



# Eindrapportage Onderzoek Wortelverdikking

Juli 2003

Groen Agro Control  
Distributieweg 1  
2645 EG Delfgauw

## COLOFON

Auteur: Dr. Ir. C.M. Santegoeds  
Groen Agro Control  
Distributieweg 1  
2645 EG Delfgauw

Telefoon: +31-15 2572511  
Telefax: +31-15 2572522  
E-mail: [info@agrocontrol.nl](mailto:info@agrocontrol.nl)

Projectnummer: 2003044  
Datum: 31 juli 2003  
Titel Rapport: Onderzoek Wortelverdikking  
Opdrachtgever: Productschap Tuinbouw  
Contactpersoon PT: J.W. Donkers  
Kernwoorden: DW-bacterie, wortelverdikking, komkommer, FISH

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

## **Voorwoord**

In dit eindrapport is het “Onderzoek wortelverdikking” beschreven. Het onderzoek werd uitgevoerd vanaf oktober 2001 tot juli 2003 en is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw. Het PT-projectnummer is 10.908.

Dit rapport is geschreven op basis van de tussenrapporten van augustus 2002 en januari 2003, waarbij aanvullingen op de relevante onderdelen zijn gemaakt.

## Samenvatting

### Resultaten van het huidig onderzoek

#### Opkweek van DW-bacterie

Het onderzoek naar de eigenschappen van de dikke wortel (DW) bacterie zou zeer sterk vereenvoudigd worden als de bacterie op een kunstmatig medium opgekweekt zou kunnen worden. In het eerste deel van het onderzoek is dus nagegaan of er opkweekmethoden beschikbaar zijn voor de wortelverdicker. Moleculair onderzoek heeft aangetoond dat het DNA van de bacterie verwant is aan *Pseudomonas pickettii* of tewel *Burkholderia* (zoals de bacteriegroep tegenwoordig wordt genoemd). Op basis hiervan is literatuuronderzoek uitgevoerd en is contact gezocht met ter zake deskundigen. Naar aanleiding van de literatuur en informatie van de deskundigen zijn verschillende media getest voor het isoleren van de mogelijke wortelverdicker. In eerste instantie leken bepaalde media te voldoen, maar na meerdere overentingen bleek de DW-bacterie te verdwijnen (op basis van DNA-profiel) en ook het vermogen om wortelverdikking op te roepen met de kweek verdween. Er zijn geen opkweekmedia gevonden waarmee de DW-bacterie geïsoleerd kan worden. Wel is uit het onderzoek gebleken dat de DW-bacterie gestimuleerd wordt door de aanwezigheid van grondextracten. De DW-bacterie komt (ten tijde van het onderzoek) echter niet voor in de grond die gebruikt is op verschillende bedrijven waar wortelverdikking in het verleden is opgetreden.

#### Zichtbaar maken van DW-bacterie in water en op wortels

In het tweede deel van het onderzoek wordt met behulp van de moleculaire methode FISH (Fluorescerende In Situ Hybridisatie) de bacteriepopulatie in de wortels en in het besmette water in beeld gebracht. Deze techniek is gebaseerd op het zichtbaar maken van de genetische code van de bacteriën door middel van fluorescentie: de aanwezigheid van de DW-bacterie is te herkennen door oplichten van de bacterie onder de microscoop. Naast de eerder ontwikkelde fluorescerende probe zijn tijdens dit onderzoek twee nieuwe probes ontwikkeld. Met een van de nieuwe probes kan een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen de microbiële populatie van besmet en onbesmet water. Met behulp van deze probe is het mogelijk om een grove schatting te maken van de concentratie van de DW-bacterie in water, zodat een verband tussen het aantal bacteriën en de besmettelijkheid van het water gelegd kan worden. Het blijkt dat besmet drainwater na  $10^4$  maal verdunnen nog wortelverdikking kan veroorzaken. Een schatting van het aantal DW-bacteriën in deze verdunning onder proefomstandigheden is 800 bacteriën per ml. Met behulp van een nieuwe PCR techniek, de real time PCR, zal in de toekomst een betere kwantificatie van praktijkmonsters gemaakt kunnen worden. Met de drempelwaarde uit het onderzoek krijgen telers een duidelijker beeld van de besmettelijkheid van hun geanalyseerde monsters.

Dunne coupes (10  $\mu\text{m}$  dik) van gezonde en zieke wortels zijn geanalyseerd met algemene probes (voor bacteriën in het algemeen) en probes die specifiek zijn voor de DW-bacterie. De eerder ontwikkelde probe voor de DW-bacterie gaf geen goede resultaten. Verder onderzoek is met de nieuw ontwikkelde probes uitgevoerd. Het gebruik van deze nieuwe probes voor analyse van wortelcoupes wordt echter bemoeilijkt door fluorescentie van het plantmateriaal, waardoor het ziekteverloop in de wortels dan ook niet in beeld gebracht kon worden.

### Aanwezigheid levende DW-bacterie en DNA na ontsmetting

In het derde deel van het rapport zijn op laboratoriumschaal de ontsmettingsmethoden voor DW besmet water beschreven en onderzocht. Chloor en UV-ontsmetting werken het meest effectief. In het water worden na deze behandelingen geen levende bacteriën meer aangetoond, ook al is het DW DNA nog wel enkele dagen na ontsmetting detecteerbaar.

## **Gehele onderzoek wortelverdikking**

### Praktische aspecten

Wortelverdikking wordt veroorzaakt door een bacterie, de aantasting wordt dus overgedragen door besmetting. Wortelverdikking treedt niet op zonder de aanwezigheid van de DW-bacterie (DNA-monitoring). Is de bacterie aanwezig dan spelen omstandigheden als pH een belangrijke rol. De mate waarin de aantasting zich ontwikkeld is mede afhankelijk van de groeiomstandigheden: zo treden bij lage pH (< 5.5) geen verschijnselen op en grondextracten leveren een verheviging van de aantasting op. Andere omstandigheden hebben geen meetbare invloed op de wortelverdikking: zoals EC, concentratie van ammonium en bicarbonaat (buiten hun pH-invloed), zuurstof en nitriet. De wortelverdicker is af te doden met behulp van bactericiden en algemene ontsmettingstechnieken (oxidatiemiddelen, UV, temperatuur). Bactericiden mogen in de praktijk niet gebruikt worden omdat humane pathogenen daardoor mogelijk resistentie kunnen opbouwen.

De enige manier om de infectie te verlagen of te elimineren is een monitoringprogramma waar hygiënische maatregelen en DNA-monitoring onderdeel van uit maken. Er zijn hygiënische maatregelen voor de praktijk ontwikkeld die de kans op besmetting met de DW-bacterie verkleinen. Met behulp van een DNA-test kunnen lage concentraties van de wortelverdicker in een vroeg stadium aangetoond worden. Het geheel van hygiënische maatregelen en analyses is in een monitoringmethode opgenomen. Met het monitoringprogramma is de wortelverdikking in de praktijk tot staan gebracht.

Mogelijke nieuwe ontwikkelingen met aanvullende waarde voor de praktijk is de ontwikkeling van real time PCR, waarmee concentraties wortelverdicker in praktijkmonsters te bepalen zijn.

### Wetenschappelijke aspecten:

De wortelverdikking is een bacteriële aandoening die veroorzaakt wordt door een Gram negatieve bacterie. Tot op heden is geen artificieel medium bekend waarmee de bacterie is op te kweken tot een reincultuur. Nieuw ontwikkelde media op basis van wortelextracten of -exudaten leveren ook geen kweekmethode op. Wel is een gedeelte van de DNA-sequentie van de desbetreffende bacterie bepaald en zijn primers en probes ontwikkeld. Het precieze verloop van de ziekte is nog niet duidelijk, ondanks alle nieuwe technieken die zijn toegepast. Fundamenteel onderzoek aan onder andere de FISH analyse zelf is vereist om meer inzicht in het ziektebeeld te verkrijgen, hetgeen te omvangrijk is om binnen dit project uit te voeren.

## Inhoudsopgave

Voorwoord	.....	1
Samenvatting	.....	2
1. Inleiding	.....	5
2. Literatuuronderzoek	.....	6
3. Gesprekken met deskundigen	.....	7
4. Experimenteel onderzoek	.....	9
4.1. Opkweekmethoden voor Burkholderia en Pseudomonas bacteriën	.....	9
4.2. FISH onderzoek	.....	19
4.3. Optimaliseren van controle en hygiëne maatregelen in praktijk	.....	25
5. Vervolgonderzoek	.....	33
6. Literatuur	.....	34

## 1. Inleiding

Uit eerder onderzoek door Groen Agro Control is gebleken dat wortelverdikking bij tomaat, komkommer en paprika een bacteriële oorzaak heeft. Het opkweken van de besmettelijke bacterie bleek echter niet mogelijk te zijn met de bekende media voor bacteriën. Wel is door Groen Agro Control een moleculaire methode ontwikkeld waarmee de veroorzaker van de wortelverdikking al in een vroeg stadium, op een gevoelige en snelle wijze aangetoond kan worden, zowel in wortels als in water. Met deze methode (door het vroegtijdig ingrijpen) kan een aantasting worden voorkomen.

Uit praktijkmetingen blijkt dat de DW-bacterie incidenteel (ook in 2002 en 2003) en verspreid over een aantal plantenkwekerijen voorkomt. Hieruit volgt dat de bacterie niet afkomstig is van één besmettingshaard maar waarschijnlijk algemeen in de omgeving voorkomt. Hieruit kan afgeleid worden dat ook in de toekomst besmettingen van wortelverdikking kunnen plaats vinden.

Bij wortelverdikking blijkt één DNA sequentie altijd aanwezig te zijn. Deze sequentie is geanalyseerd en vergeleken in een DNA database. Het betreft een sequentie van een bacterie verwant aan de bacterie *Pseudomonas*, tegenwoordig ook bekend onder de naam *Burkholderia*. De sequentie is gebruikt voor de specifieke detectie methode van wortelverdikking en tevens voor de ontwikkeling van een specifieke probe met fluorescentie-label voor FISH analyse.

In dit verslag is het onderzoek vanaf oktober 2001 beschreven, het literatuuronderzoek, de gesprekken met deskundigen en de proeven. Ten opzichte van de tussenrapporten van maart 2002 en januari 2003 zijn de hoofdstukken 4 en 5 aangevuld met extra informatie verkregen uit het onderzoek van de afgelopen maanden.

Met behulp van literatuuronderzoek en gesprekken met deskundigen wordt getracht meer achtergrond informatie te winnen over de DW-bacterie om zo methoden te ontwikkelen voor de isolatie van de DW-bacterie. Uitgebreide DNA analyses worden uitgevoerd om meer duidelijkheid te scheppen over de herkomst, de verspreiding en besmettelijkheid van de DW-bacterie. En onderzoek naar ontsmettingmethoden zullen de controle en hygiënemaatregelen op de bedrijven moeten verbeteren.

## 2. Literatuuronderzoek

Via het internet en de bibliotheken van de universiteiten Delft en Wageningen is een zoekopdracht geplaatst naar vakliteratuur over de bacterie *Burkholderia* en *Pseudomonas*, met name betrekking hebbend op de rhizosfeer van planten. De zoekopdracht leverde meerdere artikelen en proefschriften op die vervolgens bestudeerd zijn. In de literatuuropgave is een selectie van deze artikelen weergegeven (1-22).

De belangrijkste conclusies met betrekking tot de *Burkholderia/Pseudomonas* groep zijn:

- de groep is erg divers, de bacteriën hebben verschillende metabolismen en komen voor in verschillende ecosystemen (grond, water, rhizosfeer van planten)
- de groep bevat zowel plantpathogene als humaan pathogene bacteriën
- enkele species uit de groep worden zelfs als biomiddel (antagonist) gebruikt tegen plantpathogenen

Uit de literatuur bleek tevens dat met name één groep in Nederland zich bezig houdt met onderzoek naar deze groep bacteriën, de groep van Prof. Lugtenberg in Leiden. Met deze groep is contact gelegd voor het uitwisselen van informatie (zie volgend hoofdstuk).

In de literatuur is tevens gekeken naar diverse opkweekmedia voor *Burkholderia/Pseudomonas*-achtige bacteriën om zo mogelijkerwijs de DW-bacterie te isoleren. Er zijn verschillende media gevonden (19, 20, 21, 22) die getest zijn.



### 3. Gesprekken met deskundigen

Op basis van voorgaande literatuurstudie over *Burkholderia* en *Pseudomonas* bacteriën via het internet en de bibliotheken van de universiteiten Delft en Wageningen zijn de volgende deskundigen opgespoord en geraadpleegd.

#### Prof. Dr. Lugtenberg, Instituut Moleculaire Plantkunde, Universiteit Leiden

De groep van Prof. Lugtenberg houdt zich bezig met rhizosfeer microbiologie. Zij bestuderen op moleculair niveau de microbiologische controle van plantenziekten. Voor het onderzoek worden met name *Pseudomonas* bacteriën gebruikt. Hun kennis op het gebied van deze bacteriën en het wortelmilieu is groot. De groep van Lugtenberg werd daarom geraadpleegd over mogelijke isolatie methoden voor de DW-bacterie. De volgende media zijn voor het opkweken van de DW-bacterie voorgesteld:

- King's medium B voor *Pseudomonas* bacteriën
- Bacto *Pseudomonas* Isolation Agar, een algemeen medium voor *Pseudomonas*
- 2 isolatiemedia voor het opkweken van *Pseudomonas cepacia* bacteriën

Deze opkweekmedia worden door Groen Agro Control getest om isolaten uit gezond en besmet plantenmateriaal te verkrijgen. Op basis van de resultaten van deze proeven werd verder contact gelegd met deskundigen (o.a. van het NCCB, The Netherlands Culture Collection for Bacteria) op symposia en bijeenkomsten, maar geen van de desbetreffende personen had nadere aanvullende informatie. Suggesties zijn nagewerkt maar leverden geen resultaten op.

#### Dr. Jennifer Parke, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University USA

Jennifer Parke houdt zich bezig met plantpathogenen afkomstig uit grond, bestudeert plant – micro-organisme interacties en de microbiële ecologie in de rhizosfeer. Met name op het gebied van *Burkholderia cepacia* is zij een kenner. Na meermaals contact met haar te hebben gezocht, bleek dat ook zij niet kon helpen bij de isolatie van de DW-bacterie.

#### Dr. Gerard Muyzer, faculteit microbiologie, TU Delft

De afdeling microbiologie aan de TU Delft heeft de nodige kennis en apparatuur in huis voor het uitvoeren van diverse moleculaire technieken. Voor de detectie, lokalisatie en kwantificatie van de DW-bacterie in besmet wortelmateriaal en besmet water zal gebruik gemaakt moeten worden van de FISH (fluorescerende in situ hybridisatie) techniek. Deze techniek wordt op de afdeling microbiologie van de TU Delft veelvuldig toegepast. De opzet van het onderzoek, mogelijke isolatie methoden voor de DW-bacterie en toepasbare moleculaire technieken zijn door de heer Muyzer getoetst. De FISH analyses zijn daarna door Groen Agro Control aan de TU Delft uitgevoerd.

Dr. Norbert C.A. de Ruijter, Plant Cell Biology (PCB), Universiteit Wageningen

Voor de FISH techniek zullen wortelcoupes gesneden moeten worden. Hiervoor is speciale apparatuur nodig waarover de universiteit van Wageningen beschikt. De heer de Ruijter is daarover aangesproken. De preparatie van coupes, de techniek en werkwijze, zijn besproken met de heer de Ruijter en geoptimaliseerd. Doordat de afdeling echter midden in een verhuizing zat op de tijd van het onderzoek is naar een andere locatie voor het snijden van de coupes gezocht.

Dr. W. de Priester, IMP/EMCA, Instituut Moleculaire Plantkunde, Universiteit Leiden

De universiteit in Leiden heeft eveneens ervaring met het snijden van wortelcoupes. Uit de gesprekken met de heer de Priester bleek echter dat men niet beschikte over de benodigde expertise m.b.t. FISH analyses. De chemicaliën die bij de fixatie en het snijden gebruikt worden interfereren met de daarop volgende FISH analyse waardoor de analyse verstoord wordt en er zodoende naar een andere mogelijkheid voor het snijden van de coupes gezocht moet worden.

Dr. Armin Gieseke, Max Planck Institut für marine Mikrobiologie, Bremen, Duitsland

Aan het Max Planck Instituut in Bremen heeft men ruime ervaring met FISH analyse en tevens met het snijden van coupes. Contact is gelegd met de heer Gieseke die de nodige tips kon geven m.b.t. het gebruik van het cryomicrotoom voor het snijden van de wortelcoupes. In maart is Dr. ir. Sjila Santegoeds van Groen Agro Control naar Bremen gereisd en heeft daar zowel gezonde als besmette wortels in coupes gesneden van 8 – 10 µm.

## 4. Experimenteel onderzoek

### 4.1. Opkweekmethoden voor *Burkholderia* en *Pseudomonas* bacteriën

In de literatuur is gekeken naar opkweekmedia voor *Burkholderia/Pseudomonas*-achtige bacteriën om zo mogelijk de DW-bacterie te isoleren. Op aanraden van *Burkholderia/Pseudomonas*-deskundigen in Leiden (groep van Prof. Dr. Lugtenberg) zijn in eerste instantie twee verschillende media gekozen (20, 21) voor de isolatie van de wortelverdikker:

- DeCicco Holding Medium (DHM; paragraaf 4.1.1.)  
vast medium met o.a. pyruvaatzuur, pH 7.0
- King's B Medium (KB; paragraaf 4.1.2.)  
vloeibaar medium met o.a. pepton en glycerol (pH 4.9, pH 6.6 of pH 8.9)

Later zijn nog drie andere media getest:

- Bacto *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA), een algemeen medium voor *Pseudomonas* (paragraaf 4.1.3.)
- OFPBL, een selectief medium voor *Pseudomonas* (22; paragraaf 4.1.4.)
- Bloedagar (BA), een algemeen isolatie medium (19; paragraaf 4.1.5.)

Naast de isolatiemedia zijn ook nog diverse andere technieken gebruikt om de DW-bacterie te isoleren. In de paragrafen 4.1.6. - 4.1.8. staan deze experimenten beschreven.

#### 4.1.1. Opkweekmethoden: DeCicco Holding Medium (DHM)

##### Methode

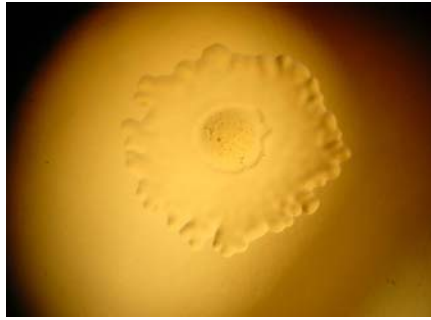
Zowel gezonde als wortels met wortelverdikking en besmet en onbesmet water worden voor deze proef gebruikt. Van het water worden verschillende verdunningen genomen en de wortels worden of direct gebruikt of vermalen. Van het DHM medium worden platen gegoten. De DHM platen met het monstermateriaal worden geïncubeerd bij 37°C. Kolonies van platen worden overgeënt om zo reïnculturen te creëren en getest met behulp van de DW specifieke PCR op de aanwezigheid van de DW-bacterie. In een biotoets wordt de besmettelijkheid van de geïsoleerde kolonie getest.

##### Resultaten

Op de DHM platen is duidelijk een verschil tussen de monsters met wel en niet besmet water te zien en gezonde en zieke wortels. Op de platen met besmet materiaal groeien grote, witte bacteriekolonies en tevens een heel specifieke omelet-achtige kleine kolonie (zie Figuur 1) die op de gezonde onbesmette DHM platen niet te zien is. Op de onbesmette platen groeien daarentegen meer kleine gele kolonies.

Na controle met PCR bleek echter geen van alle geïsoleerde kolonies DW positief te zijn. In de biotoets was het ook niet mogelijk om wortelverdikking met behulp van geïsoleerde kolonies op te wekken.

Om de mogelijkheid uit te sluiten dat de DW-bacterie geremd wordt in zijn groei bij 37°C, werden tevens platen bij 25°C geïncubeerd. Echter ook bij deze condities kon geen positieve DW kolonie gevonden worden.



*Figuur 1: Microscopisch beeld van DW verdachte kleine kolonie.*

### Conclusie

Het is niet mogelijk om met het DHM medium de DW-bacterie te isoleren.

### 4.1.2. Opweekmethoden: King's B Medium (KB)

#### Methode

Het vloeibare King's B medium wordt in buisjes gegoten. Monstermateriaal (besmet en onbesmet water, gezonde en zieke wortelstukjes) worden aan de buisjes toegevoegd die vervolgens bij 37°C geïncubeerd worden. Het KB medium is op verschillende pH-waarden ingesteld (pH 4.9, pH 6.6 en pH 8.9) aangezien uit eerder onderzoek is gebleken dat de DW-bacterie gevoelig is voor een te hoge of lage pH. Het monstermateriaal met medium wordt overgeënt en gecontroleerd op de aanwezigheid van de DW-bacterie.

#### Resultaten

Het KB medium laat in eerste instantie geen verschillen zien tussen incubaties van gezond en besmet monstermateriaal. Het medium wordt troebel en heeft verder geen bijzondere kenmerken. Controle met de DW specifieke PCR en de biotoets toont aan dat de DW-bacterie alleen in het KB medium met pH 6.6 opgekweekt kan worden (zie Tabel 1).

*Tabel 1: PCR en biotoets controle van het KB opweekmedium met verschillende pH waarden.*

pH waarde	monster	kweek (KB medium)	
		PCR	biotoets
pH 4.9	besmet materiaal	+	-
	gezond materiaal	-	-
pH 6.6	besmet materiaal	+	+
	gezond materiaal	-	-
pH 8.3	besmet materiaal	+	-
	gezond materiaal	-	-

Het experiment wordt voortgezet met het KB medium pH 6.6. De kweek wordt na drie dagen overgeënt, gecontroleerd en vervolgens na 2 dagen weer overgeënt en gecontroleerd. Uit de controle met PCR en biotoets blijkt dat na meerdere keren overenten van het materiaal + medium de DW-bacterie verdwijnt (zie Tabel 2).

### Conclusie

Het KB medium is niet geschikt voor het opkweken van de DW-bacterie.

Tabel 2: PCR en biotoets controle van het KB opkweekmedium en de overentingen.

monster (pH 6.6)	kweek (KB medium)		1e overenting		2e overenting	
	PCR	biotoets	PCR	biotoets	PCR	biotoets
besmet materiaal	+	+	+	-	-	-
gezond materiaal	-	-	-	-	-	-

#### 4.1.3. Opkweekmethoden: Bacto Pseudomonas Isolation Agar (PIA)

##### Methode

De volgende monsterbehandelingen zijn uitgevoerd:

- Monsterbehandeling 1: DW besmette en onbesmette voedingsoplossing, verdunningen 0x, 50x en 2500x.
- Monsterbehandeling 2: DW besmette en onbesmette wortels, in alcohol ontsmet voor 1, 5 en 15 seconden en aansluitend schoon gespoeld met demi water en gemalen m.b.v. een mortier.
- Monsterbehandeling 3: DW besmette en onbesmette wortels, schoon gespoeld met demi water en gemalen m.b.v. een mortier.
- Monsterbehandeling 4: DW besmette en onbesmette wortels, zonder voorbehandeling, gemalen m.b.v. een mortier.

Al deze monsters zijn uitgeplaat op Pseudomonas Isolation Agar (PIA) en geïncubeerd bij 37°C. Per behandeling zijn de platen met elkaar vergeleken en zijn kolonies geselecteerd, die wel voorkwamen bij DW besmette monsters en niet bij DW onbesmette monsters. Van de geïsoleerde kolonies (12 in aantal) is het DNA geëxtraheerd en is een PCR ingezet om de aanwezigheid van de DW-bacterie te controleren.

##### Resultaten

Op de PIA platen is duidelijk een verschil tussen de monsters met wel en niet besmet materiaal te zien. Na isolatie van kolonies die alleen bij uitplating van besmet materiaal voorkomen en controle met PCR bleek echter geen van alle kolonies DW positief te zijn. In de biotoets was het ook niet mogelijk om wortelverdikking met behulp van geïsoleerde kolonies op te wekken.

##### Conclusie

Met het PIA medium is het niet mogelijk om de DW-bacterie op te kweken en te isoleren.

#### 4.1.4. Opkweekmethoden: OFPBL

##### Methode

Dezelfde monsters zijn gebruikt als bij experiment 4.1.3. met dezelfde monsterbehandelingen. Alle monsters zijn uitgeplaat op OFPBL medium en geïncubeerd bij 37°C. Per behandeling zijn de platen met elkaar vergeleken en zijn kolonies geselecteerd, die wel voorkwamen bij DW besmette monsters en niet bij DW onbesmette monsters. Van de geïsoleerde kolonies is het DNA geëxtraheerd en is een PCR ingezet om de aanwezigheid van de DW-bacterie te controleren.

### Resultaten

Op de OFPBL platen is weer een duidelijk verschil te zien tussen de monsters met wel en niet besmet materiaal. Na isolatie van kolonies die alleen bij uitplating van besmet materiaal voorkomen en controle met PCR bleek echter geen van alle kolonies DW positief te zijn. In de biotoets was het ook niet mogelijk om wortelverdikking met behulp van geïsoleerde kolonies op te wekken.

### Conclusie

Met het OFPBL medium is het niet mogelijk om de DW-bacterie op te kweken en te isoleren.

## **4.1.5. Opkweekmethoden: bloedagar (BA)**

### Methode

Dezelfde monsters zijn gebruikt als bij experiment 4.1.3. met dezelfde monsterbehandelingen. Alle monsters zijn uitgeplaat op bloedagar medium en geïncubeerd bij 37°C. Per behandeling zijn de platen met elkaar vergeleken en zijn kolonies geselecteerd, die wel voorkwamen bij DW besmette monsters en niet bij DW onbesmette monsters. Van de geïsoleerde kolonies is het DNA geëxtraheerd en is een PCR ingezet om de aanwezigheid van de DW-bacterie te controleren.

### Resultaten

Op de bloedagar platen is weer een duidelijk verschil te zien tussen de monsters met wel en niet besmet materiaal. Na isolatie van kolonies die alleen bij uitplating van besmet materiaal voorkomen en controle met PCR bleek echter geen van alle kolonies DW positief te zijn. In de biotoets was het niet mogelijk om wortelverdikking met behulp van geïsoleerde kolonies op te wekken.

### Conclusie

Met het bloedagar medium is het niet mogelijk om de DW-bacterie op te kweken en te isoleren.

## **4.1.6. Opkweekmethode: Isolatie van DW-bacterie m.b.v. uitscheidingsproducten van de plant (diverse technieken)**

### Doel

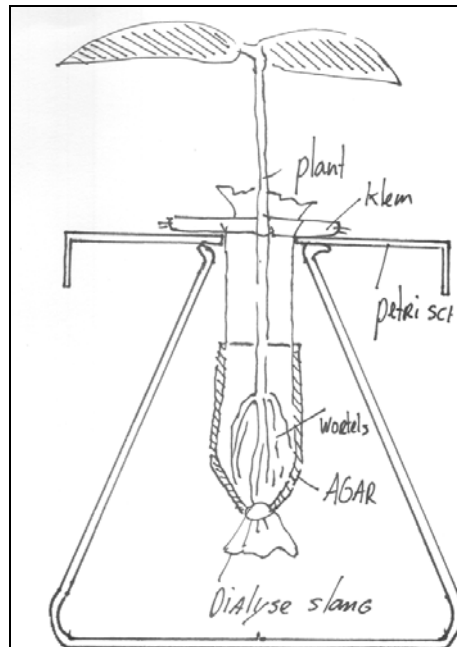
Deze proeven zijn opgezet met de gedachte dat de DW-bacterie afhankelijk is van uitscheidingsproducten van de plant en dat de DW-bacterie geïsoleerd kan worden op agar of andere voedingsbodems indien deze afscheidingsproducten aanwezig zijn. Eventueel kunnen via een verdunningenreeks van besmet materiaal concurrerende bacteriën zo veel mogelijk verwijderd worden zodat de isolatie van de DW-bacterie bespoedigd wordt.

### **4.1.6.a Dialyseslang experimenten**

#### Methode

Voor dit experiment wordt een gesteriliseerde dialyseslang gevuld met voedingsoplossing. Een komkommerplantje wordt in de voeding geplaatst. Daarna wordt een coating van wateragar aangebracht aan de buitenkant van de dialyseslang. De uitscheidingsproducten van het plantje

kunnen nu door de dialyseslang in de agarcoating dringen. Het geheel wordt opgehangen in een steriele erlenmeyer (zie Figuur 2). Na het drogen van de wateragar worden gemalen wortels met en zonder wortelverdikking aangebracht aan de buitenkant van de agarcoating. Incubatie vindt plaats onder een assimilatielamp.



Figuur 2. Experimentele opstelling dialyse-proef.

#### Resultaat

Aan de buitenkant van de agarcoating vormen zich geen zichtbare kolonies. Met deze methode is het dus niet mogelijk om bacteriën te isoleren.

#### **4.1.6.b Isolatie op wateragar en/of gelatine m.b.v. DW besmette plantjes**

##### Methode

Komkommerplantjes met dikke wortel verschijnselen worden in kweekbuisjes met semi-vloeibare wateragar en in kweekbuisjes met semi-vloeibare gelatine oplossing gezet. Het geheel wordt onder een assimilatielamp geplaatst. Aan het oppervlak van de agar of de gelatine kunnen nu bacteriën geïsoleerd worden die met behulp van PCR op de aanwezigheid van de DW-bacterie geanalyseerd kunnen worden.

##### Resultaat

De methode leverde geen groei van zichtbare kolonies op aan het agar/gelatine-oppervlak.

#### **4.1.6.c Isolatie op wateragar bij verschillende concentraties DW oplossingen**

##### Methode

Komkommerzaad wordt ontkiemd in een zo steriel mogelijke omgeving en de plantjes worden vervolgens opgekweekt in steriele buisjes met een schuine, semi-vaste laag van 2 % wateragar. Na groei van de planten worden deze besmet met verschillende concentraties van een met de DW-bacterie besmette oplossing (onverdund, 10x, 100x en 1000x verdund).

### Resultaat

De planten die met onverdunde oplossing en die met 10x verdunde oplossing zijn besmet gingen na één week dood. Planten besmet met 100x verdunde oplossing stierven na twee weken af. De planten vertoonden geen symptomen van wortelverdikking. Wel konden plantjes op hydrocultuur besmet worden met de waterige laag die in de buisjes aanwezig was van de plantjes besmet met 1000x verdunde oplossing. Kolonies konden niet geïsoleerd worden op de waterager. Het afsterven van de planten kan verklaard worden door een te hoge concentratie van (DW-) bacteriën en/of door de aanwezigheid van een tweede ziekteverwekker (naast de DW-bacterie) in het besmette materiaal, zoals bijvoorbeeld *Pythium*.

#### **4.1.6.d Isolatie op voedingsbodems bij verschillende concentraties DW oplossingen**

### Methode

Komkommerzaadjes worden ontkiemd in een steriele omgeving, een gedeelte van de zaadjes is van tevoren ontsmet in een oplossing van 2000 ppm aereomycine en 2000 ppm pimarinine. Van een besmette DW oplossing en van gemalen dikke wortels wordt een verdunningsreeks gemaakt. Elke verdunning wordt uitgeplaat op een voedingsbodem om kolonies te isoleren en om de hoeveelheid bacteriën in de verdunning te bepalen. Een gedeelte van de verdunning wordt gepipetteerd op de wortels van een (steriel) komkommerplantje dat of in een buisje met wateragar opgekweekt is of in een buisje met een steenwolplug. Na incubatie onder een assimilatielamp worden de plantjes gecontroleerd op DW symptomen. De hoogste verdunningen waarbij een DW besmetting optreedt, worden verder onderzocht, de kolonies op de platen worden met PCR getest op de aanwezigheid van de DW-bacterie en verdachte kolonies worden geïsoleerd.

### Resultaat

Bij de planten, waarvan het zaad behandeld is met 2000 ppm aereomycine en 2000 ppm pimarinine, konden geen DW verschijnselen opgewekt worden, bij geen enkele besmetting met de verschillende verdunningen van het DW-besmette materiaal. Waarschijnlijk is het antibioticum het zaad binnengedrongen, waardoor de plant resistent is voor de DW-bacterie. De resultaten van de proef, waarbij het zaad niet van tevoren ontsmet was, zijn weergegeven in Tabel 3.

*Tabel 3. Besmettelijkheid (biotoets) en PCR analyses van de verschillende DW oplossingen en van geïsoleerde kolonies.*

Monsteromschrijving DW oplossing	Biotoets besmettelijkheid: DW aanwezig	PCR analyse oplossingen: DW DNA aanwezig	PCR analyse geïsoleerde kolonies: DW DNA aanwezig
Onverdund	+	+	-
10 <sup>1</sup> x verdund	+	+	-
10 <sup>2</sup> x verdund	+	+	-
10 <sup>3</sup> x verdund	+	+	-
10 <sup>4</sup> x verdund	+	+	-
10 <sup>5</sup> x verdund	-	-	-
10 <sup>6</sup> x verdund	-	-	-
Onbesmet: Blanco	-	-	-

+ = aangetoond; - = niet aangetoond



Het kiemgetal van de onverdunde oplossing was  $2.0 \times 10^7$  k.v.e./ml. Tot en met een verdunning van  $10^4$  was de oplossing nog besmettelijk, de komkommerplantjes op hydrocultuur kregen nog DW aantastingverschijnselen (wortelverdikking en kringeling). Met PCR kon tot en met verdunning  $10^4$  de DW besmetting aangetoond worden. Bij geïsoleerde kolonies was dit niet mogelijk, geen kolonie bevatte het DW DNA.

### Conclusie

Ondanks dat de uitscheidingsproducten van de komkommerplanten toegankelijk zijn voor de DW-bacterie is het niet mogelijk met deze methoden de bacterie op te kweken op wateragar of andere voedingsbodems.

#### **4.1.7. Effect van grondextract op groei van DW-bacterie**

##### Doel

In de praktijk is gebleken dat bedrijven met grond in de kassen vaker last hebben van de aanwezigheid van de DW-bacterie. De planten zijn dan echter meestal (nog) niet aangetast. Hieruit rees het vermoeden dat de DW-bacterie in de grond aanwezig is of dat de groei van de bacterie bevordert wordt door de aanwezigheid van grond. Om deze theorie te testen is het volgende onderzoek uitgevoerd.

##### Methode

In eerste instantie is het effect van grondextract op de groei en de aantasting van DW bij komkommerplantjes getest. Hiervoor worden plantjes opgekweekt in reageerbuisjes met voedingsoplossing waaraan verschillende concentraties grondextract zijn toegevoegd. De buisjes worden na 1 dag incubatie besmet met DW oplossing. Gedurende drie weken wordt de groei van de planten gevolgd en worden de planten getest op de aanwezigheid van dikke wortel. In tweede instantie worden bij verschillende bedrijven grondmonsters gehaald. De bedrijven die daarvoor uitgekozen worden hebben in het verleden last gehad van wortelverdikking. De monsters worden met behulp van de PCR analyse getest op de aanwezigheid van de DW-bacterie. Tevens worden potgronden van verschillende leveranciers getest.

*Tabel 4. Effect van grondextract op DW aantasting bij komkommerplantjes.*

<b>Monsteromschrijving</b>	<b>Eerste DW aantastingverschijnselen (dagen)</b>	<b>Biotoets: DW aantasting</b>
Plant zonder grondextract en zonder besmetting (blanco)	-	-
Plant zonder grondextract	14	+
Plant met 10% grondextract	12	+
Plant met 50 % grondextract	9	+
Plant met 100% grondextract	8	+
Plant met 100% grondextract, zonder besmetting	-	-

+ = DW aangetoond; - = DW niet aangetoond

### Resultaat

In Tabel 4 zijn de resultaten van het effect van grondextract op de DW aantasting weergegeven. Figuur 3 laat de plantjes zien waaraan verschillende concentraties grondextract zijn toegevoegd en die besmet zijn met DW. Duidelijk is het stimulerende effect van het grondextract te zien op de vorming van wortelverdikking. Hoe meer grondextract gebruikt is hoe sterker de DW aantasting. Grondextract bleek op de groei van de planten die niet besmet waren met DW verder geen negatief of remmend effect te hebben.

In de grondmonsters van de leveranciers (totaal 5) en van de bedrijven (totaal 8) die onderzocht zijn kon geen DW DNA worden aangetoond. Wel kon het DNA van andere bacteriën in de grond worden gedetecteerd. De PCR wordt dus niet geïnhibeerd door storende elementen in de grond.



*Figuur 3. Komkommerplantjes met verschillende concentraties grondextract. Van links naar rechts: 100% grondextract niet besmet, 100% grondextract besmet met DW, 50 % grondextract besmet met DW, 10% grondextract besmet met DW, 0% grondextract besmet met DW, 0% grondextract niet besmet.*

### Conclusie

Grondextract heeft een stimulerend effect op de ontwikkeling van wortelverdikking. Hieruit zou afgeleid kunnen worden dat de DW-bacterie afkomstig is uit grond. Tot op heden kon de DW-bacterie echter in grond niet worden aangetoond.

#### **4.1.8. Opkweekmethode: Groei en isolatie van DW-bacterie op grondextract agar**

##### Doel

Zoals uit het vorige experiment (zie paragraaf 4.1.7.) bleek, heeft grond een positieve invloed op de groei van de DW-bacterie. Mogelijk dat de DW-bacterie geïsoleerd kan worden op een voedingsbodem met grondextract.

##### Methode

De voedingsoplossing van een plant met DW symptomen wordt onverdund en 50x verdund uitgeplaat op voedingsbodemplaten gemaakt van grondextract en agar. Als controle wordt tevens

voedingsoplossing van een onbesmette plant (blanco) uitgeplaat. De incubatie vindt plaats bij 22°C. De kolonies die op de platen opgroeien, worden op de aanwezigheid van de DW-bacterie gecontroleerd met behulp van PCR en worden opnieuw uitgeplaat en weer getest met PCR.

### Resultaat en conclusie

De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in Tabel 5. De DW-bacterie is na de 1e keer uitplaten van besmet voedingswater nog traceerbaar op de grondextract platen. Na een 2e keer uitplaten van de kolonies op plaat 1, blijkt de DW-bacterie niet meer aanwezig te zijn. De DW-bacterie groeit dus niet op grondextract platen en is zodoende met deze methode dus niet te isoleren.

Tabel 5. PCR analyses van kolonies opgegroeid op grondextract agar.

Monsteromschrijving	1e uitplating		2e uitplating	
	incubatietijd (dagen)	PCR analyse: DW aanwezig	incubatietijd (dagen)	PCR analyse: DW aanwezig
DW oplossing onverdund	6	+	7	-
DW oplossing 50x verdund	6	+	7	-
Blanco onverdund	6	-	7	-
Blanco 50x verdund	6	-	7	-

+ = aangetoond; - = niet aangetoond

## 4.1.8. Isolatie en opslag van de DW-bacterie

### Doel

Bacteriën kunnen door middel van vriesdrogen gedurende meerdere maanden, zelfs jaren, bewaard worden door de bacteriesuspensie te vriesdrogen. Een andere mogelijkheid van opslag van bacteriën is het invriezen van een bacteriesuspensie na toevoeging van glycerol, een standaard methode voor het bewaren van levende bacterieculturen. De cellen van de bacteriën blijven tijdens het vriesdrogen en het invriezen met glycerol in tact. Beide methoden worden getest om uiteindelijk de DW-bacterie te kunnen bewaren voor verder onderzoek.

### 4.1.8.a Vriesdrogen

#### Methode

In eerste instantie is een met DW-bacterie besmette oplossing getest. Hiervoor is de oplossing afgedraaid om alle aanwezige bacteriën in een pellet te verzamelen. Het pellet is gedurende 24 uur gevriesdroogd. Het zo gevormde poeder (een klein laagje van ca. 1 mm in 1.5 ml Eppendorf vaatjes) werd gedurende 2 jaar bewaard bij kamertemperatuur en is uiteindelijk getest op de besmettelijkheid bij jonge komkommerplantjes. Verschillende hoeveelheden poeder (10%, 90% en 100% uit de vaatjes) worden hiervoor direct in een hydrocultuur met twee komkommerkiemplanten en 700 ml voedingsoplossing ingebracht.

In tweede instantie zijn wortels met DW aantasting gebruikt voor vriesdrogen. De wortels worden direct bevroren in vloeibare stikstof en gedurende 24 uur gevriesdroogd. De wortels

worden hierna vermalen en na 1-2 weken wordt de besmettelijkheid getest op jonge komkommerplantjes door verschillende hoeveelheden poeder (10%, 50%, 100%) toe te voegen aan de voedingsoplossing van de plantjes.

#### Resultaat

Het poeder van de gevriesdroogde oplossing veroorzaakte in een eerst test met 100% poeder dikke wortels bij de komkommerplantjes. De test werd herhaald met 10% en 90% poeder. Na twee weken trad er bij toevoeging van 10 % poeder een zeer sterke DW aantasting op. Bij toevoeging van 90 % poeder was geen DW aantasting zichtbaar. Herhaling van de proef met de verschillende concentraties leverde vervolgens geen DW aantasting meer op. Het vriesdrogen van dikke wortels had geen succes. Met het verkregen poeder kon geen DW aantasting opgewekt worden.

#### Conclusie

De testen met het vriesdrogen leverden geen eenduidige resultaten op. Aangenomen wordt dat het poeder niet homogeen verdeeld was en dat concentratie verschillen een rol speelden. Mogelijk is ook dat er stoffen aanwezig zijn in de suspensie en de wortels die het vriesdroogproces belemmeren, waardoor de bacteriën niet allemaal meer levensvatbaar zijn. Voor betere resultaten zal de DW-bacterie eerst opgezuiverd moeten worden alvorens het vriesdroogproces te starten.

### **4.1.8.b Invriezen m.b.v. glycerol**

#### Methode

Het invriezen van bacteriën met behulp van glycerol is een in de microbiologische wereld gebruikelijke (standaard) methode. In dit experiment wordende met DW besmette oplossingen afgedraaid om de bacterie suspensie te concentreren. Verschillende hoeveelheden glycerol worden toegevoegd (10%, 20% en 30%) waarna de suspensies ingevroren worden bij -20°C en bij -80°C. De besmettelijkheid van de suspensies wordt na 1-3 maanden getest op een hydrocultuur van jonge komkommerplantjes.

#### Resultaat

Met behulp van de ingevroren suspensies kon geen wortelverdikking opgeroepen worden bij de komkommerplantjes.

#### Conclusie

De DW-bacteriën overleven het invriezen niet ondanks toevoeging van glycerol. Mogelijk dat nog andere stoffen nodig zijn om de cellen te beschermen bij het invriezen.

## 4.2. FISH onderzoek

Uit eerste FISH (fluorescerende in situ hybridisatie) experimenten waarbij wortelstukjes geplet werden tussen twee objectglasjes blijkt dat het mogelijk is om bacteriën in en om de wortels heen aan te tonen. Het plantmateriaal fluoresceert echter ook en door de dikte van het geplette monster is het moeilijk om onderscheid te maken tussen genetisch materiaal van plantmateriaal en van bacteriën. Het is dus noodzakelijk om voor de FISH analyse zo dun mogelijk materiaal te hebben. In maart 2002 heeft Dr. ir. Sjila Santegoeds het Max Planck Instituut in Bremen bezocht om daar als gast gebruik te maken van een cryomicrotoom, een apparaat voor het snijden van erg dunne plakjes/coupes. De wortels worden hiervoor allereerst gefixeerd met behulp van paraformaldehyde om de structuur en de locatie van de bacteriën in het wortelmateriaal te behouden. Daarna worden de wortels ingebed, ingevroren bij  $-18^{\circ}\text{C}$  en in plakjes van 8 - 10  $\mu\text{m}$  gesneden met het cryomicrotoom. De plakjes worden op speciale objectglazen opgevangen die later voor de FISH analyse gebruikt worden.

Het snijden van de coupes is voor de volgende monsters uitgevoerd:

1. gezonde komkommerplant, 4 dagen op hydrocultuur
2. gezonde komkommerplant, 8 dagen op hydrocultuur
3. gezonde komkommerplant, 11 dagen op hydrocultuur
4. gezonde komkommerplant, 18 dagen op hydrocultuur
5. besmette komkommerplant, 4 dagen besmet met DW, op hydrocultuur
6. besmette komkommerplant, 8 dagen besmet met DW, op hydrocultuur
7. besmette komkommerplant, 11 dagen besmet met DW, op hydrocultuur
8. besmette komkommerplant, 18 dagen besmet met DW, op hydrocultuur

Op 2 verschillende plekken van het plantmateriaal werden coupes gesneden, van de hoofdwortel zelf en bij de overgang hoofdwortel en stengel.

### 4.2.1. FISH onderzoek: coupes van wortels

#### Methode

De FISH analyse bestaat uit de volgende stappen:

- fixatie van de cellen met behulp van 4% paraformaldehyde
- hybridisatie van de cellen met specifieke fluorescerende probes
- wassen en drogen van het gehybridiseerde monster
- microscopische analyse van het monster na bestraling met een bepaalde kleur

De fixatie stap is al voor het snijden van de coupes uitgevoerd. Voor de hybridisatiestap wordt een hybridisatiebuffer gemaakt met NaCl, Tris-HCl, formamide, SDS en een fluorescerende specifieke probe (zie Tabel 6). De coupes op de objectglazen worden bedekt met de hybridisatiebuffer en in een hybridisatiebuisje geplaatst bij  $46^{\circ}\text{C}$  gedurende 1-2 uur. De probe hecht zich onder deze condities aan het target ribosomaal RNA (het RNA van de bacterie die gedetecteerd moet worden). De coupes worden hierna gewassen in een wasbuffer (NaCl, Tris-HCl, EDTA en SDS) bij  $48^{\circ}\text{C}$  gedurende 15 minuten om de overtollige probes af te wassen en onspecifieke binding van de probes te voorkomen. Na het wassen worden de coupes afgespoeld en gedroogd. Door de coupes na het drogen tevens te kleuren met DAPI, kunnen alle organismen

die DNA bevatten (o.a. bacteriën, schimmels etc.) onder de microscoop zichtbaar gemaakt worden.

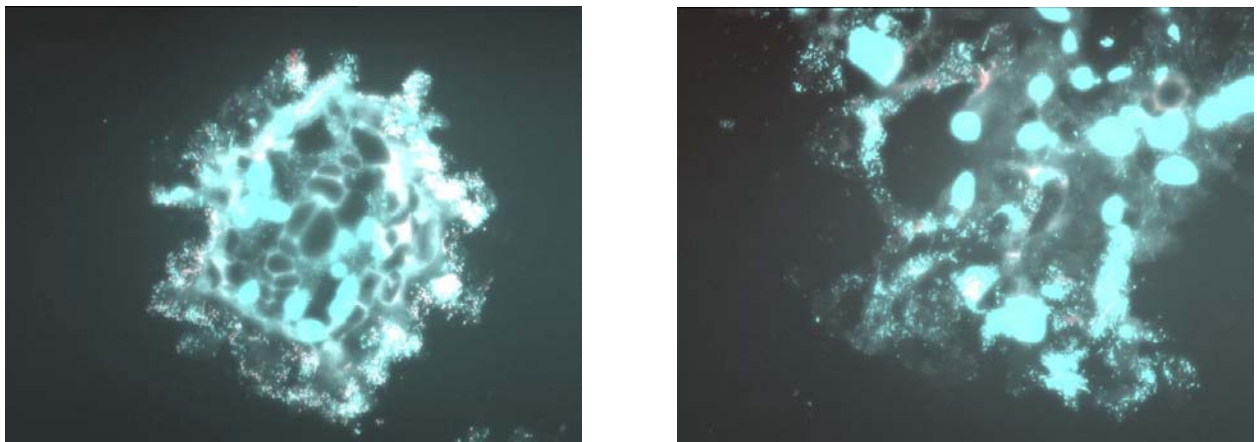
Tabel 6: Probes voor FISH analyse.

Probe	Doel organismen
EUB	alle bacteriën (o.a. alle proteobacteriën)
Alpha	$\alpha$ -proteobacteriën
Beta	$\beta$ -proteobacteriën (o.a. <i>Burkholderia</i> bacteriën)
Gamma	$\gamma$ -proteobacteriën (o.a. <i>Pseudomonas</i> bacteriën)
Delta	$\delta$ -proteobacteriën
DW-1	DW-bacterie (eerste DW probe, 2001)
DW-2	DW-bacterie (verbeterde probe DW-1, mei 2002)
DW-3	DW-bacterie (nieuw ontwikkelde probe, mei 2002)

De coupes (ca. 10  $\mu\text{m}$  dik) van gezonde en zieke wortels worden op de hierboven beschreven wijze behandeld en geanalyseerd met verschillende probes (zie Tabel 6) om bepaalde bacteriën zichtbaar te maken met behulp van een fluorescentie microscoop.

### Resultaten

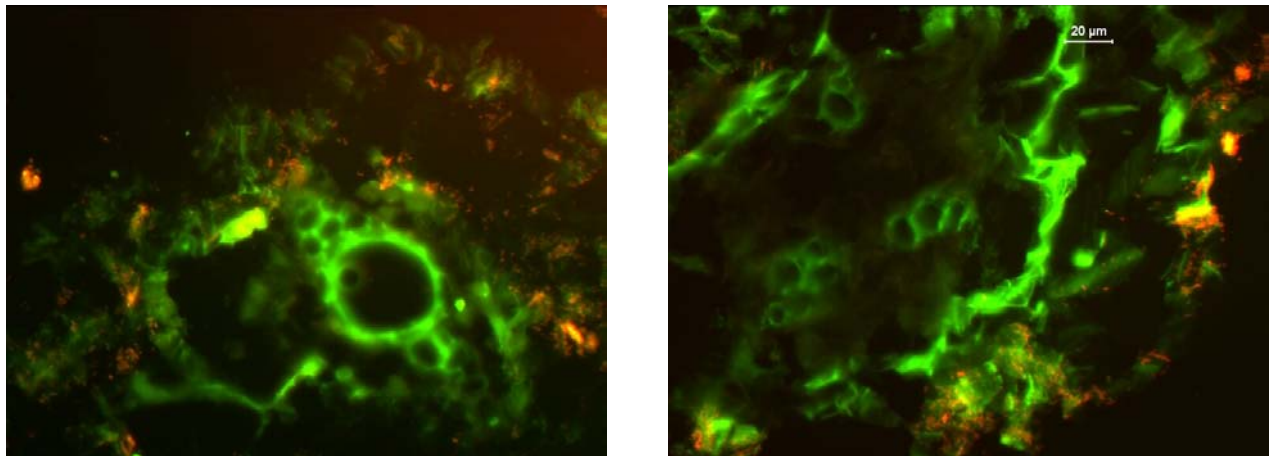
In Figuur 4 zijn de resultaten te zien van een DAPI kleuring van gezonde en zieke wortelcoupes. De afbeeldingen laten geen duidelijke verschillen zien tussen besmette en onbesmette wortels. In beide coupes bevinden zich bacteriën rond om de wortel en tussen de plantencellen (kleine lichtblauwe stipjes). De grotere lichtblauwe vlekken worden veroorzaakt door fluorescentie van plantencellen in de kern van de wortels (vooral te zien in het linker plaatje) of door grote hoeveelheden bacteriën aan de rand van de wortels (vooral in het rechter plaatje te zien).



Figuur 4. DAPI kleuring van dwarsdoorsneden van gezonde (links) en zieke (rechts) wortelcoupes.

Na de algemene kleuring zijn de groep-specifiek kleuringen gedaan. Hybridisaties met probes voor de verschillende groepen proteobacteriën laten geen opvallende verschillen zien tussen gezonde en besmette wortels. Er zijn verscheidene  $\alpha$ - en  $\beta$ -proteobacteriën zichtbaar (vooral aan de wortelrand, zie Figuur 5), tot deze laatste groep behoort ook de DW-bacterie. Hybridisatie met de al eerder ontwikkelde fluorescentieprobe voor de DW-bacterie leverde geen duidelijk beeld op. Mogelijk zijn de hybridisatie-condities niet in orde voor een goede hybridisatie met de DW-bacterie of autofluorescentie verstoort het zwakke signaal van de probe. Ondertussen zijn nieuwe probes ontwikkeld, één probe met een ander verbeterd fluorescentielabel (probe DW-2)

waardoor het signaal van de probe sterker is dan bij de oudere probe (probe DW-1) en één probe met een andere sequentie (probe DW-3) voor betere hybridisatie. Deze probes zijn eerst getest op watermonsters (paragraaf 4.2.2. - 4.2.3.).



*Figuur 5. Hybridisatie met  $\alpha$ -proteobacteriën-probe (rode signaal). Links dwarsdoorsnede van gezonde wortel, rechts dwarsdoorsnede van zieke wortel.*

### Conclusie

Er is nog geen duidelijk verschil tussen de zieke en gezonde wortelcoupes met behulp van FISH aangetoond. In paragraaf 4.2.4. wordt het onderzoek van de coupes met de nieuwe probe beschreven.

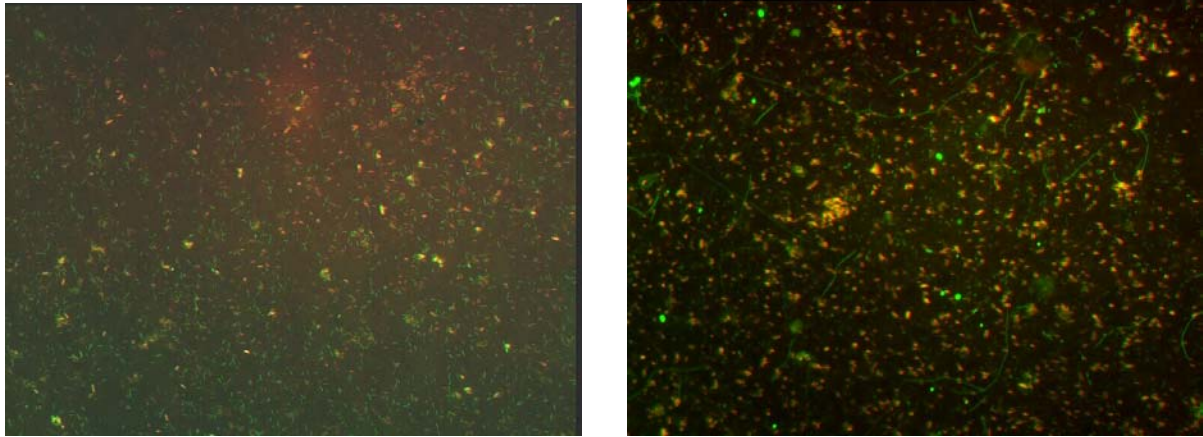
## **4.2.2. FISH onderzoek: besmet en onbesmet water**

### Methode

Om de autofluorescentie van het plantmateriaal te vermijden en om de nieuw ontwikkelde probes voor de DW-bacterie te testen is een volgend experiment ingezet met besmet en onbesmet voedingswater. Hiervoor is 200 ml watermonster gefixeerd met paraformaldehyde en vervolgens gefiltreerd met een 0.2  $\mu\text{m}$  polycarbonaat filter. Deze filters worden onder verschillende condities gehybridiseerd (zie paragraaf 4.2.1. voor een beschrijving van de methode) met algemene probes (zie Tabel 6), maar ook met de nieuwe DW probes om zo de methode te optimaliseren.

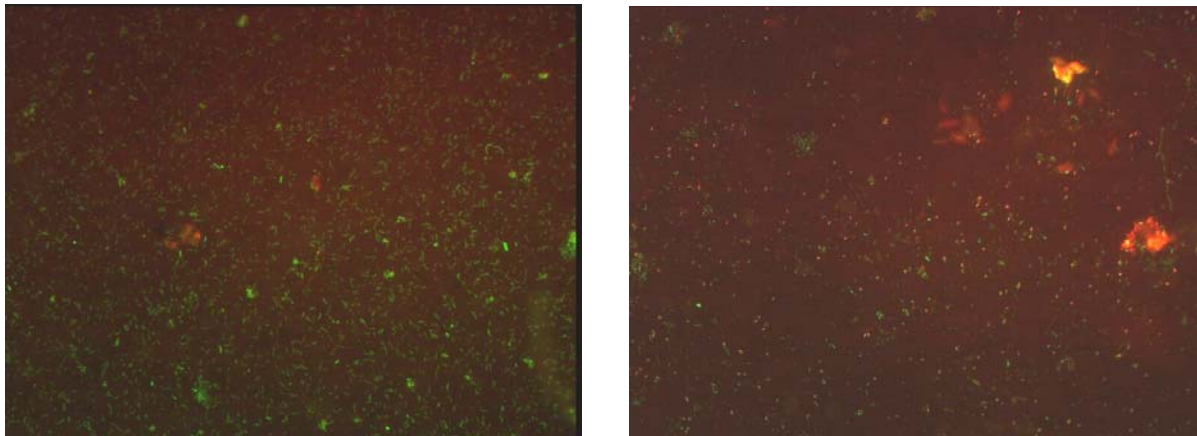
### Resultaten

Eén van de twee nieuw ontwikkelde probes (DW-3) blijkt zeer onspecifiek te zijn. Zowel op de filters van het onbesmette water als op de filters van het besmette water hybridiseren erg veel verschillende bacteriën met de DW-3 probe (zie Figuur 6). Met deze probe wordt niet verder gewerkt. In Figuur 6 is te zien dat de bacteriële samenstelling van het onbesmette water en het besmette water erg van elkaar verschilt (het besmette water bevat vele draderige organismen). Dit verschijnsel (draderige organismen) werd nader onderzocht door verschillende oplossingen besmet en onbesmet meerdere keren door te enten. De draderige structuren traden niet altijd op bij de DW besmette oplossingen, waardoor een verband tussen deze organismen en de DW besmetting is uit te sluiten.



*Figuur 6: Hybridisatie van filters met onbesmet water (links) en besmet water (rechts). De EUB probe hybridiseert met alle bacteriën (groen signaal) en de DW-3 probe zou alleen met de DW-bacterie moeten hybridiseren (rood signaal). Het gele signaal ontstaat doordat bacteriën zowel met de EUB probe hybridiseren als met de DW-3 probe.*

Hybridisaties met de andere nieuw ontwikkelde probe, DW-2 probe (de DW-1 probe met een beter fluorescentielabel), geven goede resultaten. De probe blijkt zich specifiek aan een soort bacterie (met een bepaalde morfologie) te hechten in het besmette water, het onbesmette water geeft geen signaal (zie Figuur 7).



*Figuur 7: Hybridisatie van filters met onbesmet water (links) en besmet water (rechts). De EUB probe hybridiseert met alle bacteriën (groen signaal) en de DW-2 probe hybridiseert met de DW-bacterie (rood signaal). Het gele signaal ontstaat doordat bacteriën zowel met de EUB probe hybridiseren als met de DW-2 probe. De grote rood-gele vlekken in het rechter plaatje zijn kristallen. De rode signalen in het linker plaatje zijn afkomstig van autofluorescerende organismen en zijn dus geen DW-bacteriën (dit onderscheid is te maken door het monster aan te stralen met verschillende laser-kleuren).*

### Conclusie

De eerder ontwikkelde probe DW-1 hybridiseert niet met de DW-bacterie of geeft nauwelijks signaal voor detectie. De probe DW-3 is te onspecifiek, zodat deze probes niet meer gebruikt zullen worden voor FISH analyse.



Probe DW-2 geeft goede resultaten met FISH op gefiltreerde watermonsters. Met deze probe is het mogelijk kwantitatieve metingen te verrichten in watermonsters zodat de besmettingsgraad en de relatie tussen aantasting en aantallen DW-bacteriën bepaald kunnen worden. Dit onderzoek wordt in paragraaf 4.2.3. beschreven. Verder zal met probe DW-2 de locatie van de DW-bacterie in de wortel en het verloop van de besmetting onderzocht worden. Hiervoor worden coupes van de gezonde en zieke wortels geanalyseerd met FISH (paragraaf 4.2.4.).

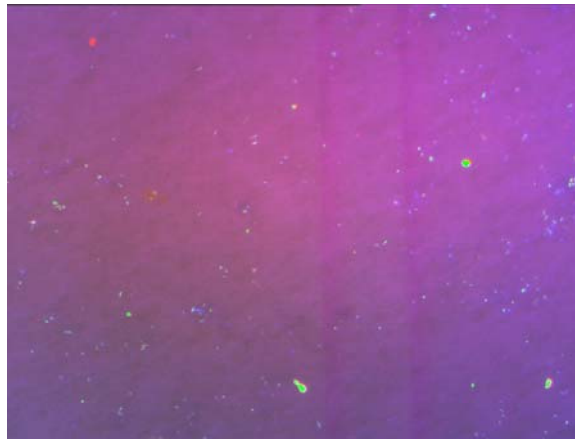
#### 4.2.3. FISH onderzoek: kwantificatie van de DW-bacterie in besmettelijk water

##### Methode

Om het verband tussen de besmettelijkheid van DW oplossingen en het aantal DW-bacteriën te bepalen wordt een verdunningsreeks gemaakt van een besmette oplossing. Een gedeelte van de verdunningen wordt gebruikt om de besmettelijkheid te testen door kiemplantjes in de oplossingen te plaatsen en een gedeelte wordt gebruikt om het aantal DW-bacteriën te bepalen met behulp van FISH analyse. Hiervoor wordt 93 ml watermonster gefixeerd met paraformaldehyde en vervolgens gefiltreerd met een 0.2 µm polycarbonaat filter. De filters worden bij -20°C bewaard. Zodra de besmettelijkheid van de monsters bekend is, worden de filters van de monsters met de hoogste verdunningen waarbij DW aantasting optreedt geanalyseerd met de nieuwe DW-2 probe.

##### Resultaat

De DW oplossing bleek tot een verdunning van  $10^4$  nog besmettelijk te zijn. Bij een verdunning van  $10^6$  treedt geen wortelverdikking meer op bij de komkommerplanten in de biotoets. Analyse van de filters waarover 93 ml van de verdunning  $10^4$  is gehaald leverde het volgende beeld op (Figuur 8):



*Figuur 8. Hybridisatie van filter met besmet water (verdunning  $10^4$ ). DAPI kleurt al het DNA (blauwe kleur). De EUB probe hybridiseert met alle bacteriën (groen signaal) en de DW-2 probe hybridiseert met de DW-bacterie (rood signaal). Het gele signaal ontstaat doordat bacteriën zowel kleuren met DAPI als met de EUB probe hybridiseren en met de DW-2 probe. De grote rood-gele vlekken zijn kristallen.*

Door nu het aantal bacteriën te tellen dat met de DW-2 hybridiseert en het oppervlak van de foto te vergelijken met het oppervlak van de filter kan een schatting gemaakt worden van de DW-bacterie concentratie (zie Tabel 7).

Tabel 7. Berekening van de DW-bacterie concentratie

Oppervlak foto	$0.252 \text{ mm} \times 0.190 \text{ mm} = 4.8 \times 10^{-8} \text{ m}^2$
Oppervlak filter	$7.8 \times 10^{-4} \text{ m}^2$
Gefiltreerde hoeveelheid vloeistof	93 ml
Aantal DW-bacteriën op foto	5
DW concentratie	$0.8 \times 10^3$ bacteriën per ml

Deze berekening is een indicatieve waarde, aangezien voor de telling maar een klein gedeelte van de filter bekeken wordt en de bacteriën niet homogeen over de filter verdeeld hoeven te zijn. Bovendien zijn in deze experimenten de teeltcondities optimaal voor de DW aantasting, hetgeen in de praktijk niet het geval zal zijn.

### Conclusie

De methode om met behulp van FISH de besmettelijkheid van oplossingen te bepalen is te bewerkelijk om ook in de praktijk uit te voeren. In de toekomst zal gekeken worden naar een kwantitatieve PCR methode (real time PCR) waarmee binnen 1 dag de besmettelijkheid van oplossingen bepaald kan worden.

#### **4.2.4. FISH onderzoek: lokalisatie van de DW-bacterie in de wortel**

##### Methode

Met de nieuwe probe DW-2 worden de wortelcoupes met verschillende stadia van wortelverdikking gehybridiseerd zoals al eerder beschreven in paragraaf 4.2.1.

##### Resultaat

Hybridisatie met de nieuwe fluorescentie-probe voor de DW-bacterie (DW-2) leverde geen duidelijk beeld op. Het plantmateriaal veroorzaakt te veel fluorescentie om het signaal van de DW-2 probe te detecteren. De lokatie van de DW-bacterie en de verschillende stadia van wortelverdikking konden dus met deze probe niet bestudeerd worden.

##### Conclusie

Plantmateriaal veroorzaakt te veel fluorescentie waardoor FISH analyse met specifieke probes niet mogelijk is. Het verloop van de wortelverdikkingsziekte zal op een andere manier onderzocht moeten worden. In plaats van fluorescentie zouden voor de detectie van de DW-bacterie andere methoden gebruikt moeten worden (bijvoorbeeld met behulp van radioactiviteit of horseradish peroxidase), zodat de autofluorescentie van het plantmateriaal geen problemen geeft. Hiervoor moet de FISH methode echter aangepast en geoptimaliseerd worden. Dit onderzoek is te fundamenteel en te uitgebreid om binnen dit project uit te voeren.

### 4.3. Optimaliseren van controle en hygiëne maatregelen in praktijk

#### Doel

De moleculaire methode die door Groen Agro Control is ontwikkeld om de veroorzaker van wortelverdikking aan te tonen is gebaseerd op DNA. Het DNA is vrij stabiel in de natuur en kan nog enige tijd nadat de DW-bacterie is afgestorven aangetoond worden. Het kan dus voorkomen dat direct na een ontsmetter de bacterie al dood is maar dat zijn DNA nog aangetoond wordt. Daarom wordt in het vervolgonderzoek nagegaan hoe lang het DNA van de DW-bacterie aantoonbaar blijft na afsterven van de bacterie. Uit initiële metingen is gebleken dat bij het afsterven van de DW-bacterie door verhitting het DNA na 2 weken niet meer te detecteren is. Verschillende ontsmettingsmethoden zullen echter een andere uitwerking hebben op het DNA. De effectiviteit van de volgende ontsmettingsmethoden wordt onderzocht:

- UV
- chloor
- verhitting
- pH

Uit eerste experimenten blijkt dat het ontsmetten van besmet water met behulp van UV het meest effectief is. Direct na ontsmetting kan het DNA van de DW-bacterie nog wel aangetoond worden maar 2 dagen na behandeling is het meestal niet meer aantoonbaar. Bij de andere ontsmettingsmethoden is het DNA nog langer aanwezig, afhankelijk van concentratie, temperatuur en ingestelde pH.

#### Methode

In een eerste proef wordt de meest effectieve en realistische condities van ontsmetting bepaald (o.a. tijdsduur, concentratie; zie Tabel 8). In de daarop volgende proeven worden deze condities aangenomen en wordt het verloop van de aanwezigheid van het DW DNA in de tijd en de besmettelijkheid van de oplossing gevolgd.

De voedingsoplossing van een met DW besmette hydrocultuur plant wordt gefiltreerd door een vouwfilter om de meeste grove deeltjes af te vangen en 5x verdund. Een gedeelte van de oplossing wordt uitgeplaat op PCA om het kiemgetal van de oplossing te bepalen (het aantal bacteriën per ml). Daarna wordt de ontsmetting van de oplossing uitgevoerd met de verschillende ontsmettingsmethoden (zie Tabel 8). De oplossing wordt gedeeltelijk gebruikt voor het testen op de aanwezigheid van DW DNA door middel van een PCR analyse, gedeeltelijk wordt de oplossing toegevoegd aan een komkommerplantje om de besmettelijkheid van de oplossing te testen (biotoets). De resterende oplossing wordt bij kamertemperatuur en bij 4°C bewaard en gedurende 2-3 weken getest op aanwezigheid van DW DNA en besmettelijkheid.

Tabel 8: Ontsmettingsmethoden

Behandeling	Omschrijving methode	Tijdsduur ontsmetting
UV	bestraling van het besmette watermonster met UV gedurende verschillende tijden	15, 30, 45, 60 en 120 seconden
Chloor	toevoeging van verschillende concentraties hypochlorietoplossing (2, 3, 5, 7 en 10 ppm) aan het besmette watermonster	- (gedurende de activiteit van de chloorcomponenten)
Verhitting (95°C)	verhitting van het besmette watermonster tot 95°C gedurende verschillende tijden	1, 1.5, 2, 2.5 en 3 minuten
pH	instellen van verschillende pH waarden (pH 4, 5, 7 en 8) bij het besmette watermonster	- (gedurende de hele proef)

## Resultaat

De gegevens van de eerste proef zijn weergegeven in Tabel 9. Bij alle ontsmettingsbehandelingen is het DW DNA teruggevonden. Dit duidt erop dat het DW DNA niet direct na ontsmetting degenereert.

Tabel 9: Ontsmetting van DW oplossingen onder verschillende condities (tijd en concentraties), de biotoets en de PCR analyse werden 24 uur na ontsmetting ingezet.

Behandeling	Tijdsduur/ concentratie	Aantal bacteriën (k.v.e./ml)	PCR analyse: DW DNA	Biotoets: DW symptomen
UV	15 sec / -	0	+	-
	30 sec / -	0	+	-
	45 sec / -	0	+	-
	60 sec / -	0	+	-
	120 sec / -	0	+	-
Chloor	24 uur / 2 ppm	0	+	-
	24 uur / 3 ppm	0	+	-
	24 uur / 5 ppm	0	+	-
	24 uur / 7 ppm	0	+	-
	24 uur / 10 ppm	0	+	-
Verhitting (95°C)	1 min / -	0	+	-
	1.5 min / -	0	+	-
	2 min / -	0	+	-
	2.5 min / -	0	+	-
	3 min / -	0	+	-
pH	24 uur / pH 4	$2.1 \times 10^3$	+	-
	24 uur / pH 5	$8.3 \times 10^3$	+	+
	24 uur / pH 6	$5.2 \times 10^3$	+	+
	24 uur / pH 7	$8.2 \times 10^3$	+	+
	24 uur / pH 8	$5.3 \times 10^3$	+	+
Onbehandeld besmet monster (positief)	-	$8.4 \times 10^3$	+	+
Onbehandeld niet besmet monster (blanco)	-	$2.0 \times 10^1$	-	-

k.v.e. = kolonie vormende eenheden; + = aangetoond; - = niet aangetoond

Om de snelheid van degeneratie van het DW DNA te bepalen wordt een volgende proef ingezet. Hierbij worden de volgende condities gekozen voor de behandeling van DW besmette oplossingen:

- 30 seconden UV bestraling
- toevoeging van 50 ppm chloor
- verhitting tot 90°C gedurende 1 minuut
- instellen van pH 4.5

Na ontsmetting worden de monsters bij kamertemperatuur (20°C) en bij 4°C bewaard. Om het verloop van DW DNA in de tijd na ontsmetting te meten worden de monsters gedurende 3

weken getest op besmettelijkheid en op de aanwezigheid van het DW DNA. Hiervoor wordt respectievelijk 400 µl van het behandelde monster toegevoegd aan een komkommerplantje op hydrocultuur (biotoets) en 400 µl wordt geanalyseerd in een PCR. De gegevens van de deze proef zijn vermeld in Tabel 10.

Tabel 10: Het verloop van DW DNA in de tijd na ontsmetting.

Behandeling	Tijdsduur na ontsmetting (dagen)	PCR analyse: DW DNA		Biotoets: DW symptomen	
		monsters bewaard bij 4°C	monsters bewaard bij 20°C	monsters bewaard bij 4°C	monsters bewaard bij 20°C
UV (30 seconden)	1	-	-	-	-
	2	+	-	-	-
	3	+	-	-	-
	4	-	+	-	-
	7	+	+	-	-
	18	-	-	-	-
Chloor (50 ppm)	1	-	-	-	-
	2	-	+	-	-
	3	+/-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	18	-	-	-	-
Verhitting (90°C, 1 minuut)	1	+	+	-	-
	2	-	+	-	-
	3	+	+	-	-
	4	+	-	-	-
	7	+	+	-	-
	18	+	-	-	-
pH 4.5	1	+	+	-	-
	2	+	+	-	-
	3	+	+	-	-
	4	+	+/-	-	-
	7	+	+	-	-
	18	+	-	-	-
Onbehandeld besmet monster (positief)	1	+	+	+	+
Onbehandeld niet besmet monster (blanco)	1	-	-	-	-

+ = aangetoond; - = niet aangetoond; +/- = twijfelachtig

### Conclusie

Uit de experimenten blijkt dat een behandeling met chloor, UV en verhitting van besmet water het meest effectief is voor de ontsmetting van het water, alle bacteriën worden afgedood. Men moet er echter rekening mee houden dat de experimenten op laboratoriumschaal zijn uitgevoerd, de praktijksituatie kan hiervan iets afwijken.

Het DNA van de aanwezige, maar dode, DW-bacteriën wordt na ontsmetting echter in de meeste gevallen niet direct afgebroken. Vooral bij verhitting en bij pH 4.5 behandelingen degenereert het DNA niet of nauwelijks. De temperatuur waarbij de monsters worden opgeslagen heeft daarbij geen directe invloed. Het DNA wordt bij 20°C misschien iets sneller/beter afgebroken dan bij 4°C. Het verloop van de degeneratie van het DNA in de tijd laat geen duidelijke trend zien. Mogelijk doordat het te detecteren DNA net boven of onder de detectiegrens ligt. Daardoor kan het gebeuren dat bij een iets effectievere DNA extractie van de monsters wel DW DNA aangetoond wordt met de PCR en bij een minder effectieve DNA extractie niet. De PCR methode zou gekwantificeerd moeten worden (bijvoorbeeld door gebruik te maken van een real time PCR) om een duidelijker beeld te krijgen en om de mate van besmettelijkheid te koppelen aan het signaal van de PCR reactie.

#### **4.4. Groeiremmende factoren voor wortelverdikking**

In deze paragraaf worden de volgende experimenten uitgevoerd om het effect op wortelverdikking te testen en zo mogelijke factoren van groeiremming te bepalen:

- concurrentietest
- biofilm vorming/remming
- effect antibiotica toevoeging

##### **4.4.1. Concurrentietest**

###### Doel

Voor dit experiment worden plantjes gekweekt met gezonde bacteriepopulaties, waarna de plantjes besmet worden met dikke wortel. Het is mogelijk dat de gezonde bacteriën die in eerste instantie aanwezig zijn op de wortels van de plantjes de groei van de DW-bacterie tegen gaan zodat er geen DW aantasting plaats vindt.

###### Methode

Een gezond komkommerplantje wordt gemalen. Het sap wordt uitgeplaat op PCA. Na incubatie bij 22°C gedurende 4 dagen wordt een bacteriesuspensie gemaakt van de plaat. Van de suspensie wordt een verdunningsreeks gemaakt waarin gezonde komkommer-kiemplantjes worden geplaatst. Na 1 dag incubatie en kolonisatie wordt een 20x verdunde dikke worteloplossing toegevoegd. De plantjes worden gedurende 3 weken gecontroleerd op dikke wortel aantasting.

###### Resultaat

Figuur 9 laat de DW aantasting zien bij komkommerplanten geïncubeerd met gezonde bacteriepopulaties 14 dagen na besmetting met DW. De gegevens van de aantasting zijn weergegeven in Tabel 11. De DW aantasting trad eerder op bij hoge bacteriesuspensie concentraties dan bij lage. Planten geïncubeerd in onverdunde bacteriesuspensie maar zonder DW besmetting vertoonden wel aantasting maar geen DW vorming.

###### Conclusie

Er treedt geen remming van de DW aantasting op indien voor de besmetting met de DW-bacterie "gezonde" bacteriën aan de plant worden toegevoegd. Eerder het tegenovergestelde is waar. De planten worden door de bacteriepopulaties aangetast waarna de DW besmetting en aantasting

juist sneller verloopt. De DW-bacterie ondervindt dus eerder stimulatie dan hinder van de andere aanwezige bacteriën op de wortels.



Figuur9 : DW vorming na 14 dagen incubatie met verschillende concentraties bacteriesuspensie. Van links naar rechts planten in: onverdunde bacteriesuspensie zonder besmetting, 8x verdunde bacteriesuspensie, 16x verdunde bacteriesuspensie, 80x verdunde bacteriesuspensie, 400x verdunde bacteriesuspensie en voedingsoplossing zonder bacteriesuspensie.

Tabel 11. DW symptomen bij planten geïncubeerd met verschillende concentraties gezonde bacteriën en besmet met 20x verdunde DW oplossing.

Monsteromschrijving	Eerste DW aantasting-verschijnselen (dagen)	Biotoets: DW aantasting	PCR analyse: DW DNA
Plant in onverdunde bacteriesuspensie zonder besmetting	-	-*	-
Plant in 8x verdunde bacteriesuspensie	12	+	+
Plant in 16x verdunde bacteriesuspensie	12	+	+
Plant in 80x verdunde bacteriesuspensie	14	+	+
Plant in 400x verdunde bacteriesuspensie	17	+	+
Plant zonder bacterieïncubatie (positief)	17	+	+

+ = aangetoond; - = niet aangetoond; -\* = plantaantasting maar geen DW verschijnselen

#### 4.4.2. Biofilmvorming/remming

##### Doel

Uitgaande van de theorie dat de DW-bacterie misschien een biofilm vormt rond de wortels van de planten en dat deze planten daardoor geen voedingsstoffen op kunnen nemen en/of uitscheidingsproducten af kunnen staan, zijn enkele experimenten gestart om deze theorie te toetsen.

##### Methode

Oppervlakactieve stoffen zorgen ervoor dat bacteriën minder snel coaguleren en dat dus biofilmvorming wordt tegen gegaan. Drie concentraties van de oppervlakactieve stof Triton (5, 10 en 15  $\mu\text{l/l}$ ) worden direct in hydrocultuur toegepast met komkommer-kiemplantjes. Drie concentraties worden niet besmet en drie concentraties worden wel besmet door toevoeging van een DW oplossing. De planten worden gedurende 3 weken gecontroleerd op DW verschijnselen. In een tweede proef wordt getracht om biofilmvorming tegen te gaan door stroming/circulatie van de voedingsoplossing langs de wortels van de planten of door het schudden van de voedingsoplossing gedurende de groei van de planten. Voor de circulatie-proef worden kiemplantjes in een stromende voedingsoplossing geplaatst. De oplossing wordt besmet met DW. In de schud-proef worden de planten in bakjes met besmette voedingsoplossing op een schudtafel geplaatst. Gedurende drie weken worden de planten getest op DW aantasting.

##### Resultaat

Uit de experimenten met Triton toevoeging blijkt dat bij concentraties vanaf 10  $\mu\text{l/l}$  Triton ernstige groeiremming optreedt bij de komkommerplantjes (zie Figuur 10). Bij 5  $\mu\text{l/l}$  was er sprake van enige groeiremming door Triton. Bij geen van de besmette bakjes trad DW aantasting op (zie Figuur 10).



*Figuur 10. Van boven naar onder zijn de concentraties 5, 10 en 15  $\mu\text{l/l}$  Triton toegevoegd aan de hydrocultuur. De bakjes links in de foto zijn niet besmet, de bakjes rechts in de foto zijn wel met DW besmet. Er treedt geen DW aantasting op bij Triton toevoeging vanaf 5  $\mu\text{l/l}$ , wel wortelschade en groeiremming vanaf 10  $\mu\text{l/l}$  Triton.*



Bij de proef met circulatie werd het voedingswater verwarmd en het stromende water zorgde voor extra stress voor de plant. De toetsplanten stierven binnen enkele dagen af. Door het schudden van de voedingsoplossing braken de wortels van de plantjes af, zodat ook deze proef geen bevredigende resultaten opleverde.

### Conclusie

Met de hier besproken proefopstellingen is het niet mogelijk om biofilmvorming/remming te bestuderen daar te veel stress op de planten uitgeoefend wordt.

### **4.4.3. Effect antibiotica toevoeging**

#### Doel

Al in eerder onderzoek is aangetoond dat door toevoeging van antibiotica bij komkommerplanten de DW aantasting tegen gegaan kan worden. Met name bactericiden die tegen Gram negatieve bacteriën werken zijn erg effectief. In dit onderzoek worden specifieke antibiotica getest om de remmende werking van de antibiotica te achterhalen en om de groep van de bacteriën die bij DW aantasting een rol spelen te kunnen beperken.

#### Methode

Een met DW besmette oplossing wordt gedurende 24 uur geïncubeerd met verschillende concentraties antibiotica (1, 10 en 50 ppm). Hierna wordt een gedeelte van de oplossing 40x verdund. Komkommer-kiemplantjes worden in de onverdunde oplossing en in de 40x verdunde oplossing geplaatst. Gedurende zes weken worden de plantjes gecontroleerd op dikke wortel vorming.

#### Resultaat

De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in Tabel 12. Alle antibiotica met een remmende of dodende werking tegen Gram negatieve bacteriën gaan de DW vorming tegen. Het antibioticum Bacitracin met een dodende werking tegen Gram positieve bacteriën heeft geen effect op de DW vorming.

#### Conclusie

Uit deze experimenten blijkt weer dat wortelverdikking door een Gram negatieve bacterie moet worden veroorzaakt. Alleen de antibiotica met een dodende werking tegen Gram negatieve bacteriën remmen en stoppen de dikke wortel vorming. Zelfs een specifiek antibioticum met een smal spectrum, zoals Polymyxin B sulfaat, werkt effectief tegen de wortelverdikking. Het antibioticum Polymyxin B sulfaat heeft met name een dodende werking op *Pseudomonas* bacteriën. Naast het moleculaire onderzoek (de fylogenetische sequentie analyse van de DW band uit de DGGE profielen) laat ook het chemisch onderzoek (de antibiotica experimenten) zien dat de DW-bacterie tot de groep van *Pseudomonas* (of te wel *Bulkholderia*) bacteriën behoort. Ondanks de effectiviteit van de geteste antibiotica tegen de DW aantasting, zullen deze stoffen in de praktijk niet gebruikt kunnen worden om het DW probleem op te lossen, aangezien het gebruik van antibiotica in de teelt niet is toegestaan.

Tabel 12. Effect van antibiotica op de vorming van DW.

Antibioticum	Werking	Concentratie (ppm)	DW aantasting (onverdunde oplossing)	DW aantasting (40x verdunde oplossing)
Aureomycine (chlortetracyclin)	breed bacteriostatisch; remming van Gram negatieve en positieve bacteriën	1	+	+
		10	-	+
		50	_*	-
Streptomycine	bactericide; doding van Gram negatieve bacteriën d.m.v. inhibitie van eiwit synthese	1	+	+
		10	-	-
		50	-	-
Ampicilline	bactericide; doding van Gram negatieve en positieve bacteriën d.m.v. inhibitie van celwand synthese	1	-	-
		10	-	-
		50	-	-
Polymyxin B sulfaat	bactericide; doding van Gram negatieve bacteriën (met name Pseudomonas) d.m.v. disruptie van cytoplasmamembraan	1	-	-
		10	-	-
		50	_*	-
Cefotaxime sodium	bactericide; doding van Gram negatieve bacteriën d.m.v. inhibitie van celwand synthese	1	-	-
		10	-	-
		50	-	-
Bacitracin	bactericide; doding van Gram positieve bacteriën d.m.v. inhibitie van celwand synthese	1	+	+
		10	+	+
		50	+	+

+ = DW aangetoond; - = DW niet aangetoond; -\* = DW niet aangetoond maar wel plantaantasting

## 5. Vervolgonderzoek

### Praktijkonderzoek

Het onderzoek naar wortelverdikking is voor wat betreft de praktijkrichtlijnen afgerond. Door preventieve hygiënische maatregelen, teelttechnische maatregelen en monitoring van DW-bacterie is de wortelverdikking in de praktijk tot staan gebracht. In het onderzoeksrapport van september 2000 (Onderzoek Wortelverdikking, deel C) zijn hiervoor door Groen Agro Control richtlijnen opgesteld. Curatieve bestrijding van wortelverdikking is in de praktijk niet mogelijk, aangezien toevoeging van antibiotica tijdens de teelt niet zijn toegestaan. Wel kan door toepassing van chloor als ontsmettingsmiddel de ziekte worden tegengegaan. Dit zal alleen in een vroeg stadium van de ziekte mogelijk zijn. Regelmatige controle van planten en drainwater is dan ook van groot belang. Daarnaast kunnen teeltaanpassingen in combinatie met hygiënische maatregelen, zoals lage pH de symptomen in geval van aantasting tot een minimum worden teruggebracht. De huidige beperking van de analysetechniek is de kwantificering. Met behulp van de real time PCR techniek kunnen monsters kwantitatief geanalyseerd worden en kan inzicht verkregen worden in de infectiedruk op de bedrijven.

### Wetenschappelijk onderzoek

Voor wat betreft het ontstaan en het verloop van de ziekte is nog veel onduidelijk. Ondanks het gebruik van de nieuwste moleculaire technieken kon de aantasting en het verloop van de infectiedruk niet in beeld gebracht worden. De FISH methode zal verbeterd moeten worden (door het gebruik van anders, niet-fluorescerend, gelabelde probes) of een andere techniek zal ontwikkeld moeten worden om het ziekteverloop in de komkommerplanten te kunnen volgen en om meer duidelijkheid te verkrijgen over het ontstaan van de aantasting. Om dit te bereiken is echter een fundamenteel onderzoek vereist om de huidige analysemethoden te verbeteren, wat eerder als promotieonderzoek op een universiteit uitgevoerd kan worden in samenwerking met GAC dan binnen het huidige project.

## 6. Literatuur

1. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. J.L. Parke and D. Gurian-Sherman. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2001. Vol. 39: 225-258.
2. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/burkholderia.html>
3. Microbiology of the space shuttle water system. D.W. Koenig and D.L. Pierson. *Wat. Sci. Tech.* 1997. Vol. 35, no. 11-12: 59-64.
4. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. S. E. Seal, L.A. Jackson, J.P.W. Toung, and M.J. Daniels. *J. Gen. Microbiol.* 1993. Vol. 139: 1587-1594.
5. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. E. Yabuuchi, Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. *Microbiol. Immunol.* 1992. Vol. 36: 1251-1275.
6. *Lautropia mirabilis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative motile coccus with unusual morphology isolated from the human mouth. P.Gerner-Smith, H. Keiser-Nielsen, M. Dorsch, e.a. *Micriobiol.* 1994. Vol. 140: 1787-1797.
7. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. M.E. Juhnke, D.E. Mathre, and D.C. Sands. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. Vol. 53: 2793-2799.
8. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. H. Cao, R. L. Baldini, and L.G. Rahme. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2001. Vol. 39: 259-284.
9. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. S.E. Seal, L.A. Kackson, and M.J. Daniels. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992 Vol. 58: 3751-3758.
10. Isolation of an *Acanthamoeba* strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection. R. Michel, and B. Hauroder. *Zentralbl-Bakteriol.* 1997. Vol. 285(4): 541-57.
11. Microbial interactions in the rhizosphere; root colonization by *Pseudomonas* spp. And suppression of *Fusarium* wilt. J.M. Raaijmakers. *Dissertatie* 1994.
12. Isolation and characterization of novel rhizosphere colonization mutants of *Pseudomonas fluorescens* WCS365. L.C. Dekkers. *Dissertatie*.
13. Spatial and temporal dynamics in the bacterial community of the rhizosphere: a first step to the biological control of *Pythium*. B.M. Duineveld. *Dissertatie* 2000.
14. Changes in population of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. B.B. McSpadden Gardener and D.M. Weller. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67: 4414-4425.
15. Intraspecific metabolic diversity among strains of *Burkholderia cepacia* isolated from decayed onions, soils, and the clinical environment. D.S. Yohalem and J.W. Lorbeer. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1994. Vol. 65: 111-131.
16. Molecular determination of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. B.J.J. Lugtenberg, L. Dekkers, and G.V. Bloemberg. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001. Vol. 39:461-490.
17. Rhizosphere colonisation by biocontrol *Pseudomonas* spp. G.V. Bloemberg, M.M. Camacho-Carvajal, T.F.C. Chin-A-Woeng, e.a. *Proceedings of the 5th International PGPR Workshop.* 2000. 1-7.

18. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? B.J.J. Lugtenberg, and L.C. Dekkers. *Environ. Microbiol.* 1999 Vol. 1: 9-13.
19. Comparative evaluation of selective media for isolation of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis patients and environmental sources. L.A. Carson, O.C. Tablan, L.B. Cusick, W.R. Jarvis, M.S. Favero, and L.A. Bland. *J. Clin. Microbiol.* 1988. Vol. 26: 2096-2100.
20. Isolation medium for the recovery of *Pseudomonas cepacia* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. P.H. Gilligan, P.A. Gage, L.M. Bradshaw, D.V. Schidlow, and B.T. DeCicco. *J. Clin. Microbiol.* 1985. Vol. 22: 5-8.
21. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescen. E.O. King, K. Ward, and D.E. Raney. *J. Lab. Clin. Med.* 1954. Vol. 44: 301-307.
22. Selective and differential medium for the recovery of *Pseudomonas cepacia* from the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. D.F. Welch, M.J. Muszynski, e.a. *J. Clin. Microbiol.* 1987. Vol. 25: p. 1730-1734.