



Onderzoek naar de oorzaak van ‘zwarte vaten in radijs’

Auteurs: Daniël Ludeking, Roel Hamelink, Jantineke Hofland-Zijlstra, Wim van Wensveen



Referaat

Op één Nederlands radijsbedrijf treedt vanaf de herfst van 2007 een verschijnsel op, waarbij radijsknollen bruine tot zwarte vaatbundels vertonen. De radijsplantjes blijven veelal achter in groei of gaan dood. Uitwendig is de verkleuring niet altijd waarneembaar, waardoor deze knollen toch in het handelskanaal terecht kunnen komen. Sinds het voorjaar van 2008 is het verschijnsel ook op een ander bedrijf opgetreden. Op de betreffende bedrijven breidt het verschijnsel zich elk jaar uit en leidt tot veel schade in het winterhalfjaar.

Een bekende ziekteverwekker is in voorgaande onderzoeken niet geïsoleerd, daarom is er in dit onderzoek verder gezocht om een onbekende ziekteverwekker te kunnen identificeren. Gedurende dit onderzoek is er vastgesteld dat de ziekte overdraagbaar is via grond en wordt veroorzaakt door de bacterie *Stenotrophomonas spp.* De bacterie is geïsoleerd uit geïnfecteerde knollen, er is een moleculaire analyse gemaakt van de isolaten en de postulaten van Koch zijn toegepast. Op basis van de analyse en het terug toetsen van het pathogeen kan worden geconcludeerd dat *Stenotrophomonas spp.* verantwoordelijk is voor de symptomen in het gewas.

Abstract

Dutch radish growers found a new disease symptom in their crop in the fall of the year 2007. Two radish growers first discovered symptoms of the disease, but ever since more growers came in touch with this persistent disease, that is called "black veins in Radish". A group of Dutch growers introduced the symptoms to researchers of Wageningen UR Greenhouse Horticulture and together research was started with objective to find the cause of the new disease in radish. The symptoms are primarily described as typical dark brown to black veins in the white flesh of the swollen roots. The black veins are also found in other parts of the plant, such as leaf stems and roots.

A known pathogen was in previous research not isolated or detected, therefore this research was started to identify the cause of this disease. Selected isolates were used to infect a known vulnerable radish-variety 'Lennox' by adding large amounts (10^6 bacteria/ml soil). Minor symptoms developed. Out of the developed bacteria were re-isolated and compared to the original isolated so Koch's postulates were fulfilled.

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Wageningen UR Glastuinbouw.

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 Probleemstelling en aanleiding voor het onderzoek	7
	1.2 Symptomen	8
2	Aanpak	8
	2.1 Biotoets: ziekteverwekker of een fysiologisch probleem	8
	2.1.1 Opzet experiment	9
	2.1.2 Resultaten	9
	2.1.3 Conclusie	10
	2.2 Identificatie pathogeen; analyse en moleculaire detectie	10
	2.2.1 Uitvoeringen en resultaten 2010	11
	2.2.2 Monsters	11
	2.2.3 Monsters van praktijkbedrijf, december 2009	11
	2.2.4 Monsters uit de biotoets (§2.1)	12
	2.2.4.1 Resultaten	12
	2.2.4.2 Conclusie; monsters direct uit het plantmateriaal	14
	2.2.5 Radijs met symptomen uit Italië december 2011	15
	2.2.5.1 Monsters	15
	2.2.5.2 Resultaten	16
	2.2.5.3 Resultaten sequencing	17
	2.2.5.4 Conclusie	17
	2.3 Postulaten van Koch; Biotoets met geïdentificeerde isolaten	17
	2.3.1 Experiment: biotoets in incubator	17
	2.3.1.1 Materiaal en Methode:	18
	2.3.1.1.1 Periode:	18
	2.3.1.1.2 Grond en kokers bestraald met gammabestraling (25 kGray):	18
	2.3.1.1.3 Behandelingen:	19
	2.3.1.1.4 Watergift:	19
	2.3.1.1.5 Inoculatie	19
	2.3.1.1.6 Metingen:	19
	2.3.1.1.7 Statistiek:	19
	2.3.1.2 Resultaten	20
	2.3.2 Experiment: biotoets in klimaatkast	20
	2.3.2.1 Materiaal en Methode:	20
	2.3.2.1.1 Periode:	20
	2.3.2.1.2 Materiaal en Methode:	20
	2.3.2.1.3 Grond en kokers bestraald met gammabestraling (25 kGray):	21
	2.3.2.1.4 Behandelingen:	21
	2.3.2.1.5 Watergift:	21
	2.3.2.1.6 Inoculatie	21
	2.3.2.1.7 Metingen:	22
	2.3.2.1.8 Statistiek:	22
	2.3.2.2 Resultaten	22
	2.3.2.3 Conclusie	22
	2.3.3 Opzet experiment: biotoets onder kascondities	23
	2.3.3.1 Doel	23

	2.3.3.2	Materiaal en Methode:	23
	2.3.3.2.1	Periode	23
	2.3.3.2.2	Materiaal en Methode:	23
	2.3.3.2.3	Behandelingen:	24
	2.3.3.2.4	Watergift:	24
	2.3.3.2.5	Metingen:	24
	2.3.3.2.6	Inoculaties	24
	2.3.3.3	Resultaten	25
	2.3.3.4	Conclusie	27
3		Beschrijving van het pathogeen <i>Stenotrophomonas</i> spp.	29
	3.1	Verspreiding	29
	3.2	Schade	29
	3.3	Hygiënemaatregelen om verspreiding van bacteriën te voorkomen (per teeltfase)	29
4		Conclusies en aanbevelingen	31
5		Literatuur	33
Bijlage I		Resultaten Blast search	35

Samenvatting

Op één Nederlands radijsbedrijf treedt vanaf de herfst van 2007 een verschijnsel op, waarbij radijsknollen bruine tot zwarte vaatbundels vertonen. De radijsplantjes blijven veelal achter in groei of gaan dood. Uitwendig is de verkleuring niet altijd waarneembaar, waardoor deze knollen toch in het handelskanaal terecht kunnen komen. Dit leidt tot ernstige imagoschade en schaadt het vertrouwen in het product door de handel en de consument. Sinds het voorjaar van 2008 is het verschijnsel ook op een ander bedrijf opgetreden. Op de betreffende bedrijven breidt het verschijnsel zich elk jaar uit en leidt tot veel schade in het winterhalfjaar. Stomen blijkt onvoldoende en kan slechts een tijdelijke oplossing zijn voor de problematiek.

In 2009 is via een consultancy onderzoek (Janse *et al.* 2009) een eerste aanzet gegeven om de mogelijke oorzaak van dit verschijnsel op te sporen. In eerste instantie is gezocht naar een fysiologische verklaring voor de oorzaak van de zwarte vaten, omdat er in monsters die door telers waren ingestuurd geen duidelijke ziekteverwekkers waren aangetoond. Er is onderzocht of mogelijk een tekort of overmaat aan een bepaald voedingselement in de knol of blad de oorzaak voor zwarte vaten zou kunnen zijn. Radijzen met meer of minder zwarte vaatbundels zijn daarom geanalyseerd. Ondanks kleine verschillen in de gehalten van een aantal mineralen lijkt het er niet direct op dat de oorzaak in een mineralentekort of -overmaat moet worden gezocht.

Een bekende ziekteverwekker is in voorgaande onderzoeken niet geïsoleerd, daarom is er in dit onderzoek verder gezocht om een onbekende ziekteverwekker te kunnen identificeren. De symptomen van radijsknollen met zwarte vaatbundels komen enigszins overeen met die van zwartnervigheid in koolachtige gewassen, welke veroorzaakt wordt door de bacterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Deze bacterie is zaad overdraagbaar (Van der Wolf, 2010) en zal vooral toeslaan onder omstandigheden met een hoge temperatuur in combinatie met een hoge luchtvochtigheid. Hiervan is juist bij het optreden van de symptomen in de radijs geen sprake. De symptomen treden vooral op in het najaar en voorjaar. De observatie dat de zwarte vaatbundels niet verschijnen in de eerste teelt na het stomen en de mogelijke verspreiding via grond- en plantmateriaal lijken te wijzen in de richting van een ziekteverwekker. Telers geven daarnaast aan dat sommige rassen minder gevoelig zijn voor het verschijnsel dan andere rassen.

In dit onderzoek is er vastgesteld dat de ziekte overdraagbaar is via grond en wordt veroorzaakt door de bacterie *Stenotrophomonas* spp. De bacterie is geïsoleerd uit geïnfecteerde knollen, er is een moleculaire analyse gemaakt van de isolaten en de postulaten van Koch zijn toegepast. Op basis van de analyse en het terug toetsen van het pathogeen kan worden geconcludeerd dat *Stenotrophomonas* spp. verantwoordelijk is voor de symptomen in het gewas.

1 Inleiding

1.1 Probleemstelling en aanleiding voor het onderzoek

Op één Nederlands radijsbedrijf treedt vanaf de herfst van 2007 een verschijnsel op, waarbij radijsknollen bruine tot zwarte vaatbundels vertonen. De radijsplantjes blijven veelal achter in groei of gaan dood. Uitwendig is de verkleuring niet altijd waarneembaar, waardoor deze knollen toch in het handelskanaal terecht kunnen komen. Dit leidt tot ernstige imagoschade en schaadt het vertrouwen in het product door de handel en de consument. Sinds het voorjaar van 2008 is het verschijnsel ook op een ander bedrijf opgetreden. Op de betreffende bedrijven breidt het verschijnsel zich elk jaar uit en leidt tot veel schade in het winterhalfjaar. Stomen blijkt onvoldoende en kan slechts een tijdelijke oplossing zijn voor de problematiek.

In 2009 is via een consultancy onderzoek (Janse *et al.* 2009) een eerste aanzet gegeven om de mogelijke oorzaak van dit verschijnsel op te sporen. In eerste instantie is gezocht naar een fysiologische verklaring voor de oorzaak van de zwarte vaten, omdat er in monsters die door telers waren ingestuurd geen duidelijke ziekteverwekkers waren aangetoond. Er is onderzocht of mogelijk een tekort of overmaat aan een bepaald voedingselement in de knol of blad de oorzaak voor zwarte vaten zou kunnen zijn. Radijzen met meer of minder zwarte vaatbundels zijn daarom geanalyseerd. Ondanks kleine verschillen in de gehalten van een aantal mineralen lijkt het er niet direct op dat de oorzaak in een mineralentekort of -overmaat moet worden gezocht.

In het onderzoek zijn bij verschillende laboratoria monsters getoetst op mogelijke ziekteverwekkers. Via de klassieke methode van uitplaten en via DNA-analyse zijn verschillende schimmels en bacteriën aangetroffen (*Pythium spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora spp.*, *Penicillium spp.*, *Botrytis cinerea*). Deze schimmels kunnen pathogeen zijn, maar zijn geen logische verklaring voor de symptomen in het gewas en konden dus niet gerelateerd worden aan de waargenomen ziekteverschijnselen. Specifieke toetsing op ziekteverwekkende bacteriën in de *Xanthomonas*-groep gaven tot dusver een negatief resultaat evenals specifieke detectie op *Verticillium dahliae* en *V. albo-atrum*. Bij diagnose van besmet materiaal door een extern laboratorium is één maal een onbekende *Xanthomonas*-bacterie aangetroffen, maar die kon niet verder worden geïdentificeerd.

Een bekende ziekteverwekker is in voorgaande onderzoeken niet geïsoleerd, daarom is er in dit onderzoek verder gezocht om een onbekende ziekteverwekker te kunnen identificeren. De symptomen van radijsknollen met zwarte vaatbundels komen enigszins overeen met die van zwartnervigheid in koolachtige gewassen, welke veroorzaakt wordt door de bacterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Deze bacterie is zaad overdraagbaar (Van der Wolf, 2010) en zal vooral toeslaan onder omstandigheden met een hoge temperatuur in combinatie met een hoge luchtvochtigheid. Hiervan is juist bij het optreden van de symptomen in de radijs geen sprake. De symptomen treden vooral op in het najaar en voorjaar. De observatie dat de zwarte vaatbundels niet verschijnen in de eerste teelt na het stomen en de mogelijke verspreiding via grond- en plantmateriaal lijken te wijzen in de richting van een ziekteverwekker. Telers geven daarnaast aan dat sommige rassen minder gevoelig zijn voor het verschijnsel dan andere rassen.

Hoewel er diverse aanwijzingen zijn dat een ziekteverwekker de oorzaak is van de verspreiding van zwarte vaatbundels in radijs, is de werkelijke oorzaak van zwarte vaatbundels nog niet opgespoord. Daarom is dit uitgebreid vervolgonderzoek gestart om na te gaan of er inderdaad een ziekteverwekker bij betrokken is. Als de oorzaak bekend is, kunnen telers gerichter maatregelen nemen om het verschijnsel te voorkomen en/of te verminderen. Tevens is het van groot belang om het vertrouwen bij de handel en bij de consument weer terug te winnen en om verdere imagoschade te voorkomen.

1.2 Symptomen

De symptomen worden bovengronds gekenmerkt door een dofte kleur van het blad. In een later stadium vergelen oudere bladeren. De vergeelde bladeren verwelken. Ook een algemene groeistagnatie komt voor. Ondergronds hebben de symptomen ook zeer duidelijke kenmerken. De knolvorming komt niet goed tot stand, waardoor er langgerekte en misvormde knolletjes kunnen ontstaan. Ook het wortelgestel neemt sterk toe in omvang: er worden veel extra wortels gevormd. Extra grond blijft aan het knolletje hangen bij het oogsten. De ziekte is onomkeerbaar. Als de eerste symptomen zichtbaar worden, zullen de planten uitvallen en zijn de knolletjes niet oogstbaar. Echter de symptomen zijn niet altijd bovengronds zichtbaar. Bij het doorsnijden van verdachte knolletjes kan pas onherroepelijk worden vastgesteld of het gewas is aangetast. Zowel in de doorsnede van de knol, de wortel of de bladstelen kunnen duidelijke zwarte transportvaten waarneembaar zijn. De kleur van de vaten varieert van zwart tot bruin. Zowel de hoofdvaten als kleinere vaten worden geïnfecteerd. Geïnfecteerde vaten zijn dus niet wit meer wat aangeeft dat de vaten door de ziekte zijn aangetast en er geen transport meer mogelijk is. Dit verklaart de bovengrondse verwelking en groeistagnatie.



Figuur 1.1: Groeistagnatie en vergeling van de radijsplantjes in de kas (Foto Wageningen UR Glastuinbouw)

Figuur 1.2: Symptomen in de knol bij doorsnede. Duidelijke zwarte vaten zijn herkenbaar in zowel de knol als de bladsteel (Foto Wageningen UR Glastuinbouw)

2 Aanpak

Er is gekozen voor een aanpak waarbij via deelexperimenten (biotoetsen) is getracht om dichter bij de oorzaak van het zwarte vaten probleem te komen. Er is getest of de symptomen overdraagbaar waren via grond, via aangetast plantmateriaal doorgemengd in de grond, in vergelijking met steriele grond. Vervolgens zijn isolaten gemaakt van geïnfecteerde knollen. Organismen die aanwezig waren in de kweken, zijn klassiek en moleculair onderzocht. Geselecteerde isolaten zijn vergeleken en terug getoetst op radijsaailingen die gezaaid waren op steriele grond.

2.1 Biotoets: ziekteverwekker of een fysiologisch probleem

In de winterperiode van 2009/2010 is gestart met de uitvoering van een biotoets met gesteriliseerde en besmette grond. Doel van dit deelonderzoek was om na te gaan of de verkleuring van de vaatbundels in radijs door een ziekteverwekker wordt veroorzaakt of niet.

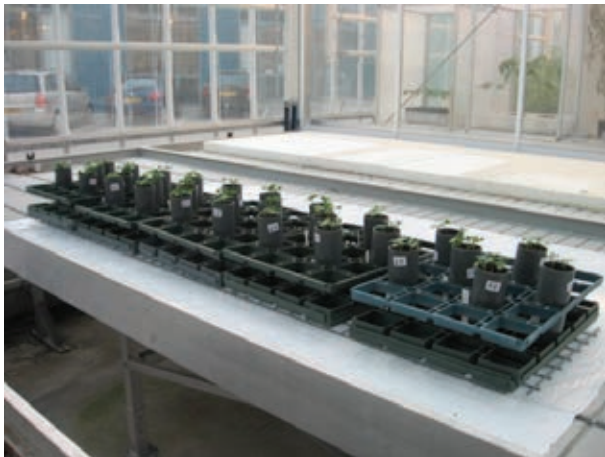
2.1.1 Opzet experiment

Er is van bedrijven met symptomen grond verzameld (2 praktijkbedrijven, zwaar geïnfecteerde percelen). Deze besmette grond is uitgangsmateriaal geweest voor de biotoets. De grond van beide bedrijven is gehomogeniseerd en in drieën gesplitst. Tweederde van de grond is gesteriliseerd met gamma straling (25 kGray, Isotron, Ede). Een derde deel is onbehandeld gelaten en gekoeld bewaard in een koelcel (donker, 10 °C).

De gesteriliseerde grond is deels onbehandeld gelaten en deels is getracht om te herbesmetten door middel van het doormengen van de pulp van geïnfecteerde knollen.

De biotoets is uitgevoerd in gesteriliseerde PVC kokers met een diameter van 8 cm en een hoogte van 20 cm. Voor deze kokers is gekozen om er voor te zorgen dat de radijs ook fysisch in staat is om een goede knol te vormen en een zoveel mogelijk de teelt in de praktijk na te bootsen.

Het experiment is uitgevoerd met het ras Lennox (F1, Nunhem's zaden). Dit is een ras dat door de telers als gevoelig werd betiteld voor ontwikkeling van de symptomen. In een kleine kasafdeling is de gesteriliseerde en geïnfecteerde grond gebruikt om radijs in te zaaien. De kokers zijn in houders geplaatst om omvallen te voorkomen en er is geteeld met belichting om de praktijkcondities waaronder de symptomen ontstaan in de praktijk zoveel mogelijk te benaderen.



Figuur 2.1: Opstelling van de biotoets op teelttafels

2.1.2 Resultaten

In de behandelingen met besmette grond waren de radijswortels van alle planten sterk of in ietwat mindere mate zwart verkleurd. Eveneens was er een opvallende overmatige wortelgroei aanwezig. De planten vertoonden tevens een lagere productie van plantgewicht en knolgewicht. Al na één of twee weken waren er in de behandelingen met besmette grond planten zichtbaar waarvan de bladeren slap gingen hangen. Dit duidde kennelijk al op een verstoorde wateropname. Ook vergeling van het blad, vooral de oudere blaadjes is waargenomen in deze behandeling. Dit werd ook bevestigd door een sterke afname van de verdamping van de planten. De kwaliteit van de wortel was slecht: niet recht, een sterke vertakking van het wortelgestel (bossige groei). Ook de knolvorm was variabel en de diameter van de knol was kleiner. Radijzen gezaaid in de geïnfecteerde grond werden 100% aangetast onder de gegeven condities.

De besmette knollen die in de vorm van pulp door de gesteriliseerde (bestraalde) grond gemengd waren, bleken niet in staat om schone grond te besmetten. Kennelijk was de procedure van opslag, fijnmaken en verdere verwerking niet geschikt voor succesvolle overbrenging van de pathogenen uit de knollen.

Eventueel aanwezige pathogenen waren niet in staat om gezaaide radijs te infecteren. Mogelijk was de pulp niet homogeen genoeg verdeeld over de grond of bevatte de pulp nog voldoende voedingsstoffen om de pathogenen te laten overleven waardoor verspreiding en infectie van de pathogenen van de gezaaide radijs niet tot stand is gekomen.

Aan de gesteriliseerde (bestraalde) grond waren geen toevoegingen gedaan. Ook in de gesteriliseerde grond zijn geen knollen met de symptomen waargenomen. Knollen waren net als bij de gesteriliseerde grond met toegevoegde pulp in alle gevallen gezond. Symptomen zijn niet opgetreden. Zowel bovengronds (bladkleur, verwelkingsverschijnselen en vergeling) als ondergronds (knolvorm, wortelvorming en zwarte vaten) is de behandeling met de gesteriliseerde grond vrij van de eerder beschreven symptomen gebleven.



Figuur 2.2: In de biotoets was na negen weken een duidelijk verschil in gewasgroei en vaatverkleuring aanwezig tussen radijsplanten die op besmette grond stonden en radijsplanten die op grond stonden die vooraf met gammastraling was behandeld.

2.1.3 Conclusie

Uit de resultaten van de proef kunnen we concluderen dat er een pathogeen in de niet-bestraalde (natuurlijk geïnfecteerde) grond aanwezig is, dat verantwoordelijk is voor de verkleuring van de vaatbundels. De ziekte is overdraagbaar via de grond.

2.2 Identificatie pathogeen; analyse en moleculaire detectie

In 2009 zijn knollen met een lichte vaatverkleuring afkomstig van één bedrijf moleculair geanalyseerd op de aanwezigheid van ziekteverwekkers. Van besmet plantmateriaal van diverse herkomsten (2 Nederlandse bedrijven en een Italiaans bedrijf) zijn isolaten gemaakt van de mogelijke ziekte verwekkers. In eerste instantie is in de breedte gezocht naar aan mogelijk aanwezige pathogenen. Focus lag hier niet meer op nematoden, insecten of virus gezien de symptomen. In samenwerking met PPO Bloembollen en Bomen in Lisse is met behulp van moleculaire (DNA) technieken een analyse gemaakt van de mogelijke pathogenen en gezocht naar verbanden en overeenkomsten tussen de gedetecteerde pathogenen.

In de eerste moleculaire analyses is een Xanthomonas-achtige bacterie aangetroffen. De focus van het identificatie

onderzoek is vervolgens komen te liggen op de isolatie en analyse van geïsoleerde bacteriën. Verschillende herkomsten (praktijk) en isolaten uit de biotoets en isolaten uit geïnfecteerde gronden zijn in reïncultuur gebracht en zijn onderzocht op overeenkomsten om vast te stellen of er sprake is van één pathogeen en of er verschillen zijn tussen de pathogenen.

2.2.1 Uitvoeringen en resultaten 2010

Isolaten verkregen uit de biotoets (§2.1) en monsters uit de praktijk zijn gebruikt om een vergelijking te maken tussen de isolaten. Er is vastgesteld of de isolaten uit de knollen overeenkomen met eventuele bacteriën in de grondmonsters.

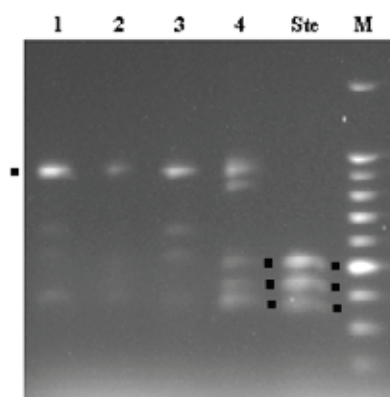
2.2.2 Monsters

Deze monsters zijn gedurende het beschreven onderzoek geanalyseerd:

1. Monsters van december 2009 (praktijkbedrijf, code: Ra3), geanalyseerd in januari 2010 (monsters zijn later met monsters uit de biotoets ter vergelijking geanalyseerd).
2. Monsters uit biotoets:
 - Radijsmonsters uit biotoets die "Besmet" aangegeven: **1, 2, 9, 10, 11, 13**
 - Radijsmonsters uit biotoets die "Schoon" aangegeven: **17, 19, 21, 22, 27, 29**
 - Ook grondmonsters van **2, 10, 13, BG** (Besmette grond).
3. Monster via BCO uit de praktijk **Gezond** en **Ziek**
4. Monsters uit Italië witte en rode radijs.

2.2.3 Monsters van praktijkbedrijf, december 2009

De monsters zijn afkomstig uit de praktijk en zijn zwaar aangetast. Uit isolaties van verschillende knollen, die zijn ontvangen in december 2009 (Ra3-1 t/m Ra3-4), groeien verschillende soorten bacteriën. Er is gebruik gemaakt van een deel van het ribosomaal DNA van de bacteriën om een vergelijking te maken tussen bacteriën. Een deel van dat ribosomaal DNA het zogenaamde, 16S fragment, is gebruikt om onderscheid te maken of overeenkomsten te vinden tussen de verschillende isolaten. Na wat eerdere analyses is er aanleiding om aan te nemen dat de bacterie overeenkomsten heeft met *Xanthomonas spp.* en *Stenotrophomonas spp.*. PCR oogsten van isolaties zijn niet gesequenced. Er is gebruik gemaakt van een vergelijking aan de hand van RFLP-techniek. Hierbij wordt de PCR oogst geknipt door een enzym. Het knippatroon toont dan eventuele overeenkomsten of verschillen. Volgens het gevonden knippatroon kan er in de monsters *Stenotrophomonas spp.* aanwezig zijn. De sterkte van de signalen (helderheid van de bandjes) in Figuur 2.3. ligt echter lager dan van de analyse ten opzichte van andere bacteriën, zoals *Pseudomonas*.

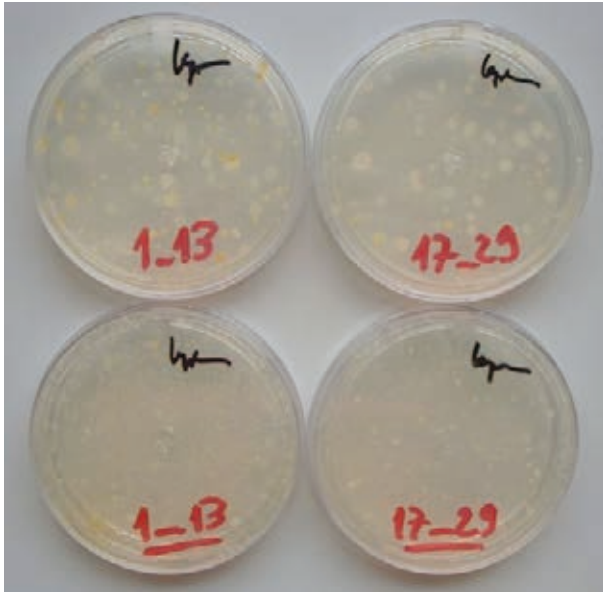


Figuur 2.3: Ongeknipte bandjes van 900 bp. Ste= *Stenotrophomonas*, 1-4 isolaten uit de praktijk.

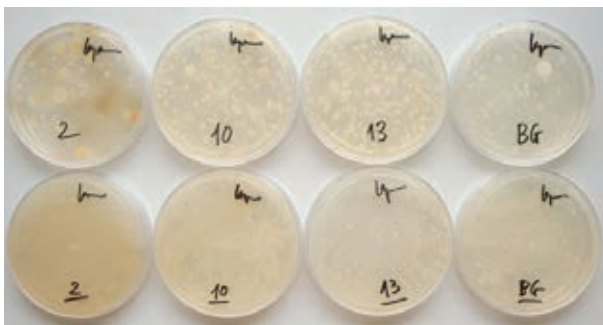
2.2.4 Monsters uit de biotoets (§2.1)

Uit de radijsjes die zijn geoogst uit de biotoets om vast te stellen of de bacteriën (grond)overdraagbaar zijn, zijn isolaten gemaakt. De gekweekte bacteriën uit het radijsmateriaal met en zonder symptomen is gebruikt voor DNA extractie en daarna PCR. De isolaten zijn ook doorgekweekt om de bacteriestammen later te kunnen gebruiken als het nodig is. Grondmonsters werden eerst opgenomen in steriel water. Watermonsters werden gebruikt voor DNA-extractie (kookmethode), daarna werd een PCR uitgevoerd. Ook van deze monsters zijn isolaties gemaakt.

2.2.4.1 Resultaten

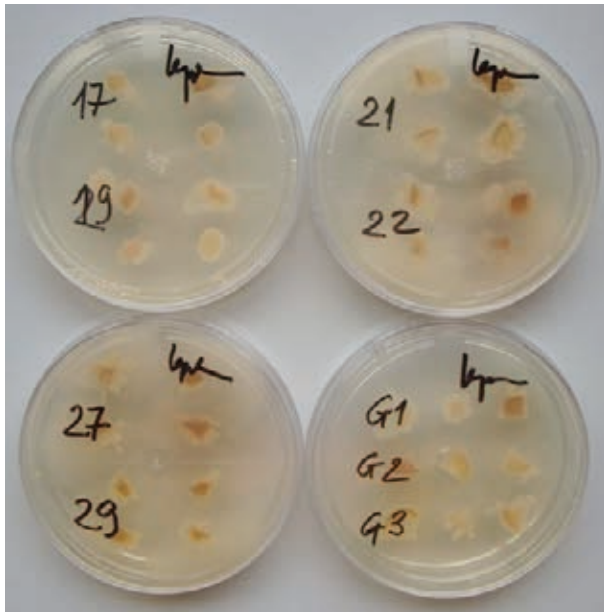


Figuur 2.4: Uitplating van mix 1-13 (besmet) en 17-29 (schoon). Indicatie meer koloniegroei bij 1-13 dan bij 17-29, analyse alle kolonies is geen reële optie, daarom zijn bacteriesuspensies, in plaats van individuele isolaten van de honderden kolonies, met PCR geanalyseerd.



Figuur 2.5: Uitplating van de grondmonsters, veel soorten bacteriën, analyse alle kolonies is geen optie (veel werk). Daarom zijn ook hier bacteriesuspensies met PCR geanalyseerd.

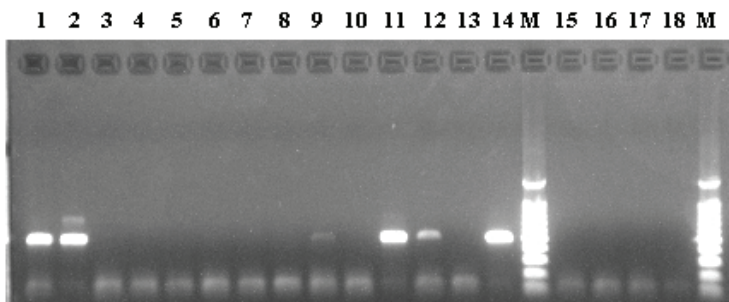
Bij uitplaten van plantmateriaal (Figuur 2.6.) groeiden ook heel veel bacteriën uit het plantmateriaal dat symptomeloos was (nr. 17, 19, 21, 22, 27, 29 en G1, 2, 3). Er was geen duidelijk onderscheid te maken tussen de kolonies die zijn ontwikkeld uit de knolletjes met symptomen (1, 2, 9, 10, 11, 13) als van de bacteriën die zich ontwikkelden uit symptomeloos materiaal. Daarom is op alle isolaten een directe PCR uitgevoerd met primerset voor de Xanthomonas groep met (primerset X1/X2). Er is gebruik gemaakt van deze primerset omdat een specifieke PCR toets voor *Stenotrophomonas* nog niet beschikbaar is.



Figuur 2.6: Uitplating van plantmateriaal

Tabel 2.1: PCR resultaten met primers X1/X2 (voor *Xanthomonas*-groep, kruis reageert met *Stenotrophomonas*-groep) op DNA van plantmateriaal

Laan nr.	Isolaat nr.	PCR	Seq. analyse	Identiteit volgens BLAST search
1	1 ('besmet')	+	Ja (19-maart)	<i>uncultured bacterium</i> , en <i>Stenotrophomonas</i> (1)
2	2	+	Ja (20-april)	<i>uncultured bacterium</i> , en <i>Stenotrophomonas</i> (2)
3	9	-		
4	10	-		
5	11	-		
6	13	-		
7	17 ('schoon')	-		
8	19	-		
9	21	?		
10	22	-		
11	27	+	Ja (20-april)	<i>Uncultured bacterium</i> , en <i>Xanthomonas campestris pv.</i> (3)
12	29	+	Ja (20-april)	<i>uncultured bacterium</i> (4)
13	Neg Contr	-		
14	Pos Contr (Xant.)	+		
15	Grond 2 ('besmet')	-		
16	Grond 10	-		
17	Grond 13	-		
18	Grond BG	-		
19	Gezond	-		
20	Ziek	-		



Figuur 2.7: Resultaten behorend bij Tabel 2.1.

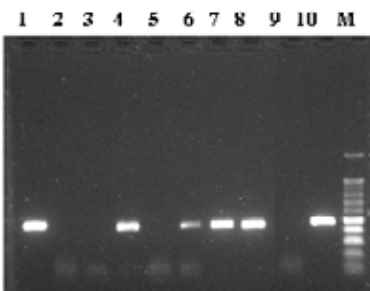
2.2.4.2 Conclusie; monsters direct uit het plantmateriaal

1. *Stenotrophomonas* te detecteren (via sequentie analyse) in monsters 1 en 2 (zonder radijsknollen door de grond gemengd, besmette grond); maar ook te vinden in 27 en 29. (radijsknollen in steriele grond en met gammastralen behandeld).

2. Geen fragment te pakken door PCR met X1/X2 primers op grondmonsters, dus *Stenotrophomonas* niet direct te detecteren in grondmonsters (Dit is hoogstwaarschijnlijk te wijten aan monsternamen, subbemonstering en extractie). Het heeft de voorkeur om grondmonsters uit te platen en bacteriesuspensie te analyseren. Bacteriën zijn ook moeilijk direct te analyseren in submonsters die zijn genomen direct uit de radijs.

Tabel 2.2: PCR resultaten met primers X1/X2 op bacterie suspensie

Laan nr.	Suspensie uit monster	PCR
1	2	++
2	9	-
3	11	-
4	13	++
5	19	-
6	21	+
7	27	++
8	29	++
9	Neg Contr	-
10	Pos Contr	+



Figuur 2.8: Resultaten behorend bij Tabel 2.2

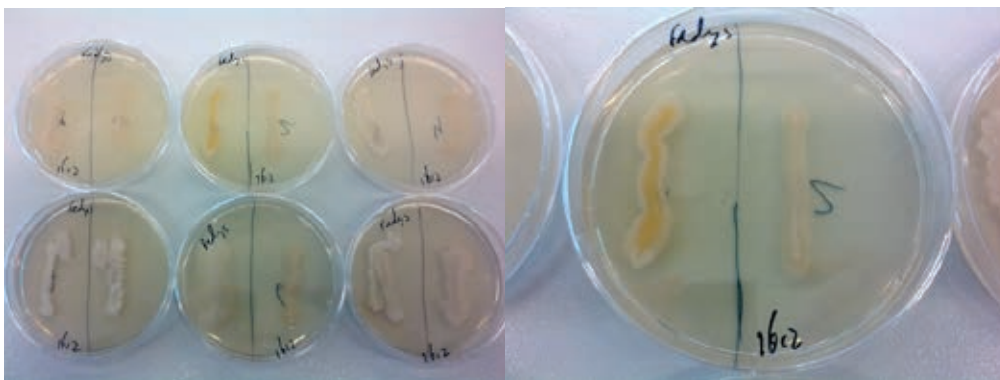
2.2.5 Radijs met symptomen uit Italië december 2011

2.2.5.1 Monsters

Radijsknollen 's ochtends geoogst in Italië, zijn dezelfde middag behandeld en er zijn monsters uitgeplaat. Duidelijke symptomen zijn zichtbaar in de doorgesneden knolletjes. Zowel de knolletjes van de witte als rode cultivar zijn aangetast. Ook bovengronds zijn symptomen zichtbaar, delen van het blad zijn vergeeld en de planten verwelken. In de knolletjes zijn de symptomen soms overduidelijk. In andere gevallen zijn de vaten minder prominent aanwezig en treedt slechts verkleuring (bruin) op van de nerven in de knol. Opmerkelijk is dat de symptomen meer in de bovenste helft van de knol aanwezig zijn en in sommige gevallen in de hoofdnerf. Mogelijk is de plaats waar de bacterie in de gelegenheid is de knollen te infecteren, boven of onder het knolletje, gerelateerd aan de plaats waar de symptomen zich manifesteren.



Figuur 2.9-2.12: Symptomen van zwarte vaten in de uit Italië afkomstige knollen. Duidelijk is dat de knollen niet altijd even zwaar geïnfecteerd zijn, sommige knollen vertonen veel zwartere vaten dan andere. Bovengronds slaat de ziekte in de praktijk met duidelijk vergeling en verwelking heftig toe.



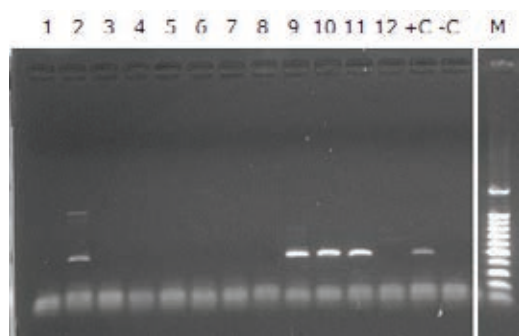
Figuur 2.13-2.14: Bacterie isolaten gemaakt uit geïnfecteerde knolletjes.

2.2.5.2 Resultaten

Enkele dagen na het uitplaten van het originele materiaal zijn de isolaten gemaakt (16-12-2011) uit de bacteriekolonies die groeiden uit het geïnfecteerde materiaal. Uiteindelijk zijn een 12-tal isolaten gemaakt die zijn vergeleken met de isolaten die eind 2009 zijn verkregen en tijdens biotoetsen zijn gebruikt.

Tabel 2.3: PCR resultaten met primers X1/X2 (voor *Xanthomonas*-groep, geeft 'kruisreactie' met *Stenotrophomonas*-groep).

Bacterie isolaat nummer	Resultaat met primers X1/X2 (zie Figuur 2.15.)
1 Wit	Neg
2 Wit	Pos (zwak)
3 Wit	Neg
4 Wit	Neg
5 Wit	Neg
6 Wit	Neg
7 Rood	Neg
8 Rood	Neg
9 Rood	Pos
10 Rood	Pos
11 Rood	Pos
12 Rood	Neg



Figuur 2.15: Resultaten elektroforese van geogst DNA uit de isolaten met primers voor *Xanthomonas* groep.

Positieve resultaten zijn gevonden bij nr. 2 (zwak), 9,10 en 11 (rode rondjes). Drie van deze positieve kolonies zijn geïsoleerd uit de rode radijs (9,10,11) en het zwakke signaal is van het isolaat afkomstig uit de witte radijs (2); daar is ook een tweede bandje waarneembaar (gele rondje). Gezien de symptomen en eerdere ervaringen met de bacteriën is de verwachting dat het bij de positieve monsters om *Stenotrophomonas* gaat. Echter op basis van deze DNA analyse met de gebruikte primerset kunnen we dit niet met 100% zekerheid concluderen. De primers die zijn gebruikt reageren ook met *Xanthomonas* (kruisreactie). De primers zijn met andere woorden niet specifiek genoeg om *Xanthomonas* van *Stenotrophomonas* te kunnen onderscheiden. Daarom is het DNA dat is verkregen uit de geïsoleerde bacteriën "gesequenced" (DNA analyse).

2.2.5.3 Resultaten sequencing

Van het DNA dat is geogst uit de 4 verdachte bacterie isolaten is een deel van het DNA (16S, dit is ribosomaal DNA en in de tijd genetisch stabiel materiaal) vermeerderd. Dit DNA is vervolgens gesequenced (Dit is het ontrafelen van de DNA code van het stuk. De code van het DNA is uitgeschreven in ATCG). Deze gegevens zijn vergeleken in een BLAST-search met de bekende sequenties (BLAST is een databank waar allerlei sequenties in worden gezet die mensen ooit hebben gevonden). Op basis hiervan kan worden gezegd dat 100% van de resultaten homoloog zijn met het genus *Stenotrophomonas*.

De bepaling van de soortnaam is minder zeker, het merendeel van de van de homologie (overeenkomsten) zit bij *S. maltophilia*, maar er zijn naar alle waarschijnlijkheid nog veel meer soorten die we nog niet kennen of onvoldoende zijn gesequenced om daar een zekere uitspraak over te doen. Het is dus zeker dat het om *Stenotrophomonas spp.* gaat, de soort kunnen we niet met 100% zekerheid benoemen.

Aan de hand van deze sequentie analyse kan geen uitspraak worden gedaan over de pathogeniteit van de bacterie. De pathogeniteit hebben we natuurlijk gezien aan de hand van het symptomatisch materiaal waaruit de bacteriën zijn geïsoleerd en deze symptomen kunnen we relateren aan de isolaten die we hebben gemaakt.

2.2.5.4 Conclusie

Er is een monster aangeleverd vanuit Italië van witte en rode radijs. Uit het aangeleverde symptomatische materiaal zijn verschillende bacteriën geïsoleerd. Alle isolaten zijn gescreend en 4 isolaten vertoonden een kruisreactie met primers voor de *Xanthomonas*-groep en zijn verdacht gebleken.

Om vervolgens de 4 isolaten te kunnen classificeren en te onderscheiden van *Xanthomonas spp.*, is van de 4 bacterie-isolaten de code van een deel van het ribosomaal DNA ontrafeld (gesequenced). Aan de hand van een homologie analyse kunnen alle 4 isolaten worden benoemd als *Stenotrophomonas spp.*

Op basis van de analyse kan worden geconcludeerd dat de bacteriën geïsoleerd uit het symptomatisch materiaal behoren tot het genus *Stenotrophomonas*. Deze bacterie kan verantwoordelijk worden gehouden voor de symptomen in het gewas.

2.3 Postulaten van Koch; Biotoets met geïdentificeerde isolaten

Om vast te stellen of de geïsoleerde en geïdentificeerde bacterie isolaten ook verantwoordelijk zijn voor de waargenomen symptomen, is het noodzakelijk om de isolaten (in dit geval O2, O11, O12 en O13) te gebruiken om de radijs te infecteren en de symptomen op te wekken. Het zogenaamd terugtoetsen van een isolaat om de pathogeniteit vast te stellen wordt het toetsen van de 'postulaten van Koch' genoemd. Met het uitvoeren van de postulaten van Koch is het bewijs geleverd voor de pathogeniteit van de geïsoleerde bacteriën. In dit geval is dat de geïdentificeerde *Stenotrophomonas*.

2.3.1 Experiment: biotoets in incubator

Er zijn vier isolaten gebruikt om de planten mee te inoculeren. Deze isolaten zijn in alle voorgaande toetsen gebruikt en positief getest. De isolaten zijn genaamd O2, O11, O12 en O13 en zijn opgeschaald naar een grotere kweek om voldoende bacteriën te inoculeren. Als inoculum is een suspensie gemaakt van de gekweekte bacteriën met een minimale hoeveelheid van $1 \cdot 10^6$ bacteriën (cfu's) per ml suspensie. Daarmee is geïnoculeerd tijdens het zaaien en na het kiemen van de zaden (2 maal). Omdat in dit geval de biotoets werd uitgevoerd in maart en de teeltsituatie van de wintermaanden nodig zijn voor de symptomen is gekozen voor een incubator om het experiment in uit te voeren. De incubator is ingesteld op een vaste temperatuur (7 °C) en voorzien van extra licht en hoge RV (90%).



Figuur 2.16. en 2.17: Opstelling van de kokers in de incubator.

2.3.1.1 Materiaal en Methode:

- Incubator
 1. Temperatuur 7 °C
 2. Belichting 8 uur, 16 uur donker, 4 maal 18 watt TL verlichting
 3. RV 90%
- Grijs containers (20 cm hoog x 7 cm breed).
- Radijsras: Lennox, Nunhem's Seeds.
- Grond: afkomstig van eerste biotoets, veldvochtig inzetten (60% vocht).
- Reincultuur wordt voor het zaaien toegediend door 1 ml suspensie per plantje toe te dienen. Na het kiemen van het zaadje wordt ook nog eens eenzelfde hoeveelheid bacteriesuspensie per kiempje toegevoegd. Controles worden met een fysiologische zoutoplossing behandeld.
- Per koker worden 8 zaden gezaaid, direct na kieming worden twee of meer kiempjes verwijderd om op een totaal van 6 radijsplantjes per pot uit te komen.
- Aantal herhalingen: 2
- Opweek reinculturen: nutrient yeast agar bij 22 °C.
- 20 kokers worden gesteriliseerd, aan onderzijde gesloten met doek
- Kokers zijn op een schaalte geplaatst

2.3.1.1.1 Periode:

- week 12-20

2.3.1.1.2 Grond en kokers bestraald met gammabestraling (25 kGray):

- 20 potten (kokers)
- 2 liter **gamma** bestraalde grond (uit mix van nrs. 16-30)
- 2 liter grond 'C'
- Minimaal 10 liter grond van 'G'

2.3.1.1.3 Behandelingen:

Onderstaande behandelingen en controles zijn uitgevoerd en herhaald.

1-1 positieve controle: besmette grond 'C'
2-1 positieve controle: besmette grond uit eerste proef
3-1 controle: grond 'G'
4-1 negatieve controle: gamma bestraalde grond
5-1 negatieve controle: gamma bestraalde grond van 'C'
6-1 negatieve controle: gamma bestraalde grond van 'G'
7-1 Isolaat O2 door gestoomde grond mengen van 'G'
8-1 Isolaat O13 door gestoomde grond mengen van 'G'
9-1 Isolaat O11 door gestoomde grond mengen van 'G'
10-1 Isolaat O12 door gestoomde grond mengen van 'G'

2.3.1.1.4 Watergift:

- Kokers bij start van de proef wegen
- Wekelijks vochtverlies aanvullen op startgewicht
- Vocht aanvullen met voedingsoplossing van komkommer. EC moet zo tussen de 1.0 à 1.5 liggen.

2.3.1.1.5 Inoculatie

Gedurende het incubator experiment zijn op 2 momenten inoculaties uitgevoerd. In de tabel zijn dichtheden bacteriën per isolaat en per inoculatie moment weergegeven in cfu/ml.

isolaat	9-4-2010	16-4-2010
O2	8.45E+08	1.88E+10
O11	2.7E+08	1.25E+10
O12	1.46E+08	2.49E+10
O13	7.1E+08	2.53E+10

2.3.1.1.6 Metingen:

- Na 8 weken plantjes oogsten en beoordelen op zwarte vaten
- Biomassa blad en knollen bepalen
- Diameter knollen meten
- Beoordeling extra wortelkwaliteit, knolvorm (index 0-10, 0- slecht, 10 - goed)

2.3.1.1.7 Statistiek:

- One-way Anova, Tukey ($P < 0.05$). Elk plantje wordt als aparte herhaling beschouwd.
- Rouleer kokers wekelijks voor randomizing factor lichtbron.

2.3.1.2 Resultaten

De plantjes zijn bij dit experiment niet tot volle wasdom gekomen. De biotoets in de incubator heeft niet tot een goed experiment geleid; de groei was zeer langzaam en er werden nauwelijks knollen gevormd. Als verklaring voor de matige ontwikkeling van de radijs is de minimale hoeveelheid licht en de voortdurende ventilatie (luchtstroom) in de kast op te voeren. Er is besloten tot een herhaling van het experiment in een klimaatkast. Er zijn geen conclusies te trekken aan de hand van dit experiment.

2.3.2 Experiment: biotoets in klimaatkast

Het experiment gestart in week 12 (16-4-2010) is mislukt: De radijsjes hebben geen knol gevormd en er is geen overtuigende verkleuring van de vaatbundels waargenomen. Om toch de winterperiode na te kunnen bootsen, maar wel meer kans op knolvorming te hebben is het experiment uitgevoerd in een klimaatkast met een betere klimaatbeheersing en voldoende licht om de groei te faciliteren.



Figuur 2.18. en 2.19: Opstelling van de kokers in de klimaatkast.

2.3.2.1 Materiaal en Methode:

2.3.2.1.1 Periode:

- week 30-38

2.3.2.1.2 Materiaal en Methode:

- Snijder klimaatkast
 1. Nachttemperatuur 6 °C, dagtemperatuur 9 °C.
 2. Belichting 8 uur, 16 uur donker, 8 maal Sylvania Britegro f36WT8/2084, 36 W, 1700 lumen.
 3. Nacht RV 90% - dag RV 85%
 4. Indien mogelijk ventilatie op lage stand om verdamping te beperken.
- Grijs containers (20 cm hoog x 7 cm breed).
- Radijsras: Lennox, Nunhem's Seeds.
- Grond: afkomstig van eerste biotoets, veldvochtig inzetten (60% vocht).
- Reincultuur wordt voor het zaaien toegediend door de potten veld vochtig te maken met bacterie suspensie. Na het kiemen van het zaadje wordt ook nog eens 1 ml bacteriesuspensie per kiempje toegevoegd. Controles worden met een fysiologische zoutoplossing behandeld.

- Per koker worden 8 zaden gezaaid, direct na kieming worden twee of meer kiempjes verwijderd om op een totaal van 6 radijsplantjes per pot te komen.
- Aantal herhalingen 2
- Opkweek reïnculturen: nutrient yeast agar bij 22 °C.
- 20 kokers worden gesteriliseerd, aan een zijde gesloten met doek
- Plaats de kokers op een schaalpje

2.3.2.1.3 Grond en kokers bestraald met gammabestraling (25 kGray):

- 20 potten (kokers)
- 2 liter **gamma** bestraalde grond
- 2 liter grond 'C'
- Minimaal 10 liter grond van 'G'

2.3.2.1.4 Behandelingen:

Onderstaande behandelingen en controles zijn uitgevoerd en herhaald.

1-1 positieve controle: besmette grond 'C'
2-1 positieve controle: besmette grond uit eerste proef
3-1 controle: grond 'G'
4-1 negatieve controle: gamma bestraalde grond
5-1 negatieve controle: gamma bestraalde grond van 'C'
6-1 negatieve controle: gamma bestraalde grond van 'G'
7-1 Isolaat O2 door gestoomde grond mengen van 'G'
8-1 Isolaat O13 door gestoomde grond mengen van 'G'
9-1 Isolaat O11 door gestoomde grond mengen van 'G'
10-1 Isolaat O12 door gestoomde grond mengen van 'G'

2.3.2.1.5 Watergift:

- Kokers bij start van de proef wegen
- Wekelijks vochtverlies aanvullen op startgewicht
- Vocht aanvullen met voedingsoplossing van komkommer. EC moet zo tussen de 1.0 à 1.5 liggen.

2.3.2.1.6 Inoculatie

Op 20.08.2010 is 10 ml bacteriële suspensie toegevoegd aan 500g grond (voor kokers 7.1, 7.2, 8.1, 8.2, 9.1, 9.2, 10.1, 10.2). Na inoculatie is de grond in de kokers gestort. Aantallen bacteriën in suspensie (cfu/ml):

Stam O2: 3.36x10¹⁰

Stam O11: 1.27x10¹⁰

Stam O12: 1.90x10¹⁰

Stam O13: 3.92x10¹⁰

Op 24.08.2010 is radijs (Lennox) gezaaid. Daarna is 5 ml bacteriële suspensie boven op de grond in de koker toegediend. De aantallen bacteriën in suspensie waren als volgt (cfu/ml):

Stam O2: 4.58x10¹⁰

Stam O11: 1.91x10¹⁰

Stam 012: 3.5x10⁹
Stam 013: 4.66x10⁹

2.3.2.1.7 Metingen:

- Na 8 weken plantjes oogsten en beoordelen op zwarte vaten
- Biomassa blad en knollen bepalen
- Diameter knollen meten
- Beoordeling extra wortelkwaliteit, knolvorm (index 0-10, 0- slecht, 10 - goed)

2.3.2.1.8 Statistiek:

- One-way Anova, Tukey ($P < 0.05$). Elk plantje beschouw je als aparte herhaling.
- Rouleer kokers wekelijks voor randomizing factor lichtbron.

2.3.2.2 Resultaten



Figuur 2.20: Lichte symptomen in een enkel knolletje dat is geïnoculeerd met een bacteriesuspensie van O2.

Figuur 2.21: Uiterlijke symptomen. Een knolletje heeft een sterk vertakt wortelgestel.

Uitsluitend in de steriele grond met daaraan toegevoegd isolaat O2 zijn symptomen waargenomen. De symptomen waren niet heel sterk aanwezig in vergelijking tot eerder waargenomen symptomen in de uitgevoerde biotoets. De vaten waren verkleurd en licht aangetast. De knollen gevormd in de geïnfecteerde grond uit de praktijk (positieve controle G) zijn wel meer aangetast, maar ook niet zo sterk als in het eerder uitgevoerde experiment. In de tweede partij met geïnfecteerde grond (positieve controle C) zijn geen symptomen waargenomen.

2.3.2.3 Conclusie

Tijdens dit experiment is de teelt voldoende goed verlopen. De planten hebben goed staan groeien en er zijn knollen gevormd in de kokers. De postulaten van Koch zijn voltooid doordat er in de kokers waaraan isolaat O2 is toegevoegd, symptomen zijn waar te nemen. Echter er zijn slechts enkele knollen met duidelijke symptomen, die op hun beurt niet zo duidelijk zijn als de symptomen die in de praktijk worden waargenomen. Aangetaste knollen vertonen wel allemaal overtuigende overmatige wortelgroei en asymmetrische of ellipsvormige knolletjes.

Daarnaast zijn in een van de twee positieve controles geen symptomen waargenomen. Isolaten gemaakt uit de aangetaste knolletjes zijn weer teruggetoetst en de bacterie geïsoleerd uit de verkleurde vaten is gediagnosticeerd met behulp van moleculaire technieken als *Stenotrophomonas spp.*

Op basis van deze resultaten zijn de volgende conclusies te trekken:

- Plant pathogeen *Stenotrophomonas spp.* is overdraagbaar en is in staat een gezond gewas te infecteren (postulaten van Koch).
- Alleen isolaat O2 is onder de gegeven condities in staat om radijs te infecteren.
- Her-isolaat O2 is gediagnosticeerd als *Stenotrophomonas spp.*
- Geïnfecteerde grond blijft langer dan een jaar infectieus bij 10 °C (koelcel, donker) zonder de aanwezigheid van een waardplant.

2.3.3 Opzet experiment: biotoets onder kascondities

2.3.3.1 Doel

Bevestigen van eerdere resultaten in de klimaatkast (§ 2.3.2). Dit experiment wordt uitgevoerd om experiment in de klimaatkast (§ 2.3.2) te herhalen, met als doel vast te stellen of reïnculturen van *Stenotrophomonas* in staat zijn om zwarte vaten in radijs te veroorzaken.



Figuur 2.22. en 2.23: Inoculatie van de bacteriesuspensies aan de gekiemde radijs.

2.3.3.2 Materiaal en Methode:

2.3.3.2.1 Periode

- week 44-52

2.3.3.2.2 Materiaal en Methode:

- Kas van 144 m²
 1. Gemiddelde etmaal temperatuur ca. 7,5 °C.
 2. Geen belichting
 3. RV 90%

- Grijs PVC containers (20 cm hoog x 7 cm breed). Kokers van experiment 2 worden hergebruikt.
- Radijsras: Lennox (Nunhem's Seeds).
- Kokers uit proef in klimaatkast zijn hergebruikt, net als de inhoud grond. De grond in de kokers alleen losmaken en op vochtspanning (60% vocht) brengen. Werk koker voor koker en gebruik **nieuwe** handschoenen bij elke koker.
- Voor het zaaien wordt een suspensie toegediend door de kokers veldvochtig te maken met bacterie suspensie. Na het kiemen van het zaadje wordt ook nog eens gedurende 4 weken, 1 maal per week, 1 ml bacteriesuspensie per kiempje toegevoegd. Controles worden met een fysiologische zoutoplossing behandeld.
- Per koker worden 8 zaden gezaaid, direct na kieming worden twee of meer kiempjes verwijderd om op een totaal van 6 radijsplantjes per pot te komen.
- Aantal herhalingen: 2
- Opkweek reïnculturen: nutrient yeast agar bij 22 °C.
- Cfu van isolaten worden bepaald per gram grond
- Kokers worden geplaatst in een **NIEUW** schaalpje

2.3.3.2.3 Behandelingen:

Onderstaande behandelingen en controles zijn uitgevoerd en herhaald.

1-1 Vervalt
2-1 positieve controle: besmette grond uit eerste proef
3-1 Vervalt
4-1 Vervalt
5-1 Vervalt
6-1 negatieve controle: gamma bestraalde grond van 'G'
7-1 Isolaat O2 door gestoomde grond mengen van 'G'
8-1 Isolaat O13 door gestoomde grond mengen van 'G'
9-1 Isolaat O11 door gestoomde grond mengen van 'G'
10-1 Isolaat O12 door gestoomde grond mengen van 'G'

2.3.3.2.4 Watergift:

- kokers bij start van de proef wegen
- wekelijks vochtverlies aanvullen op startgewicht
- vocht aanvullen met voedingsoplossing van komkommer. EC moet zo tussen de 1.0 à 1.5 liggen.

2.3.3.2.5 Metingen:

- Na 8 weken plantjes oogsten en beoordelen op zwarte vaten
- Biomassa blad en knollen bepalen
- Diameter knollen meten
- Beoordeling extra wortelkwaliteit, knolvorm (index 0-10, 0- slecht, 10 - goed)

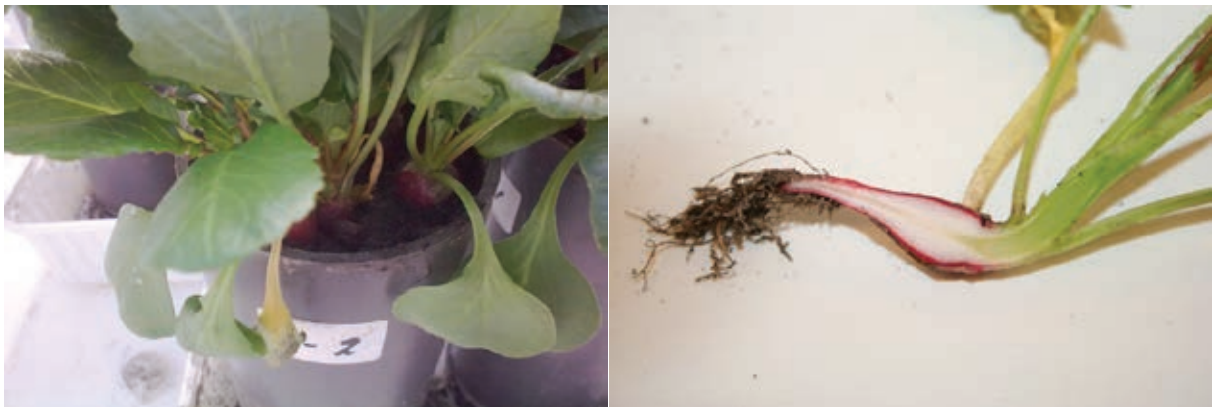
2.3.3.2.6 Inoculaties

Gedurende het kasexperiment zijn op 4 momenten inoculaties uitgevoerd. In de tabel zijn dichtheden bacteriën per isolaat en per inoculatie moment weergegeven in cfu/ml.

Isolaat	22-12-2010	29-12-2010	5-1-2011	12-1-2011
O2	3.65E+10	2.71E+08	2.83E+06	6.20E+08
O11	5.30E+10	3.12E+10	3.22E+09	1.55E+08
O12	2.20E+09	7.20E+09	1.10E+07	3.94E+07
O13	3.50E+10	4.90E+10	8.70E+09	3.68E+10

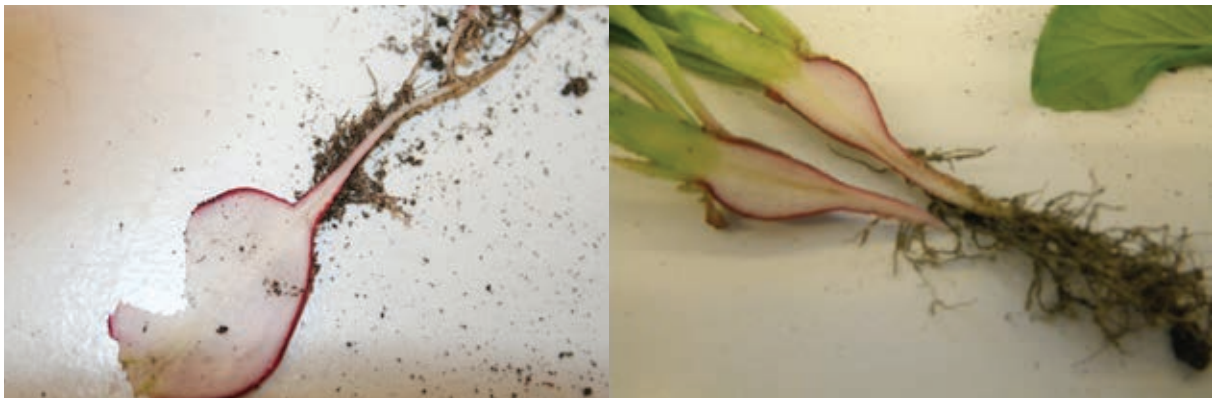
2.3.3.3 Resultaten

Naast de positieve controle grond die wederom is gebruikt in dit experiment, hebben ook de radijsjes waar de 4 isolaten aan zijn toegevoegd gereageerd. Er zijn duidelijke vaatverkleuringen te zien. Ook zijn de knolletjes misvormd en vertonen de kenmerkende bossige groei. De vaten worden echter niet gitzwart, ook niet bij de positieve controle. Symptomen tussen de positieve controle en met de isolaten van de geïnoculeerde knollen komen wel overeen.



Figuur 2.24: Verwelking en vergeling van de oudste blaadjes.

Figuur 2.25: Bossige groei van de wortels, verwelking van het blad en "zwarte vaten" na inoculatie met isolaat O11.



Figuur 2.26: Symptomen na inoculatie met O12, vooral symptomen in de wortel zichtbaar.

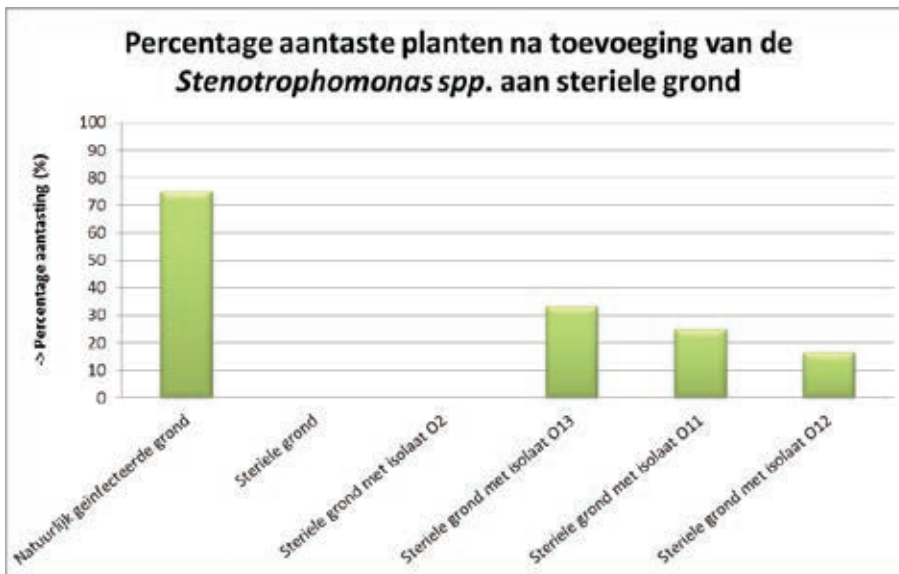
Figuur 2.27: Symptomen ook in de knol zelf zichtbaar.



Figuur 2.28: Symptomen ook uiterlijk duidelijk waarneembaar, geel blad en vooral bossige wortelgroei.

Figuur 2.29: Veel symptomen onderin de knol te zien.

In tegenstelling tot de biotoets in de klimaatkast heeft isolaat O2 gedurende dit experiment geen kans gezien om een infectie tot stand te brengen. Mogelijk zijn de omstandigheden voor de andere isolaten gunstiger geweest om zich te ontwikkelen. In dit experiment waren de symptomen in ieder geval overtuigender aanwezig zowel in de positieve controle als in de behandelingen met de verschillende isolaten. De symptomen bleven wederom sterk achter met die van de praktijk maar datzelfde gold ook voor de symptomen veroorzaakt in de van nature aangetaste grond (positieve controle), ook daar geen duidelijk zwarte vaten. Onderstaande Figuur geeft een duidelijk beeld van de infectiepercentages in de geïnoculeerde kokers ten opzichte van de natuurlijke infectie.



Figuur 2.30: Percentage aangetaste radijs na toevoegingen van 4 *Stenotrophomonas* isolaten aan steriele grond ten opzichte van natuurlijke geïnfecteerde grond.

2.3.3.4 Conclusie

Bovenstaande resultaten versterken de conclusies die zijn getrokken in §2.3.2.

- Plant pathogeen *Stenotrophomonas spp.* is overdraagbaar en is in staat een gezond gewas te infecteren (postulaten van Koch).
- Isolaat O2 is onder de gegeven condities niet in staat om radijs te infecteren, daar waar de isolaten O11, O12 en O13 dat in dit experiment wel tot stand kunnen brengen.
- Her-isolaten zijn gediagnosticeerd als *Stenotrophomonas spp.*
- Symptomen in de biotoets-opstelling blijven achter ten opzichte van de symptomen die worden waargenomen in de praktijk, dit geldt voor zowel voor een natuurlijk geïnfecteerde grond, als voor geïnoculeerde grond.
- Op basis van de resultaten van biotoets beschreven §2.3.2 en §2.3.3. zijn alle vier isolaten in staat om symptomen te veroorzaken in radijs.

3 Beschrijving van het pathogeen *Stenotrophomonas* spp.

Uit dit onderzoek blijkt dat deze ziekte in radijs wordt veroorzaakt door de grondgebonden bacterie *Stenotrophomonas* spp. Deze groep van bacteriën heeft een rol in de afbraakcyclus van voedingselementen in de grond en er worden groeibevorderende eigenschappen aan de bacterie toegedicht. Daarnaast heeft de bacterie een schimmelwerende werking. De bacterie kan ziekteverwekkend zijn (Suckstorff & Berg, 2003) en kan de bovenbeschreven symptomen veroorzaken. De bacterie die is geïsoleerd uit de zwarte vaten is met behulp van moleculaire technieken geïdentificeerd als *Stenotrophomonas rhizophila* (Wolf *et al.* 2002) en is verwant aan de in *Brassica*-achtigen bekendere ziekteverwekker, *Xanthomonas campestris* (*Xanthomonadaceae*). In 1993 is gekozen om de bacterie *Stenotrophomonas* uit het genus *Xanthomonas* te plaatsen vanwege de specifieke eigenschappen van deze bacterie (Palleroni & Bardbury, 1993). *Stenotrophomonas* is een bacterie die zich goed kan handhaven in de bodem. Gedurende langere tijd kan de bacterie in de grond zonder waardplant overleven. In het uitgevoerde onderzoek bleek besmette grond wel twee jaar infectieus (bij bewaring bij 7 °C). De bacteriën zijn in staat om auxine (indolazijnzuur, IAA) te vormen. Dit plantenhormoon heeft vele effecten op de groei, waaronder extra wortelvorming (onlosmakelijk verbonden aan de symptomen), ethyleen productie, apicale dominantie en vaatweefsel differentiatie. De bacterie is actief tussen 4 °C en 37 °C en vormt crèmekleurige kolonies op een kunstmatig voedingsmedium, is aeroob en staafvormig (licht gekromd). De bacteriën hebben een antagonistische werking op *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* en *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.1 Verspreiding

Stenotrophomonas spp. kan in grond, plantenresten en mogelijk op zaad aanwezig zijn. De bacteriën zijn het meest thuis in grond en op planten, maar kunnen ook prima onder andere omstandigheden overleven. Er zijn ook *Stenotrophomonas*-stammen die goed kunnen overleven op de mens en daar infecties veroorzaken van onder andere luchtwegen en wonden. Bij de teelt van radijs zal de primaire besmetting plaats vinden via grond en gewasresten. De bacterie kan lang overleven in de grond. Een hoge concentratie van de bacteriën lijkt nodig voor infectie en symptomen. Als gewasresten van aangetast materiaal in contact komen met een zaailing kan de infectie met de bacterie tot stand komen. Mogelijk dat er andere verzwakkende omstandigheden of ziekteverwekkers en plagen nodig zijn om tot een infectie te komen. Ook water kan een mogelijke bron van verspreiding zijn.

3.2 Schade

De schade is moeilijk in geld uit te drukken per hectare. Bij een zware aantasting verwelken de knolletjes en is het gewas of delen daarvan niet oogstbaar. Dit veroorzaakt directe schade voor de teler. Daarnaast is er ook nog sprake van indirecte schade doordat er ook knolletjes geoogst worden waarbij de symptomen zich primair in het knolletje manifesteren en nog niet aan de buitenkant tonen dat het gewas is geïnfecteerd. Deze knollen kunnen met een lichte aantasting worden geoogst en in het handelskanaal terecht komen wat schade doet aan het imago van de Nederlandse radijs. Ook worden getroffen telers genoodzaakt om extra maatregelen te nemen om de symptomen te onderdrukken. Intensief stomen en het aanleggen van stoomdrainage hebben direct effect op het bedrijfsresultaat.

3.3 Hygiënemaatregelen om verspreiding van bacteriën te voorkomen (per teeltfase)

Verwijderen oude gewas

- Verwijder al het gewas of alle gewasresten uit de kas.
- Gooi geen gewasresten terug in de kas of spit geen gewasresten onder. Rooi een aangetast gewas in het geheel en verwijder het gewas van het bedrijf. Zorg voor een afgedekte en lekdichte container en laat het zorgvuldig verwerken.

- Maak direct nadat het oude gewas is weggehaald het pad, de rest van het bedrijf en het erf schoon.
- Zorg er voor dat personeel dat in een aangetast perceel heeft gewerkt niet zonder voorzorgsmaatregelen in andere percelen aan het werk gaat.
- Zorg ervoor dat materiaal, gereedschappen en mensen van loonbedrijven schoon op het bedrijf komen en schoon weer weggaan.
- Gooi geen plantmateriaal op compost- en afvalhopen.
- Maak alles goed schoon na het verwijderen van het oude gewas. Ontsmet de oogst/bosmachine, ander materieel en machines, gereedschap, schoeisel, kleding en handen.
- Ontsmet de regenleiding.

Ontsmetten van het aangetaste perceel.

- Stoom de aangetaste percelen grondig.
- Reinig en ontsmet het pad grondig. Zonder voorafgaande reiniging is ontsmetten zinloos. Meestomen van het pad is ook een goede optie.
- Reinig en ontsmet de spit- of freesmachine en andere eventuele grondbewerkingsmaterialen.
- Reinig ook alle apparatuur in de bedrijfsruimte grondig.
- Maak de bedrijfsruimte, kantine, kleedruimte, kantoren, toiletten en douches goed schoon.
- Alle kleding en schoeisel die gebruikt is in de oude teelt moet heet worden gereinigd. Kleding wassen op minimaal 60°C. Laarzen en werkschoenen afborstelen met heet water.

Start nieuwe teelt en controle gedurende de teelt

- Ontsmet de zaaimachine voor gebruik.
- Gebruik kwaliteitszaad.
- Houd personeel en materialen zoveel mogelijk apart tussen gestoomde en ongestoomde percelen. Breng eventueel markeringen aan.
- Voorkom herinfectie als gevolg van besmet materiaal of menselijk handelen. Maak personeel attent op symptomen en gevaren van verspreiding.

Algemeen

- Plaats geen hobbyplanten in de teeltruimte.
- Verwijder onkruid in en om de kas.
- Bestrijd ongedierte als muizen en woelratten etc.
- Zorg ervoor dat vuile en schone stromen elkaar niet kruisen.
- Voer spoelwater direct af in het riool of hergebruik het niet zonder ontsmetting.
- Gebruik verpakkingsmateriaal of fust niet opnieuw.
- Houd toegangsdeuren dicht en op slot.
- Laat geen huisdieren toe op het bedrijf.
- Was de handen bij aankomst en vertrek van het bedrijf. Was handen ook altijd als werkzaamheden zich verplaatsen van het ene naar het andere perceel.
- Sieraden en mobiele telefoons horen niet thuis in de teeltruimte.

4 Conclusies en aanbevelingen

Op basis van uitgevoerde onderzoeken kunnen enkele conclusies worden getrokken:

1. De bacterie verantwoordelijk voor de symptomen van zwarte vaten in radijs behoort tot het genus *Stenotrophomonas*. Fylogenetische analyse (of stamboom analyse) leidt tot *S. rhizophila*, meer dan tot de soort *S. maltophila*. Echter op basis van een sequentie analyse kan geen 100% oordeel worden geveld.
2. De symptomen als gevolg van de bacterie aantasting zijn overdraagbaar via grond.
3. De bacterie is zeer lang in grond zonder waardplanten en onder gekoelde condities (10 °C) te bewaren.
4. De aantasting door de bacterie is afhankelijk van teeltomstandigheden. De omgevingsfactoren bepalen in welke mate en of de bacterie tot uiting komt in de vorm van symptomen in de knol.
5. Bacteriën geïsoleerd van de diverse praktijkbedrijven komen (moleculair) overeen. Ook het isolaat uit Italië heeft gelijkens met de eerder gevonden Nederlandse isolaten.
6. Verspreiding van de bacterie en kunstmatige infectie is moeilijk te realiseren. Het lijkt of de verspreiding van de bacterie in de praktijk door deze eigenschap wordt belemmerd. Gronddeeltjes kunnen wel een bron van besmetting zijn.

5 Literatuur

Foster N.F., 2008.

Cross-Reaction of *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* Species in a 23S rRNA Gene-Directed PCR for Detection of *S. maltophilia*. J Clin Microbiol. December; 46(12): 4111-4113.

Janse, J., Paternotte, S. J., & Voogt, W., 2009.

Zwarte vaatbundels in radijs: Een consultancy-onderzoek

Jeng R.S., Svircev A.M., Myers A.L., Beliaeva L., Hunter D.M., Hubbes M., 2001.

The use of 16S and 16S-23S rDNA to

easily detect and differentiate common Gram-negative orchard epiphytes. J Microbiol Methods. Feb 1;44(1):69-77.

Lee Y.A., Sung A.N., Liu T.F, and Lee Y.S., 2009.

Combination of Chromogenic Differential Medium and estA-Specific PCR

for Isolation and Detection of Phytopathogenic *Xanthomonas* spp. Applied and Environmental Microbiology, November, p. 6831-6838,

Vol. 75, No. 21.

Maes, M., 1993,

Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. FEMS Microbiology Letters,

Volume 113, Issue 2, Pages161 - 165.

Palleroni N.J., Bradbury J.F., 1993.

Stenotrophomonas, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980)

Suckstorff, I., & Berg, G. (2003).

Evidence for dose dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. Journal of applied microbiology, 95(4), 656-663.

Swings, J., De Vos, P., den Mooter, M. V., & De Ley, J., 1983.

Transfer of *Pseudomonas maltophilia* (Hugh 1981)

to the

Genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981)

comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 33(2), 409-413.

Whitby P.W., Carter K.B., Burns J.L., Royall J.A., LiPuma J.J., Stull T.L., 2000.

Identification and detection of

Stenotrophomonas maltophilia by rRNA-directed PCR. J Clin Microbiol. Dec;38(12):4305-9.

Widmer F., Seidler R.J., Gillevet, P.M., Watrud L.S., and Giovanni, G.D. di, 1998.

A Highly Selective PCR

Protocol for Detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in Environmental Samples. Appl

Environ Microbiol, p. 2545-2553,

Vol. 64, No. 7.

Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., & Berg, G. (2002).

Stenotrophomonas rhizophila sp. nov., a novel plant

associated bacterium with antifungal properties. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 52(6), 1937-1944.

Wolf, van der J. M., & Van Der Zouwen, P. S. 2010.

Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by

Xanthomonas campestris pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. Journal of Phytopathology, 158(11-12), 726-732.

Bijlage I Resultaten Blast search

Note:

als (2)

- . Bacteria [bacteria]
- . environmental samples [bacteria]
- . . uncultured bacterium — 690 16 hits [bacteria] Uncultured bacterium clone CE2_d09 16S ribosomal RNA gene,
- . . uncultured soil bacterium ... 677 4 hits [bacteria] Uncultured soil bacterium clone B5_8 16S ribosomal RNA gene
- . **Stenotrophomonas humi** — 690 1 hit [g-proteobacteria] Stenotrophomonas humi partial 16S rRNA gene, type strain R-
- . Stenotrophomonas sp. 31 673 1 hit [g-proteobacteria] Stenotrophomonas sp. 31 16S ribosomal RNA gene, partial seq
- . Stenotrophomonas sp. 15 673 1 hit [g-proteobacteria] Stenotrophomonas sp. 15 16S ribosomal RNA gene, partial seq
- . Stenotrophomonas sp. SMSM 672 1 hit [g-proteobacteria] Stenotrophomonas sp. SMSM 16S ribosomal RNA gene, partial s
- . Stenotrophomonas maltophilia ... 668 4 hits [g-proteobacteria] Stenotrophomonas maltophilia, 16S rRNA gene, strain LMG 108
- . Stenotrophomonas sp. 668 2 hits [g-proteobacteria] Stenotrophomonas sp. 16S rRNA gene, isolate R3
- . Stenotrophomonas sp. SY1 666 1 hit [g-proteobacteria] Stenotrophomonas sp. SY1 16S ribosomal RNA gene, partial se
- . Stenotrophomonas nitritireducens . 666 1 hit [g-proteobacteria] Stenotrophomonas nitritireducens strain VTT E-022107 16S ri

(3)

- Bacteria [bacteria]
- . environmental samples [bacteria]
- . . unidentified bacterium — 751 2 hits [bacteria] Unidentified bacterium clone MEB114 16S ribosomal RNA gene,
- . . uncultured bacterium744 22 hits [bacteria] Uncultured bacterium clone CF91 16S ribosomal RNA gene, par
- . **Xanthomonas campestris** pv. campestris 747 25 hits [g-proteobacteria] Xanthomonas campestris pv. campestris strain Race5 16S
- . Xanthomonas campestris pv. barbareae 747 1 hit [g-proteobacteria] Xanthomonas campestris pv. barbareae strain
- . Xanthomonas campestris pv. abberans 747 1 hit [g-proteobacteria] Xanthomonas campestris pv. abberans strain
- . Xanthomonas arboricola pv. poinsettiiicola 744 3 hits [g-proteobacteria] Xanthomonas arboricola pv. poinsettiiicola strain L
- . Xanthomonas theicola744 2 hits [g-proteobacteria] Xanthomonas theicola strain TC1 16S ribosomal RNA, partial
- . Xanthomonas euvesicatoria744 1 hit [g-proteobacteria] Xanthomonas euvesicatoria strain NEP XCV09 16S ribosomal
- . Xanthomonas campestris744 5 hits [g-proteobacteria] Xanthomonas campestris strain TA 16S ribosomal RNA
- . Xanthomonas campestris pv. campestris str 744 2 hits [g-proteobacteria] Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913

(4)

Bacteria [bacteria]

- . environmental samples [bacteria]

. . **uncultured bacterium** ——— 282 71 hits [bacteria] Uncultured bacterium clone SedUMB28 16S ribosomal RNA
. . potato plant root bacterium RC-III-94 .277 1 hit [bacteria] Potato plant root bacterium clone RC-III-94, 16S rRNA gene
. bacterium UASWS0061 ———282 1 hit [bacteria] Bacterium UASWS0061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
. Enterobacter sp. I-Bh15-16 277 1 hit [enterobacteria] Enterobacter sp. I-Bh15-16 partial 16S rRNA gene, isolate I
. Enterobacter sp. 9(2009) 277 1 hit [enterobacteria] Enterobacter sp. 9(2009) 16S ribosomal RNA gene, partial
se

