief
41	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 2001	negatief
42	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 1999	negatief
43	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 2001	negatief
44	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 1997	negatief
45	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 2001	negatief
46	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 1999	negatief
47	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 2001	negatief
48	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 1997	negatief
49	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 2001	negatief
50	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 1999	negatief
51	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 2001	negatief
52	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 1997	negatief
53	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 2001	negatief
54	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 1999	negatief
55	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 2001	negatief
56	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 1997	negatief
57	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 2001	negatief
58	Plant	Weefselkweek	Cassandra inzetting 1999	negatief
59	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 2001	negatief
60	Plant	Weefselkweek	Cindy special inzetting 1997	negatief