



Aanpak van overmatige wortelgroei in vruchtgroentegewassen

Daniël Ludeking¹, Roel Hamelink¹, Jos Wubben², Martijn Schenk³

¹Wageningen UR Glastuinbouw ²BLGG AgroXpertus ³Wageningen Universiteit Plantenwetenschappen, Laboratorium voor Erfelijkheidslcer



Referaat

Bij de teelt van komkommer, tomaat en aubergine worden planten waargenomen, waarbij het wortelgestel een overmatige productie aan wortels laat zien. Het fenomeen dat daarom ook 'overmatige wortelgroei' wordt genoemd, wordt veroorzaakt door de bacterie *Agrobacterium rhizogenes*. Via verzwakte cellen of via verwondingen aan de wortels kan de bacterie de plant binnendringen. In dit onderzoek zijn verschillende middelen onderzocht die de aanwezigheid en infectie van wortels met de Ri-plasmide afkomstig uit *Agrobacterium rhizogenes* in een kas kunnen voorkomen of verspreiding ervan kunnen inperken. Tijdens de kasproef zijn behandelingen meegenomen met: reinigingsmiddelen (H₂O₂, Chloor (Natriumhypochloriet) in een hoge en lage dosering en een natuurlijk gewasbeschermingsmiddel.

Uit het onderzoek kan worden geconcludeerd dat er bij géén van de toegepaste behandelingen wordt voorkomen dat er verspreiding plaats vindt tussen de matten. Dit is zowel vastgesteld op basis van visuele waarnemingen als op basis van analyse. Zowel bij tomaat als bij komkommer is bij het experiment vastgesteld dat de verspreiding van de bacterie *A. rhizogenes* tegen de (drain)stroom plaats vindt. Dit impliceert een actieve verspreiding van het pathogeen in de kas. Het drainwater is een bron van besmetting. Watermonsters zijn herhaaldelijk positief getest op de aanwezigheid van *A. rhizogenes*.

Abstract

Roots of plants of cucumber, tomato and eggplant can develop excessive during cultivation. The phenomena is called 'root mat disease' or 'crazy roots', is caused by the bacterium *Agrobacterium rhizogenes*. Through weakened cells or through wounds because of fungal or nematological damage the bacterium can introduce a piece of DNA from the so-called Ri-plasmid (root inducing (plasmid) During the research some experiments were executed to determine the effect of cleaning agents like (H₂O₂, Chlorine (Natriumhypochlorite) in a high and low concentration together with a natural crop protection product.

Out of these experiments can be concluded that none of the treatments is capable of reducing the dispersal of the bacteria in and between slabs. In the experiment with cucumber as well as in the experiment with tomato is determined that the bacterium *A. rhizogenes* is capable of dispersing opposite to the drain flow. This implicates an active dispersal of the pathogen in the greenhouse. Drain water is a source for contamination with the bacteria, since water samples have been tested positively repeatedly.

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk
Tel. : 0317 - 48 12 14
Fax : 010 - 522 51 93
E-mail : daniel.ludeking@wur.nl
Internet : www.glastuinbouw.wur.nl

Inhoudsopgave

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
	1.1 Overmatige wortelgroei	7
	1.2 Problematiek	8
	1.3 Doelstellingen	8
2	Uitvoering	11
	2.1 Opzet kasproeven	11
	2.2 Behandelingen	12
	2.3 Verloop proeven	12
	2.4 Waarnemingen en monsternamen	12
3	Resultaten	13
	3.1 Proef komkommer	13
	3.1.1 Besmetting	13
	3.1.2 Productie	14
	3.1.3 Verspreiding aantasting	15
	3.2 Proef tomaat	17
	3.2.1 Besmetting	18
	3.2.2 Productie	19
	3.2.3 Verspreiding van de aantasting	21
	3.2.3.1 Visueel zichtbare symptomen op de steenwolpot	21
	3.2.3.2 Visueel zichtbare symptomen in de steenwolmat	23
	3.2.3.3 Verspreiding tussen de matten op basis van analyse	26
4	Discussie en conclusie	29
	4.1 Conclusies; Komkommer	29
	4.2 Conclusies; Tomaat	29
	4.3 Discussie en aanbevelingen	29
	4.4 Aanbevelingen	30
5	Literatuur	31

Samenvatting

Bij de teelt van komkommer, tomaat en aubergine in uiteen lopende glastuinbouwgebieden in Nederland worden planten waargenomen in de teelt waarbij het wortelgestel een overmatige productie aan wortels laat zien. Het fenomeen dat daarom ook 'overmatige wortelgroei' wordt genoemd, uit zich door het ontstaan van veel extra wortels aan het grond- of steenwoloppervlak.

De oorzaak van deze overmatige wortelgroei is de bacterie *Agrobacterium rhizogenes*. Deze bacterie wordt ook wel *Agrobacterium radiobacter* genoemd. Via verzwakte cellen of via verwondingen aan de wortels kan de bacterie de plant binnendringen. Een mechanische beschadiging of een beschadiging als gevolg van een infectie met pathogeen (*Pythium spp.*) of een parasiet (bijvoorbeeld nematoden) kunnen zorgen voor een invalspoort voor de bacterie. *Agrobacterium rhizogenes* kan drager zijn van een zogenaamd Ri-plasmide (root inducing plasmide of wortel stimulerende plasmide).

In dit experiment zijn verschillende methoden of middelen onderzocht die de aanwezigheid en infectie van wortels met de Ri-plasmide afkomstig uit *Agrobacterium rhizogenes* in een kas kunnen voorkomen of verspreiding ervan kunnen inperken. Tijdens de kasproef zijn behandelingen meegenomen met: reinigingsmiddelen (H₂O₂, Chloor (natrium hypochloriet) in een hoge en lage dosering en een natuurlijk gewasbeschermingsmiddel. De kasproef is uitgevoerd met een komkommer- en tomatengewas. De effectiviteit van de middelen is vastgesteld aan de hand van de symptomontwikkeling (ziekteontwikkeling) van het gewas en door de verspreiding van *Agrobacterium rhizogenes* vast te stellen (visueel en analyse). Behandelingen zijn vergeleken met een onbesmette controle en een besmette controle waaraan geen middelen zijn toegevoegd.

De uitgevoerde proeven hebben als doel: Het ontwikkelen en testen van effectieve maatregelen die de aanwezigheid en verspreiding van overmatige wortelgroei in vruchtgroentegewassen kunnen beperken.

Uit het onderzoek kan worden geconcludeerd dat er bij géén van de toegepaste behandelingen wordt voorkomen dat er verspreiding plaats vindt tussen de matten. Dit is zowel vastgesteld op basis van visuele waarnemingen als op basis van analyse.

Zowel bij tomaat als bij komkommer is bij het experiment vastgesteld dat de verspreiding van de bacterie *A. rhizogenes* tegen de (drain)stroom plaats vindt. Dit impliceert een actieve verspreiding van het pathogeen in de kas.

Het drainwater is een bron van besmetting. Watermonsters zijn herhaaldelijk positief getest op de aanwezigheid van *A. rhizogenes*.

Op basis van het aantal aangetaste planten per behandeling kan worden geconcludeerd dat alleen de hoge chloordosering significant afwijkt van de controles en andere behandelingen. Bij deze hoge dosering chloor zal mogelijk de verspreiding wat worden beperkt (er vindt wel verspreiding plaats), echter bij deze hoge dosering zal gewasschade en oogstverlies (gewicht) optreden.

1 Inleiding

1.1 Overmatige wortelgroei

Bij de teelt van komkommer, tomaat, aubergine en courgettetelers in diverse delen van het land worden planten waargenomen in de teelt waarbij het wortelgestel een overmatige productie aan wortels laat zien. Het fenomeen dat daarom ook 'overmatige wortelgroei' wordt genoemd, uit zich door het ontstaan van veel extra wortels aan het grond- of steenwoloppervlak (Figuur 1.). De mate van aantasting kan enorm variëren; van enkele extra wortels in de steenwolmat of een paar wortels, die boven het steenwol uitsteken tot steenwolblokken en matten die geheel gevuld zijn met wortels. In sommige gevallen worden steenwolblokken door de enorme wortelproductie 'afgesloten'. De fysische eigenschappen van de mat verdwijnen en de steenwolmat wordt ondoordringbaar voor druppelwater, kan geen water meer vasthouden of opnemen, met als gevolg dat het druppelwater langs de mat de draingoot inloopt. Ook druppelaars kunnen door omhooggroeiende wortels uit de steenwolpot worden gedrukt of verstopt raken. Planten kunnen als gevolg hiervan verwelken en afsterven. Ook wordt de plant door de enorme wortelgroei vegetatief en gaat veel blad produceren. De plant verzwakt, wordt onstuurbaar, verliest productie en kan verwelken. Het blijkt dat de ziekteverschijnselen hardnekkig zijn en teelt na teelt kunnen optreden.



Figuur 1 Overmatige wortelgroei bij tomaat, wortels groeien omhoog en bedekken het oppervlak van de steenwolpot.

De oorzaak van deze overmatige wortelgroei is de bacterie *Agrobacterium rhizogenes*. Deze bacterie wordt ook wel *Agrobacterium radiobacter* genoemd. Via verzwakte cellen of via verwondingen aan de wortels kan de bacterie de plant binnendringen. Een mechanische beschadiging of een beschadiging als gevolg van een infectie met pathogeen (*Pythium* spp.) of een parasiet (aaltjes) kunnen zorgen voor een invalspoort voor de bacterie. *Agrobacterium rhizogenes* kan drager zijn van een zogenaamd Ri-plasmide (root inducing plasmide of wortel stimulerende plasmide). Niet alle bacteriën (*Agrobacterium rhizogenes*) dragen een plasmide en dus niet alle bacteriën zijn ziekte verwekkend. De ziekteverwekkende soort van overmatige wortelgroei behoort tot het biotype of biovar 1. Om overmatige wortelgroei te kunnen veroorzaken moet de bacterie wel een Ri-plasmide bevatten (Weller *et al.* 2000). Het Ri-plasmide is een cirkelvormig DNA-element dat door de bacterie op efficiënte wijze aan de plant overdragen kan worden. De bacterie is dus geen directe oorzaak van de symptomen, maar is verantwoordelijk voor de overdracht van de ziekteverschijnselen van de ene naar de andere plant. Het extra stuk DNA (Ri-plasmide) wordt opgenomen in het oorspronkelijke DNA van de plant. Bij vermeerdering van de 'aangepaste cel' dragen alle nieuw gevormde cellen ook het extra stuk DNA. Cellen met het extra stuk DNA, delen abnormaal en zorgen voor een razendsnelle vermeerdering van wortels (O'Neill & Yarham, 1993; Hooykaas & Beiersbergen, 1994). Het extra stuk DNA zorgt voor een verstoring van de hormoonhuishouding van de plant. De wortelcellen worden aangezet tot een overproductie aan hormonen, zoals auxinen en cytokininen. Als gevolg daarvan produceert de plant een enorme hoeveelheid secundaire wortels. Daarnaast gaan de cellen ongewone aminozuren produceren. Deze stofwisselingsproducten worden opines genoemd en dienen ondermeer als voedsel voor de betreffende bacteriën. Het aminozuur dat gevormd wordt bij overmatige wortelgroei in komkommers, wordt 'cucumopine' genoemd. (Davioud *et al.* 1988; Zabel, 2005; Weller *et al.* 2006). De stofwisselingsproducten dienen als voedingsbron

voor *Agrobacterium rhizogenes*. Daarmee verschaft *Agrobacterium rhizogenes* zich een voordeel in de concurrentie ten opzichte van andere bacteriën.

De problemen met overmatige wortelgroei, voorheen ookwel aangeduid als gekke wortels, root mat, hairy roots of crazy roots, zijn in Nederland voor het eerst als probleem herkend sinds 1999. De ziekte was vooral bekend in Groot-Brittannië. Vanaf 1970 zijn in de komkommerteelt in de grond enorme problemen opgekomen met het beschreven fenomeen. De ziekte heeft zich enige jaren gemanifesteerd (eind jaren 70 van de vorige eeuw), maar was net zo mysterieus als de komst van de bacterie ook weer verdwenen. 15 jaar later werden er in Groot-Brittannië opnieuw symptomen van de ziekte waargenomen, maar nu bij een komkommerteelt op steenwol. In Nederland blijven de problemen van omstreeks 2000 tot 2006 beperkt tot enkele incidenten op een paar komkommerbedrijven, maar sindsdien neemt het aantal aangetaste bedrijven toe. Op dit moment is de ziekte over heel Nederland verspreid en wordt overmatige wortelgroei waargenomen in de teelten van komkommer, tomaat en aubergine (inventarisatie Groen Agro Control, 2010). Ook glasgroentebedrijven in geïsoleerde glastuinbouwgebieden zoals in Wieringermeer of in het noorden van Nederland hebben sinds kort te maken met overmatige wortelgroei.

1.2 Problematiek

Telers hebben veelal vragen over de oorzaak en de herkomst van een besmetting met *Agrobacterium rhizogenes*. Het is bekend dat de bacterie lang in de grond kan overleven en de aanwezigheid van besmette grond en stofdeeltjes van buitenteelten potentiële infectiebronnen vormen. Men brengt besmettingen in de praktijk tevens in verband met het gebruik van besmet oppervlaktewater, overlopende kasgoten in het drainsysteem, doorgroeien van wortels uit de mat naar draingootjes en inloop van besmette gronddeeltjes via gaten in het gronddoek. Uit het buitenland is bekend dat de ziekte gemakkelijk via de opkweek kan verspreiden. Ook in Nederland heeft dit plaatsgevonden. Belangrijk voor de diagnose van zieke planten en de detectie van *Agrobacterium rhizogenes* is een gevoelige toets. De Bio-PCR toetsen voor *Agrobacterium rhizogenes* van de deelnemende laboratoria hebben zich afgelopen jaren in de praktijk bewezen bij diverse bedrijven waar duidelijk aangetaste planten aanwezig waren. Hoewel de huidige toets geschikt is om zeer lage aantallen van bacteriën aan te tonen, schiet de bemonsteringsmethode nog te kort om de infectiebron te achterhalen.

Besmetting van een teeltsysteem met *Agrobacterium rhizogenes* blijkt hardnekkig te zijn. Hebben bedrijven eenmaal een besmetting opgelopen, dan raken zij deze maar moeilijk kwijt. Er zijn bedrijven die bij een teeltwissel al het mogelijke ontsmetten, folie vervangen, silo's en kassen reinigen en ondanks dat bij een volgende teelt hernieuwd in de problemen lopen. Momenteel zijn er geen gewasbeschermingsmiddelen toegelaten met een directe werking tegen bacteriën. Daarbij komt dat planten die besmet zijn, niet meer genezen. Het plasmide wordt in het planteigen DNA ingebouwd. Bij vermeerdering van deze cellen, dragen de nakomelingen ook het extra stuk DNA uit de plasmide. Dit is een onomkeerbaar proces. Voorkomen van een infectie met *Agrobacterium rhizogenes* is daarom van het allergrrootste belang. Heeft de infectie ondanks alle voorzorgsmaatregelen toch plaats gevonden, zal er alles aan moeten worden gedaan om een verdere verspreiding van de bacterie te voorkomen. Strikte hygiënemaatregelen zijn daarom van het grootste belang om een primaire besmetting met de ziekteverwekker te voorkomen en daarna de verspreiding tegen te gaan. Er kan worden getracht de verspreiding van de aantasting te beperken met het toepassen van reinigingsmiddelen in het substraatsysteem, vormen van biologische bestrijding (antagonistische bacteriën, plantversterkers of het verhogen van de weerbaarheid van het substraat met middelen zoals compostthee. In de praktijk blijkt het inperken van het probleem lastig, praktijkresultaten op dit gebied zijn wisselend.

1.3 Doelstellingen

Dit project beoogt twee vraagstukken te onderzoeken:

1. Het opsporen van infectiebronnen in de praktijk met een geoptimaliseerde bemonsteringsstrategie
2. Het ontwikkelen en testen van maatregelen die de aanwezigheid en verspreiding van overmatige wortelgroei in vruchtgroentegewassen inperken.

Binnen beide vraagstukken is de overdracht van informatie aan telers over de mogelijkheden om verspreiding tegen te gaan en over hygiënemaatregelen om de besmetting te beheersen of kwijt te raken, van groot belang. Over het eerste vraagstuk is gerapporteerd door GAC, dit verslag behandelt de kasproef waarin het tweede vraagstuk is onderzocht.

In dit experiment zijn verschillende methoden of middelen onderzocht die de aanwezigheid en infectie van wortels met de Ri-plasmide afkomstig uit *Agrobacterium rhizogenes* in een kas kunnen voorkomen of verspreiding ervan kunnen inperken. Tijdens de kasproef zijn behandelingen meegenomen met: reinigingsmiddelen (H₂O₂, Chloor (Natriumhypochloriet) in een hoge en lage dosering en een natuurlijk gewasbeschermingsmiddel. De kasproef is uitgevoerd met een komkommer- en tomatengewas. De effectiviteit van de middelen is vastgesteld aan de hand van de symptoomontwikkeling (ziekteontwikkeling) van het gewas en door de verspreiding van *Agrobacterium rhizogenes* vast te stellen (visueel en analyse). Behandelingen zijn vergeleken met een onbesmette controle en een besmette controle waaraan geen middelen zijn toegevoegd.

De uitgevoerde proeven hebben als doel: Het ontwikkelen en testen van effectieve maatregelen die de aanwezigheid en verspreiding van overmatige wortelgroei in vruchtgroentegewassen kunnen beperken.

2 Uitvoering

2.1 Opzet kasproeven

In het complex van Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk zijn twee kasproeven uitgevoerd. In overleg met de begeleidingscommissie (BCO) is gekozen voor de gewassen komkommer en tomaat. Daarbij vond de kasproef met komkommer in de nazomer van 2009 plaats, terwijl de kasproef met tomaat gelijktijdig met de reguliere tomatenteelt in 2010 startte. Oorspronkelijk was het plan om beide kasproeven gelijktijdig te laten starten, maar in overleg met de BCO is ervoor gekozen om ze na elkaar te laten plaatsvinden om de verkregen kennis uit de eerste kasproef te kunnen benutten bij de tweede kasproef.

De kasproeven vonden plaats in een compartiment van ~120 m². In het kascompartiment bevonden zich 12 teeltgoten. Elke teeltgoot krijgt voeding doormiddel van een apart buizensysteem vanuit één van de zes beschikbare voedingsbakken. In totaal zijn er dus zes behandelingen mogelijk per kas, waarbij elke behandeling twee teeltgoten beslaat. Doordat het drainsysteem van de teeltgoten naar het midden van de goot afwatert, kunnen per teeltgoot twee herhalingen van een behandeling worden uitgevoerd.

Binnen elk van de behandelingen (met uitzondering van de negatieve controle) worden een aantal planten op elke goot kunstmatig besmet bij aanvang van de proef. Deze vormen de besmettingsbron waarvandaan de bacterie zich kan verspreiden. De toegepaste behandelingen worden geacht deze verspreiding tegen te gaan. De effectiviteit van de maatregelen wordt vastgesteld door de verspreiding van de aantasting over de rest van de goot te volgen, de productie te volgen en aanwezigheid van *Agrobacterium rhizogenes* te monitoren met behulp van een Bio-PCR toets.

De positie op de mat van de bij aanvang besmette planten is gevarieerd tussen de herhalingen, om zo vast te kunnen stellen hoe de verspreiding van de bacteriën over de matten verloopt. Zo kan worden vastgesteld of er verspreiding plaats vindt binnen een steenwolmat, tussen steenwolmatten en of deze verspreiding dan plaats vindt met de stroming van het drainwater mee of dat er ook tegen de stroomrichting van het drainwater in verspreiding plaats vindt.

2.2 Behandelingen

Mogelijk kan men verspreiding van *Agrobacterium rhizogenes* tegengaan door het meedruppelen van middelen met de voedingsoplossing (behandeling 3-5) of door een preventieve behandeling met een antagonistische bacterie (behandeling 6). In beide teelten (komkommer en tomaat) zijn zes behandelingen onderzocht. De behandelingen zijn in samenspraak met de BCO gekozen:

1. Negatieve controle. Bij deze behandeling zijn geen planten besmet. Omdat de kans op verspreiding van *Agrobacterium rhizogenes* via gewashandelingen minimaal is, zou deze behandelingen vrij moeten blijven van de ziekteverwekker. Daarnaast geeft deze behandeling aan wat de normproductie is voor het gewas, wat als referentie kan dienen voor de productie van de behandelde gewassen.
2. Positieve controle. In de behandeling worden geen maatregelen genomen om de verspreiding van *Agrobacterium rhizogenes* in te perken. Deze behandeling geeft aan hoe snel en in welke mate de aantasting zich verspreidt en dient als referentie voor de werking van de andere behandelingen.
3. Behandeling van het druppelwater met een lage dosering natriumhypochloriet (2 ppm).
4. Behandeling van het druppelwater met een hoge dosering van natriumhypochloriet (20 ppm).
5. Behandeling van het druppelwater met Jet 5 (waterstofperoxide plus complexvormer perazijnzuur) (20 ppm). Tijdens de kasproef tomaat is gekozen voor waterstofperoxide zonder complexvormer (20 ppm). De aanpassing is gedaan vanwege verstoppingproblematiek tijdens de kasproef komkommer.
6. Een preventieve behandeling in de opkweekfase met het Proradix-preparaat (ProradixAgro, Koppert). Toelating voor de teelt van aardappel). Het middel is twee maal toegediend voor inoculatie en plaatsing van de jonge planten op de mat. Het middel bevat de bacterie *Pseudomonas sp.* (stam DSMZ 13134).

2.3 Verloop proeven

Gezien de lay-out van de beschikbare faciliteiten kan er vanuit worden gegaan dat de bacterie zich niet via gewashandelingen verspreidt. Wel heeft elk van de behandelingen zijn eigen gereedschap en worden de mesjes tussendoor ontsmet. Verder zijn alle gewashandelingen conform wat voor de praktijk gebruikelijk is, uitgevoerd.

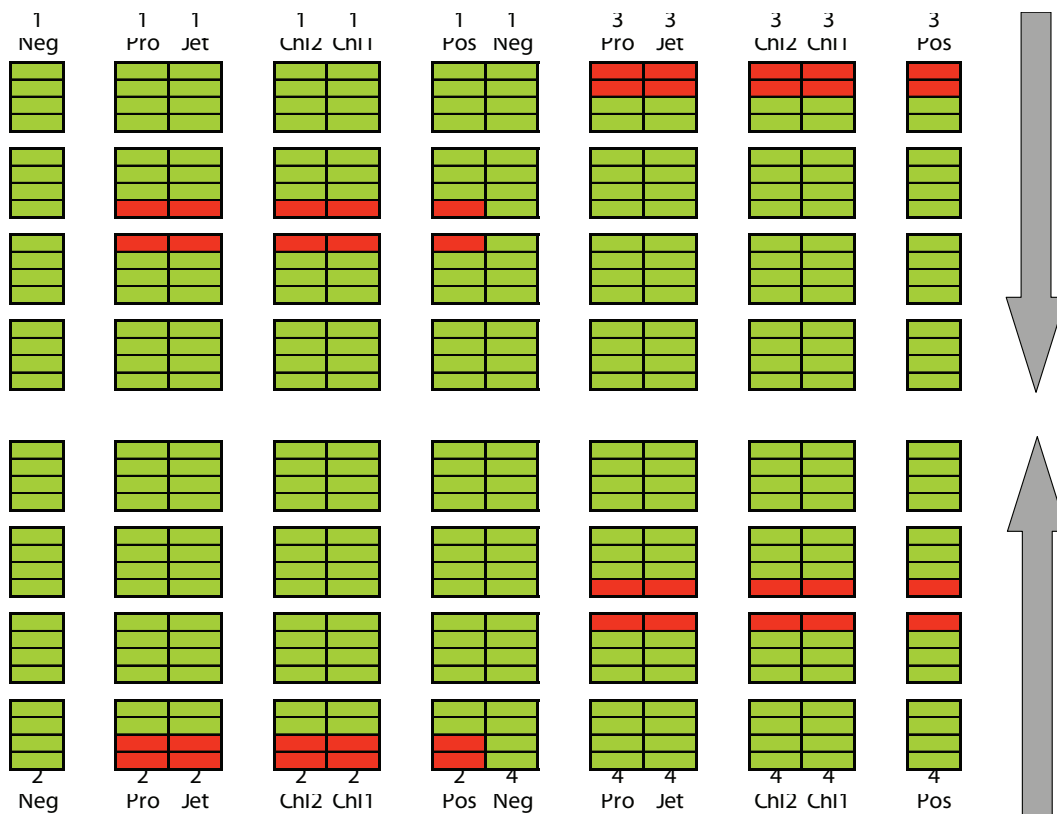
2.4 Waarnemingen en monsternamen

Na het inbrengen van de besmetting zijn de symptomen wekelijks waargenomen door te kijken naar het optreden van overmatige wortelgroei bovenop het steenwolkblok. Er zijn op diverse tijdstippen monsters van planten en matmonsters genomen om deze te analyseren op de aanwezigheid van *Agrobacterium* en het ziekmakende plasmide. Daarnaast is de productie gevolgd door per herhaling het aantal geogste vruchten en het gewicht hiervan te bepalen.

3 Resultaten

3.1 Proef komkommer

Om een goed beeld te krijgen van de proef wordt in *Figuur 2*. de proefopzet van deze kasproef weergegeven. De planten van de cultivar Shakira zijn op 2 juni 2009 gezaaid en op 10 juni 2009 de kas in gegaan. Op 25 juni 2009 zijn de planten op het plangat geplaatst.



Figuur 2 Proefopzet kasproef komkommer. In elk compartiment liggen vier herhalingen (1 t/m 4) van de zes behandelingen (neg= negatieve controle; pos=positieve controle; Chl1=lage concentratie chloor; Chl2=hoge concentratie chloor; Jet=Jet5; Pro=Proradix). Elk blokje stelt een individuele plant voor, er stonden telkens vier planten per mat. De rode blokjes stellen de planten voor die opzettelijk besmet zijn bij aanvang van de proef.

3.1.1 Besmetting

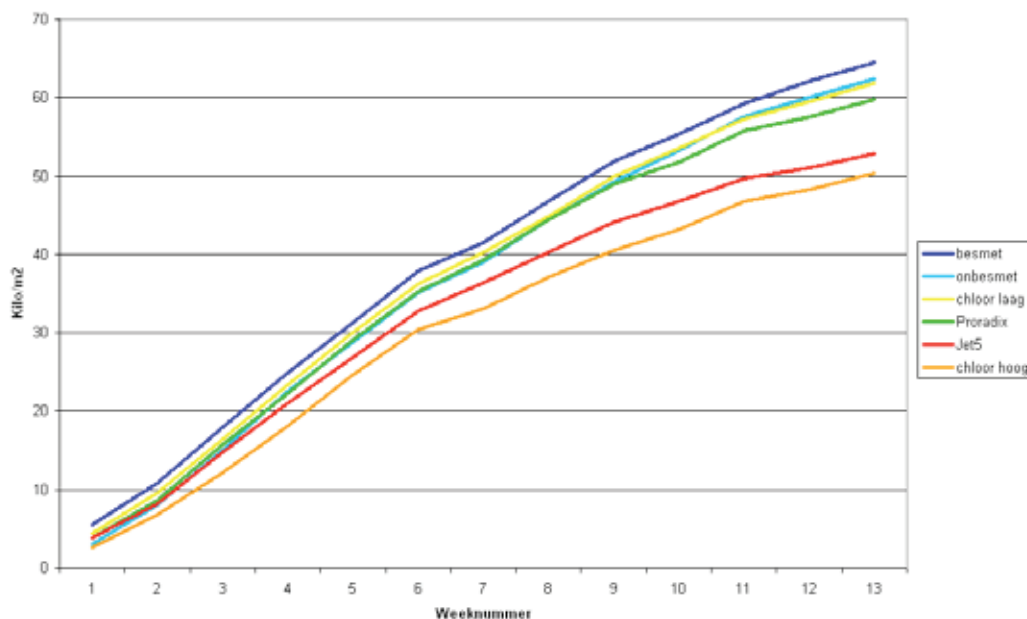
Bij het planten op 10 juni is ook voor het eerst besmet met een praktijkisolaat van *Agrobacterium rhizogenes* wat afkomstig was van besmette komkommerplanten. De besmetting met *Agrobacterium rhizogenes* bleek moeizaam te verlopen. Na vijf weken is één verdachte plant gesignaleerd, maar deze bleek bij toetsing niet besmet te zijn. Toen na zeven weken nog geen symptomen zichtbaar waren, zijn er opnieuw een aantal monsters onderzocht, welke allen negatief bleken te zijn. Daarom is er een tweede besmetting uitgevoerd, die wel aansloeg (*Figuur 3*). De oorzaak hiervan ligt waarschijnlijk in het onvoldoende beschadigen van de wortels bij de eerste inoculatie. In alle latere inoculaties is daarom gekozen voor een vrij rigoureuze beschadiging, wat de succeskans op besmetting sterk vergrootte. Vanwege de late besmetting heeft de kasproef langer doorgelopen dan oorspronkelijk gepland was. In ieder geval waren in week 12 van de proef in alle behandelingen *Agrobacterium rhizogenes* en het ziekmakende Ri-plasmide terug te vinden met de door BggAgroXpertus uitgevoerde analyse.



Figuur 3. en 4. Beeld van een beginnende aantasting met overmatige wortelgroei in respectievelijk komkommer en tomaat.

3.1.2 Productie

Gedurende de kasproef is de productie voor een periode van 13 weken gevolgd (Figuur 5.). De cumulatieve productiecijfers geven aan dat de behandeling met de hoge concentratie chloor (20 ppm) een negatief effect heeft op de opbrengst. Dit verschil is significant. Bij de planten in deze behandeling was ook visuele schade (lichte chlorose) zichtbaar, vooral toen de planten nog jong waren. Ook in de behandeling met Jet 5 is de opbrengst significant lager, maar dit is waarschijnlijk niet te wijten aan een direct effect van Jet 5 op de planten, maar een indirect effect. In deze behandeling ontstond een neerslag/verstopping in de leiding, wat periodiek heeft geleid tot te droge matten. Er is herhaaldelijk geprobeerd om deze behandeling draaiende te houden door vervanging van de stekers en het volledige leidingensysteem, maar de verstopping bleek een terugkerend probleem te zijn (7 juli, 22 juli, 5 augustus en opnieuw op 31 augustus 2009). Hierdoor kwamen de planten gedurende langere periodes droog te staan, wat een effect heeft op de productie.



Figuur 5 Cumulatieve opbrengst (kg/m^2) in de kasproef met komkommer gedurende 13 oogstweken. De verschillen tussen "chloor hoog" en "Jet5" enerzijds en de andere vier behandelingen anderzijds, zijn significant ($p < 0.05$). De productie van de randrijen is overigens gecorrigeerd omdat deze rijen profiteren van een grotere hoeveelheid licht.

Opvallend is ook dat in de besmette controle, waarin dus geen maatregelen zijn genomen voor inperking van de aantasting, er geen negatief opbrengsteffect was ten opzichte van de onbesmette controle. Dit wil niet zeggen dat *Agrobacterium* geen effect heeft op de opbrengst, want het aantal besmette planten was klein ten opzichte van het aantal gezonde planten en bovendien kwam de infectie pas laat in de teelt tot stand.

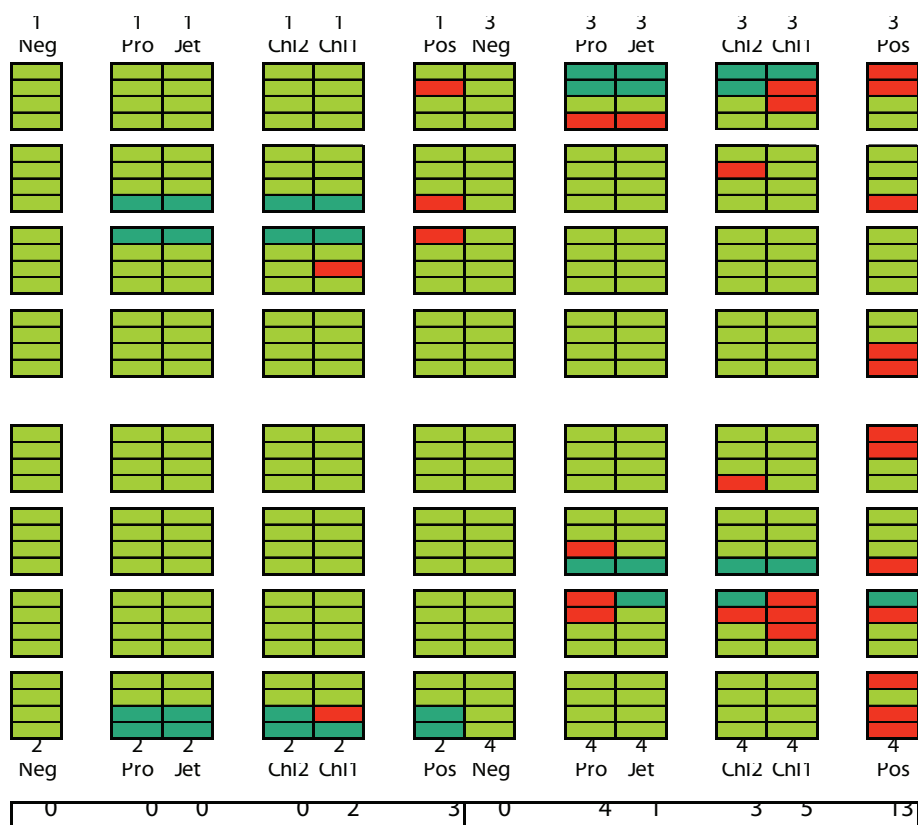
Voor wat betreft het aantal vruchten is het beeld gelijk aan dat van de opbrengst. De productie loopt dus terug doordat er minder en lichtere vruchten (Tabel 1.) geproduceerd worden in de behandelingen met de hoge concentratie chloor en Jet 5.

Tabel 1 Gemiddeld vruchtgewicht komkommer in de zes behandelingen.

Behandeling	Gemiddeld vruchtgewicht (gram)
Onbesmette controle	344
Besmette controle	353
Proradix	350
Chloor laag	346
Jet 5	337
Chloor hoog	332

3.1.3 Verspreiding aantasting

Gedurende de proef heeft de besmetting met *Agrobacterium rhizogenes* zich geleidelijk uitgebreid (Figuur 6.). Daarbij komen een aantal zaken naar voren. Allereerst blijken niet alle planten die opzettelijk besmet zijn, ook daadwerkelijk symptomen te hebben. De donkergroene blokjes in Figuur 6. geven aan welke planten wel geïnoculeerd zijn, maar geen symptomen toonden. Ten tweede heeft er bij alle behandelingen met uitzondering van de negatieve controle, verspreiding plaatsgevonden naar eertijds gezonde planten. Geen van de behandelingen blijkt dus in staat te zijn om besmetting voor 100% te voorkomen. Ten derde blijkt verspreiding opmerkelijk genoeg, zowel tegen de stroom van de drain in en met de stroom van de drain mee plaats te vinden, wat vragen oproept over de verspreidingswijze van de bacterie. Ten slotte lijkt er een kaseffect te zijn, waarbij de behandelingen steeds meer besmette planten hebben naarmate ze verder naar rechts in de kas liggen. Dat wordt het best geïllustreerd door de kas in twee vlakken te verdelen: links bevinden zich 5 besmette planten, rechts zijn dat er 26. Dat zou je niet verwachten aangezien in beide helften alle behandelingen in gelijke mate vertegenwoordigd zijn. Hiervoor is geen duidelijke oorzaak aanwijsbaar, maar het heeft wel grote gevolgen voor de conclusies van het onderzoek doordat de positieve controles het meest rechts liggen en zij nu juist de referentie vormen waarmee de behandelingen worden vergeleken.



Figuur 6 Planten met symptomen in de kasproef komkommer. Elk blokje stelt een individuele plant voor, er stonden vier planten per mat. De rode blokjes stellen de planten voor met symptomen aan het eind van de proef. Lichtgroene en donkergroene planten waren symptoomloos. De balk onderaan de Figuur telt het totaal aantal besmette planten per rij op.

De besmetting met *Agrobacterium* kan ook sluimerend in de kas aanwezig zijn. Aan het eind van de kasproef zijn een groot aantal monsters geanalyseerd op de aanwezigheid van de *Agrobacterium* en het ziekmakende plasmide. Daarbij zijn zowel mengmonsters van planten als matmonsters onderzocht. Uit deze analyse bleek dat het werkelijke aantal besmette planten hoger ligt dan op grond van de visuele symptomen is vastgesteld (Figuur 6.). Naast de al waargenomen zieke planten bleken nog minimaal tien andere planten, die dus ogenschijnlijk gezond waren, aangetast te zijn. Zorgwekkend is daarbij dat een aantal van de bewust besmette planten die visueel gezond waren, wel voor verspreiding hebben gezorgd. Dit heeft belangrijke implicaties voor de praktijk, aangezien in een kas die schijnbaar zonder aantasting is, dus toch besmette planten kunnen staan, waar vanuit de aantasting zich kan verspreiden over de kas.

Tabel 2. vat de belangrijkste uitkomsten van de verspreiding van *Agrobacterium* binnen deze proef samen. Daarbij wordt onderscheid gemaakt tussen geïnoculeerde planten, planten die met deze geïnoculeerde plant in één mat staan en planten om matten zonder geïnoculeerde planten. De reden voor dit onderscheid is dat je van geïnoculeerde planten die bewust beschadigd zijn, mag verwachten dat ze ziek worden, ongeacht de behandeling. Verspreiding binnen de mat zal lastig te voorkomen zijn doordat de wortels van planten binnen een mat gemakkelijk met elkaar in contact komen. Verspreiding tussen de matten kan (bij losliggende matten zoals we dat hier hebben toegepast, eigenlijk alleen plaatsvinden via drainwater wat van de ene naar de andere mat loopt. Over het geheel valt ook op dat de verspreiding binnen matten hoger ligt dan de verspreiding tussen matten (Tabel 2).

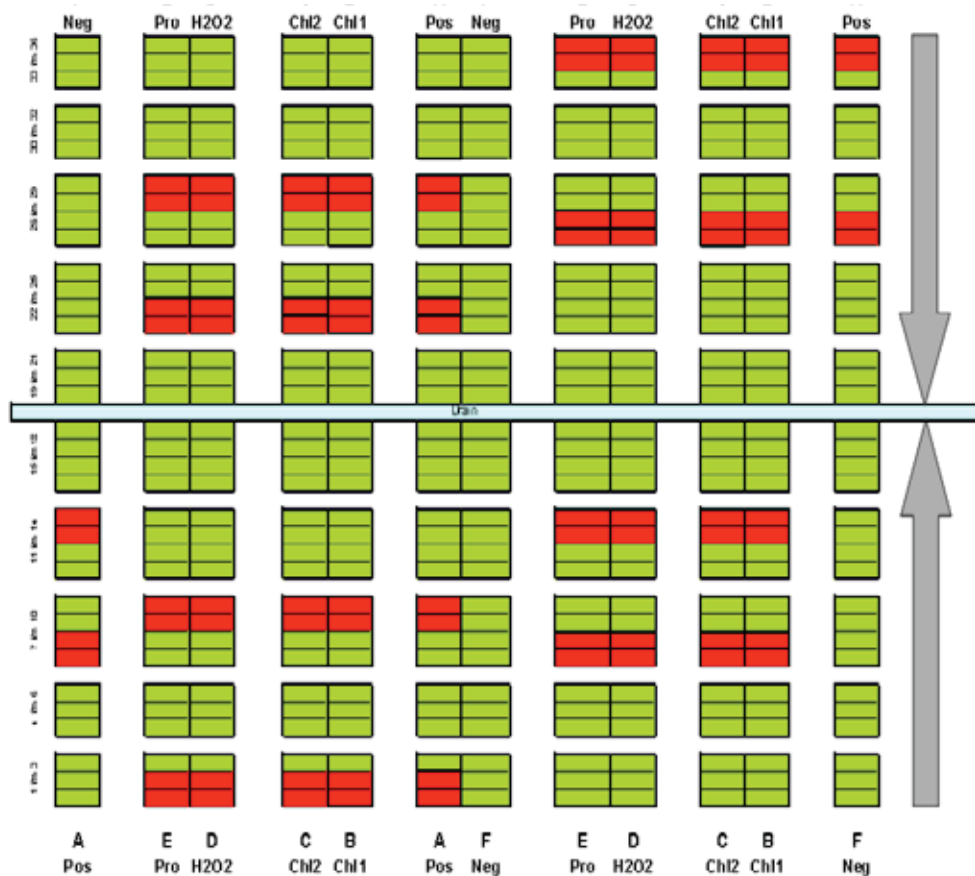
Binnen de onbesmette controle zijn - zoals verwacht - geen zieke planten teruggevonden. In de besmette controle was het aantal besmette planten het hoogst. De vier behandelingen liggen hier tussenin. Toch is het de vroeg om te constateren dat de behandelingen dus gewerkt hebben, vanwege het eerder genoemde effect van de locatie van de behandelingen in de kas. De proef in tomaat zal hier uitsluitsel over moeten geven.

Tabel 2 Relatieve aantastingsniveau van geïnoculeerde planten en de uitbreiding naar andere planten binnen en tussen de verschillende matten. Het aantastingsniveau is bepaald op basis van symptoomwaarnemingen.

Behandeling	Aantastingsniveau geïnoculeerde planten	Verspreiding binnen matten	Verspreiding tussen matten
Onbesmette controle	0%	0%	0%
Besmette controle	63%	13%	23%
Proradix	13%	19%	0%
Chloor laag	38%	25%	0%
Jet 5	0%	6%	0%
Chloor hoog	0%	6%	5%

3.2 Proef tomaat

De proefopzet van de kasproef met tomaat (Figuur 7.) is aangepast ten opzichte van de proef met komkommer (Figuur 2.). Er is een aanpassing gedaan door bij de start van de proef een groter aantal besmette planten te plaatsen en door de ligging van de negatieve controle behandeling te verplaatsen. De achterliggende reden voor de eerstgenoemde aanpassing is het trage verloop van de aantasting bij de komkommerproef. De reden voor de tweede aanpassing was het vreemde verloop van een toenemende aantasting in de richting van de rechterkant van de kas bij de komkommerproef. Per herhaling (van een halve teeltgoot) staan 19 tomatenplanten van de cultivar Komeett met onderstam Maxifort waarvan vier planten opzettelijk besmet zijn met *A. rhizogenes* en die daarmee de besmettingsbron voor de gezonde planten vormen.



Figuur 7 Proefopzet kasproef tomaat. In elk compartiment liggen vier herhalingen van de zes behandelingen (neg= negatieve controle; pos=positieve controle; Chl1=lage concentratie chloor; Chl2=hoge concentratie chloor; Per=Waterstofperoxide; Pro=Proradix). De pijlen geven de richting van de drain weer. Elk blokje stelt een individuele plant voor, er stonden telkens drie tot vier planten per mat. De rode blokjes stellen de planten voor die opzettelijk besmet zijn bij aanvang van de proef.

3.2.1 Besmetting

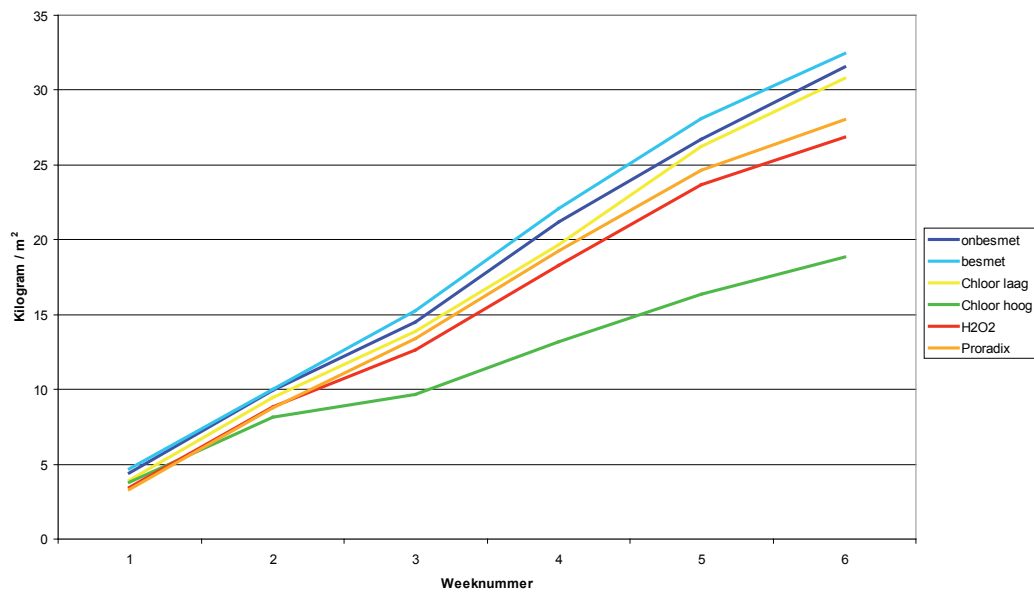
Voor de start van de proef is voor de zekerheid een aantal proefbesmettingen uitgevoerd om te zien of de besmetting van tomaat wel direct succesvol was. Telkens bleken na drie weken de eerste symptomen zichtbaar te worden op de steenwolkblokken.

De planten zijn 11-12-2009 gezaaid (plantenkwekerij Leo Ammerlaan). De planten zijn 4 weken na zaaien geleverd. Na 5 weken zijn de planten geïnoculeerd (15-1-2010). Vervolgens zijn de planten op 26-1-2010 nogmaals geïnoculeerd bij het plaatsen van de planten op het plantgat. Als inoculum is een isolaat gebruikt uit de vorige proeven met komkommer. Bij het besmetten zijn de wortels beschadigd om de infectie te stimuleren. Na elke inoculatie is vastgesteld of de besmetting gelukt is doormiddel van analyse. Na een maand ontstonden de eerste symptomen op de potten van de geïnoculeerde tomaten. Omdat de ontwikkeling van symptomen stagneerde en de overmatige wortelgroei niet direct zichtbaar en wijd verspreid was in het gewas wordt op 9-4-2010 nogmaals geïnoculeerd. Ditmaal is bij een komkommerteler met een aantasting met overmatige wortelgroei op het bedrijf een mat met ernstige symptomen van overmatige wortelgroei opgehaald. Uit deze steenwolmat zijn wortels geselecteerd, waarvan een suspensie is gemaakt. De suspensie is aan de wortels toegevoegd, waarbij de wortels eerst ernstig zijn beschadigd om de kans op infectie met *A. rhizogenes* te verhogen. Dezelfde planten zijn telkens geïnoculeerd. Van het inoculum is moleculair vastgesteld (BlggAgroXpertus) dat er *Agrobacterium rhizogenes* in aanwezig was. Daarnaast is vastgesteld of er andere mogelijk schadelijke pathogenen in het inoculum aanwezig waren. Andere voor tomaat plant pathogene schimmels zijn niet in het inoculum vastgesteld. Na ieder inoculatie moment is na enige tijd een monster genomen dat is gecontroleerd op de aanwezigheid van *Agrobacterium rhizogenes* en het ziekmakende Ri-plasmide. Deze analyses zijn uitgevoerd door BlggAgroXpertus. Na alle drie pogingen is vastgesteld dat de inoculatie is geslaagd. Vanwege het langzaam opgang komen van de symptomen heeft de kasproef

langer doorgelopen dan oorspronkelijk gepland was. Uiteindelijk zijn de matten op 8-6-2010 opgesneden. De matten zijn bij het opensnijden visueel beoordeeld op aanwezigheid van de symptomen en daarnaast is van elke behandeling van aangrenzende niet-geïnoculeerde matten een monster genomen om eventuele verspreiding tussen de matten objectief vast te stellen.

3.2.2 Productie

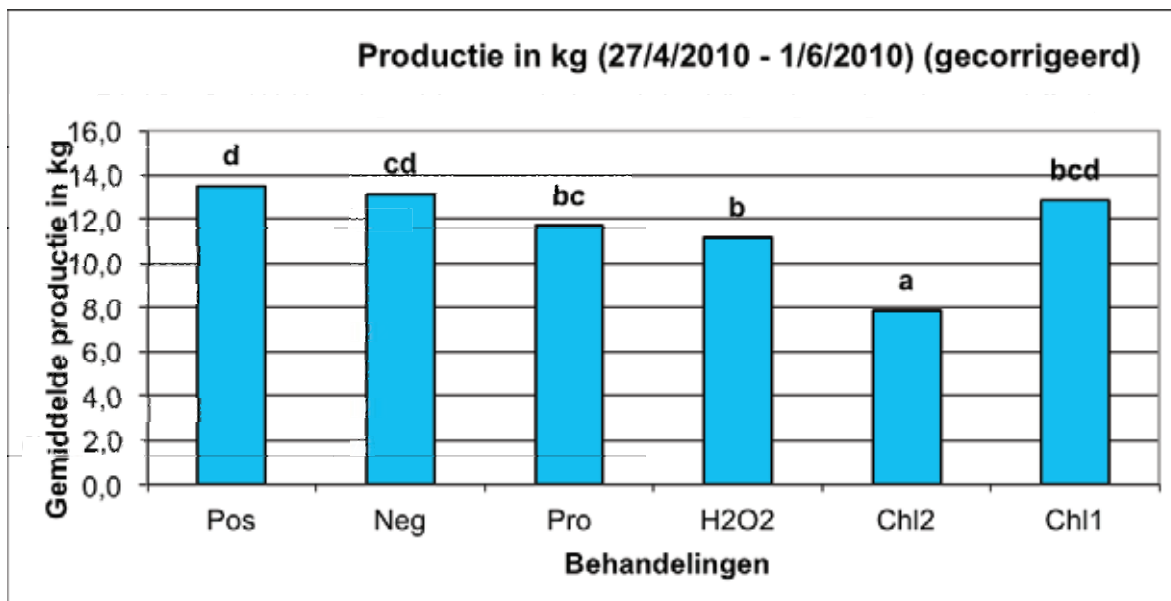
Gedurende de kasproef is de productie voor een periode van 6 weken gevolgd. De cumulatieve productiecijfers geven aan dat de behandeling met de hoge concentratie chloor (20 ppm) een negatief effect heeft op de opbrengst. Dit verschil met de andere behandelingen is significant te noemen ($p < 0,05$). De planten die de hoge dosering chloor hebben gekregen vertoonden ernstige chlorose, bleven achter in groei en hadden een slecht ontwikkeld wortelgestel (sommige potten stonden los op de mat). Er is geen verschil tussen de andere behandelingen.



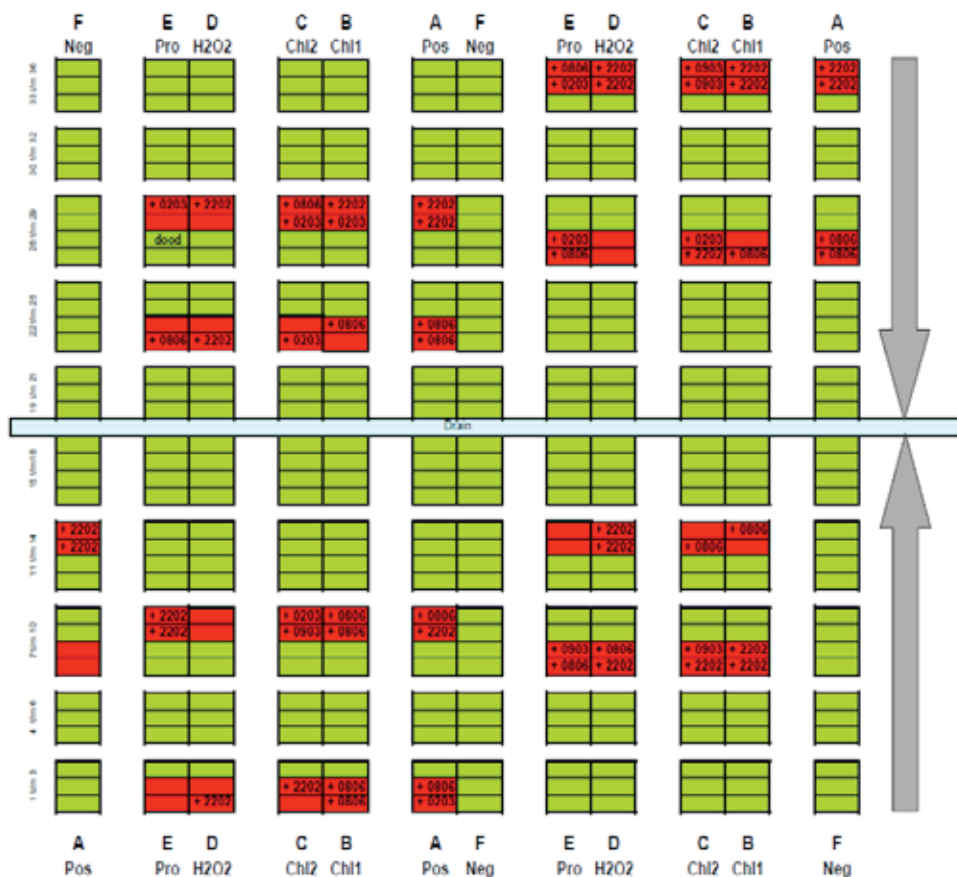
Figuur 7 Cumulatieve opbrengst (kg/m²) in de kasproef met tomaat gedurende 6 oogstweken. De verschillen tussen "chloor hoog" en de andere behandelingen anderzijds, zijn significant ($p < 0.05$). De productie van de randrijen is gecorrigeerd omdat deze rijen profiteren van een grotere hoeveelheid licht.

Het is opmerkelijk dat de gedurende de 6 weken dat de oogst is bij gehouden, de besmette controle (zonder behandeling om de aantasting te beperken) er geen negatief opbrengsteffect was ten opzichte van de onbesmette controle. Dit zelfde kan worden waargenomen bij de proef met komkommer. Echter hieruit mag niet worden geconcludeerd dat *Agrobacterium rhizogenes* geen effect heeft op de opbrengst; het aantal besmette planten is klein ten opzichte van het aantal gezonde planten en bovendien is net als bij de komkommerproef de infectie pas laat op gang gekomen en heeft bovendien geen excessieve vormen aangenomen.

Voor wat betreft het aantal vruchten is het beeld gelijk aan dat van de opbrengst. De productie loopt terug doordat er meer, maar veel lichtere vruchten (Tabel 3.) geproduceerd worden in de behandelingen met de hoge concentratie chloor.



Figuur 1. Figuur 8 Gemiddelde productie (kg, 4 herhalingen) in de kasproef met tomaat gedurende 6 oogstweken. De verschillen tussen Chl2 "Chloor hoog" (a) en de andere behandelingen anderzijds, zijn significant. Behandelingen Pro "Proradix", H2O2 "Waterstofperoxide" en Chl1 "chloor laag" verschillen niet significant (b) van elkaar. Pos "besmette controle" (d) verschilt wel significant van Pro "Proradix" en H2O2 "Waterstofperoxide" (b), maar niet van Neg "onbesmette controle" en Chl1 "chloor laag" (d). De productie van de randrijen is gecorrigeerd voor randeffecten (een grotere hoeveelheid licht bij positieve en negatieve controle). Fischer's protected least significant difference ($p < 0.05$).



Figuur 9 Overzicht van de planten met symptomen op de steenwolpot in de kasproef tomaat. Elk blokje stelt een individuele plant voor, er stonden telkens drie tot vier planten per mat. De rode blokjes stellen de planten voor die opzettelijk besmet zijn bij aanvang van de proef. In de rode blokjes zijn de data zichtbaar waarop de plant als positief is gescoord op basis van de symptomen op de pot. Lichtgroene blokjes zijn symptomeloos. In elk compartiment liggen vier herhalingen van de zes behandelingen (Neg "onbesmette controle", Pos "besmette controle", Chl1 "lage concentratie chloor", Chl2 "hoge concentratie chloor", H2O2 "waterstofperoxide", Pro "proradix". De pijlen geven de richting van de drain weer.

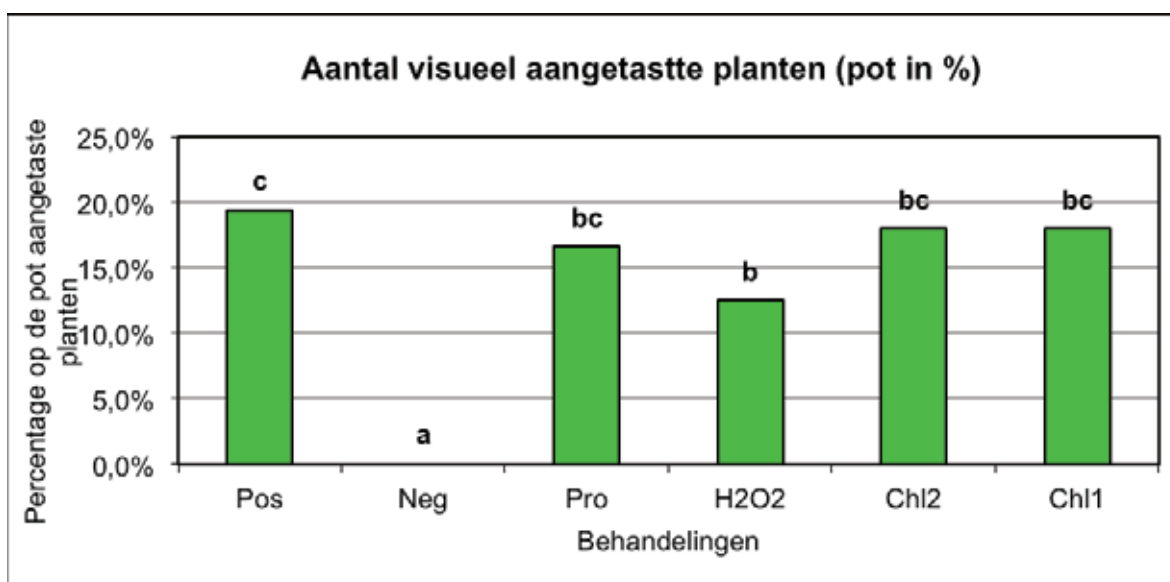
Gedurende de gehele duur van de proef zijn uitsluitend op de steenwolpotten symptomen waar te nemen. De symptomen van overmatige wortelgroei in de steenwolmat worden alleen zichtbaar bij het opensnijden van de matten of bij extremen, waarbij zowel de steenwolpot als de steenwolmatten volgroeien met wortels. Extreme vorming van wortels zoals in de praktijk regelmatig wordt gezien zijn in geen geval in dit kasexperiment waargenomen.

Tijdens het experiment zijn uitsluitend op de geïnoculeerde potten symptomen waarneembaar. Eerste symptomen komen snel opgang en zijn na 4-5 weken al zichtbaar (22-2-2010) en lijken zich goed te ontwikkelen op de geïnoculeerde potten. Echter de uitbreiding op de potten stagneert en de verspreiding van de bacteriën naar naastgelegen planten is niet visueel vast te stellen in de kas. Daarnaast tonen niet alle planten die opzettelijk besmet zijn, ook daadwerkelijk symptomen. Middels analyse is vastgesteld dat de inoculatie is geslaagd en inoculaties lijken beter gelukt dan bij komkommer. De percentages visueel aangetaste planten zijn veel hoger. Uiteindelijk tonen minimaal 56% (H₂O₂) en maximaal 88% (positieve controle) van de geïnoculeerde planten symptomen op de steenwolpot. Op basis van de visuele waarnemingen kan geen verspreiding naar niet besmette planten worden vastgesteld (Tabel 4).

Tabel 4 Relatieve aantastingsniveau van geïnoculeerde planten en de uitbreiding naar andere planten binnen en tussen de verschillende matten. Het aantastingsniveau is bepaald op basis van symptoomwaarnemingen op de steenwolpot.

Behandeling	Aantastingsniveau geïnoculeerde planten	Verspreiding binnen matten	Verspreiding tussen matten
Onbesmette controle	0%	0%	0%
Besmette controle	88%	0%	0%
Proradix	75%	0%	0%
Chloor laag	81%	0%	0%
H ₂ O ₂	56%	0%	0%
Chloor hoog	81%	0%	0%

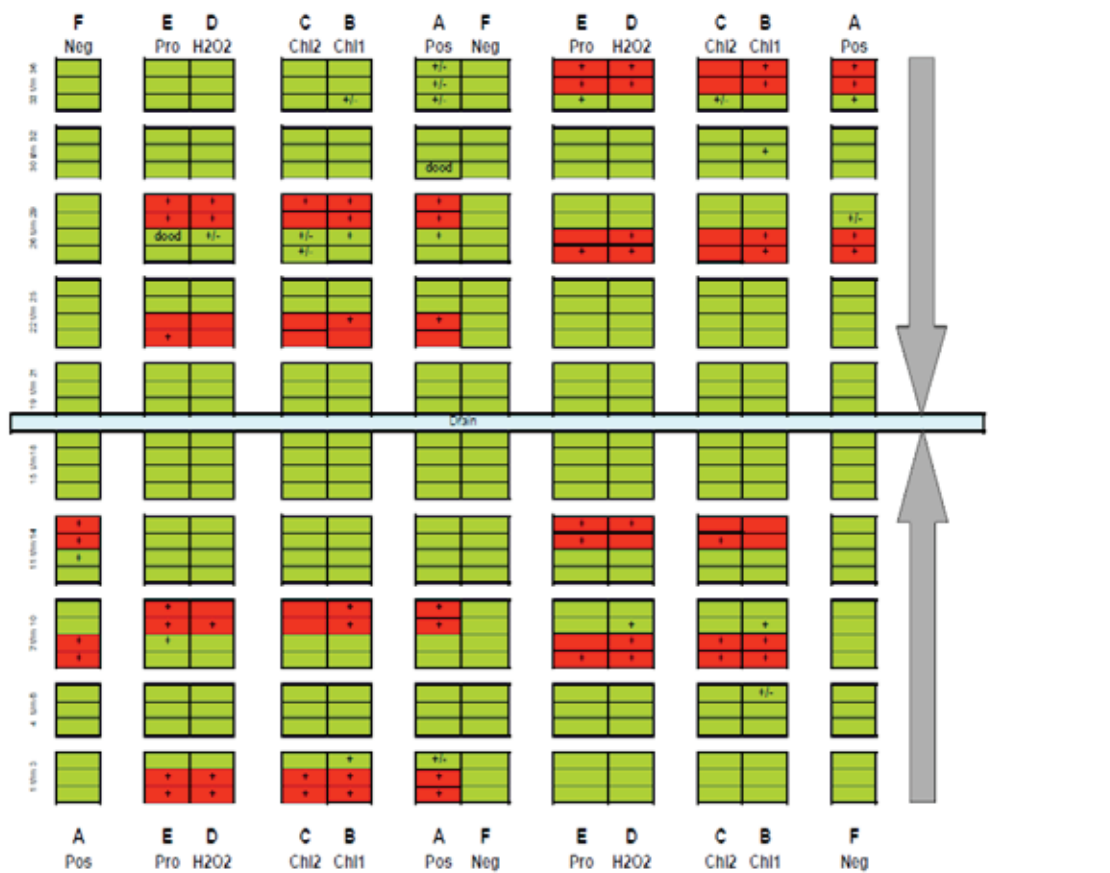
Op basis van de symptomen in de pot lijkt een behandeling met 20 ppm waterstofperoxide (H₂O₂) het laagste percentage aangetaste planten (met symptomen op de pot) te geven (Figuur 10.). Echter de verschillen tussen de behandelingen zijn minimaal en niet significant ($p < 0,05$). Alleen het verschil tussen H₂O₂ “waterstofperoxide” en Pos “besmette controle” is significant.



Figuur 10 Planten met visueel waarneembare symptomen op de steenwolpot in de kasproef tomaat. Neg “onbesmette controle”, Pos “besmette controle”, Chl1 “lage concentratie chloor”, Chl2 “hoge concentratie chloor”, H2O2 “waterstofperoxide”, Pro “proradix”.

Het verschil tussen H2O2 “waterstofperoxide” (b) en Pos “besmette controle” is significant. De andere behandelingen Pro “proradix”, Chl1 “lage concentratie chloor” en Chl2 “hoge concentratie chloor” verschillen niet significant van de Pos “besmette controle” (c) en niet van H2O2 “waterstofperoxide” (b). Fischer's protected least significant difference ($p < 0.05$).

3.2.3.2 Visueel zichtbare symptomen in de steenwolmat



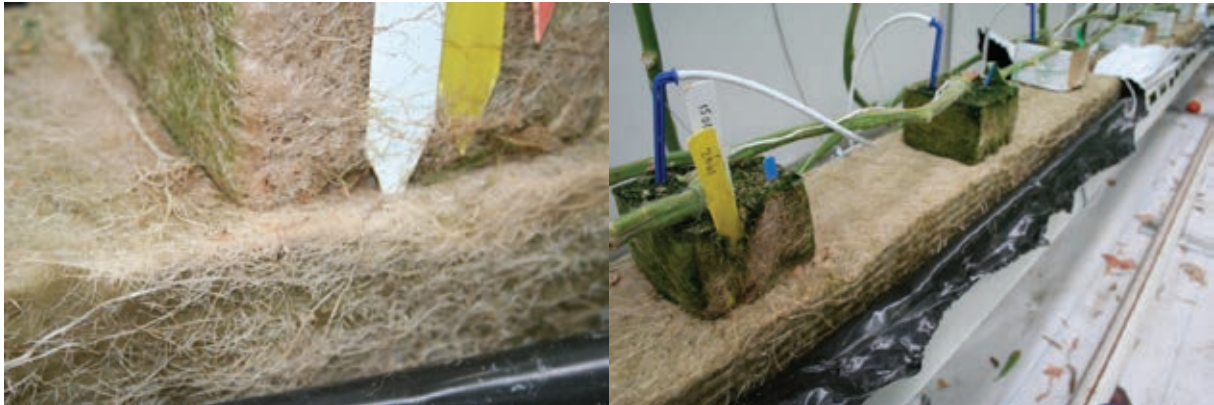
Figuur 12 Overzicht van de planten met symptomen in de steenwolmat in de kasproef tomaat. Elk blokje stelt een individuele plant voor, er stonden telkens drie tot vier planten per mat. De rode blokjes stellen de planten voor die opzettelijk besmet zijn bij aanvang van de proef. In de blokjes is met + (aangetast) en +/- (extra wortelgroei, geen overtuigende aantasting) aangegeven of de planten visueel zijn aangetast. De plant is als positief gescoord op basis van de symptomen bij het opensnijden van de mat. In elk compartiment liggen vier herhalingen van de zes behandelingen (neg= negatieve controle; Pos=positieve controle; Chl1=lage concentratie chloor; Chl2=hoge concentratie chloor; Per=Waterstofperoxide; Pro=Proradix). De pijlen geven de richting van de drain weer.

Aan het einde van het experiment zijn de steenwolmatten opengesneden en zijn de symptomen visueel vastgesteld in de mat. Symptomen van *Agrobacterium rhizogenes* zijn visueel goed te herkennen. De wortels groeien bij geïnfecteerde planten aan de bovenzijde van de steenwolmat, de aangetaste wortels hebben een lichte oranje-roze gloed, wortels groeien in een fijne spinnenweb-achtige structuur en vanzelfsprekend is er een duidelijke vertakking en verdichting van het wortelgestel vast te stellen. De symptomen in de steenwolmat hebben zich verder verspreid dan de opzettelijk besmette (geïnoculeerde) planten. Ook niet opzettelijk besmette (initieel gezonde) planten in een steenwolmat met geïnoculeerde planten vertonen duidelijke symptomen. Verder zijn ook symptomen waarneembaar in steenwolmatten waar geen opzettelijk besmette (geïnoculeerde) planten in staan. Dat betekent dat er ook verspreiding van de bacterie heeft plaats gevonden naar aangrenzende steenwolmatten. Er vindt dus verspreiding binnen een steenwolmat, maar ook tussen steenwolmatten. Verspreiding in de mat ligt voor de hand via 'wortel-wortel' contact. Verspreiding tussen steenwolmatten moet via drainwater zijn verlopen. Bij de planten met symptomen die uiteindelijk tegen de stroom van het drainwater in worden gevonden, lijkt *Agrobacterium rhizogenes* zich te hebben verspreid via het vrije water onder de steenwolmatten of water dat nog in de goten staat.

Wat opmerkelijk te noemen is, is dat bij het beoordelen van de symptomen er planten in de steenwolmat worden aangetroffen waarbij de bacterie zich zowel met de stroom van de drain mee, als tegen de stroom van de drain in heeft verspreid. Dit zelfde beeld is ook waargenomen bij de komkommerproef. Dit geeft dus aanleiding om te veronderstellen

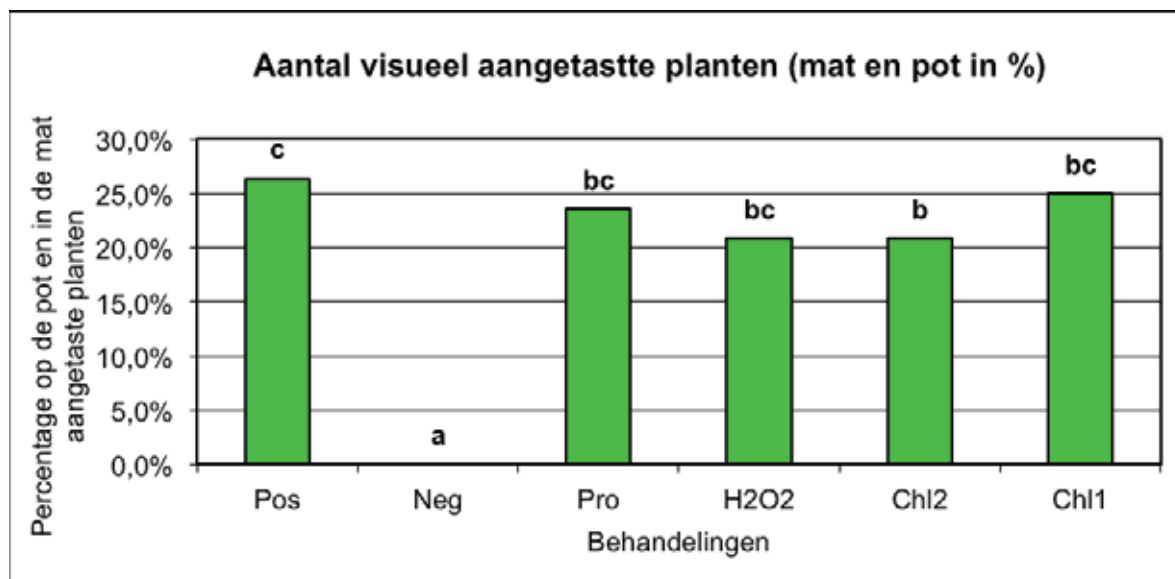
dat de bacterie zich niet allen passief mee laat voeren met drainwater, maar zich ook tegen de stroom in kan verspreiden. Dit fenomeen is verklaarbaar doordat de bacteriën mogelijk worden aangetrokken door signaalstoffen van de plant die worden afgescheiden bij verwondingen en dat de bacteriën met behulp van de aanwezige flagel in de richting van deze signaalstoffen kunnen bewegen.

Bij het verwijderen van de wikkels van de steenwolpotten is ook een sterk verdicht en fijn wortelgestel waarneembaar. Geïnoculeerde potten zijn ook moeilijker in te knijpen vanwege de grote massa wortels in de steenwolpot.



Figuur 10 Symptomen in de mat met duidelijk herkenbaar de fijne wortelstructuur, de oranje-roze gloed en de verdichting en extra vertakking van het wortelgestel aan de bovenzijde van de steenwol mat.

Figuur 11 Planten met symptomen waarbij er verspreiding heeft plaats gevonden van de besmette plant (met labels) naar een niet besmette plant.



Figuur 13 Planten met visueel waarneembare symptomen op de steenwolpot en in de steenwolmat in de kasproef tomaat. Neg "onbesmette controle", Pos "besmette controle", Chl1 "lage concentratie chloor", Chl2 "hoge concentratie chloor", H2O2 "waterstofperoxide", Pro "proradix".

Figuur 2. Het verschil tussen Chl2 "hoge concentratie chloor" (b) en Pos "besmette controle" is significant. De andere behandelingen Pro "Proradix", Chl1 "lage concentratie chloor" en H2O2 "waterstofperoxide" verschillen niet significant (c) van de Pos "besmette controle". Fischer's protected least significant difference ($p < 0.05$).

Bij alle behandelingen, uitgezonderd de onbesmette controle behandeling, is er visueel verspreiding vast te stellen naar onbesmette planten. Op basis van deze waarneming kan worden gesteld dat géén van de behandelingen in staat blijkt te zijn om verspreiding met *Agrobacterium rhizogenes* voor 100% te voorkomen.

De symptomen blijken bij het opensnijden van de matten erger en verder verspreid te zijn dan op basis van de visuele beoordeling van de steenwolkpotten. Dit geeft aanleiding om te denken dat de symptomen in veel praktijkteelten mogelijk over het hoofd worden gezien, verkeerd worden ingeschat of niet serieus genoeg genomen worden. Dit kan leiden tot een verborgen problematiek en uitbraken met plotseling zeer ernstige symptomen omdat de aanloop over het hoofd is gezien.

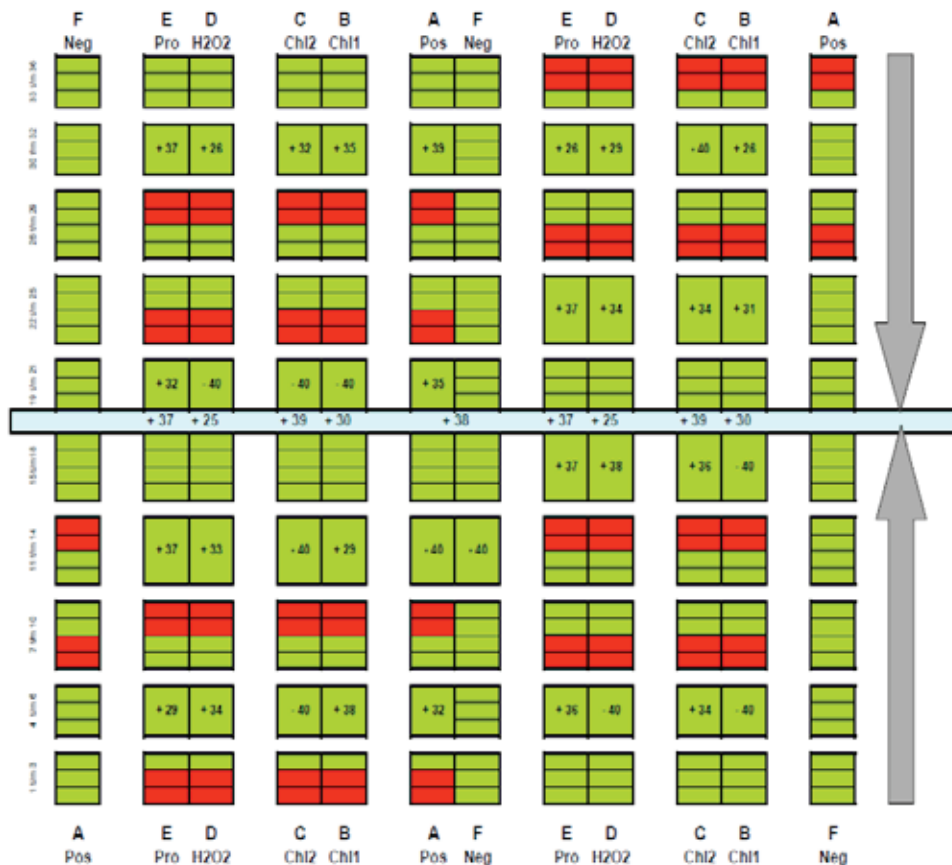
Tabel 5. vat de belangrijkste uitkomsten van de verspreiding van *Agrobacterium* binnen deze proef samen. Daarbij wordt onderscheid gemaakt tussen geïnoculeerde planten, planten die met deze geïnoculeerde plant in één mat staan en planten in matten zonder geïnoculeerde planten. De reden voor dit onderscheid is dat je van geïnoculeerde planten die bewust beschadigd zijn, mag verwachten dat ze ziek worden, ongeacht de behandeling. Verspreiding binnen de mat zal lastig te voorkomen zijn doordat de wortels van planten binnen een mat makkelijk met elkaar in contact komen. Verspreiding tussen de matten kan (bij losliggende matten zoals die in dit experiment zijn toegepast, eigenlijk alleen plaatsvinden via drainwater dat van de ene naar de andere mat loopt. Het is duidelijk dat de verspreiding binnen matten hoger ligt dan de verspreiding tussen matten (Tabel 5).

Binnen de onbesmette controle zijn - zoals verwacht - geen zieke planten teruggevonden. In de besmette controle was het aantal besmette planten het hoogst. De vier behandelingen liggen hier tussenin.

Tabel 5 Relatieve aantastingsniveau van geïnoculeerde planten en de uitbreiding naar andere planten binnen en tussen de verschillende matten. Het aantastingsniveau is bepaald op basis van symptoomwaarnemingen in de mat en op de pot.

Behandeling	Aantastingsniveau geïnoculeerde planten	Verspreiding binnen matten	Verspreiding tussen matten
Onbesmette controle	0%	0%	0%
Besmette controle	88%	13%	23%
Proradix	75%	19%	0%
Chloor laag	81%	25%	0%
H2O2	56%	6%	0%
Chloor hoog	81%	6%	5%

3.2.3.3 Verspreiding tussen de maten op basis van analyse



Figuur 11 In deze Figuur wordt visueel getoond welke steenwolmaten op basis van een moleculaire analyse zijn aangetast. Er is gekozen om het drainwater te analyseren en om een analyse uit te voeren van steenwolmaten die grenzen aan die bewust geïnfecteerd zijn. Dit om aan te geven of er verspreiding tussen de maten heeft plaats gevonden. De rode blokjes stellen de planten voor die opzettelijk besmet zijn bij aanvang van de proef. In elk compartiment liggen vier herhalingen van de zes behandelingen (neg= negatieve controle; Pos=positieve controle; Chl1=lage concentratie chloor; Chl2=hoge concentratie chloor; Per=Waterstofperoxide; Pro=Proradix). De pijlen geven de richting van de drain weer.

Van de verschillende behandelingen in de proef zijn ook wortelmonsters genomen om met behulp van een moleculaire analyse te bevestigen dat de wortels (en maten) aangetast waren. De bemonstering is vooral uitgevoerd in de maten die grensden aan een geïnoculeerde mat. Dit is gedaan om ook de verspreiding van de bacterie objectief te kunnen vaststellen. De resultaten zijn verwerkt in de bovenstaande Figuur (Figuur 11.).

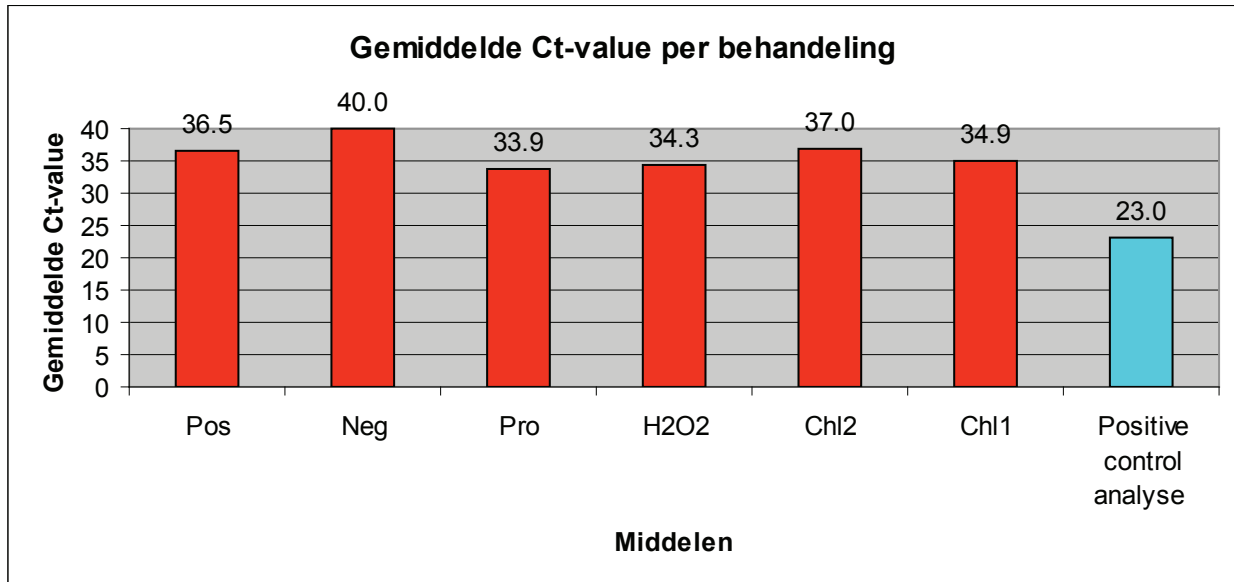
Duidelijk is dat er verspreiding van de bacterie heeft plaatsgevonden naar aangrenzende en niet geïnoculeerde maten. Dat betekent dat er geen middel is toegepast in dit experiment dat de verspreiding naar andere maten heeft kunnen voorkomen. Ook uit het drainwater meerder positieve monsters genomen.

Indicatief kan om een indruk te geven van de mate van verspreiding gekeken worden naar de CT-value. Deze waarde is een maat voor de hoeveelheid *A. rhizogenes* in het oorspronkelijke monster. De CT-value geeft aan hoeveel PCR cycli zijn doorlopen voor een positief signaal wordt gedetecteerd. Dat wil zeggen dat hoe lager deze waarde hoe meer bacteriën er in het oorspronkelijke monster hebben gezeten.

Informatief kunnen we deze waarden analyseren, maar conclusies kunnen er niet aan verbonden worden. De monsternaam is daarbij sterk bepalend en de monsters zijn eerst voorgekweekt alvorens een PCR uit te voeren (Zogenaamde bio-PCR). De Ct-value zegt iets of er in het oorspronkelijke monster weinig of veel bacteriën hebben gezeten. Daarbij is de Ct-value van de positieve controle in de Q-PCR een maat voor een hoge concentratie bacteriën in het oorspronkelijke monster. Per behandeling is in het experiment is de gemiddelde Ct-value bepaald als een indicatieve maat voor de verspreiding. Daarbij is het opmerkelijk dat alle analyse ver boven de positieve controle uit de analyse liggen en dat de behandeling CH12

(hoge chloordosering) de hoogste Ct-value heeft. Speculatief kan daarbij gezegd worden dat de hoge chloor dosering de minste verspreiding laat zien, echter in relatie tot de positieve controle in het experiment is het verschil verwaarloosbaar.

Op basis van de Ct-values kunnen we slechts een conclusie trekken dat er verspreiding plaats vindt. De mate van verspreiding door deze analyse niet worden verklaard.



Figuur 12 Gemiddelde Ct-values van de uitgevoerde moleculaire analyses van monsters uit de mat, per behandeling.

4 Discussie en conclusie

4.1 Conclusies; Komkommer

Uit de komkommer proef kwam naar voren dat alle behandelingen mogelijk een effect hebben, maar doordat er ook een sterk effect was van de ligging van de behandelingen in de kas, kon hierover geen zekerheid worden verschaft. Wel was duidelijk dat geen van de behandelingen de verspreiding van de besmetting voor 100% remt.

De behandeling met een hoge concentratie chloor (~20 ppm) geeft gewasschade in komkommer. Een hoge concentratie chloor zorgde voor minder vruchten, een lager vruchtgewicht en dus ook minder opbrengst. Datzelfde gold ook voor Jet 5, maar dit kan ook een indirect effect zijn wat veroorzaakt is door de verstopping van het watergeefstelsel in deze behandeling.

Symptoomloze planten kunnen besmet zijn en kunnen ook een bron vormen voor verdere verspreiding van de bacterie en zijn plasmide.

Verspreiding vindt plaats binnen de mat en tussen matten, waarbij de verspreiding binnen de mat eerder en vaker voorkomt. Verspreiding van mat naar mat vindt ook plaats tegen de drain in.

4.2 Conclusies; Tomaat

Het experiment met tomaat heeft geleid tot vergelijkbare resultaten en conclusies als het experiment met komkommer. De belangrijkste conclusie is dat er bij géén van de behandelingen wordt voorkomen dat er verspreiding plaats vindt tussen de matten. Dit is zowel vastgesteld op basis van visuele waarnemingen als op basis van analyse.

Net als bij komkommer is bij het experiment met tomaat vastgesteld dat de verspreiding van de bacterie *A. rhizogenes* tegen de (drain)stroom plaats vindt. Dit impliceert een actieve verspreiding van het pathogeen in de kas.

Het drainwater is een bron van besmetting. Watermonsters zijn herhaaldelijk positief getest op de aanwezigheid van *A. rhizogenes*.

Op basis van het aantal aangetaste planten per behandeling kan worden geconcludeerd dat alleen de hoge chloordosering significant afwijkt van de controles en andere behandelingen. Bij deze hoge dosering chloor zal mogelijk de verspreiding wat worden beperkt (er vindt verspreiding plaats, echter bij deze hoge dosering zal gewasschade en oogstverlies (gewicht) optreden).

4.3 Discussie en aanbevelingen

Belangrijkste punt van discussie is de matige verspreiding van symptomen van *Agrobacterium rhizogenes* in de positieve controle. Bij deze behandeling zou de ziekte zich ongebreideld moeten kunnen verspreiden, echter heftige symptoomvorming is niet gerealiseerd. Dit ondanks hoge inoculum dichtheden, het drie maal inoculeren van het gewas (tomaat), het aanbrengen van verwondingen bij inoculeren zijn symptomen zoals bekend uit de praktijk niet gerealiseerd. De inoculatie op zich is gelukt en symptomen hebben zich gevormd maar een snelle en excessieve verspreiding zijn niet gerealiseerd.

Hiervoor zijn een aantal verklaringen te bedenken of hypothesen over te formuleren

- Er is tijdens het experiment niet gerecirculeerd. Mogelijk vindt de belangrijkste verspreiding in de praktijk primair plaats via het drainwater. Door geen recirculatie toe te passen, geldt het feit dat de infectie van drie inoculatie momenten afhangt. In de praktijk staan planten, wanneer het water niet wordt ontsmet, onder voortdurende infectie door recirculatie van het drainwater.
- Uit de experimenten blijkt dat water een grote rol speelt bij de verspreiding van de bacterie. In de toetsingen worden de beste resultaten bereikt met drainwater uit de matten. De laagste Ct-waarden zijn namelijk gevonden in drainwater uit besmette matten. Hoe lager de Ct-waarden hoe groter de mate van aantasting.
- Het tijdstip van de eerste inoculatie is gekozen op 5 weken na zaaien. Mogelijk heeft zich gedurende deze eerste 5 weken zich een natuurlijke microflora ontwikkeld, die een snelle en explosieve groei van de bacterie hebben kunnen voorkomen. Uit onderzoek van Postma (2010) blijkt dat in een nieuwe en schone steenwolmat zich zeer snel 'bodemleven' ontwikkeld en dat de diversiteit en dichtheden na 6-7 weken niet meer toenemen.

4.4 Aanbevelingen

Op basis van dit onderzoek en de resultaten is het aan te bevelen om vast te stellen in een vervolg onderzoek wanneer de planten vatbaar zijn en of er momenten zijn waarbij een plant gevoelig(er) is voor een infectie of een verhoogde vatbaarheid toont.

Ook is het zinvol om eerst een screening te doen van een brede range aan chemische en alternatieve gewasbeschermingsmiddelen op laboratorium schaal. Beste middelen kunnen worden gebruikt in een experiment met jonge planten. Dit geeft een snel en kosten efficiënt resultaat op de vraag welke middelen toepasbaar zijn tegen *A. rhizogenes*.

In de praktijk wordt gewerkt met nieuwe technieken zoals Aquanox, ECA-water, Koperionisatie en Zilverionisatie. Van deze technieken dient te worden vast gesteld wat het effect is op deze bacterie en of de verspreiding van de bacterie kan worden ingedamd.

5 Literatuur

- Davioud, E., A. Petit., M.E. Tate, M.H. Ryder en J. Pempe 1988.
Cucumopine - a new T-DNA encoded opine in hairy root and crown gall. *Phytochemistry* 27: 2429-2433.
- Hooykaas, P.J.J. & Beijersbergen, A.G.M., 1994.
The Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. Annual Review of Phytopathology. Vol. 32: 157-181.
- O'Neill, T.M. & Yarham, D. 1993.
The cucumber root mat mystery. *Grower*, 120: 8-9.
- O'Neill, T.M. 1994.
Cucumber: Investigation of root mat disease - 1993.
Final Report. ADAS Cambridge, 19 p.
- Weller, S.A., D.E. Stead, T.O. O'Neill, D. Hargreaves & G. M. McPerson, 2000.
Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathology* 49: 43-20.
- Weller, S. A., D. E. Stead en J.P.W. Young 2006.
Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various *Alphaproteobacteria*. *FEMS Microbiology Letters* 258(1): 136-143.
- Weller, S. A., Elphinstone, J.G. Parkinson, N. & Thwaites, R. 2006.
Moleculair diagnosis of plant pathogenic bacteria. *Arab J. Pl. Prot.* 24:143-146.
- Zabel, P. 2005.
Gene technology. Laboratory of Molecular Biology, Department of Plant Sciences, Wageningen University, p. 144.

