

Onderzoeksverslag 'Distributie van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenplanten'

J.M. van der Wolf, P.S. van der Zouwen, D. Ludeking, M.R. Hamelink & M. Schenk





Onderzoeksverslag 'Distributie van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenplanten'

J.M. van der Wolf¹, P.S. van der Zouwen¹, D. Ludeking², M.R. Hamelink² & M. Schenk³

¹ Plant Research International, Droevendaalsesteeg 1, 6700 PB, Wageningen, Jan.vanderWolf@wur.nl

² Wageningen UR Glastuinbouw, Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk, Daniel.Ludeking@wur.nl

³ Wageningen UR Laboratorium voor Erfelijkheidsleer, Droevendaalsesteeg 1, 6700 PB Wageningen

© 2012 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Bio-interacties en Plantgezondheid.

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

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Bio-interacties en Plantgezondheid

Adres : Postbus 69, 6700 AB Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 - 48 05 98
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
Algemene inleiding	3
1. Experimenten 2009 'Verticale distributie'	5
1.1 Inleiding	5
1.2 Materiaal en methoden	5
1.3 Resultaten	6
1.4 Discussie	11
2. Experimenten 2010 'Verticale distributie'	13
2.1 Inleiding	13
2.2 Materiaal en Methoden	13
2.3 Resultaten	14
2.4 Discussie	20
3. Experimenten 2011 'Horizontale distributie'	21
3.1 Inleiding	21
3.2 Materiaal en Methoden	21
3.3 Resultaten	24
3.4 Discussie	27
Literatuur	31
Acknowledgement	33

Samenvatting

Van 2009 tot 2011 werden kasproeven uitgevoerd om de kolonisatie van tomatenplanten met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) vanuit besmet zaad en de secundaire verspreiding van Cmm in een gewas te bestuderen. Er werd in het onderzoek gebruik gemaakt van besmet zaad. Dit zaad is geproduceerd door de bloemstelen van bloeiende planten te inoculeren met een spontane rifampicine resistente mutant van Cmm. De aanwezigheid van de bacterie in plantmateriaal werd vastgesteld door uitplaten op een selectief medium (SCMFast), waaraan rifampicine was toegevoegd. De identiteit van typische kolonies op de platen werd steekproefsgewijs gecontroleerd m.b.v. PCR-amplificatie.

In 2010, twee jaar na productie van het zaad, was nog steeds 100% van de zaden besmet met dichtheden die varieerden tussen de 5 en 2000 cfu per zaadje. Gebruik van het zaad resulteerde in een infectie-incidentie van ca. 95%. In 2011, drie jaar na productie, was 87% van de zaden nog besmet en waren de dichtheden in de geïnfecteerde zaden gedaald met een factor 10. Gebruik van dit zaad resulteerde in een infectie-incidentie van 67%. De transmissie van Cmm van zaad naar zaailing verloopt efficiënt en lage dichtheden (5-10 cfu per zaadje) kunnen al voor infectie zorgen.

In 2009 en 2010 was 14 dagen na zaaien van besmet zaad al een groot deel van de kiemplanten geïnfecteerd. In 2011 verliep de transmissie trager en was na 14 dagen het kiemblad van slechts 1 van de 15 planten geïnfecteerd, mogelijk door de lagere dichtheden Cmm in en op het zaad. Na 60 dagen was het percentage geïnfecteerde planten in 2011 niet meer verschillend van die in 2009 en 2010. In alle jaren gaf het besmette zaad een hoog percentage zieke planten, variërend van 67% tot 95%. De symptomen varieerden van (permanente) verwelking, laesies op blad en stengels, verslijmen van stengeldelen tot het totaal afsterven en indrogen van het gewas.

Gemiddeld over de drie jaren was 60 dagen na zaaien 52% van de wortels, 62% van de stengels, 33% van het jonge blad en 34% van het oude blad besmet (N=61). Als planten primair (vanuit zaad) geïnfecteerd zijn, geeft bemonstering van stengel of wortels de hoogste kans op detectie. Het is echter praktischer om blad te bemonsteren. Het maakt daarbij niet uit of er jong of oud blad wordt bemonsterd. In 2010 hadden 10 planten bloemtrossen gevormd waarvan slechts 2 bloemtrossen geïnfecteerd waren met hoge dichtheden Cmm. Bij primaire infectie van planten door transmissie vanuit zaad wordt in een zaadproductiegewas het risico op infectie van bloemstelen en infectie van het zaad daarom als hoog ingeschat.

In 2010 en 2011 is er ook onderzoek gedaan naar verspreiding vanuit primair geïnfecteerde planten naar schone planten (horizontale verspreiding). In 2010 werden 16 dagen na zaaien, twee Cmm-vrije planten geplaatst naast een besmette plant in een bak met voedingsoplossing. Na 60 dagen waren 8 van de 25 aanvankelijk Cmm-vrije planten (32%) besmet met Cmm, waarvan 2 met symptomen. Van de 25 planten was 20 % van de stengels, 16% van de wortels, 12% van het oude blad, en 8% van de jonge bladeren besmet. Acht van deze planten hadden bloemstelen gevormd. Hierin werd geen Cmm aangetroffen.

In 2011 werden de planten conform de situatie bij plantenkwekers opgekweekt. De planten werden gezaaid in standaard zaaitrays met steenwolpluggen. In het centrum van de zaaitrays zijn een 4 tal zaden gebruikt van de partij zaden die geïnfecteerd was met de rifampicine resistente mutant van Cmm. De rest van de tray is gezaaid met een Cmm vrije cultivar (Clothilde) dat ook in 2010 is gebruikt. Vervolgens zijn de zaailingen verspeend in standaard steenwolkblokken, enkele malen uitgezet en is er onderdoor watergegeven d.m.v. een eb- en vloedsysteem. Het retourwater werd daarbij niet hergebruikt om praktijkomstandigheden na te bootsen waarbij het retour water wordt ontsmet. De vier planten uit besmet zaad werden na verspenen op een tafel in het centrum van 80 niet-besmette planten geplaatst. In totaal 4 tafels werden gebruikt, verdeeld over twee compartimenten. In een derde compartiment werden op een tafel, 84 niet-geïnfecteerde planten opgegroeid van uit niet-besmet zaad. Er is niet geënt, maar er is wel gekopt wat de bovengrondse verspreiding in potentie kan hebben bevorderd. Er werd desondanks geen secundaire verspreiding vastgesteld. Door de trage transmissie van zaad naar plant en het trage ziekteverloop zijn mogelijk de kansen voor secundaire verspreiding in het gewas te gering geweest. Er zijn nog niet voldoende gegevens beschikbaar om een uitspraak te kunnen doen over de verdeling van Cmm in tomatenplanten na secundaire verspreiding.

Algemene inleiding

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) is een Q-organisme (EPPO A2) dat bacteriekanker in tomaat veroorzaakt en de laatste jaren veel schade geeft in de tomatenteelt. Tomatenzaad wordt gezien als de primaire infectiebron. Het pathogeen kan zich snel verspreiden binnen een bedrijf. Voor regulering van dit Q-organisme en het opstellen van pest risk analyses is kennis over de distributie van het pathogeen in de plant en in het gewas van groot belang. Er zijn geen toegelaten gewasbeschermingsmiddelen beschikbaar om de ziekteverwekker te beheersen.

Om verspreiding van Cmm te voorkomen, zou naast een toets op zaden ook een toets op latente infecties van (jong) plantmateriaal gewenst zijn. Kennis ontbreekt over de verdeling van Cmm binnen de plant (verticale verspreiding) en binnen het gewas (horizontale verspreiding). Er wordt nu van circa 0.1% van de planten een ouder blad bemonsterd, omdat er aanwijzingen zijn dat de hoogste concentraties aanwezig zijn in de stengelbasis en de oudere bladeren (Krämer & Grisbach, 1995). Secundaire infecties ontstaan via druppelverspreiding of via gewashandelingen (snoeien, enten, koppen, bladplukken, oogsthandelingen, etc.) en kunnen in theorie ook gevonden worden in hogere delen van de plant (Chang et al., 1991).

In dit verslag worden drie kasexperimenten beschreven, uitgevoerd in de periode van 2009-2011, om inzicht te krijgen in de distributie van Cmm in planten opgekweekt vanuit besmet zaad en in de verdeling van Cmm in een productiegewas als gevolg van secundaire verspreiding. De kennis kan worden gebruikt bij het ontwikkelen van een gevalideerde bemonsteringstechniek.

1. Experimenten 2009 'Verticale distributie'

1.1 Inleiding

In 2009 werd gekeken naar de verticale distributie van Cmm in tomatenplanten. Hiervoor werden geïnfecteerde zaden gezaaid in bakken met vermiculiet en na 12 dagen verspeend naar steenwolblokken. Op T=14 werden mengmonsters van kiembladen, op T=30 mengmonsters van blad, wortel of stengel en op T=60 delen van individuele planten bemonsterd d.m.v. uitplaten. Verdachte kolonies werden steekproefsgewijs gecontroleerd met kolonie-PCR.

1.2 Materiaal en methoden

Plantengroei. Tomatenzaden (F2 zaad van een F1 hybride, Cv. Colby) geïnfecteerd met een spontane rifampicine stam van Cmm werden door Syngenta (Dr. B. Woudt) beschikbaar gesteld. De stam is uit besmet materiaal geïsoleerd op SCMFast, reingestroken op TSA + 25 µg/ml rifampicine, gekarakteriseerd met PCR technieken, en in de IPO collectie opgenomen (IPO 3356). De stam werd gebruikt voor controle van agar media en diagnostische toetsen. De zaden werden op 6 november 2009 in bakken met vermiculiet opgekweekt in een kas onder een voor tomaat gangbaar temperatuurregime, maar zonder bij te belichten. Na 12 dagen werden 190 zaailingen overgezet in steenwolblokken die vervolgens in plastic bakken in de kas zijn geplaatst (10 steenwolblokken per bak). De experimenten zijn uitgevoerd in het kassencomplex van Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk. De gebruikte kasjes hebben een Q-status en zijn geschikt voor het uitvoeren van experimenten met Cmm.

Beoordeling symptomen

De symptomen werden visueel vastgesteld, waarbij de planten om de 2-3 dagen zijn beoordeeld op het voorkomen van de symptomen. Ook de ontwikkeling van de symptomen in de tijd is gevolgd. Planten werden geclassificeerd als:

0. Symptoomloze plant
1. Slappe plant. Plant hangt slap, maar er is nog herstel mogelijk
2. Verwelkte plant. Plant is permanent verwelkt
3. Verwelkte plant met necrose. Plant is permanent verwelkt en er zijn necrotische zones op het blad waarneembaar
4. Afgestorven plant. Plant is verwelkt, blad is necrotisch en de stengels zijn bruin

Bemonstering

Van 150 zaailingen werd na 14 dagen (20 november 2009), in het 2-blad stadium, 1 blad geknipt en in pools van 10 bladeren geëxtraheerd in BioReba maalzakjes. Na elk plantje werd het schaartje in alcohol ontsmet. Na elke bemonsterde bak werden handschoenen gewisseld.

Op identieke wijze werd op T=30 (15 december 2009 en 20 januari 2010 (T=66), een pool van resp. de bladeren, stengels of wortels van 10 planten in BioReba zakjes gedaan. Het gewicht van de plantendelen werd bepaald en aan de plantenextracten werden op T=14, 10x het gewicht PBT (zaadextractiebuffer ISHI, per liter 7.75 g Na_2HPO_4 en 1.65 g KH_2PO_4 en 0.2 ml Tween 20 (steriel)), op T=30, 2x het gewicht en op T=60 (20 januari), ca. 2 ml PBT toegevoegd (en daarna 10 verdund in PBT).

Extractie en analyse plantmateriaal

Uitplaten selectieve media. Extracten werden uitgeplaat (10, 100 en/of 1000x verdund in PBT) op het selectieve medium SCM-fast (Koenraadt et al., 2010). Per liter gedemineraliseerd water bevatte dit medium de volgende ingrediënten: 33.2 g SCM mix (Duchefa, S5127) wat bestaat uit : 18 g agar, 2 g K_2HPO_4 , 0.5 g KH_2PO_4 , 0.122 g MgSO_4 (watervrij), 1.5 g H_3BO_3 , 1.9 g gistextract. Verder werd, 1.9 g extra gistextract toegevoegd. Na autoclaveren word het medium afgekoeld tot 50 °C en werden de volgende antibiotica toegevoegd: 20 mg nalidixinezuur, 80 mg Trimetoprim, 100 mg Nystatine, 0.001% (w/v) Potassium tellurite (Difco, Chapman tellurite oplossing), 0.1 g Nicotinezuur. Op T=14 en T=35 werd ook op D2ANX (recept ISHI, versie 3, 2008) uitgeplaat. De selectiviteit van dit

medium was minder goed, waardoor Cmm in een (klein) aantal monsters wel met SCM-fast, maar niet met D2ANX kon worden aangetoond, door het overgroeien van platen door saprophyten. Er is verder gewerkt met alleen SCM-fast. Ter bevestiging werden van elk monster 2 verdachte kolonies uitgestreken op TSA met rifampicine en beoordeeld op groei, kleur en textuur.

Kolonie-PCR Van elk monster werden Cmm-typische kolonies op SCMfast geanalyseerd met PCR (Souza Santos et al., 1997, primers 5,6). Een reactievolume van 25 µl werd gebruikt: 19.2 µl MilliQ water, 0.5 µl 10 mM dNTP, 10x PCR buffer, 0.1 µl van elke primer, 0.1 µl Taq polymerase en 2.5 µl monster (cellen, 5 min gekookt in 5 mM NaOH). PCR programma: 5 min 95 °C, 30 cycli van 94 °C, 1 min, 55 °C, 1.5 min en 72 °C, 1 min, terminatie 5 min 72 °C. De besmettingsincidentie werd berekend met de volgende formule: $I = \{1 - [(N-p)/N]^{1/n}\} * 100$ (I = incidentie, N = totaal aantal composiet monsters, p = aantal geïnfecteerde monsters, n = aantal plantendelen per composiet monster).

1.3 Resultaten

De ontwikkeling van de groei van de planten op 14, 30 en 60 dagen na zaaien, is weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. Stadium ontwikkeling tomatenplanten 14, 30 en 60 dagen na zaaien (kasproef 2009).

Achtentwintig dagen na zaaien werden de eerste symptomen zichtbaar, namelijk slappe planten, verwelking en necrose, soms gevolgd door een volledig afsterven van de plant (Figuur 2). Daarnaast bleven sommige planten zichtbaar achter in groei. Op 35 dagen na zaaien werd voor (tweede) bemonstering, de 150 planten beoordeeld (Tabel 1). In totaal 10% van de planten waren dood, 4% vertoonde verwelking en necrose, 1% was verwelkt, 10% van de planten hingen slap (tijdelijke verwelking) en 75% van de planten waren symptoomloos. Het aantal symptomatische planten nam toe in de tijd en betrof na 60 dagen 77% (43% slappe planten, 15% verwelkte planten,

5% planten met verwelking en necrose en 15% dode planten) (Figuur 3). In Figuur 4 zijn de verschillende stadia in symptoomexpressie weergegeven.

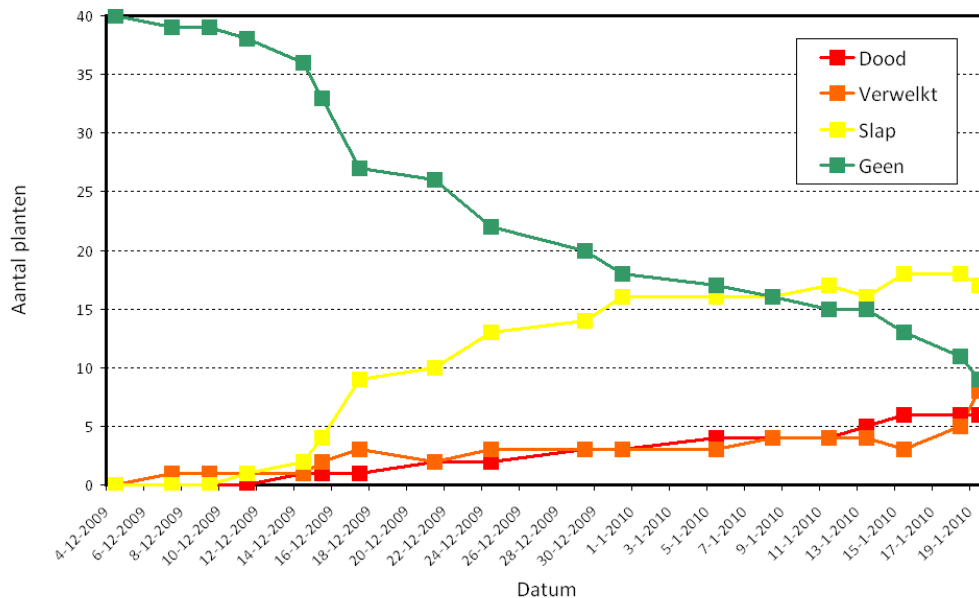


Figuur 2. Typische symptomen veroorzaakt door *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenplanten (28 dagen na zaaien) (kasproef 2009).

Tabel 1. Symptomen bij planten die in bulkmonsters getoetst zijn bij de tweede bemonstering (n=100) (kasproef 2009).

Bulk	Zichtbare symptomen bij de 2 ^{de} bemonstering (aantal planten)				
	Geen symptomen	Slappe planten	Verwelking	Verwelking met necrose	Dood
1	9	1			
2	8	2			
3	8			1	1
4	6	1		1	2
5	6	1		1	2
6	8	1			1
7	9				1
8	6	3			1
9	8	1		1	
10	7	1			2
11	8	2			
12	8		1		1
13	8				2
14	7	1		2	
15	7	1			2
Totaal	113 (75%)	15 (10%)	1 (1%)	6 (4%)	15 (10%)

Van 150 zaailingen werd na 14 dagen, in het 2-blad stadium, één blad geoogst en in bulkmonsters van 10 bladeren geëxtraheerd en uitgeplaat (Tabel 2). Bij alle 15 bulkmonsters groeiden typische Cmm kolonies uit op TSA+rif. De identiteit van de kolonies werd bevestigd met PCR (1 of 2 kolonies per monster). Vaak waren er hoge aantallen kolonies ($>10^4$ cfu/g) zichtbaar en kon de dichtheid niet exact worden vastgesteld. Een bulkmonster van 10 zaailingen die opgekweekt zijn uit Cmm-vrij zaad leverde op de selectieve media atypisch kolonies op en deze waren negatief in de PCR en op TSA met rifampicine.



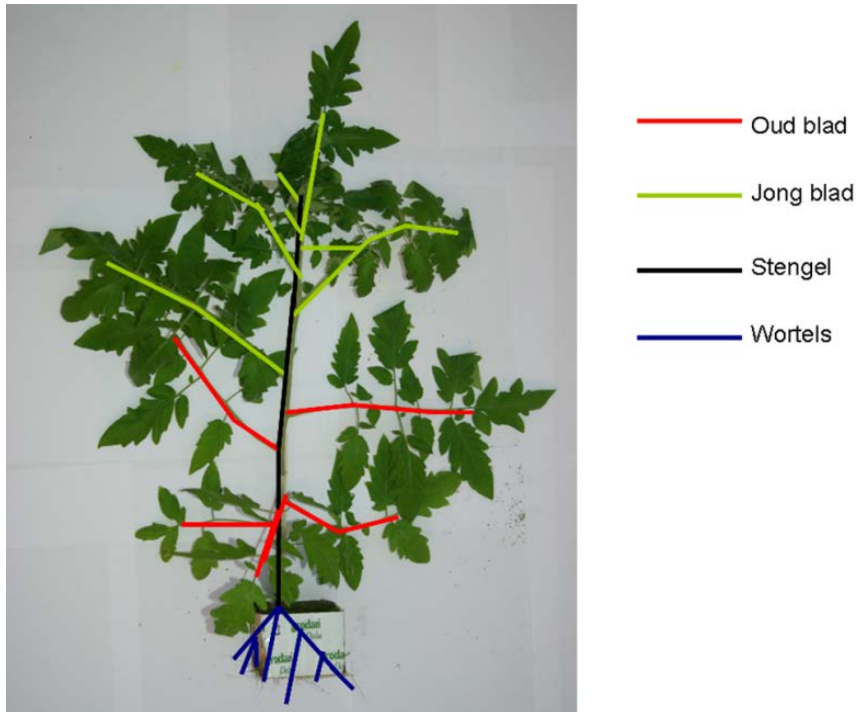
Figuur 3. Ontwikkeling van symptomen in tomatenplanten gekweekt uit zaad besmet met Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (kasproef 2009).

Vijfendertig dagen na het zaaien werden van de eerder bemonsterde planten 15 mengmonsters van blad, stengels en wortels gemaakt (bulkmonsters van elk 10 planten). De extracten werden op identieke wijze geanalyseerd als na 14 dagen. Alle mengmonsters van delen van planten die opgekweekt zijn vanuit potentieel besmet zaad waren positief (Tabel 2). Soms toetsten individuele kolonies negatief, maar werd na afspoelen van de platen en een PCR analyse op 100 maal verdunde suspensies wel een positieve reactie gevonden (resultaten niet getoond). Op basis hiervan is berekend dat de incidentie van de besmetting voor individuele planten tussen de 23 en 100% lag. Mengmonsters van stengels en in het bijzonder van wortels bevatten hogere dichtheden Cmm dan mengmonsters van blad. Ook in alle 14 afgestorven planten, die individueel bemonsterd werden, werd Cmm gedetecteerd.



Figuur 4. Type symptomen veroorzaakt door *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenplanten, 60 dagen na zaaien (kasproef 2009).

Na 60 dagen waren de eerste bloemen gevormd. Dertig individuele planten die opgekweekt zijn uit potentieel Cmm-besmet zaad en 3 planten opgekweekt vanuit Cmm-vrij zaad zijn op T=60 bemonsterd. Daarbij zijn monsters van de wortels, een groot deel van de stengel, 2-4 oudere en 2-4 jongere bladeren geanalyseerd door uitplaten op SCMfast (Figuur 5). Van elk monster is een typische kolonie gekarakteriseerd met PCR. Van de planten die opgekweekt zijn uit Cmm-vrij zaad waren alle monsters negatief in de uitplaattoets. Van de planten die opgekweekt zijn uit potentieel Cmm-besmet zaad bleek 50% van de wortels, 60% van de stengels, 27% van de oudere bladeren en 23% van de jongere bladeren positief te toetsen (Tabel 2). Op een enkele uitzondering na, bevatten de monsters hoge aantallen typische kolonies voor Cmm ($> 10^6$ cfu/g materiaal).



Figuur 5. Bemonsterde plantendelen op T=60 (Kasproef 2009).

Er was niet altijd een goede relatie tussen de aanwezigheid van symptomen (geen, slap of verwelkte planten) en de resultaten met uitplaten (Tabel 3). In één van de acht verwelkte planten kon geen Cmm aangetoond worden, terwijl in 3 van de 6 planten zonder symptomen Cmm werd aangetroffen in wortels en stengels.

Tabel 2. Overzicht besmettingen van tomatenplanten met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (kasproef 2009). Op T=14 en T=35 zijn mengmonsters geanalyseerd van 10 planten. Op T=60 zijn individuele planten geanalyseerd.

Dagen na zaaien	Monster	Zaadpartij	Aantal (meng) monsters	Aantal positief			Totaal positief	% Positief	Berekende incidentie
				Hoog	Matig	Laag			
14	Kiemblad	Cmm-positief	15	15	0	0	15	100	>23,7
	Kiemblad	Cmm-negatief	1	0	0	0	0	0	0,0
35	Kiemblad	Cmm-positief	15	15	0	0	15	100	>23,7
	Stengels	Cmm-positief	15	9	2	4	15	100	>23,7
	Wortels	Cmm-positief	15	6	2	7	15	100	>23,7
	Dode planten	Cmm-positief	14	12	0	2	14	100	>23,2
	Kiemblad	Cmm-negatief	1	0	0	0	0	0	0,0
	Stengels	Cmm-negatief	1	0	0	0	0	0	0,0
	Wortels	Cmm-negatief	1	0	0	0	0	0	0,0
60	<i>Jong blad</i>	Cmm-positief	30	7	0	0	7	23,3	23,3
	<i>Oud blad</i>	Cmm-positief	30	8	0	0	8	26,7	26,7
	<i>Stengels</i>	Cmm-positief	30	17	1	0	18	60,0	60,0
	<i>Wortels</i>	Cmm-positief	30	13	1	1	15	50,0	50,0
	<i>Jong blad</i>	Cmm-negatief	3	0	0	0	0	0,0	0,0
	<i>Oud blad</i>	Cmm-negatief	3	0	0	0	0	0,0	0,0
	<i>Stengels</i>	Cmm-negatief	3	0	0	0	0	0,0	0,0
	<i>Wortels</i>	Cmm-negatief	3	0	0	0	0	0,0	0,0

1.4 Discussie

Bij gebruik van tomatenzaad dat (zwaar) besmet is met Cmm, raakt een hoog percentage van de planten besmet (63%). In het zes-blad stadium (T=30) levert bemonstering van de bladeren de hoogste dichtheden Cmm op via uitplaten op SCMfast. In het plantstadium waarin ze uitgeleverd worden aan telers (T=60), geeft bemonstering van stengels de hoogste kans op detectie van Cmm. Ook bevatten de stengels gemiddeld de hoogste dichtheden Cmm. Verder zijn wortelmonsters relatief vaak besmet en bevatten ze relatief hoge aantallen kolonies. Bij gebruik van (zwaar) besmet zaad kunnen al na ca. 4 weken (T=30) symptomen worden verwacht. De percentages besmette plantendelen op T=14 en T=30 konden niet bepaald worden omdat alle (meng)monsters besmet waren. Als experimenten herhaald worden, zullen er in een eerder stadium, individuele planten bemonsterd moeten worden. Het lijkt er op dat de detectiemethode niet in alle gevallen in staat is Cmm aan te tonen. Er kan ook niet helemaal uitgesloten worden dat verwelking veroorzaakt is door een andere ziekteverwekker.

Tabel 3. Verband tussen symptomen en aanwezigheid *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in plantmateriaal (kasproef 2009).

Positief op basis van symptomen	Symptomen		Positief in uitplaten				
			Oude bladeren	Jonge bladeren	Stengels	Wortels	Minimaal 1 planten-deel positief
Positief op basis van symptomen	Geen	N=6	0	0	3	3	3
	Slap	N=16	4	3	9	8	9
	Verwelkt	N=8	4	4	6	5	7

2. Experimenten 2010 'Verticale distributie'

2.1 Inleiding

Ook in 2010 werd onderzoek gedaan naar de verticale distributie van Cmm in tomatenplanten na primaire infecties. Individuele zaden, van de geïnfecteerde zaadpartij die in 2008 geproduceerd was, werden geanalyseerd.

Geïnfecteerde zaden, gezaaid in steenwolpluggen en werden na 16 dagen verspeend naar steenwolblokken.

De planten werden vervolgens in bakken met een voedingsoplossing geplaatst. Deze keer werden tijdens alle bemonsteringstijdstippen (T=14, T=35 en T=60) individuele planten bemonsterd.

Tevens werd oriënterend onderzoek gedaan naar de verspreiding van Cmm van zieke naar gezonde planten door Cmm-vrije planten bij geïnfecteerde planten te plaatsen in bakken met een voedingsoplossing. Daarbij werd ook gekeken naar de verdeling van Cmm in tomatenplanten na secundaire infecties.

2.2 Materiaal en Methoden

Opkweek plantmateriaal

De zaden zijn in steenwolpluggen opgekweekt in een kas onder een voor tomaat gangbaar temperatuurregime van gemiddeld 23°C en een RV van 70%, maar zonder belichting. De zaden zijn op 2-8-2010 gezaaid in standaard Cultilène tempex zaaitrays met 240 steenwolpluggen zoals die veelal bij de plantenkwekers worden gebruikt. De zaden zijn na het zaaien afgedekt met vermiculiet. De trays zijn in witte plastic bakken op tafels geplaatst en gedurende 7 dagen afgedekt met een transparante folie om de kieming te stimuleren. Zestien dagen na zaaien (18-8-2010) werden zaailingen verspeend naar steenwolblokken (steenwolpotten) die vervolgens in plastic bakken op roltafels over twee kascompartimenten zijn verdeeld. Als gevolg van de verspening is geen uitval waargenomen. In elke bak zijn naast de planten gekweekt uit geïnfecteerd zaad, 2 planten opgegroeid uit gezond zaad gezet, om secundaire verspreiding (via water of wortelcontact) te bestuderen. Tijdens de opkweek was er sprake van wortelcontact tussen planten gegroeid uit besmet en Cmm-vrij zaad.

Er is gedurende de duur van het experiment handmatig water gegeven. Watergift heeft plaats gevonden zonder toevoeging van meststoffen (schoon water) en de watergift is overmatig geweest om de secundaire verspreiding te stimuleren. Getracht is om altijd minimaal een waterfilmpje in de bakken te houden om verwelking als gevolg van droogtestress te voorkomen en de secundaire verspreiding via water te bewerkstelligen.

De experimenten zijn uitgevoerd in het kassencomplex van Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk. De gebruikte kasjes hebben een Q-status.

Tomatenzaden (F2 zaad van een F1 hybride, cv. Colby) die in 2009 geïnfecteerd waren met een spontane rifampicine stam van Cmm werden door Syngenta (Dr. B. Woudt) beschikbaar gesteld. De gezonde planten zijn opgekweekt vanuit zaad dat eveneens door Syngenta is geleverd. De gebruikte cultivar is Clothilde.

Beoordeling symptomen

Wederom zijn gedurende het experiment de symptomen visueel vastgesteld, waarbij de planten om de 2-3 dagen zijn beoordeeld op het voorkomen van de symptomen (Figuur 2 en 4). Ook de ontwikkeling van de symptomen in de tijd is gevolgd. Symptomen werden op dezelfde wijze als in 2009 geclassificeerd.

Bemonstering

Van de 60 zaailingen opgegroeid uit geïnfecteerd zaad werd na 14 dagen (16-8-2010), in het 2-blad stadium, 1 blad geknipt en geëxtraheerd in een BioReba maalzakje. Elke kiemplant is individueel bemonsterd. Bij het monstern zijn na elke bemonstering handschoenen verwisseld. Na elk plantje werd het schaartje in alcohol ontsmet. Ook de planten uit gezond zaad zijn na 14 dagen individueel bemonsterd (30 planten).

Na 35 dagen is uit elke bak een van de twee planten opgegroeid uit geïnfecteerd zaad individueel en destructief bemonsterd (T=35, 6-9-2010). Daarbij zijn kiemblad, blad, stengel en wortel per plant bemonsterd. Van de planten die uit gezond zaad (Cmm-vrij) zijn opgegroeid zijn 5 planten individueel bemonsterd op kiemblad (1), blad (2-4), de gehele stengel en het totale wortelstelsel.

Op 4 oktober 2010 zijn de resterende uit geïnfecteerd zaad opgegroeide planten individueel bemonsterd. Hierbij zijn de bladeren (jong en oud), stengels en wortels van de resterende 30 planten per plant gepooled in BioReba zakjes gedaan. Ook alle resterende planten die uit gezond zaad zijn opgekweekt zijn destructief bemonsterd op de bladeren (jong en oud), stengels en wortels.

Het gewicht van de plantendelen werd bepaald en aan de plantenextracten werden op T=14, 10x het gewicht PBT (zaadextractiebuffer ISH1), op T=30, 2x het gewicht en op T=60 (20 januari), ca. 2 ml PBT toegevoegd (en daarna 10 verdund in PBT). Het plantmateriaal werd kapot gehamerd.

Analyse plantmateriaal

Analyse zaden

In 2009 werden 40 tomatenzaden uit de Cmm-besmette partij (Syngenta) geanalyseerd (. De individuele zaden zijn in eppendorfbuisjes gedurende ca. 1 jaar bewaard bij 4°C. Aan elk zaadje werd 500 µl PBST toegevoegd en overnacht bij 4°C geweekt. De zaden werden met een steriele scalpel kapot gesneden en uitgeplaat op SCM-fast + Rifampicine (onverdund, 10 en 100x verdund). Steekproefsgewijs werden verdachte kolonies gecontroleerd met PCR (21 van 22 kolonies positief)

Extractie plantmateriaal

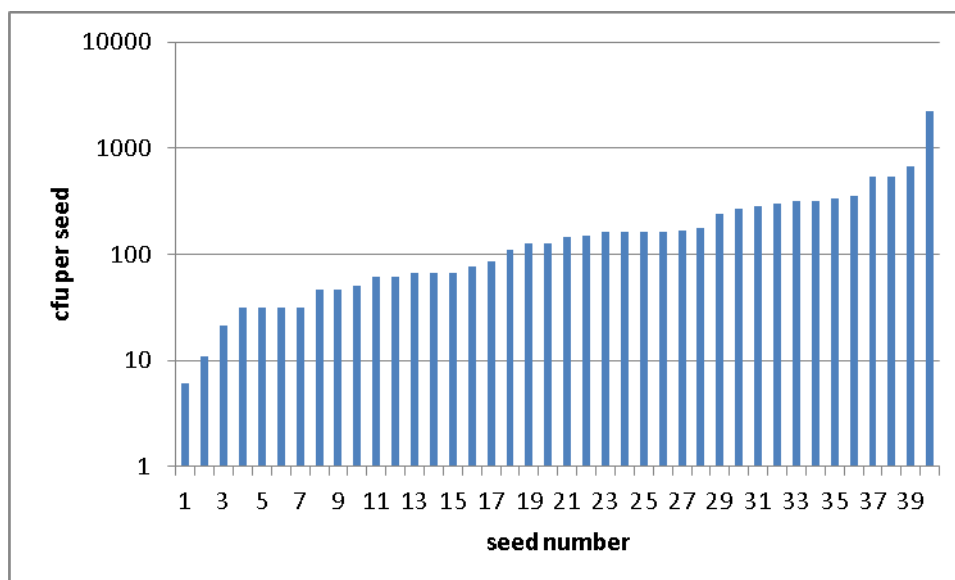
Plant materiaal werd geëxtraheerd en uitgeplaat (10x en 100 x verdund) op het selectieve medium SCMfast+ 25 µg/ml rifampicine. Op T=14 werd aan elk kiemblad (gemiddeld 0.07 g) 2 ml PBT toegevoegd, op T=35 werd het materiaal gewogen en een PBT toegevoegd (2x het gewicht aan plantmateriaal). T=60: gewogen en driemaal hoeveelheid PBT toegevoegd

Kolonie-PCR Steekproefsgewijs werden Cmm-typische kolonies op SCMfast geanalyseerd met PCR (Souza Santos et al., 1997, primers 5,6). Een reactievolume van 25 µl werd gebruikt: 19.2 µl MilliQ water, 0.5 µl 10 mM dNTP, 10x PCR buffer, 0.1 µl van elke primer, 0.1 µl Taq polymerase en 2.5 µl monster (cellen, 5 min gekookt in 5 mM NaOH). PCR programma: 5 min 95 oC, 30 cycli van 94 oC, 1 min, 55 oC, 1.5 min en 72 oC, 1 min, terminatie 5 min 72 oC.

2.3 Resultaten

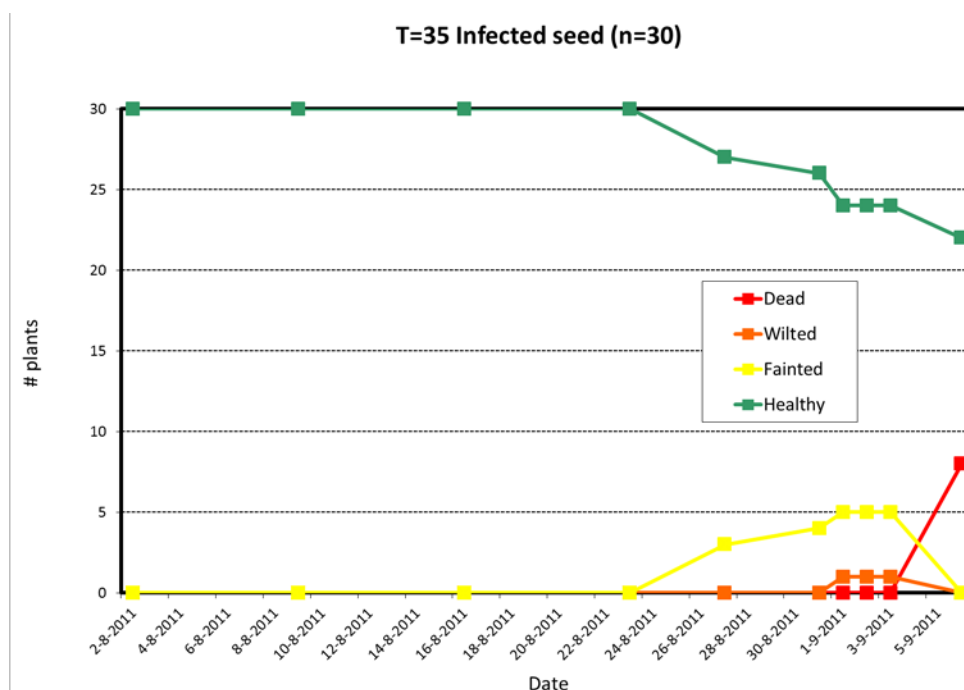
Kolonisatie van planten vanuit geïnfecteerde zaden

Veertig individuele zaden werden d.m.v. uitplaten op SCMfast met rifampicine (SCMfastR) getoetst op aanwezigheid van Cmm. Alle zaden bleken besmet. De aantallen varieerden van 5 tot 2200 cellen per zaadje (Figuur 6).



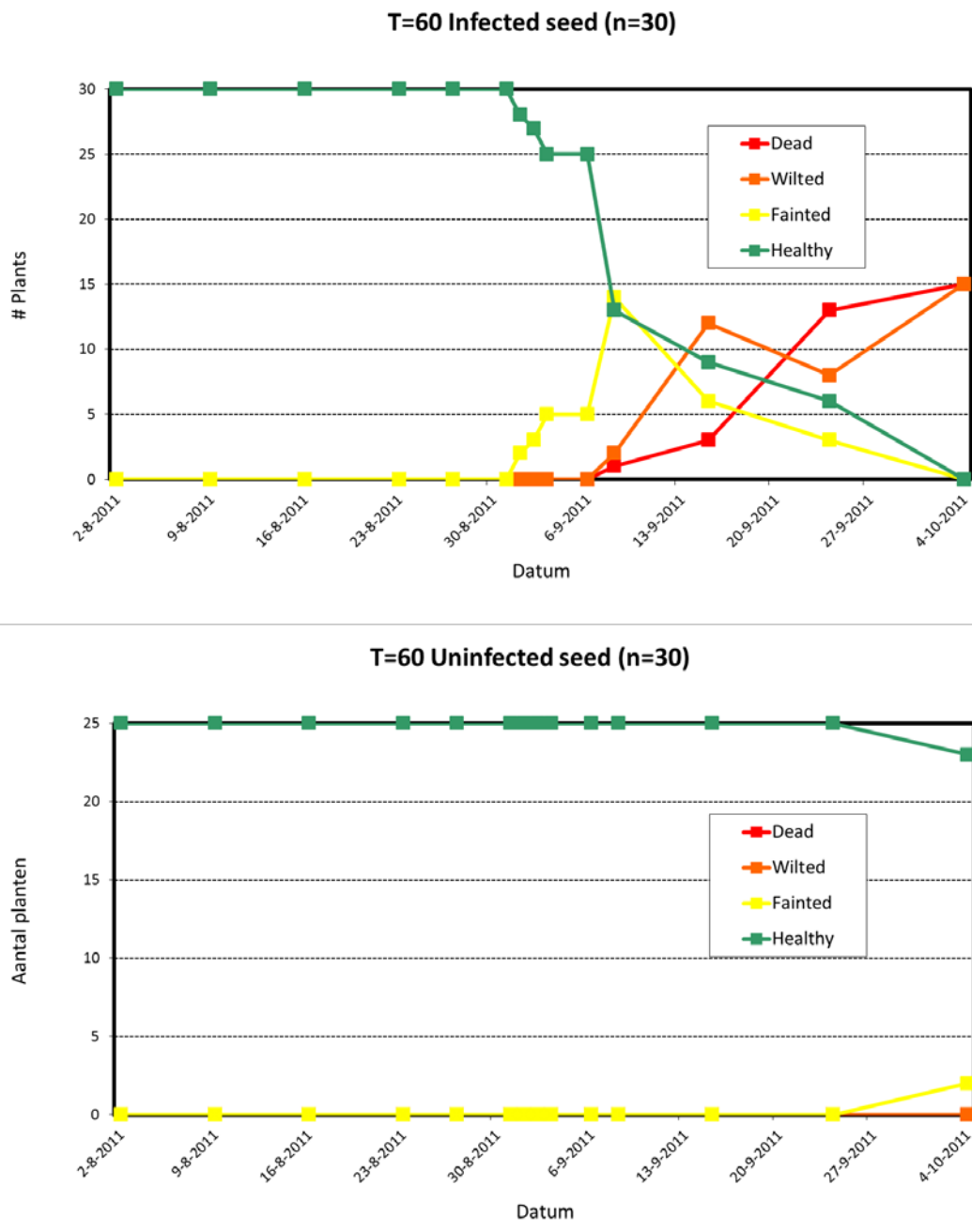
Figuur 6. Besmetting van tomatenzaden in 2010 met *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Cmm) (F2 zaad van een F1 hybride, Cv. Colby, in 2009 geïnfecteerd met een spontane rifampicine stam van Cmm).

In het eerste compartiment werden 25 dagen na zaaien in planten uit besmet zaad de eerste Cmm-symptomen waargenomen. In het andere kascompartiment werden de eerste symptomen 4 dagen later geconstateerd. In eerste instantie werden de onderste bladeren slap. Daarna werden de symptomen snel ernstiger. Planten gingen geheel slap hangen, er trad een permanente verwelking op, bladeren werden necrotisch, en soms stierven planten volledig af. Daarnaast bleven sommige planten zichtbaar achter in groei. Bij planten met vroege symptomen verliep het ziekteproces sneller dan bij latere symptomen. Op 35 dagen na zaaien waren al 8 planten dood (Figuur 7).



Figuur 7. Ontwikkeling van symptomen in tomatenplanten gekweekt uit zaad besmet met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* op T=35 (kasproef 2010).

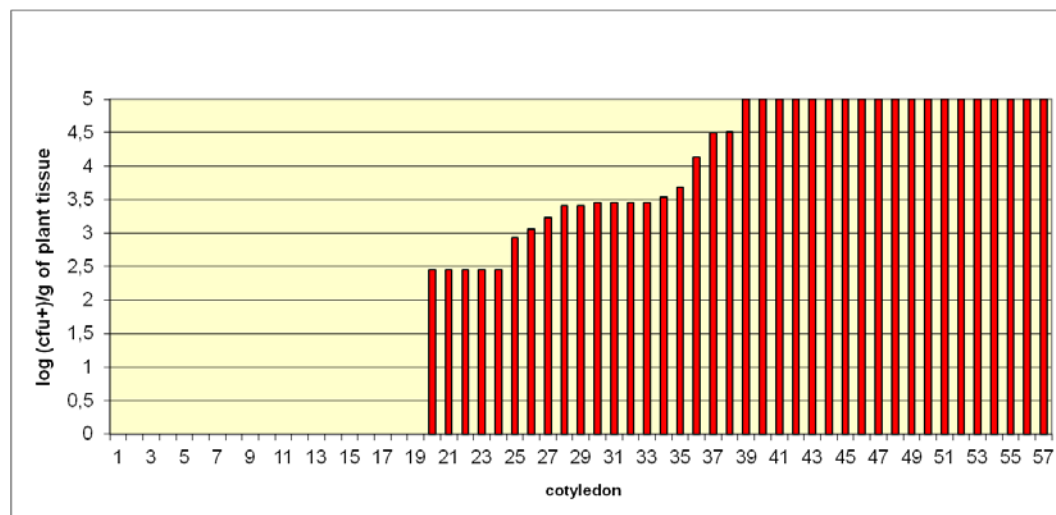
Op T=60 hadden alle planten symptomen en waren er 15 van de 30 afgestorven (Figuur 8). Van de 30 planten gekweekt uit Cmm-vrij zaad waren 2 planten slap gaan hangen op 60 dagen na zaaien (Figuur 8).



Figuur 8. Ontwikkeling van symptomen in tomatenplanten gekweekt uit zaad besmet met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (boven), en met Cmm-vrij zaad (onder) maar bijgezet in bakken met planten gekweekt uit zaad besmet met Cmm op T=60 (kasproef 2010).

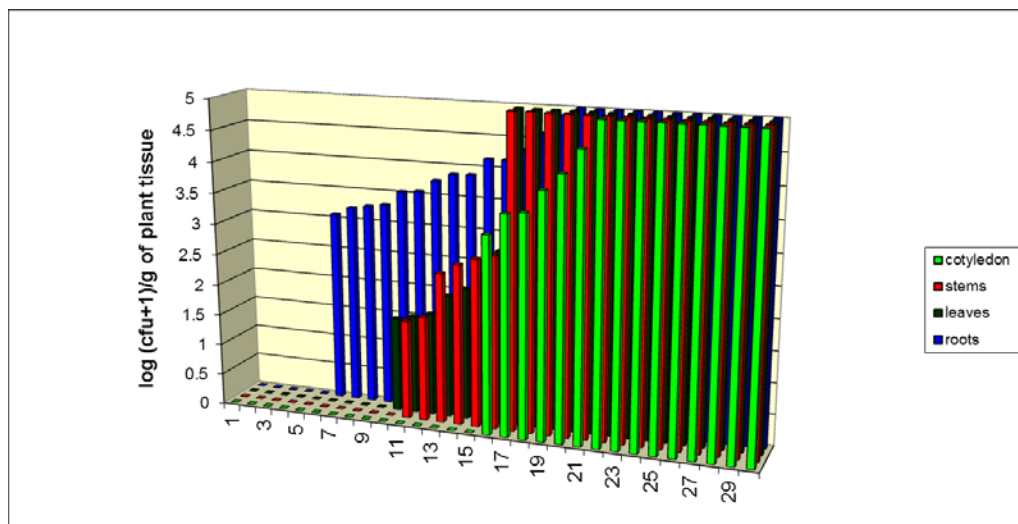
Veertien dagen na zaaien (T=14) werd van 57 individuele planten 1 cotyl genomen en met behulp van uitplaten op SCMfast-R geanalyseerd op aanwezigheid van Cmm. Hiervan waren 36 kiembladen besmet met dichtheden Cmm die varieerden van 286 tot meer dan 100.000 cellen per gram (Figuur 9). Planten waarvan de kiembladen op T=14

negatief waren, bleken op T=35 of T=60 vaak wel positief. Er werden ook kiembladen van 20 planten bemonsterd die uit Cmm-vrij zaad zijn opgekweekt en in aparte containers stonden. Deze waren alle negatief bij uitplaten.



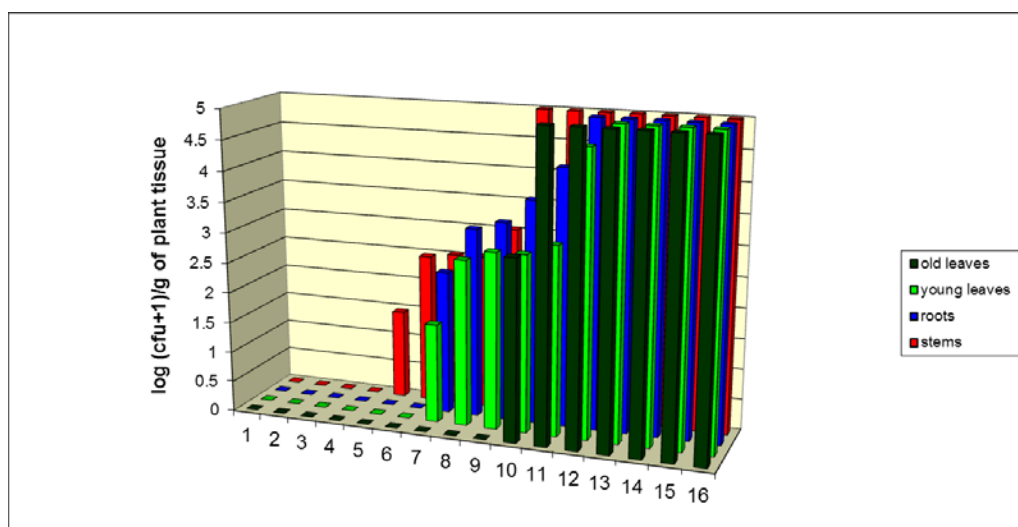
Figuur 9. Primaire infecties van kiembladen van tomatenplanten met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), 14 dagen na zaaien van Cmm besmet zaad (kasproef, 2010). Dichtheden van 100.000 cfu per gram plantmateriaal en hoger zijn niet accuraat vanwege het overgroeien van platen.

Na 35 dagen (T=35) werden 30 uit besmet zaad gekweekte planten, (destructief) bemonsterd. Bij 47% van de bemonsterde planten vertoonden deze planten al de eerste symptomen (14 van 30) (Figuur 10). Uit de analyse bleek dat in totaal 90 % van de 30 bemonsterde planten besmet waren. De percentages besmette plantendelen waren 77, 67, 63 en 53 procent voor respectievelijk wortels, bladeren, stengels en kiembladen. De verdeling van de dichtheden bacteriën in de besmette plantendelen verschilde weinig voor de verschillende plantendelen; de dichtheden varieerden van 33 tot $> 10^5$ cellen per gram. Daarnaast zijn er ook een mengmonster van 5 planten geanalyseerd die uit Cmm vrij zaad zijn opgekweekt en die bij de planten uit besmet zaad waren geplaatst, geen van deze planten vertoonden symptomen. Wel waren het kiemblad en een ouder blad besmet met lage aantallen Cmm (< 100 cfu/g), de wortels en stengels waren vrij van Cmm (gegevens niet getoond).



Figuur 10. Primaire infecties van oud en jong blad, wortels en stengels van tomatenplanten met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), 35 dagen na zaaien van Cmm besmet zaad (kasproef, 2010). Dichtheden van 100.000 cfu per gram plantmateriaal en hoger zijn niet accuraat vanwege het overgroeien van platen.

Na 60 dagen (T=60) werden 16 uit besmet zaad gekweekte planten bemonsterd (Figuur 11). Hiervan vertoonde 50% van de planten geel blad, 37,5% dood blad onderin, 6,25% necrose en 6,25% was afstervend. Uit de analyse bleek dat in totaal 94% van de planten besmet was (15 van 16 planten). De percentages besmette plantendelen waren 69, 63, 63 en 44 procent voor respectievelijk stengels, jonge bladeren, wortels en oude bladeren. De verdeling van de dichtheden in de besmette plantendelen was vergelijkbaar met die van T=35. De verdeling van Cmm in de plant was onregelmatig. Planten konden in alle delen van de plant besmet zijn met Cmm, maar ook in enkele delen of slechts in één (Tabel 4).



Figuur 11. Primaire infecties van oud en jong blad, wortels en stengels van tomatenplanten met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), 60 dagen na zaaien van Cmm besmet zaad (kasproef, 2010). Dichtheden van 100.000 cfu per gram plantmateriaal en hoger zijn niet accuraat vanwege het overgroeien van platen.

Van 10 planten gegroeid uit besmet zaad werden ook bloemen en bloemsteel als mengmonster bemonsterd. Hiervan waren 2 bloemtrossen zwaar besmet, deze planten bevatten ook hoge dichtheden Cmm in andere plantendelen.

Van veel positieve monsters werd tenminste één kolonie met een typische vorm en kleur voor Cmm geanalyseerd m.b.v. PCR (zaden, 24; T=14, 34 kolonies; T=35, 33 kolonies; T=60, 23 kolonies). De identiteit van alle kolonies werd bevestigd (PCR-positief), op twee kolonies na.

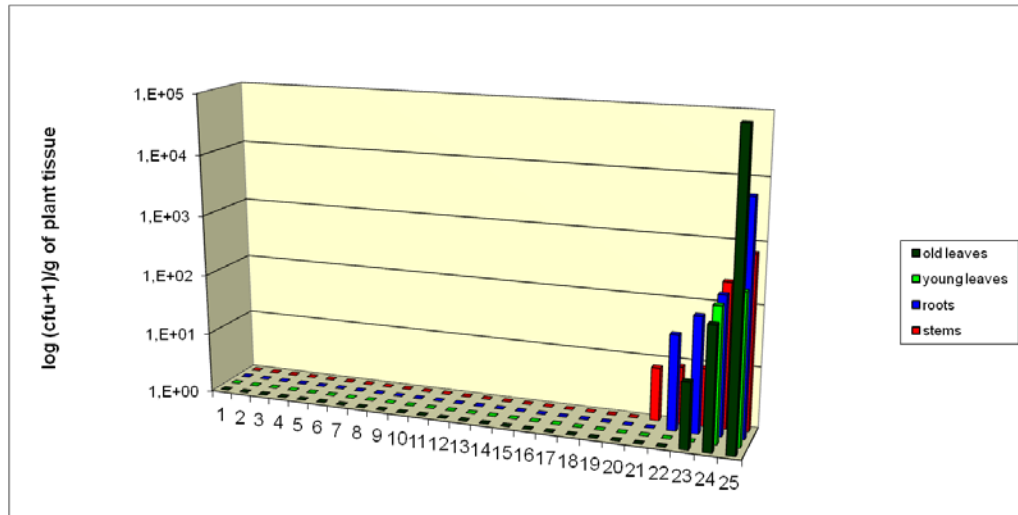
Planten met zware symptomen bevatten vaak ook hoge aantallen Cmm. Hoewel het m.n. op T=14 voorkwam dat in de kiembladen hoge aantallen Cmm werd gevonden, terwijl de planten verder symptoomloos bleven en ook in een later stadium niet of nauwelijks besmet waren.

Tabel 4. Verdeling van Cmm over de verschillende delen van tomaten planten (n=16) in een kasproef in 2010 (60 dagen na zaaien).

Monster	Aantal planten									Totaal
	6	1	1	2	1	2	1	1	1	
Jonge bladeren	+	+	+	-	-	+	-	-	-	10
Wortels	+	+	-	+	-	-	+	-	-	10
Stengels	+	+	+	+	+	-	-	+	-	12
Oude bladeren	+	-	-	-	+	-	-	-	-	7

Verspreiding tussen planten

Zestien dagen (T=16) na zaaien zijn er 30 planten opgekweekt uit Cmm-vrij zaad geplaatst in de plastic bakken met planten opgekweekt uit geïnfecteerd zaad; uit Cmm-vrij zaad werd telkens één Cmm-vrije plant bij twee planten uit besmet zaad geplaatst. In 2010 werden 16 dagen na zaaien, twee Cmm-vrije planten geplaatst naast een besmette plant in een bak met voedingsoplossing. Na 60 dagen waren 8 van de 25 aanvankelijk Cmm-vrije planten (32%) besmet met Cmm, waarvan 2 planten symptomen vertoonden (Figuur 12). Van de 25 planten was 20 % van de stengels, 16% van de wortels, 12% van het oude blad, en 8% van de jonge bladeren besmet. In 8 bloemstelen van deze planten werd geen Cmm aangetroffen.



Figuur 12. *Secundaire infecties van oud- en jong blad, wortels en stengels met Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm) (kasproef, 2010). Tomatenplanten werden gekweekt uit Cmm-vrij zaad en 16 dagen na zaaien in bakken met planten uit Cmm besmet zaad geplaatst. Dichtheden van 100.000 cfu per gram plantmateriaal en hoger zijn niet accuraat vanwege het overgroeien van platen.*

2.4 Discussie

Net als in 2009, is een zeer hoog percentage van de planten, gekweekt uit Cmm-besmet zaad besmet geraakt. Er vindt dus een efficiënte transmissie vanuit het zaad plaats. Een hoog percentage van de planten ontwikkelde ook (typische) ziektesymptomen zoals verwelking, kanker, bladnecrose en afsterving van planten. Ook in 2010 is Cmm niet in alle delen van besmette planten aangetoond. Hoewel de hoogste infectiepercentages werden gevonden voor de stengels, was het verschil in de incidenties klein. Bij primaire infecties, kunnen ook bladeren betrouwbaar bemonsterd worden.

Cmm-vrije planten die in bakken met besmette planten waren geplaatst konden al na 33 dagen ziekteverschijnselen vertonen. 32% van deze planten was besmet geraakt. De afstand tussen de planten in maakte contactbesmetting tussen blad onmogelijk. De verwachting was daarom dat de bacterie vooral via wortelcontact en voedingswater besmet zouden raken, maar de stengels hadden de hoogste infectie-incidentie. Dit kan een aanwijzing zijn voor een snelle en efficiënte systemische verspreiding in de plant na wortelinfectie. De aantallen planten zijn echter te klein om betrouwbare conclusies te trekken.

3. Experimenten 2011 'Horizontale distributie'

3.1 Inleiding

In 2011 werd vooral onderzoek gedaan naar de horizontale distributie van Cmm in secundair geïnfecteerde tomatenplanten. Hiervoor werden geïnfecteerde zaden gezaaid in pluggen en verspeend naar steenwolblokken. Planten gekweekt uit besmette zaden werden midden tussenplanten geplaatst gekweekt uit Cmm-vrije planten in een kasruimte met een eb-en vloed systeem. Per bemonsteringstijdstip (14, 38 en 60 dagen na zaaien) werd het materiaal van de aanvankelijk Cmm-vrije planten geanalyseerd als mengmonster en van planten uit geïnfecteerde zaden werden planten individueel bemonsterd.

Ook werden individuele zaden, van de geïnfecteerde zaadpartij die in 2008 geproduceerd was, opnieuw geanalyseerd.

3.2 Materiaal en Methoden

Opkweek plantmateriaal

In een standaard zaaitray (Cultilène, tempex, 240 gaats) zijn 80 niet-geïnfecteerde zaden gezaaid (14 x6) van de cultivar Clothide. De 4 zaden die in het centrum van de tray 4 zijn gezaaid, zijn tomatenzaden (F2 zaad van een F1 hybride, cv. Colby) die in 2009 geïnfecteerd waren met een spontane rifampicine stam van Cmm. Deze zaden zijn net als voorgaande jaren door Syngenta (Dr. B. Woudt) beschikbaar gesteld. Planten uit deze 4 zaden dienen als besmettingsbron voor de andere uit gezond zaad opgekweekte planten. Per kascompartiment zijn twee roltafels met een eb- en vloed systeem aangelegd. In totaal zijn er voor dit experiment 3 kascompartimenten in gebruik. Twee compartimenten zijn gevuld met de planten waaronder 4 uit geïnfecteerd zaad werden opgekweekt. Het derde compartiment diende als ziektevrije controle. Ook in het laatste compartiment is een tafel met een eb- en vloed installatie geplaatst en echter in dit geval zijn de planten allemaal opgekweekt vanuit gezond zaad.

Het water is bij dit experiment voorzien van voeding. Per tafel is een tray gezaaid in het bovenstaande schema. De zaailingen in de zaaitray hebben coördinaten gekregen, bestaande uit een letter en een cijfer. Dit is gedaan om ook in een later stadium deze coördinaten te kunnen hanteren om een vaste positie van de planten tijdens het experiment te garanderen.

De zaden zijn afgedekt met een laagje vermiculiet en zijn vervolgens enkele dagen afgedekt onder een plastic folie om de kieming te bevorderen. De zaaidatum was 29 april 2011. De zaaitrays zijn vervolgens in een plastic bak geplaatst waarin onderdoor water is gegeven. Voor het zaaien zijn de pluggen bevochtigd (Figuur 13). Na 7 dagen is voor het eerst water gegeven aan de zaailingen (6-5-2011) dit is in feite het eerste moment waarop horizontale verspreiding plaats heeft kunnen vinden. Planten zijn niet geënt.



Figuur 13. Zaaïen in schema volgens coördinaten in steenwolpluggen. Verspenen in steenwolblokken. Wijderzetten, uit geïnfecteerd zaad opgegroeide planten zijn met een rode steker gemarkeerd. Stokken en ringen van de jonge tomaten planten

Op 9-5-2011 zijn de zaailingen (pluggen) verspeend in Grodan ('Plantop') steenwolblokken. De coördinaten bestaande uit een letter en een cijfer zijn op de zijkant van de steenwolpotten geschreven met een watervaste stift. Bij het verspenen zijn de blokken tegen elkaar geplaatst. Als gevolg van het verspenen is geen uitval opgetreden. Wel is bij een van de trays één van de 4 geïnfecteerde zaden niet opgekomen. Dit plantje is niet ingeboet om het experiment niet te beïnvloeden. De plantjes opgegroeid uit geïnfecteerde zaden zijn gemarkeerd met een rode steker.

Op 25-5-2011 zijn de planten voor het eerst wijder gezet en hebben de planten water gekregen met het eb- en vloedsysteem. Op 27-5-2011 zijn de jonge planten voorzien van een stok en een ring. Bij het stokken en ringen is er mogelijk beschadiging van het wortelgestel (stok in de steenwol prikken) op getreden en intensief contact geweest met het gewas (ringen). Vervolgens zijn 31-5-2011 zijn de planten over de hele tafel verdeeld. Bij het uitvoeren van de handelingen zijn tussen de tafels handschoenen verwisseld en is een nieuwe jas aangetrokken.

De zaailingen zijn opgekweekt in een kas onder een voor tomaat gangbaar temperatuurregime, maar zonder belichting. De eerste 4 weken is een gemiddelde etmaal de temperatuur van 23 °C en een RV van 48% gerealiseerd. Vervolgens is vanwege te forse groei van het gewas de temperatuur teruggebracht naar 21°C en is de vernevelingsinstallatie bijgesteld, waarna een RV van 75% werd gerealiseerd.

Vanwege eerder genoemde goede groeiomstandigheden, bemesting en de lage incidentie van de symptomen hebben de planten zich dusdanig kunnen ontwikkelen dat de planten moesten worden getopt. De kop van de planten is er op 15-6-2011 uitgehaald omdat de planten dreigden om te vallen. Met een snoeischaar zijn de planten op de tafel teruggeknipt tot 40-50 cm lengte. De planten zijn per rij terug geknipt. Deze gewashandeling geeft kans op bovengrondse verspreiding. Tussen de tafels is de schaar ontsmet, zijn handschoenen en jassen vervangen. Er is bewust niet tussen de rijen ontsmet, om een praktijk situatie na te bootsen. Snoeiafval en bladresten zijn in de

daarvoor bestemde tonnen gestort. Planten hebben zich snel hersteld en het uitlopen van de okselknoppen heeft geleid tot planten met twee of drie stengels aan het einde van de proef.

Beoordeling symptomen

De symptomen zijn gedurende het experiment visueel vastgesteld, waarbij de planten om de 2-3 dagen zijn beoordeeld op het voorkomen van de symptomen. Ook de ontwikkeling van de symptomen in de tijd is gevolgd. Planten werden gelijk aan 2009 en 2010 geclassificeerd.

Bemonstering

Van de zaailingen in het tweeblad stadium zijn op T=14 mengmonsters genomen van de cotylen van alle planten gegroeid uit onbesmet zaad. De cotylen zijn per rij samengevoegd tot één bulkmonster. Echter, de cotylen van de planten uit besmette zaden werden als mengmonster per rij afzonderlijk bemonsterd. Per tafel leverde dat 14 monsters, van 6 cotylen. Deze samples zijn geëxtraheerd in BioReba een maalzakje. Bij het monsteren zijn per rij handschoenen verwisseld. Na elk plantje werd het schachtje in alcohol ontsmet.

Na 35 dagen is jong en oud blad bemonsterd. De bemonstering heeft uiteindelijk op 6-6-2011 (T=38) plaatsgevonden. Er zijn per plant zowel 2 jonge als 2 oude bladeren bemonsterd. De bladeren zijn wederom per rij gepooled tot één bulkmonster per rij. De jonge bladeren zijn eerst per rij bemonsterd, vervolgens de oude bladeren per rij en als laatste zijn de uit geïnfecteerd zaad opgegroeide planten bemonsterd.

Aan het einde van het experimenten zijn op 6-7-2011 zijn bulkmonsters genomen. Al het jonge blad, oude blad, alle stengels en de aanhangende wortels zijn afzonderlijk per rij (gepooled) bemonsterd.

Analyse plantmateriaal

Analyse zaden

In 2011 werden nogmaals 40 tomatenzaden ontvangen van Syngenta. De individuele zaden zijn in eppendorfbuisjes gedurende ca. 1 maand bewaard bij 4° C. Aan elk zaadje werd 500 µl PBST toegevoegd en overnacht bij 4° C geweekt. De zaden werden met een steriele scalpel kapot gesneden en uitgeplaat op SCM-fast + 25 µg/ml Rifampicine (onverdund, 10x en 100x verdund).

Overig plantmateriaal

Veertien dagen na zaaien werd één kiemblad genomen. Het gewicht werd bepaald. Per blad werd 3 maal het gewicht aan PBT toegevoegd. Plantmateriaal werd gehamerd in een plastic grip zakje. Verdunningen werden in PBT gemaakt en daarna uitgeplaat op SCM-fast+rif. Van het onverdunde extract werd 1 ml onverdund ingevroren in 1 ml eps voor controle met behulp van TaqMan.

Op de andere tijdstippen werden de monsters genomen, zoals is aangegeven in Figuur 5. Achtendertig dagen na zaaien werd plantmateriaal op identieke wijze verwerkt. Nu werd 2x het gewicht aan PBT toegevoegd. Op 60 dagen na zaaien werd 9x het gewicht aan PBT toegevoegd.

Kolonie-PCR

Op T=60 werden 11 kolonies van plantmateriaal gekweekt uit onbesmet zaad steekproefsgewijs gecontroleerd met PCR, waarvan 1 'Cmm look alike' (Souza Santos et al., 1997, primers 3,4).

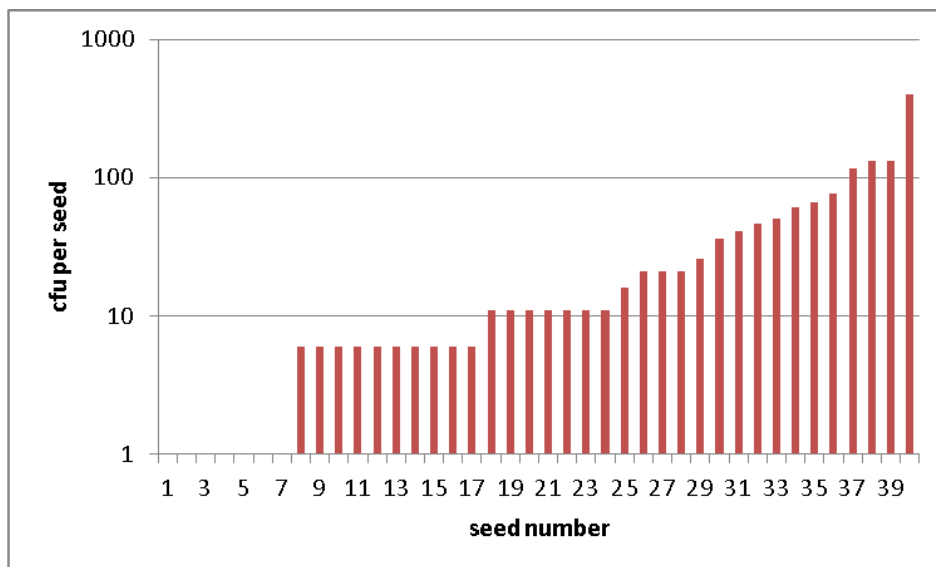
TaqMan-analyse plantmateriaal

Het plantmateriaal op T=60 dat afkomstig was uit Cmm-geïnfecteerd zaad werd ook geanalyseerd m.b.v. een TaqMan. DNA werd geïsoleerd m.b.v. een Bio-Nobile kit. Het DNA werd nagezuiverd op een PVPP kolom (in house protocol). De TaqMan werd uitgevoerd zoals beschreven door Berendsen et al. (2011), gebruik makende van de probe RZ_Ptssk 10 en de primers RZ_Ptssk 11 en RZ_Ptssk 12.

3.3 Resultaten

Analyse zaden

Het percentage geïnfecteerde zaden was gedaald van 100% in 2010 tot 87% in 2011 (Figuur 14). Ook de aantallen cfu per zaadje was t.o.v. 2010 gedaald, met gemiddeld een factor 10.



Figuur 14. Besmetting van tomatenzaden in 2011 met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (F2 zaad van een F1 hybride, cv. Colby, in 2009 geïnfecteerd met een spontane rifampicine stam van Cmm).

Symptoomontwikkeling

In Figuur 15 zijn de 3 kascompartimenten schematisch weergegeven. Afwijkende planten zijn gemarkeerd. Bij de beoordeling van de symptomen op 15-6-2011 zijn de planten beoordeeld in hun ongeknijpte hoedanigheid. De planten waren toen al fors en vertoonden in enkele gevallen lichte droogtestress. Een deel van de planten is daarom als mogelijk verwelkt gescoord. De planten die in Figuur 15 beoordeeld zijn met blauw hebben te leiden gehad onder droogtestress en gingen bij veel instraling slap, maar herstelden wel. De planten hadden veel bladmassa en verdampten zeer veel. Kascompartiment 2303 is het kasje met de meeste schaduw. Mogelijk is dit een verklaring voor het feit dat daar minder planten met droogtestress terug te vinden zijn dan in kascompartimenten 2301 en 2302 die tamelijk gelijk zijn. Ook lijkt het dat het zwaartepunt van de planten met droogtestress ligt aan de kant van de water in- en uitlaat. Dit is mogelijk te verklaren door het feit dat dit de kant van de buitengevel van de kascompartimenten is, waar iets meer zon en iets minder schaduw valt. Na het beoordelen van de planten op 15-6-2011 zijn deze terug geknipt. Slechts twee van de 420 planten kregen de beoordeling ernstige verwelking en bladsymptomen.

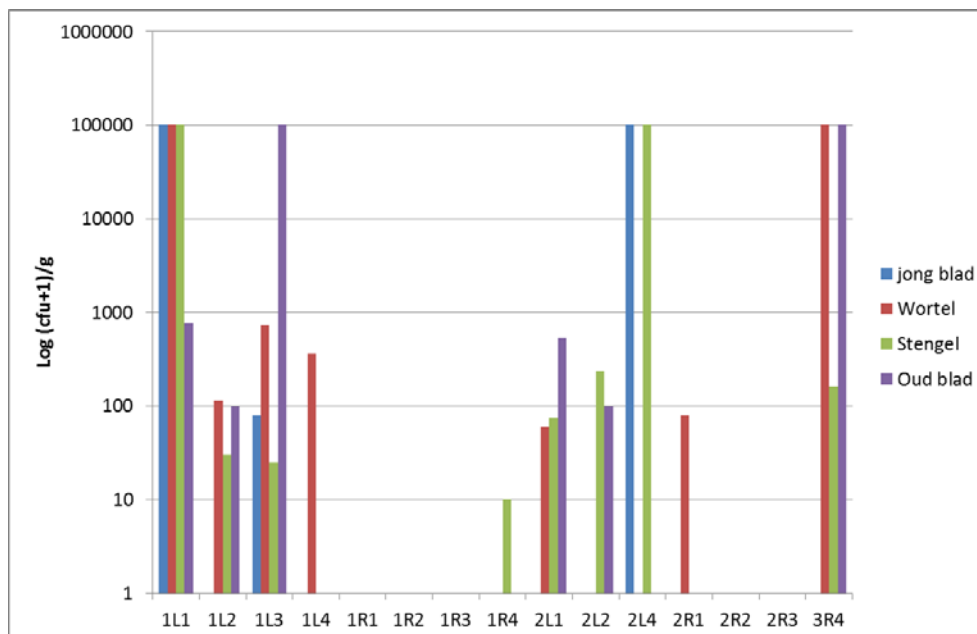


Figuur 15. Indeling van de drie kascompartimenten in 2011 en de symptomen 60 dagen na zaaien. Vier planten van geïnfecteerde zaden (rood omlijnd) werden geplaatst tussen planten van Cmm-vrije zaden. In het derde compartiment werden alleen planten van Cmm-vrije zaden opgekweekt.

Analyse monsters

In de mengmonsters van planten gekweekt uit Cmm-vrij zaad die bij planten gekweekt vanuit geïnfecteerde zaad stonden, werd op geen enkele bemonsteringstijdstip een infectie met Cmm gevonden. Ook in de kolonie-PCR werden op T=60 geen positieve reacties gevonden met kolonies die enigszins typisch leken (n=11).

Op T=14 werd in één van de 15 planten gekweekt uit besmet zaad een (zwaar) besmet kiemblad gevonden. Op T=38 kon in geen van de 15 planten CMM aangetoond worden. Op T=60 werd in 10 van de 15 planten Cmm aangetoond (67%), waarvan 6 met slechts een lichte infectie (< 1000 cfu/g) (Figuur 16). De kans op secundaire verspreiding lijkt daardoor zeer gering, met name vanuit planten op de rechterside van compartiment 1 (slechts 1 van de 4 planten was zeer licht besmet).



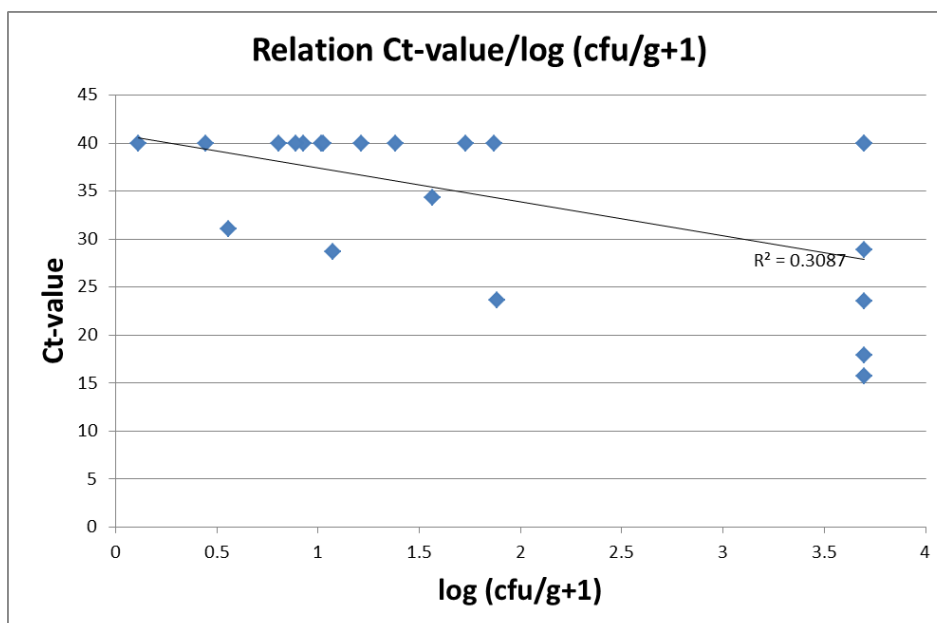
Figuur 16. *Besmetting van tomatenplanten met Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm), gekweekt uit Cmm besmette zaden 60 dagen na zaaien (kasproef 2011). Dichtheden van 100.000 cfu per g en hoger konden niet nauwkeurig worden vastgesteld door overgroei van platen.*

De verdeling van Cmm in planten gekweekt uit Cmm-besmet zaad was net als in 2010 grillig (Tabel 5). In 8 van de 15 planten was Cmm aanwezig in 1 of enkele delen van de plant maar niet in de totale plant. Slechts in 2 planten kon Cmm in alle delen van de plant teruggevonden worden. In de wortels werd in 7 (47%) van de monsters Cmm aangetroffen, de stengels in 8 (53%) in de jonge bladeren in 3 (20%) en in oude bladeren 6 (40%) (n=15). De onregelmatige verdeling was niet gebonden aan besmettingen met lage dichtheden. Met andere woorden, ook in planten waar sommige delen zwaar besmet waren, kwamen delen met lage dichtheden voor.

Tabel 5. *Verdeling van Cmm over de verschillende delen van tomaten planten (n=15) in een kasproef in 2011 (60 dagen na zaaien).*

Monster	Aantal planten							Totaal
	2	3	1	1	2	1	5	
Jonge bladeren	+	-	+	-	-	-	-	3
Wortels	+	+	-	-	+	-	-	7
Stengels	+	+	+	+	-	+	-	8
Oude bladeren	+	+	-	+	-	-	-	6

In de TaqMan assay kwamen veel vals-negatieve resultaten voor, slechts 8 van de 21 monsters die in de uitplaatmethode positief scoorden waren ook in de TaqMan positief (cut-off value Ct = 35) (Figuur 17).



Figuur 17. Relatie tussen uitplaatresultaten (in log cfu/g+1) en TaqMan resultaten (Ct-waarden) (Kasexperiment 2011, T=60, plantendelen van planten gekweekt uit geïnfecteerd tomatenzaad.

3.4 Discussie

Er is geen horizontale verspreiding van Cmm van geïnfecteerde planten naar Cmm-vrije planten aangetoond. Mogelijk was de infectiedruk te laag. Pas relatief laat in de plantontwikkeling werd transmissie van Cmm vanuit besmette zaden vastgesteld. Veertien dagen na kieming werd slechts in één van de kiembladen een besmetting gevonden. Verdere besmettingen in de planten konden na 60 dagen, maar niet na 38 dagen aangetoond worden. Mogelijk heeft het initiële besmettingsniveau van de zaden hier een relatie mee. De zaden in de Cmm-geïnfecteerde zaadpartij waren minder besmet dan in 2010. De incidentie was gedaald van 100% naar 87%. Ook de gemiddelde dichtheid per zaadje was gedaald met ca. een factor 10. Daar staat tegenover dat in 2010 ook zeer lage dichtheden (5-10 cfu per zaadje), besmette planten opleverden. In 2011 waren 5 van de 15 planten gegroeid uit besmet zaad niet besmet, terwijl op basis van de resultaten in 2010 verwacht mocht worden dat slechts 2 van de 15 planten negatief zouden blijven (13% van 15). Opvallend is dat er geen duidelijke relatie lijkt te bestaan tussen de (ernst van de) ziektesymptomen en de aanwezigheid van Cmm in de plant. In een plant aan de rechterkant van compartiment 1 met ernstige symptomen kon Cmm niet worden vastgesteld. Of dit aan de symptoombeoordeling, sub-sampling of aan de uitplaatmethode ligt, blijft onduidelijk.

De opkweek van de zaailingen is in veel opzichten vergelijkbaar geweest van die van 2010. Toch zijn er een aantal factoren anders geweest ten opzichte van 2010. In 2011 is geteeld op tafels, waarbij de planten conform de opkweek bij de plantenkweker naar behoefte water hebben gekregen via een eb en vloedstelsel. In 2010 hebben de planten voortdurend in een minimale waterfilm gestaan. In 2011 hebben de planten zeer waarschijnlijk te kampen gehad met waterstress. De planten waren in 2011 eigenlijk te groot geworden voor het steenwolblok. De waterbuffer in het steenwolblok was onvoldoende om de verdamping van het gewas in alle gevallen op te kunnen vangen bij veel instraling. De planten waren al zo groot dat ze al lang bij een teler op een mat hadden kunnen staan. Daarnaast stonden in 2010 de planten voortdurend in besmet voedingswater, waardoor de kans op (wortel)infectie hoog was. In het experiment van 2011 is er naar behoefte water gegeven. Per gietbeurt hebben de tafels zo'n 10-15 minuten volgestaan met water waarna de tafels weer zijn leeggelopen. De kans op verspreiding van de bacterie via het water is daarmee sterk gereduceerd. Dit kan verklaren waarom de secundaire verspreiding ten opzichte 2010 een stuk lager ligt, echter het verklaart niet waarom infecties in de planten opgegroeid vanuit geïnfecteerd zaad pas veel later aantoonbaar waren.

In 2011 is steeds voeding (standaard schema tomaat) gebruikt voor de opkweek van de zaailingen en de jonge planten. Hierdoor hebben de planten mogelijk een veel betere groei kunnen realiseren dan in 2010 toen gedurende het experiment schoon water zonder voeding is gegeven. Ook het weer en de tijd van het jaar kunnen een rol hebben gespeeld. Het experiment in 2011 is uitgevoerd in het voorjaar en met zeer mooi weer, hoge temperaturen en met veel instraling. In 2010 heeft het experiment in de maanden van augustus tot oktober gelopen. Ook was er in het experiment in 2010 sprake van veel algengroei in de bakken. Deze factoren hebben mogelijk geleid tot stressvolle omstandigheden voor de planten en daarmee een hogere vatbaarheid voor Cmm. In 2011 waren de groeiomstandigheden voor de tomatenplanten optimaal en planten zagen er dan ook robuust uit.

Vanwege eerder genoemde goede groeiomstandigheden, bemesting en de lage incidentie van de symptomen hebben de planten zich goed kunnen ontwikkelen. De daarbij behorende grote planten hebben voor een volle en vegetatieve plant gezorgd. Daardoor zijn de tafels erg vol geworden en zijn de planten wat gaan schieten. Daarom is er voor gekozen om de kop van de planten er uit te halen; de planten dreigden om te vallen. Met een snoeischaar zijn de planten op de tafel teruggeknipt tot 40-50 cm lengte. De planten zijn per rij terug geknipt. Deze gewas-handeling heeft geen extra verspreiding opgeleverd.

Bij de beoordeling van de symptomen op 15-6-2011 zijn de planten beoordeeld voor het knippen. De planten waren toen al fors en vertoonden in enkele gevallen lichte droogtestress. Een deel van de planten is daarom als mogelijk verwelkt gescoord. De planten die in Figuur 15 blauw gemarkeerd zijn hebben te leiden gehad onder droogtestress en gingen bij veel instraling slap hangen, maar herstelden wel. De planten hadden veel bladmassa en verdampten zeer veel. Kascompartiment 2303 is het kasje met de meeste schaduw. Mogelijk is dit een verklaring voor het feit dat daar minder planten met droogtestress terug te vinden zijn dan in kascompartimenten 2301 en 2302 die een gelijk lichtniveau en instraling hadden. Ook lijkt het dat het zwaartepunt van de planten met droogtestress ligt aan de kant van de water in- en uitlaat. Dit is mogelijk te verklaren door het feit dat dit de kant van de buitengevel van de kascompartimenten is, waar iets meer zon en iets minder schaduw valt.

De verdeling van Cmm in planten op $t=60$ was net als in 2010 onregelmatig. In de meeste planten was Cmm slechts in delen, maar niet in de gehele plant detecteerbaar. Cmm kwam het meest frequent in stengels en wortels voor en relatief weinig in de jong blad. Als de resultaten van 2010 en 2011 voor $t=60$ gecombineerd worden, zien we ook dat Cmm vaker in wortel en stengel wordt gedetecteerd dan in blad, terwijl er geen verschil tussen oud en jong blad wordt gezien (Tabel 6).

*Tabel 6. Overzicht van de infecties van plantendelen met Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm) van tomatenplanten gekweekt uit Cmm-besmet zaad (kasproeven 2009-2011).
(Weergegeven is het aantal positieve monsters/totaal aantal getoetste monsters en het percentage positieve monsters.)*

2009		2010			2011		
T=60		T=14	T=35	T=60	T=14	T=38	T=60
Kiemblad	Nd	38/57= 67%	15/30=50%	Nd	1/15=7%	Nd	Nd
Wortels	15/30=50%	Nd	25/30=83%	10/16=63%	Nd	0/15= 0%	7/15=47%
Stengels	18/30=60%	Nd	20/30=67%	12/16=75%	Nd	0/15= 0%	8/15=53%
Jong blad	7/30=23%	Nd	Nd	10/16=63%	Nd	0/15= 0%	3/15=20%
Oud blad	8/30=27%	Nd	21/30=70%	7/16=44%	Nd	0/15= 0%	6/15=40%

Van de 21 monsters die positief scoorden in de uitplaatmethode, waren er 13 negatief in een Cmm-specifieke TaqMan assay. Dit betekent dat de TaqMan assay nog niet gevoelig genoeg is voor directe detectie van Cmm in plantmateriaal. De lagere gevoeligheid wordt overigens niet veroorzaakt door PCR remmende stoffen in de gezuiverde DNA extracten. De Ct waarden van gespikete bladextracten waren even hoog als in Ringers (resultaten

niet getoond). Ook in 2010 was de gevoeligheid van de TaqMan assay lager dan die van de uitplaatmethode (resultaten niet getoond). De uitplaatmethode zal naar verwachting in dit onderzoek gevoeliger zijn dan in regulier diagnostisch onderzoek, vanwege het gebruik van een rifampicine resistente mutant .

Hoewel stengels en wortels de hoogste besmettingsincidenties hebben, zal vanuit praktisch oogpunt bemonstering van bladmateriaal een voorkeur hebben. De gemiddelde dichtheid in de besmette monsters verschilt niet significant voor de verschillende plantendelen. Bemonstering van oud of jong blad lijkt even efficiënt. Er is nog geen zicht op de verdeling van Cmm in planten na secundaire infectie. Er kan dus nog geen een betrouwbaar bemonsteringsadvies worden gegeven.

In de mengmonsters van planten gekweekt uit Cmm-vrij zaad die bij planten gekweekt vanuit geïnfecteerde zaad stonden, werd op geen enkele bemonsteringstijdstip een infectie met Cmm gevonden.

Literatuur

Chang, R.J., S.M. Ries & J.K. Pataky, 1991.

Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. Phytopathology 81, 1276-1281.

Krämer I. & E. Griesbach, 1995.

Use of ELISA for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato. EPPO Bulletin 25, 185-193.

Acknowledgement

Dit onderzoek is betaald door het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie (onderzoek 2009 en 2010 BO-06 005-001.17, Plantgezondheid, thema Fytosanitair Bèta, 'Verdeling en verspreiding van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in (jonge) planten'. Onderzoek 2011: OS project 'Bemonstering van symptoomloze tomatenplanten voor het aantonen van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*').

Dr. B. Woudt van Syngenta wordt hartelijk bedankt voor het leveren van de besmette zaden. Dr. M. Bergsma-Vlami en Dr. G. Hiddink worden bedankt voor hun commentaar op het verslag.

