



Onderzoek naar de oorzaak van misvormde groeipunten bij begonia

Isolaties van schimmels en bacteriën uit misvormde plantendelen

W.T. Runia & D.J. van der Gaag

Project 433067

INTERN RAPPORT, NIET VOOR PUBLICATIE

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Glastuinbouw
April 2002

WAGENINGEN UR GLASTUINBOUW
BIBLIOTHEEK
Violierenweg 1
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
T +31(0)317-485606
F +31(0)10-5225193
E glastuinbouw@wur.nl

© 2002 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.

Dit onderzoek werd gefinancierd door het Productschap Tuinbouw te Zoetermeer

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Glastuinbouw

Adres : Kruisbroekweg 5
: Postbus 8, 2670 AA Naaldwijk
Tel. : 0174 – 636 885
Fax : 0174 – 636835
E-mail : info@ppo.dlo.nl
Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	4
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODEN	6
2.1 Plantmateriaal.....	6
2.2 Isolaties van schimmels en bacteriën.....	6
2.3 Toetsing op virussen.....	6
3 RESULTATEN	7
3.1 Proef 1	7
3.2 Proef 2	8
3.3 Proef 3	9
3.4 Proef 4	10
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	11
5 LITERATUUR.....	12

Samenvatting

Eind jaren negentig werd voor het eerst het fenomeen "misvormde groeipunten bij begonia" (MGB) beschreven. De oorzaak van MGB is tot nu toe onbekend. Om te bepalen of bepaalde micro-organismen betrokken zijn bij het optreden van misvormde groeipunten van begonia werden isolaties gemaakt uit zieke en gezonde plantendelen van begoniaplanten met misvormde groeipunten (MGB). Plantenstukjes werden uitgelegd op verschillende media: SNA (semi-selectief voor *Fusarium begoniae*), Komada (selectief voor *Fusarium oxysporum*), PDA (algemeen schimmelmedium), BYA (semi-selectief medium voor gisten) en NA (bacteriemedium). Er werd geen verband gevonden tussen de isolatie van een bepaald micro-organisme en MGB-symptomen. Toetsing op het voorkomen van het tomatenbronsvlekkenvirus (TSWV) en het impatiensvirus (INSV) m.b.v. ELISA leverde geen éénduidige resultaten op: bij één plant met MGB werd een positieve reactie gevonden voor beide virussen maar bij 5 andere planten niet. Op wortels van planten met MGB kon het wortelverdikkingsagens niet worden aangetoond. Uit dit onderzoek lijken micro-organismen niet betrokken te zijn bij MGB. Mogelijk is net als bij wortelverdikking een niet of moeilijk op kunstmatig medium te isoleren organisme betrokken. Aanbevolen wordt om met behulp van de moleculaire methode PCR-DGGE te bepalen of MGB geassocieerd is met een bepaalde bacterie of schimmel, die mogelijk niet op een kunstmatig medium kan worden geïsoleerd.

1 Inleiding

Eind jaren negentig werd voor het eerst het fenomeen "misvormde groeipunten bij begonia" (MGB) beschreven. De oorzaak van MGB is tot nu toe onbekend. Het vermoeden bestond dat de schimmel *Fusarium begoniae* de oorzaak van MGB was maar kunstmatige besmetting van gezonde planten leverde geen MGB-symptomen op (Van der Gaag & Hiddink, 2000). Teeltomstandigheden lijken MGB tot nu toe ook niet te kunnen verklaren en mogelijk zijn andere, misschien nog onbekende micro-organismen bij het fenomeen MGB betrokken. Doel van dit onderzoek was middels isolaties te onderzoeken of bepaalde micro-organismen geassocieerd zijn met MGB om zo de veroorzaker van het fenomeen te kunnen achterhalen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Plantmateriaal

Plantmateriaal afkomstig van praktijkbedrijven met MGB-symptomen werden onderzocht. In totaal werden 33 planten uit 7 verschillende partijen onderzocht. De symptomen (misvormingen) werden beschreven.

2.2 Isolaties van schimmels en bacteriën

Misvormde plantendelen (bloemblaadjes, bloemstelen, bladstelen, stengels, bladknoppen) werden afgesneden, gespoeld in 10% ethanol en vervolgens in steriel demiwater (lichte oppervlakteontsmetting). Per plantendeel werden schijfjes uitgeplaat op 5 verschillende media: SNA (semi-selectief medium voor *Fusarium begoniae*), Komada (selectief voor *Fusarium oxysporum*), nutriënt agar (bacteriën), PDA met 50 µg/ml cefotaxime sodium en 50 µg/ml vancomycine HCl (schimmels), BYA (gisten). Per medium werden 3 schijfjes uitgeplaat op 1 Petri schaal. De schalen werden geïncubeerd bij 20°C in het donker en beoordeeld na 2-8 dagen. Als controle werden ook isolaties gemaakt uit plantendelen zonder MGB-symptomen (gezonde delen).

2.3 Toetsing op virussen

Voor toetsing op virussen is m.b.v. ELISA gekeken naar het voorkomen van het tomatenbronsvlekkenvirus en het impatiensvirus.

3 Resultaten

3.1 Proef 1

Planten afkomstig uit één partij werden onderzocht.

Symptomen

- Verfrommelde bloemknoppen in oksels (misvormde groeipunten)
- Bruine randen op de bloemblaadjes
- Eén plant met een rode streep op de bladsteel

Isolaties

Van elk plantendeel werden 3 stukjes uitgeplaat per medium. Tabel 1 toont het aantal stukjes waaruit één of meerdere micro-organismen groeiden. Er werden geen gisten geïsoleerd. Er waren geen consistente verschillen in de geïsoleerde micro-organismen tussen gezonde en misvormde delen (Tabel 1).

Tabel 1. Resultaten (proef 1) van isolaties uit plantendelen van begonia zonder (G) en met (M) MGB-symptomen op 5 verschillende media. Dni = dagen na incubatie.

Plantendeel	G/M	SNA		Komada		PDA +antibiotica		BYA		Nutriënt Agar	
		2 dni	8 dni	2 dni	8 dni	2 dni	8 dni	2 dni	8 dni	2 dni	8 dni
Bloemblaadje	G	0 ^x	0	0	0	0	0	0	1 S	3	1 B
Bloemsteel	G	0	0	1 S	1 S	3	2 S	2 S	2 S	2 S	2 S
Bladsteel	G	0	0	3	2 F	2 S	3 S(P)	3	2P,1M	3 S	3 B
Stengel	G	0	1 F,1S	0	2 F	2 S	3 S, 1 P	3 S	3 S	2 S	3 B,1 P
Bladknop	G	0	3 S	0	3 S	0	3 B,2 S	2 S	3 S	3 B	3 B
Grondvocht Paprikaplant	G	nb ^y	nb	nb	S	B+S*	B+S	B***	B+S	B ^P	B ^P
Bloemblaadje	M	2 S	2 S	0	2 S	3 S	3 S,1 B	0	3S (P+T)	3 S	3 B
Bloemsteel	M	1S	0	0	0	3 S	2 S,1 B	1 S	1 S,2 B	1 S	3 B
Bladsteel	M	1S	3 S	0	3 S	1 S	3 S (P+T)	2 S	3 S (P+T)	1 S	2 B,3 S
Stengel	M	0	2 S	0	0	1 S	3 B,1 S	1 S	2 S,1 B	1 B	3 B
Bladknop	M	0	3 S	0	1 S	3 S	3 S	1 B	3 S,3 B	3 B	3 B
Grondvocht Begoniaplant	M	nb	S	nb	1F	B+S*	B+S	B+S*	B+S*	B ^P	B
Wortel	M	3S(py)	3 S	0	1F+S, 2 S	3S(py)	3 S	3 S	3 S	3 B,3 S	3 B,3 S
Wortel	M	3S(py)	3 S	0	3 S	3S(py)	3 S	3 S	3 S	3 B,3 S	3 B,3 S

^x Het getal geeft het aantal plantenstukjes aan waaruit één of meerdere micro-organismen groeiden (totaal 3 stukjes). De letter geeft aan welk soort micro-organisme op het medium groeide:

S = (snelgroeiende) schimmel, B = bacteriën, B^P = mogelijk *Pseudomonas*, kolonie fluorescerend
py = *Pythium?*, F = *Fusarium* sp., P = *Penicillium*, T = *Trichoderma*, M = *Mucor* of *Rhizopus*

* = veel bacteriën, *** = zeer veel bacteriën

^y nb = niet bepaald

3.2 Proef 2

Planten afkomstig van één partij, cv Britt Dark werden onderzocht.

Symptomen

- Bruine strepen op bladstelen en stengels lopend tot de voet van de plant. Bij doorsnede stengel soms over gehele oppervlak bruin

Isolaties

Uit alle bladstelen werd een *Fusarium sp.* geïsoleerd (Tabel 2). De verschillende isolaten waren morfologisch identiek en één isolaat werd naar de Plantenziektkundige Dienst (PD) gestuurd voor identificatie. Het isolaat werd door de PD geïdentificeerd als de nieuwe *Fusarium* soort bij begonia die verwelking van de plant veroorzaakt.

Tabel 2. Resultaten (proef 2) van isolaties uit bladstelen van begonia zonder (G) en met (M) MGB-symptomen op 3 verschillende media.

Gezond/Misvormd	SNA	Komada	PDA
G	3 F ^x	2 F	3 Schimmels
G	3 F	1 F	3 S+ B
G	2 F	2 F	3 S
G	1 F	2 F	3 S
G	1 F	3 F	3 S
G	1 F	1 F	3 S
G	3 F	3 F	3 S
G	1 F	3 F	3 S
M	2 F	1 F	3 S
M	0 F	1 F	3 S
M	2 F	3 F	3 S
M	2 F	2 F	3 S
M	3 F	2 F	3 S
M	1 F	3 F	3 S
M	2 F	3 F	3 S
M	2 F	3 F	3 S

*Het getal geeft het aantal bladsteelstukjes aan waaruit micro-organisme(n) groeiden. Er waren 3 bladsteelstukjes per schaal.

F = *Fusarium sp.*

S = Schimmel anders dan *Fusarium sp.*

B = Bacterie

Virussen

In totaal zijn bladstelen afkomstig van 6 planten getoetst op het voorkomen van het tomatenbronsvlekkenvirus (TSWV) en het impatiens-vlekkenvirus (INSV). Eén monster had een positieve reactie op TSWV en een licht positieve reactie op INSV.

3.3 Proef 3

Planten afkomstig uit vier partijen met MGB symptomen (no. 1 t/m 4) werden onderzocht.

Symptomen

- Groeiremming: knoppen groeien niet uit

Isolaties

Op het medium Komada werd in één geval *Fusarium* geïsoleerd. Dit isolaat was morfologisch identiek met de isolaten in proef 2 en behoort vermoedelijk ook tot de nieuwe *Fusarium* soort die verwelking veroorzaakt bij begonia. De schimmels die op SNA groeiden waren geen *Fusarium* spp. De geïsoleerde bacteriën waren oranje en werden geïdentificeerd door de PD als saprofytische bacteriën behorende tot de genera *Cytophaga* en *Xanthomonas*.

Wortelverdikking

Onderzocht werd of het wortelverdikkingsagens aanwezig was op wortels van begoniaplanten met MGB m.b.v. een biotoets met komkommerplanten (Van der Gaag *et al.*, 2002). Het wortelverdikkingsagens kon niet worden aangetoond.

Tabel 3. Resultaten (proef 3) van isolaties uit bladeren en stengels van begoniaplanten uit 4 verschillende partijen met MGB-symptomen op 3 verschillende media.

partij	plant	Komada		SNA		Nutrient agar	
		blad	Stengel	blad	stengel	blad	stengel
1	1	3 ^x	3-	1+	3-	3+	2+
1	2	3-	3-	2+	1+	3+	3+
1	3	3-	3-	1+	3-	3+	3+
1	4	3-	3-	3-	1+	3+	3+
2	1	3-	3-	1+	2+	3+	2+
2	2	3-	3-	3+	2+	3+	3+
2	3	3-	3-	2+	3+	3+	3+
2	4	3-	3-	1+	1+	3+	3-
3	1	3-	3-	3+	3+	3+	3+
3	2	3-	3-	3-	1+	3+	3+
3	3	3-	3-	3-	3+	3+	3+
3	4	3-	3-	2+	3-	3+	3+
4	1	3+	3+	3+	3+	1+	2+
4	2	3-	3-	3+	3+	3+	2+
4	3	3-	3-	2+	1+	3+	3+
4	4	3-	3-	2+	1+	3+	3+

*Het getal geeft het aantal blad- of stengelstukjes weer waaruit micro-organismen groeiden. Totaal 3 stukjes per schaal.

+ : uitgroei micro-organisme(n)

- : geen uitgroei micro-organisme(n)

3.4 Proef 4

Twee begoniaplanten met MGB-symptomen werden onderzocht

Symptomen

- Groeiremming: knoppen groeien niet uit

Isolaties

Op SNA worden wel schimmels aangetoond maar geen daarvan was *Fusarium*. Op Komada werd in 2 gevallen *Fusarium* geïsoleerd. De isolaten waren morfologisch identiek aan het isolaat dat door de PD ws geïdentificeerd als de nieuwe *Fusarium* soort op begonia (zie proef 2). De geïsoleerde bacteriën hadden dezelfde oranje kleur als in proef 3.

Tabel 3. Resultaten (proef 3) van isolaties uit bladeren en stengels van begoniaplanten met MGB-symptomen op 3 verschillende media. Er waren 3 bladsteelstukjes per schaal.

Plantendeel	SNA		Komada		Nutrient agar	
	Schaal 1	Schaal 2	Schaal 1	Schaal 2	Schaal 1	Schaal 2
Bloemblad plant 1	Geen Fus	Geen Fus	3 -	3 -	3 +	2 +
Stengel plant 1	Geen Fus	Geen Fus	3 -	3 -	3 +	1 +
Bloemblad plant 2	Geen Fus	Geen Fus	1 +	1 +	3 +	3 +
Stengel plant 2	Geen Fus	Geen Fus	3 -	3 -	3 +	3 +

4 Conclusies en aanbevelingen

- Er is geen duidelijk relatie tussen MGB-symptomen en de geïsoleerde micro-organismen noch met aanwezigheid van het tomatenbronsvlekkenvirus of het impatien-vlekkenvirus.
- Het wortelverdikkingsagens kon niet worden aangetoond op wortels van planten met MGB.
- Uit het onderzoek komen geen duidelijk aanwijzingen dat een micro-organisme betrokken is bij het ontstaan van MGB. Mogelijk dat micro-organismen, die niet op een kunstmatige voedingsbodem te kweken zijn (niet-kweekbare micro-organismen), de oorzaak zijn. Om dat uit te zoeken wordt aanbevolen om m.b.v. moleculaire methoden (PCR-DGGE) te bepalen of MGB geassocieerd is met bepaalde schimmels of bacteriën.

5 Literatuur

Van der Gaag, D.J. & G. Hiddink, 2000. Inoculatie van begonia met *Fusarium begoniae*. Rapport 316, Proefstation voor de Bloemisterij en Glasgroente, Naaldwijk.

Van der Gaag, D.J., P. Paternotte, R. Hamelink & C. Bloemhard, 2002. Wortelverdikking bij komkommer: pH, potsoort en waardplanten. PPO-rapport 535.