

Detectie van *Agrobacterium tumefaciens* in grond

Ellis Meekes¹, Roland Butôt¹, Shakti Lieten², Inez Dinkla²

¹ Naktuinbouw, Postbus 40, 2370 AA Roelofarendsveen

² Bioclear, Postbus 2262, 9704 CG, Groningen

Wortelknobbelsbacterie

Agrobacterium tumefaciens, ook wel wortelknobbel genoemd, is de veroorzaker van knobbels in wortels en stengels bij een brede reeks van gewassen. Wortelknobbel kan aanzienlijke verliezen veroorzaken in uitgangsmateriaal van roos (Figuur 1) en fruitbomen. Een infectie met *A. tumefaciens* kan optreden tijdens enting, watergift of wanneer gezond materiaal geplant wordt in gronden waar *A. tumefaciens* al in aanwezig is. Het risico op infectie neemt toe als de plant beschadigingen heeft. Onder Nederlandse omstandigheden groeien de wortelknobbels traag en is de schade meestal beperkt, maar onder warmere omstan-



Figuur 1: Stengelknobbels in roos veroorzaakt door *A. tumefaciens*.

digheden kunnen de wortelknobbels snel uitgroeien. Dit kan vooral bij export naar landen met een nultolerantie grote economische schade tot gevolg hebben. Aantasting met deze bacterie kan niet worden bestreden. Verwijdering van de knobbels is geen garantie dat het materiaal vrij is van *A. tumefaciens*: er kunnen in een later stadium alsnog knobbels ontstaan.

Agrobacterium komt in de natuur vrij algemeen voor, maar niet elke *Agrobacterium* veroorzaakt een wortelknobbel. Voor knobbelvorming moet *Agrobacterium* een tumor-inducerend (Ti) plasmide bij zich hebben waarvan een deel na infectie wordt ingebouwd in het planten-DNA. Dit zal de plant aanzetten tot knobbelvorming. Isolaten zonder dit Ti-plasmide zullen geen symptomen veroorzaken. De nomenclatuur rond *Agrobacterium* is dusdanig ingewikkeld dat het lastig is om tot een eenduidige naamgeving te komen (zie voor meer informatie Willems, 2006 en Young *et al.*, 2005).

Detectie van *A. tumefaciens*

Tot voor kort was het niet mogelijk om de wortelknobbelbacterie in grondmonsters aan te tonen. Hierdoor kwam besmetting pas aan het licht als het gewas al symptomen vertoonde. In de fruitboom- en rozensector was er behoefte aan een toets waarmee *A. tumefaciens* voorafgaand aan de teelt gedetecteerd kon worden, zowel in grond als plantmateriaal. De afgelopen jaren is daarom in nauw overleg met de sector een toets ontwikkeld om de aanwezigheid van de ziekteverwekkende bacterie *A. tumefaciens* in grond aan te tonen. Deze toets is met financiering van Productschap Tuinbouw ontwikkeld door Bioclear en Naktuinbouw (Lieten *et al.*, 2008).

Om inzicht te krijgen in de wortelknobbelproblematiek is gedurende de eerste fase van het project een moleculaire toets opgezet. Het unieke aan deze nieuw ontwikkelde toets is dat hiermee *Agrobacterium* in grond kan worden aangetoond. Daarnaast kan met dezelfde methode *A. tume-*

ARTIKEL

faciens zowel in planten als in water worden aangetoond. De primers voor een *nested*-PCR zijn gebaseerd op het *iaaM*-gen van het Ti-plasmide; de moleculaire toets toont daardoor specifiek de ziekteverwekkende bacteriën aan en sluit de aanwezige niet-pathogene *Agrobacteria* uit. Aanvankelijk was de methode gebaseerd op een directe extractie van DNA uit 0,5 gram grond, maar bij analyse van grondmonsters uit de praktijk bleek dat deze methode, met een detectieniveau van 200 cellen/g grond, niet gevoelig genoeg was. Om de gevoeligheid van de toets verder te verhogen is een vermeerderingsstap op semi-selectief medium geïmplementeerd. Het detectieniveau werd daarmee verhoogd naar ca. 10-30 *iaaM* genen/g grond. In de onderzoeksfase is een kwantitatieve PCR analyse ontwikkeld (Q-PCR). Deze is in het onderzoeksproject gebruikt voor kwantificering van de hoeveelheid aanwezige genen, maar de Q-PCR heeft echter een hogere detectiegrens dan de *nested* PCR. Om deze reden wordt voornamelijk voor de praktijk toetsing de *nested* PCR gebruikt.

Er is nader onderzocht of er een verschil is tussen grond besmet met een laboratoriumstam van *A. tumefaciens* en een natuurlijk besmette grond wat betreft het aantal *iaaM*-genen per *A. tumefaciens* cel. Om dit te bepalen is met behulp van *real-time* PCR het totaal aantal bacteriecellen, *A. tumefaciens*-cellen en *iaaM*-genen per gram grond in de tijd vergeleken voor beide gronden. In de natuurlijk besmette grond bleek dat gemiddeld 10-100 *A. tumefaciens* cellen 1 *iaaM*-gen bevatten. Bij aanvang bevatte kunstmatig besmette grond 10 *iaaM*-genen per *A. tumefaciens* cel. In tijd nam echter het aantal *iaaM*-genen per *A. tumefaciens*-cel in kunstmatig besmette grond af, naar een niveau dat overeenkwam met de natuurlijk besmette grond (Figuur 2). Dit duidt mogelijk op een ander overlevingspatroon van een laborator-

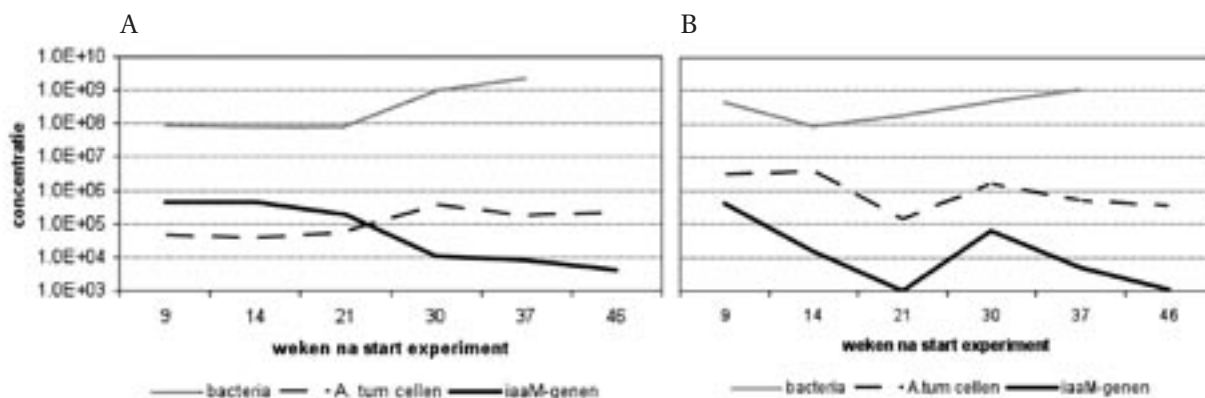
umstam dan van een van nature aanwezige stam. Hier is verder binnen dit project geen onderzoek naar gedaan

Veldvalidatie

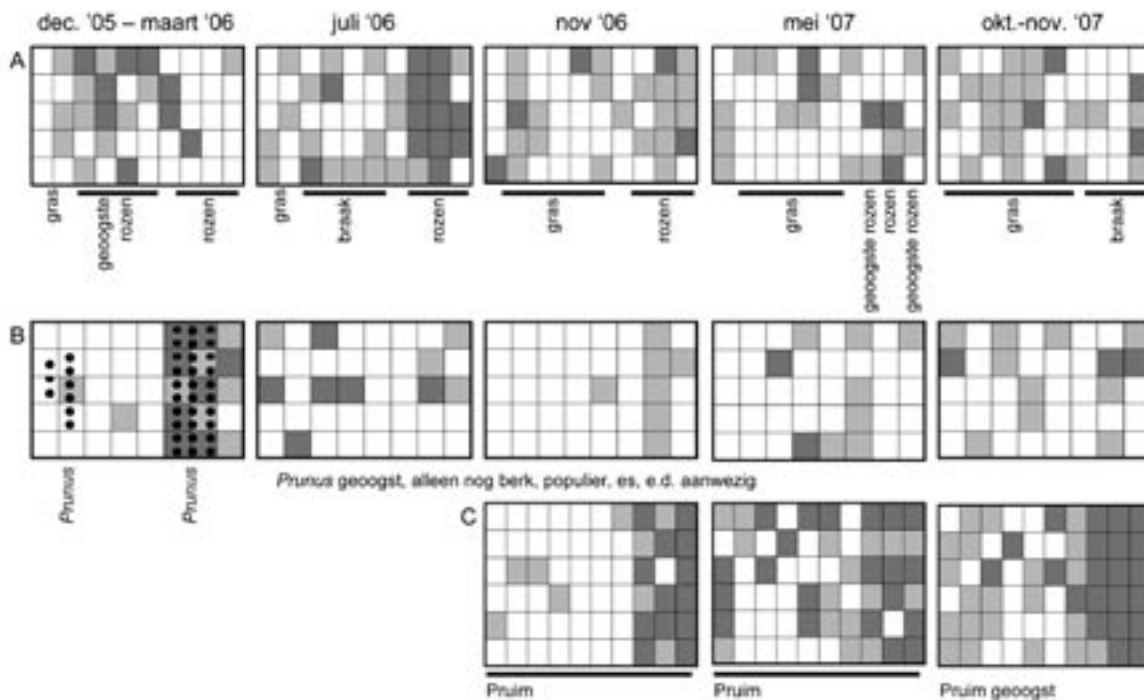
De toets is vervolgens op praktijkvelden gevalideerd. Voor validatie zijn drie percelen geselecteerd waarvan bekend was dat planten symptomen vertoonden bij oogst: de aantastingspercentages varieerden van 25 tot 100%. In het laboratorium is bevestigd dat de symptomen (knobbels) inderdaad werden veroorzaakt door *A. tumefaciens*. Deze percelen zijn gedurende twee jaar gevolgd, waarbij twee tot drie keer per jaar een bemonstering werd uitgevoerd. Hiervoor werden de percelen opgedeeld in plots van 10 x 15 m met 6 monsterpunten per plot (totaal \geq 100 g grond/plot). Door te kiezen voor een fijnmazig bemonsteringspatroon, gaven de data ook inzicht in de verspreiding van *A. tumefaciens* in een veld.

Perceel A: Op dit perceel werd enkele jaren rimpelroos (*Rosa rugosa*) geteeld. De planten zijn in etappes geoogst van november 2005 tot maart 2007 (van links naar rechts, Figuur 3A), waarna gras werd ingezaaid. In november 2005 vertoonde 25% van de geoogste planten in het midden van het perceel symptomen. In dit gedeelte van het perceel werd ook een hoge concentratie *A. tumefaciens* aangetoond (Figuur 3A). In 2006 werd de hoogste concentratie *A. tumefaciens* aangetoond in de rechter helft van het perceel, waar rozen aanwezig waren tot eind 2007.

Perceel B: Op perceel B stonden van maart 2006 tot eind 2007 laanbomen, waaronder Japanse sierkers (*Prunus serulata*). In maart 2006 werden de rijen sierkers geoogst en 100% van de planten vertoonden symptomen. *A. tumefaciens* werd zowel in de knobbels als in de grond rondom



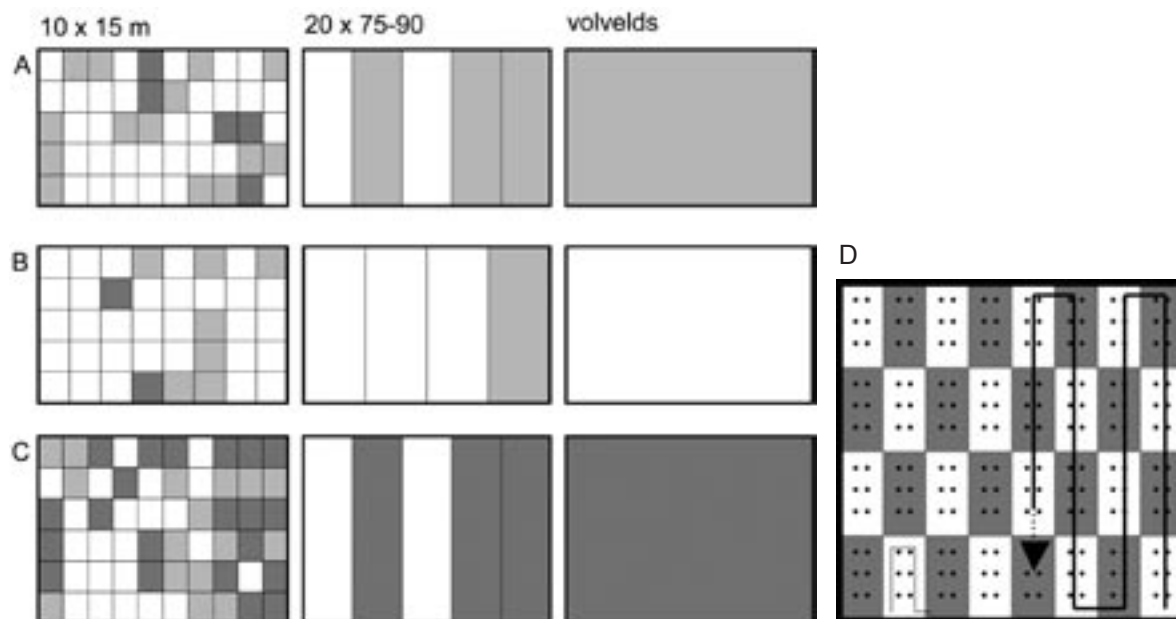
Figuur 2. Concentratie van totaal aantal aanwezige bacteriën (grijze lijn), *A. tumefaciens* cellen (gestippelde lijn) en *iaaM*-genen (gestippelde lijn) in grond kunstmatig besmet met een *A. tumefaciens* laboratorium stam (A) en in een grond natuurlijk besmet met *A. tumefaciens* (B).



Figuur 3: A. tumefaciens besmetting van percelen en plots (10 x 15 m): donker grijs: hoog niveau A. tumefaciens; licht grijs: A. tumefaciens aanwezig; wit: geen A. tumefaciens gedetecteerd. Perceel A: Rosa rugosa, B: rijen met zwarte stippen geven aan waar Prunus serulata (sierkers) heeft gestaan; C: Prunus domestica (pruim).

deze bomen aangetoond. Vlak na oogst was de concentratie van *A. tumefaciens* in de grond waar de bomen gestaan hebben het hoogst (Figuur 3B). Buiten de rijen sierkers stonden er geen andere gevoelige gewassen op dit perceel. Het is mogelijk dat op dit perceel *A. tumefaciens* met de bomen is meegekomen.

Perceel C: Op dit perceel hebben van 2002-2004 appelbomen gestaan. Bij de oogst (eind 2004) werden in 50% van de appelbomen wortelknobbelsymptomen waargenomen. Doordat in 2004 de detectiemethode nog niet was geoptimaliseerd werd de moleculaire analyse zonder voorweek



Figuur 4: Resultaten opschaling van bemonstering op A. tumefaciens besmetting in mei 2007 perceel A: Rosa rugosa, perceel B: Prunus serulata (sierkers), perceel C: Prunus domestica (pruim): donker grijs: hoog niveau A. tumefaciens; licht grijs: A. tumefaciens aanwezig; wit: geen A. tumefaciens gedetecteerd. In D worden de verschillende bemonsteringspatronen weergegeven.

ARTIKEL

uitgevoerd. De detectielimiet was 200 genen/g grond, hierdoor werd op dit perceel slechts in één van de plots *A. tumefaciens* aangetoond in de grond (data niet getoond). Toen eind 2005 opnieuw een gevoelig gewas werd geteeld (pruim, *Prunus domestica*), is dit perceel opnieuw opgenomen in de bemonsteringscyclus. Bij de oogst (eind 2007) vertoonden 50% van de pruimbomen symptomen. Het rechter gedeelte van het veld (Figuur 3C) vertoonde een hogere concentratie *A. tumefaciens* dan de rest van het veld. Dit gedeelte was beplant met uitgangsmateriaal van een andere herkomst, maar ook de grondbewerking en grondontsmetting verschilden van de rest van het perceel. (Figuur 3C).

Een fijnmazig bemonsteringspatroon is voor de praktijk niet haalbaar, omdat door de vele analyses de uiteindelijke kosten voor de toets te hoog zijn. In het laatste jaar is daarom naast dit fijnmazige bemonsteringspatroon, het bemonsterende oppervlak vergroot naar 20 x 75-90 m, en een volveldsbemonstering; de afstand tussen de bemonsteringspunten werd niet gevarieerd. De bemonstering van het grotere oppervlak werd opnieuw uitgevoerd en leverde een groter grondmonster op (>1 kg). Uit de gegevens bleek dat *A. tumefaciens* nog steeds detecteerbaar was in de grondmonsters, maar dat lagere concentraties in het veld gemist kunnen worden bij een grover bemonsteringspatroon (Figuur 4). In november 2007 is dit herhaald, wat leidde tot dezelfde resultaten.

Toets in de praktijk

Hoe werkt deze toets in de praktijk? Een perceel wordt bemonsterd volgens het aaltjesprotocol van de Naktuinbouw. Bij monsternamen kan rekening gehouden worden met eventuele verdenkingen van besmetting op het gehele of een deel van het perceel. Na analyse van de monsters wordt het risico van besmetting in drie gradaties weergegeven:

- zwaar besmet;
- besmet;
- bacterie niet aangetoond.

Als de uitkomst van de toets 'zwaar besmet' is dan wordt aangeraden om geen enkel gevoelig gewas op dit perceel te telen. Indien de bacterie niet is aangetoond dan kan er geplant worden en is het risico op besmetting op het perceel gering. Indien het toetsingsresultaat 'besmet' is dan wordt aangeraden om geen gevoelig gewas te telen. Eventueel kan indien gewenst het perceel fijnmaziger bemonsterd worden om de infectiehaard op te sporen.

De teler dient zijn gezond verstand te gebruiken bij het interpreteren van de resultaten. Het spreekt voor zich dat een teler rekening houdt met de gevoeligheid van het gewas, maar ook met het afzetgebied. Daarnaast kan de toets gebruikt worden bij de keuze van een te pachten perceel. Indien een eigen perceel besmet is, kan een planning gemaakt worden om de infectiedruk in een aantal jaren sterk terug te dringen. Indien een perceel tijdens de teelt besmet blijkt, dan is het verstandig om na het rooien de besmette planten te verwijderen en af te voeren. Het is beter om de overige symptomeloze planten uit een dergelijke partij niet te exporteren naar warme landen. Een besmetting in een partij kan namelijk latent aanwezig zijn en in de jaren daarna alsnog symptomen geven.

Tot slot

Uit bovenstaande gegevens blijkt dat er een goede relatie bestaat tussen de aanwezigheid van *A. tumefaciens* in de bodem en waargenomen symptomen in het veld. Lage concentraties van *A. tumefaciens* zijn echter moeilijk te detecteren, zoals bij opschaling is gebleken. Verder blijft *A. tumefaciens* langer dan twee jaar in grond aanwezig. Om de schadedrempel te bepalen zijn echter meer velddata noodzakelijk. Bij validatie van de toets is ook gebleken dat het bewust besmetten van grond met een laboratoriumstam kan leiden tot een overschatting van de gevoeligheid: het percentage *A. tumefaciens*-cellen met een Ti-plasmide is in natuurlijk besmette grond aanzienlijk lager dan in kunstmatig besmette grond. De toets wordt gedurende twee jaar door Naktuinbouw, met medewerking van de sector gevalideerd en klaargemaakt voor de praktijk.

Literatuur

- Lieten SH, Meekes ETM, Dinkla IJT, Butôt R, Geurkink AK, Jongedijk GP & Krooneman J (2008) Detectie van *Agrobacterium tumefaciens* in grond, verkrijgen van inzicht in de wortelknobbelproblematiek. Eindrapportage Productschap Tuinbouw (2005.2725), 34 pp
- Willems A (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* 287: 3–14
- Young, JM, Kerr, A & Sawada, H (2005) Genus II. *Agrobacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; The Proteobacteria 2nd edn Vol. 2*. (Eds. Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Volume Editors), Garrity GM (Editor-in-Chief)). Springer-Verlag, New York, pp 340-345