

Mogelijkheden biologische bestrijding van Agrobacterium in Aster

J.P. Wubben en J.M. van der Wolf

© 2006 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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

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

PPO Publicatienr. 41111040



Projectnummer: 41111040

PT nummer: 11.818

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Business Unit Glastuinbouw

Adres : Linnaeuslaan 2a 1431 JV, Aalsmeer

Tel. : 0297 – 35 25 25

Fax : 0297 – 35 22 70

E-mail : jos.wubben@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Plant Research International

Adres : Bornsesteeg 65, 6708 PD Wageningen

Tel : 0317 - 47 60 24

Fax : 0317 - 42 31 10

E-mail : jan.vanderwolf@wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODEN	9
2.1 Isolaten.....	9
2.2 Medium en kweekmethoden.....	9
2.3 Laboratorium toets antagonisme.....	9
2.4 PCR toets identificatie	9
3 RESULTATEN	11
3.1 Karakterisering van <i>A. tumefaciens</i> isolaten	11
3.2 Antagonisme van <i>A. radiobacter</i>	11
4 CONCLUSIE EN DISCUSSIE.	15
LITERATUUR.....	17
BIJLAGE I HYGIËNEADVIES	19

Samenvatting

De bacterie *Agrobacterium tumefaciens* is de veroorzaker van wortelknobbel woekeringen bij vele plantensoorten. In de vermeerdering van Aster vormt deze bacterie een groot probleem. Moerplanten kunnen binnen vier weken na de aanvang van de stekproducten al wortelknobbels vertonen en deze planten zijn niet meer geschikt voor stekproductie. In 2002 en 2003 is een bronnenonderzoek uitgevoerd waarbij gezocht werd naar besmettingsbronnen van *A. tumefaciens* bij de vermeerdering van aster. Aan de hand van dit onderzoek is een hygiëne protocol opgesteld waarvan de uitwerking moet resulteren in een vermindering van de problemen. In de praktijk blijken de problemen ondanks de uitvoering van uitgebreide hygiëne maatregelen toch nog niet volledig beheersbaar. Er is behoefte aan aanvullende bestrijdingsmethoden. Voor de bestrijding van bacterieziekten bij planten zijn nauwelijks effectieve middelen beschikbaar. Een bijkomend probleem voor de bestrijding van *Agrobacterium* is dat aangetaste planten niet meer genezen kunnen worden maar dat alleen verdere verspreiding van aantasting voorkomen wordt. Een effectief bewezen methode voor de bestrijding van *Agrobacterium* in vele gewassen is de preventieve inzet van een biologische bestrijder *Agrobacterium radiobacter* K84. Doel van het hier beschreven project is vaststellen wat de mogelijkheden zijn voor de inzet van K84 voor de bestrijding van *A. tumefaciens* in aster. Hiertoe zijn meer dan 20 isolaten van *A. tumefaciens*, afkomstig uit aster, in vitro getoetst op gevoeligheid van K84. Het resultaat van deze toets was dat met uitzondering van één isolaat, er geen groeiremming van aster isolaten door K84 verkregen werd. Dit is een indicatie dat K84 voor de bestrijding van wortelknobbel bij aster weinig perspectief lijkt te hebben.

1 Inleiding

Schade door *Agrobacterium tumefaciens* in aster treedt vooral op in de vermeerdering. De start van de vermeerdering met uitgangsmateriaal uit schone weefselkweek lijkt hier weinig aan te veranderen. Na het opzetten van de nieuwe moederplanten in de vermeerdering treedt soms al na vier weken wortelknobbel op in de moederplanten. De knobbels bevinden zich op het bovengrondse materiaal op een snijvlak. De aangetaste partij kan niet meer gebruikt worden voor vermeerdering om risico van verspreiding door stek te voorkomen. Een partij moederplanten moet daarom sneller vervangen worden. De schade die vervolgens in de teelt kan optreden is deels afhankelijk van de teeltwijze. Indien meerdere stelen van een plant geogst worden is de kans op schade groter. Indien besmetting in de teeltfase optreedt dan kan dit een verminderde bloemproductie tot gevolg hebben.

Bestrijding van wortelknobbel aantasting is lastig. Wanneer knobbels gevormd worden, kunnen ze onbeperkt doorgroeien ook in afwezigheid van levende bacteriën. Met curatieve middelen kan alleen de verspreiding van de bacteriën voorkomen worden.. Het is dus altijd zaak om besmetting en aantasting te voorkomen bijvoorbeeld door hygiënische maatregelen of door de inzet van preventieve bestrijdingsmaatregelen.

In 2002 is door PPO glastuinbouw in samenwerking met Naktuinbouw een bronnenonderzoek uitgevoerd om inzicht te krijgen in de oorzaken van besmetting van *A. tumefaciens* in de vermeerdering van aster (Wubben et al 2003). Met behulp van een gevoelige toets werd bepaald of de bacterie aanwezig was in plantmateriaal, substraat, voedingsoplossing en teeltmaterialen zoals mesjes, plantentrays, en stekers. Aan de hand van de gevonden besmettingsbronnen is een advies opgesteld om besmetting van aster tijdens de vermeerdering en beworteling te voorkomen. Als onderdeel van dit onderzoek werden ook enkele infectieproeven uitgevoerd waarbij aangetoond werd dat kleine hoeveelheden van de bacterie al na 14 dagen zichtbare knobbel op de asterplanten lieten zien wanneer deze besmet waren na beschadigen van de plant. Het advies is dan ook vooral gericht op schoon werken (ontsmetten van teeltmaterialen) en het hanteren van een werkvolgorde waarbij risico op verspreiding van aantasting tot een minimum beperkt kan worden.

Naast preventieve hygiëne maatregelen is er de behoefte om te beschikken over een goede preventieve bestrijding van *A. tumefaciens* in de vermeerdering. Mogelijkheden voor bestrijding van bacterieziekten zijn beperkt. Chemische bestrijdingsmiddelen die bij de plant gebruikt kunnen worden zijn slechts beperkt beschikbaar. Deze middelen zouden tegen *A. tumefaciens* preventief ingezet moeten worden. Dit komt er in de praktijk op neer dat er geen bestrijdingen uitgevoerd worden. Biologische bestrijding biedt mogelijk meer perspectief. In verschillende landen, wereldwijd, wordt *A. tumefaciens* effectief bestreden met behulp van de biologische bestrijder *Agrobacterium radiobacter* K84. De werking van deze bacterie berust vooral op de productie van toxische stoffen (K84 agrocines) welke de groei van verschillende *Agrobacterium* stammen specifiek kunnen remmen. Daarnaast berust de werking van K84 mogelijk ook op een stuk voedselconcurrentie. K84 is wereldwijd een van de meest succesvol toegepaste biologische bestrijders. Niet alle stammen van *A. tumefaciens* kunnen bestreden worden met de gangbare stam van *A. radiobacter* (K84). Dit is afhankelijk van het type (biovar) *A. tumefaciens* dat voorkomt op een gewas.

Doelstelling(en) en afbakening:

Doelstelling van het onderzoek is om de mogelijkheden voor effectieve (biologische) bestrijding van *A. tumefaciens* in vermeerdering van aster te bepalen door inzet van *A. radiobacter* K84.

Om de effectiviteit van *A. radiobacter* (K84) tegen *A. tumefaciens* in Aster te bepalen wordt in eerste instantie in het laboratorium bepaald of K84 groeiremming van de Nederlandse Aster isolaten van *A. tumefaciens* kan veroorzaken. Wanneer deze resultaten positief uit zouden pakken is een proef op een vermeerderingsbedrijf gepland om de mogelijkheden van wortelknobbel bestrijding van aster in de praktijk vast te stellen.

2 Materiaal en methoden

Plan van aanpak:

Het oorspronkelijke voorstel is ingedeeld in twee fasen.

- I. In de eerste fase wordt de antagonistische werking van *A. radiobacter* stammen onder laboratorium omstandigheden bepaald tegen een selectie van *A. tumefaciens* isolaten afkomstig uit aster. Hierbij wordt de effectiviteit van de antagonistische werking bepaald.
- II. Bij een positief resultaat in fase I. wordt de effectiviteit van antagonistische *A. radiobacter* getoetst in de praktijk.

2.1 Isolaten

De gebruikte isolaten zijn beschreven in Tabel 1. Een collectie van 21 Nederlandse aster isolaten, 2 buitenlandse aster isolaten en een isolaat uit roos werd gebruikt.

2.2 Medium en kweekmethoden

A. tumefaciens werd in stand gehouden en voor de experimenten gekweekt op TYA (Brisbane and Kerr, 1983). Voor de bepaling van het biovar werd gebruik gemaakt van het Schroth medium (Schroth et al., 1965), dat selectief is voor biovar 1.

2.3 Laboratorium toets antagonisme

Voor het bepalen van de gevoeligheid van bacteriestammen voor *A. radiobacter* K84, werd gebruik gemaakt van de methode zoals die is beschreven door Penalver et al, (1994) en door Moore et al. (1988). Voor toetsing werden twee media gebruikt: het Agrobacterium MG medium (Moore et al, 1988) en Stonier's medium (Stonier, 1959). Bij deze toets wordt K84 samen met de te onderzoeken *A. tumefaciens* stam op een schaal gekweekt. Een zone van groeiremming rond K84 is een indicatie van de gevoeligheid van de toetsstam voor *A. radiobacter* K84.

2.4 PCR toets identificatie

Met behulp van een zogenaamde PCR toets is het mogelijk om op basis van DNA van de bacterie vast te stellen of het *A. tumefaciens* betreft op niet. PCR-amplificatie voor identificatie van *A. tumefaciens* werd uitgevoerd met de Sawada primers volgens Sawada et al. (1995) en met de CYT primers volgens Haas et al. (1995).

3 Resultaten

3.1 Karakterisering van *A. tumefaciens* isolaten

Een collectie van 21 *A. tumefaciens* isolaten van de aster afkomstig uit Nederland, 2 buitenlandse aster isolaten en een *A. radiobacter* stam (C58), waarvan bekend is dat deze gevoelig is voor stam K84, werden gekarakteriseerd met verschillende technieken. In het verleden waren een deel van de stammen al gekarakteriseerd m.b.v. biochemische toetsen (kalkomzetting, 3-ketolactose productie) en m.b.v. pathogeniteitstoetsen op tomaat en *Nicotiana*. Tijdens dit project werden de complete collectie verder geanalyseerd m.b.v. PCR technieken, gevoeligheid voor K84 en groei op het Schroth medium, dat selectief is voor Biovar1.

De resultaten zijn samengevat in tabel 1. De meeste aster isolaten zijn biovar 1. Slechts vier van de Nederlandse stammen zijn mogelijk biovar 2; deze groeien niet op het Schroth medium en zijn ook 3-ketolactose negatief. De aster isolaat uit Israël (1528) was PCR-negatief en is mogelijk haar virulentie kwijt geraakt. De CYT primers reageren met meer isolaten dan de Sawada primers. Dit komt overeen met voorgaande evaluaties van deze primer sets. Slechts één van de vijf isolaten (2020-2024), die recent zijn geïsoleerd vanuit Nederlandse asters, was positief in PCR. Mogelijk zijn de stammen die negatief waren in de PCR niet-pathogene *A. radiobacter* isolaten, die ook op de selectieve media voor *A. tumefaciens* groeien.

3.2 Antagonisme van *A. radiobacter*

Resultaten van de toetsing van de aster isolaten van *A. tumefaciens* voor de gevoeligheid t.o.v. K84 agrocines (isolaat IPO1406) zijn samengevat in tabel 1. De positieve controle (isolaat 1466=C58) is op zowel het Stoniers als het MG medium gevoelig voor K84 (Fig. 1). Verder is isolaat 1757 zwak positief (kleine remmingszone) op het MG medium, maar niet op het ST medium.

Tabel 1. Resultaten van de toetsing van de aster isolaten van *A. tumefaciens*. De eerste kolom (A.tum) geeft het isolaatnummer weer. Onder herkomst staat het land van herkomst en het gewas waaruit deze bacterie geïsoleerd is. Groeiremming als gevolg van K84 is bepaald op MG en op ST medium en de remmingszone is weergegeven in mm.

A.tum	Herkomst	Groei op medium		remming	MG	ST	Opm.
		MG ¹⁾	ST ²⁾				
1415	Nederland, Aster	+	+	-			
1416	Nederland, Aster	+	+	-			
1421	Nederland, Aster	+	+	-			
1422	Duitsland, Aster	+	+	-			
1423	Nederland, Aster	+	+	-			
1425	Nederland, Aster	+	+	-			
1466	Onbekend	+	+	+	4.3	5	isolaat C58
1472	Spanje, Roos	+	+	-			Biovar 2
1528	Israël, Aster	+	+	-			
1612	Nederland, Aster	+	+	-			
1614	Nederland, Aster	+	+	-			
1615	Nederland, Aster	+	+	-			
1617	Nederland, Aster	+	+	-			
1757	Nederland, Aster	+	+	+ (op MG)	1.5	-	
1791	Nederland, Aster	-	-	-			
1792	Nederland, Aster	-	-	-			
1793	Nederland, Aster	-	-	-			
1795	Nederland, Aster	+	+	-			
2020	Nederland, Aster	+	+	-			PPO
2021	Nederland, Aster	+	+	-			PPO
2022	Nederland, Aster	-	-	-			PPO
2023	Nederland, Aster	-	-	-			PPO
2024*	Nederland, Aster	-	-	-			PPO

* = *A. radiobacter*

- 1) = *Agrobacterium* MG medium (Moore et al, Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria)
- 2) = *Agrobacterium* Stoniers's medium (Stonier, J. of Bacteriology 72, 259)

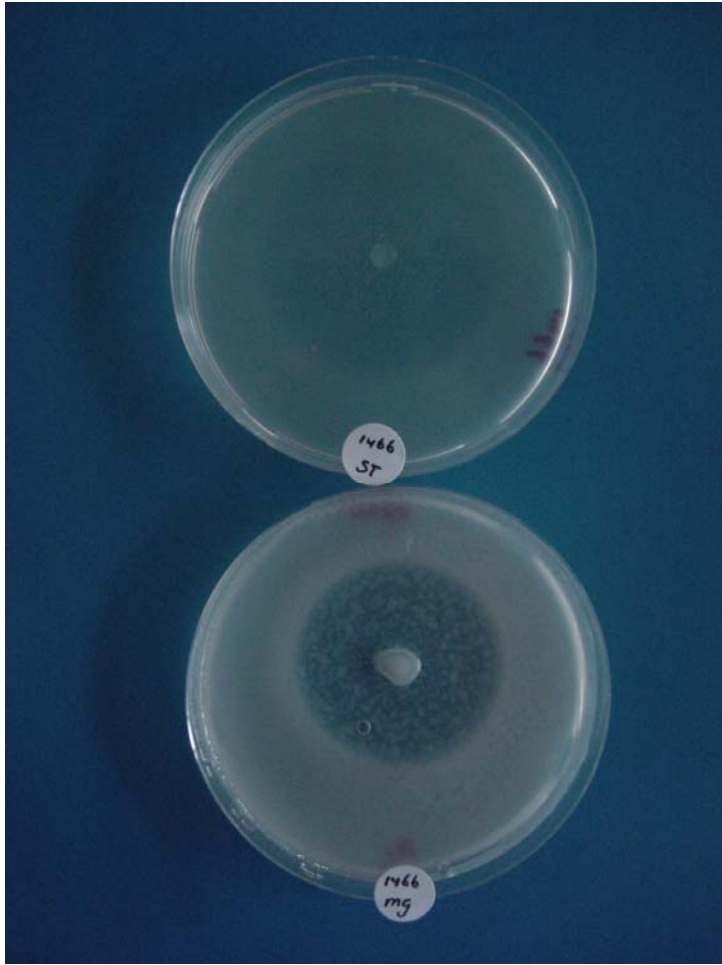


Fig. 1. Gevoeligheid van stam 1466 (C58) voor *A. radiobacter* K84, getoetst op het MG en het Stoniers (ST) medium. De groeiremmingszone rond K84 wordt veroorzaakt door de productie van agrocine K84.

4 Conclusie en discussie.

Geconcludeerd kan worden dat op één na alle aster isolaten ongevoelig zijn voor *A. radiobacter* K84. Dit geldt zowel voor de biovar 1 isolaten, als voor de isolaten die vermoedelijk biovar 2 zijn. Een effectieve inzet van K84 voor de beheersing van *A. tumefaciens* in de asterteelt lijkt daarmee niet waarschijnlijk. Het onderzoek was opgesteld in twee fasen waarbij de gevoeligheidstoets de eerste fase behelsde en een effectiviteitproef in de praktijk de tweede fase. Voorwaarde voor het opstarten van de tweede fase was een positief resultaat in de eerste fase. De resultaten van de in vitro proeven (eerste fase) zijn onvoldoende een aanvang te maken met de effectiviteitproeven (no go).

Zoals in de inleiding aangegeven is berust het mechanisme van K84 niet alleen op de werking van (twee verschillende) agrocines, maar ook op de competitie voor nutriënten. Competitie voor nutriënten kan niet aangetoond worden met de toetsmethode die in dit onderzoek uitgevoerd is.

De problematiek van *Agrobacterium* bij aster zal voorlopig via hygiënische maatregelen beheersbaar gemaakt moeten worden. Als onderdeel hiervan zou het regelmatig monitoren van vermeerderingsbedrijven op de aanwezigheid van *A. tumefaciens* een belangrijke rol kunnen spelen. Op basis van de uitkomsten van het monitoren kunnen steeds gericht hygiëne maatregelen genomen worden. Binnen deze beheersingsstrategie past ook de inzet van nieuwe bactericide middelen voor het uitwendig ontsmetten van plantmateriaal en gereedschappen. Verder zou moeten worden gezocht naar effectieve middelen of microorganismen die in de plant aanwezig populaties van *A. tumefaciens* kunnen reduceren. Tijdens het stekken kunnen deze verse wondvlakken infecteren.

Advies voor de beheersing van *Agrobacterium* in aster blijft voor het grootste deel dus afhankelijk van schoon uitgangsmateriaal en hygiënisch werken. Op basis van eerder onderzoek en recente monitoring is het beeld ontstaan dat de moederplanten en het teeltsysteem bij aanvang van de stekproductie schoon zijn maar dat er gedurende de stek productie en het stek snijden incidentele besmettingshaarden ontstaan die vervolgens snel voor verspreiding van aantasting kunnen zorgen. De bron van deze besmettingshaarden zijn vaak onduidelijk. Door hygiëne maatregelen zoals bijvoorbeeld ontsmetten van mesje en een vast werkvolgorden kan risico van verspreiding vanuit een besmettingsbron beperkt gehouden worden. Als bijlage is ter aanvulling nogmaals een hygiëne advies toegevoegd waarmee risico beperkt kan worden gehouden.

Algemene informatie over hygiënemaatregelen is te vinden in de brochure ontsmetting van teeltsystemen bij potplanten (Wubben et al 2003) en in een bedrijfshygiëne-strategie potplanten welke door DLV Adviesgroep opgesteld is in samenwerking met Naktuinbouw, PD, PPO en de landelijke commissie Begonia van LTO groeiservice. In dit leaflet is een Checklist bedrijfshygiëne opgenomen welke ook voor de vermeerdering van Aster van toepassing kan zijn.

Literatuur

Brisbane, P.G. and Kerr, A. 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 425-431.

Haas, J.H., Moore, L.W., Ream, W. and Manulis, S. (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2879-2884.

Moore, L.W., Kado, C.I. and Bouzar, H. (1988). II Gram-Negative Bacteria A. *Agrobacterium*. In: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2nd Edition. (Schaad, N.W., ed.). APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota.

Penalver, R., Vicedo, B., Salcedo, C.I., Lopez, M.M. (1994) *Agrobacterium radiobacter* strains K84, K1026 and K84 Agr produce an antibiotic-like substance, active *in vitro* against *A. tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. *Biocontrol Science and Technology* 4, 259-267.

Sawada, H., Ieki, H., Matsudi, I. (1995) PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 828-831.

Schroth, M.N., Thompson, J.P. and Hildebrand, D.C. 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*-*A. radiobacter* group from soil. *Phytopathology* 55, 645-647.

Stonier, T. (1959) *Agrobacterium tumefaciens* Conn II. Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology* 79, 889-898.

Verberkt, H., Lukassen I. (2004) *Bedrijfshygiëne strategie potplanten. Inclusief Checklist bedrijfshygiëne*. Uitgave van DLV Adviesgroep

Wubben, J.P., Hazendonk, A., Lanser, C., & Hooftman, R. (2003) *Bronnenonderzoek Agrobacterium in aster*. Rapport PPO glastuinbouw.

Bijlage I Hygiëneadvies

Het hygiëneprotocol voor *Agrobacterium* in aster is enerzijds gericht op het minimaliseren van de kans op aanvangsbesmettingen en anderzijds op het beperken van verspreiding van aantasting of eventueel isoleren en verwijderen van een besmetting. Het advies is algemeen van aard. Afhankelijk van de bedrijfssituatie kunnen aanvullingen noodzakelijk zijn.

Uitgangsmateriaal

Plantmateriaal. Uitgangsmateriaal voor de moerplanten afkomstig van weefselkweek is over het algemeen vrij van ziekteverwekkende bacteriën. 100 % garantie is er echter niet. Dit is mede afhankelijk van de methode waarop de weefselkweek opgezet is en de selectie die hiervoor gehanteerd wordt. Visueel controleren van het startmateriaal en het laten controleren (steekproef) op *Agrobacterium* met behulp van moleculaire technieken verdient aanbeveling. Indien er bij de opzet van moerplanten uitgangsmateriaal gebruikt wordt dat afkomstig is van grondteelt dan is er een grotere kans op besmetting van het moerplanten sortiment met *Agrobacterium*.

Teeltsysteem

- Teelt tafels
- Watergeefstelsysteem (druppellaars etc)

Teelttafels en watergeefstelsysteem bij teeltwisseling zijn risicovolle besmettingsbronnen. Bij teeltwisseling moet al het oude plantmateriaal verwijderd op ontsmet worden en moeten teelttafel, irrigatiesysteem en mogelijk kasopstanden ontsmet worden. Ontsmetten door verhitting (stomen met een minimale temp van 60 C) of met toegelaten en effectieve ontsmettingsmiddelen is noodzakelijk.

Teeltsubstraat

- Vb steenwol, puim, potgrond, grond

Nieuw steenwol is vrij van ziekteverwekkers.

Nieuwe gecertificeerd potgrond is over het algemeen vrij van ziekteverwekkers.

Bij hergebruik van grond of substraat dan zal dit bij de opzet van een nieuwe partij moerplanten ontsmet moeten worden, bijvoorbeeld door stomen.

Water

- Uitgangswater
- Gietwater
- Drainwater

Kans op besmetting en verspreiding van aantasting door het voedingswater is groot. Met name recirculatiewater vormt een groot risico. Regelmatig bemonsteren van het water op aanwezigheid van *A. tumefaciens* is aanbevolen. Bij aantoonbare besmetting van het water moet het ontsmet worden door verhitting of UV behandeling. Afhankelijk van de bron van het uitgangswater dient ook hier rekening gehouden te worden met mogelijke besmetting. *Agrobacterium* kan vrij voorkomen in grond. Gronddeeltje kunnen vaak eenvoudig in een waterbassin terecht komen en hiermee ontstaat ook de kans op besmetting. Analyse van het water kan hier uitsluitsel over geven.

Teeltmateriaal

- Stekmesjes
- Handen
- Kleding / schoenen
- Transportkarren / machines / fust etc

Al de materialen en handelingen die tijdens de productie in aanraking komen met plantmateriaal (en met name wonden van plantmateriaal) vormen een risico voor de verspreiding van aantasting. Veelvuldig ontsmetten van de materiaal, aanhouden van een strikte werkvolgorde (vb van jong naar oud, van gezond naar besmet) en het regelmatig ontsmetten tussen partijen (die zo klein mogelijk gehouden worden)

voorkomen verspreiding van aantasting. Met name het steksnijden is zeer risicovol. Wanneer stek van een besmette plant (die niet altijd symptomen hoeft te vertonen) gesneden wordt en hetzelfde mes wordt vervolgens gebruik voor het snijden van een nog niet besmette plant dan is de kans op verspreiding van de aantasting zeer groot. Zelf bij zeer kleine aantallen van de bacterie vindt verspreiding van aantasting plaats. Aangetaste planten moeten zorgvuldig verwijderd worden (in een aparte rondgang) waarbij de plant onmiddellijk ingepakt afgevoerd wordt. De kans is groot dat bij het zichtbaar worden van aantasting dat omliggende planten in dezelfde partij eveneens besmet zijn. Verwijder deze eveneens of behandel deze als potentieel besmet.