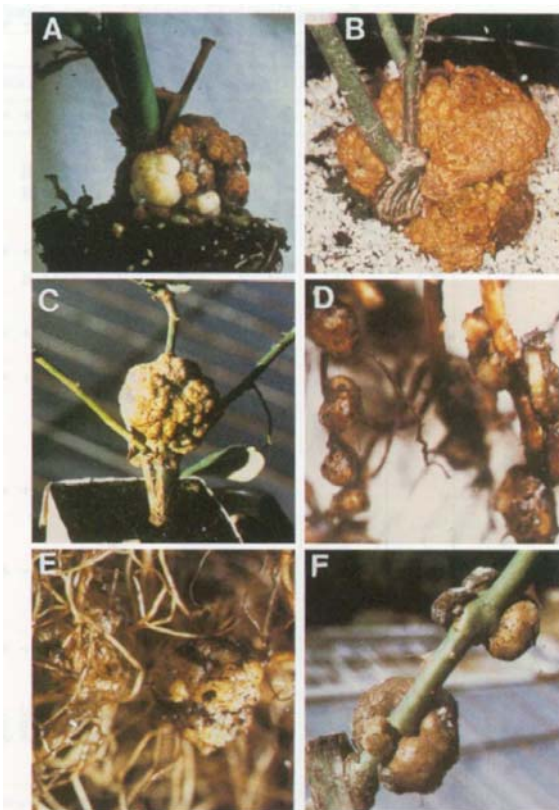


DETECTIE VAN AGROBACTERIUM TUMEFACIENS IN GROND

Verkrijgen van inzicht in de wortelknobbel problematiek

Eindrapportage (fase I-III)



Opdrachtgever: Productschap Tuinbouw
Projecttitel: Detectie van *Agrobacterium tumefaciens* in grond

Projectcode: 2005.2725
Documenttype: Eindrapportage (fase I-III)
Publicatiedatum: 14 februari 2008
Projectleider: Dr. I.J.T. Dinkla
Auteur(s): Ir. S.H. Lieten (*Bioclear*), Dr. Ir. E.T.M. Meekes (*Naktuinbouw*),
Dr. I.J.T. Dinkla (*Bioclear*), Ing. R. Butot (*Naktuinbouw*), Ing.
A.K. Geurkink (*Bioclear*), Ir. G. Jongedijk (*Naktuinbouw*) en
Dr. J. Krooneman (*Bioclear*)
Trefwoorden: bodem, *Agrobacterium* problematiek, detectie en infectie

Het in dit rapport beschreven onderzoek is mede tot stand gekomen door de kundige betrokkenheid van telers en deskundigen. Wij bedanken hiervoor de leden van de Begeleidingscommissie, Dhr. Fleuren (Boomkwekerijen Henri Fleuren bv, voorzitter), Dhr. Ebbens (F. Kuiper bv), Dhr. Coenders (Frank Coenders kwekerijen), Dhr. van de Laak (Lakei Boomkwekerijen) en Dhr. Meijer (PPO).

Bioclear b.v.
Postadres:
Postbus 2262, 9704 CG Groningen
Bezoekadres:
Rozenburglaan 13C, Groningen
Telefoon: 050 571 8455
Fax: 050 571 7920
E-mail: info@bioclear.nl
Website: www.bioclear.nl

Bioclear werkt conform het INK kwaliteitssysteem.

De cover van het rapport is gemaakt van recyclebaar polypropyleen.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande toestemming van Bioclear.

© Bioclear b.v.

Bioclear adviseert bedrijven, overheden en dienstverlenende organisaties op het terrein van de milieutechnologie.

Op opdrachten aan Bioclear zijn van toepassing de Algemene Voorwaarden voor onderzoeksopdrachten aan Bioclear, zoals gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Groningen.

PUBLIEKSSAMENVATTING

De bacterie *Agrobacterium tumefaciens* is de veroorzaker van wortelknobbels in wortels en stengels van fruitbomen en houtige siergewassen zoals rozen. Vooral bij export naar landen waar een zogenaamde nultolerantie geldt, leidt dit tot grote economische schade. Een infectie aan een plant kan pas achteraf (aan het eind van de teelt) worden vastgesteld. Met de binnen het project ontwikkelde toets kan een teler voorafgaand aan de teelt laten vaststellen of op een perceel ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aanwezig is. Met deze kennis kan de teler vervolgens beslissen om een ander perceel te gebruiken of een minder gevoelige gewas te gebruiken.

Binnen het project 'Detectie van *Agrobacterium tumefaciens* in grond II' is een gevoelige en betrouwbare toets ontwikkeld voor de detectie van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in grond. Deze toets is gebaseerd op een zogenaamde moleculaire methode, de PCR, in combinatie met een selectieve kweekstap. De toets maakt het mogelijk om (semi)kwantitatieve uitspraken te doen over de aanwezigheid van specifiek ziekteverwekkende *A. tumefaciens* op een perceel. De methode heeft een detectielimiet van 10-30 cellen *A. tumefaciens* (*iaam*-gen) per gram grond. De methode is qua ontwerp en uitvoering geschikt om te worden toegepast binnen de bestaande laboratoriumpraktijk.

Voor een accurate toepassing van de toets op een perceel is een bemonsteringsmethode ontwikkeld en geoptimaliseerd. Deze bemonsteringsmethode sluit aan bij de bestaande bemonstering voor aaltjes. Het is met de ontwikkelde methode mogelijk om *A. tumefaciens* te detecteren op percelen die verdacht worden van een *A. tumefaciens* besmetting. Hierbij kan gekozen worden voor één of meerdere analyses per perceel. Meerdere analyses verhogen de betrouwbaarheid en stellen een teler in staat de besmetting op het perceel te lokaliseren.

Naast de toets is meer inzicht verkregen in het voorkomen en overleven van *A. tumefaciens* op percelen. Hiertoe zijn drie percelen met een *A. tumefaciens* besmetting gedurende 2 jaar gevolgd. Uit de monitoring blijkt dat de bacterie op een perceel aanwezig blijft, ook als het perceel braakliggend is (geen planten aanwezig). Dit betekent dat op deze velden *A. tumefaciens* naar verwachting tot zeker enkele jaren na de teelt van een besmet gewas opnieuw voor problemen kan zorgen, ook al zijn in de tussentijd alleen gewassen geteeld, die geen waard zijn voor *A. tumefaciens*.

Met de ontwikkelde toets is het mogelijk te beoordelen of een perceel zwaar besmet, besmet of niet besmet is. De teler kan met deze resultaten in de hand een risico-inschatting maken. Zo kan de teler er voor kiezen wel een (gevoelig) gewas te telen, of juist besluiten hiervoor liever gebruik te maken van een ander perceel.

INHOUDSOPGAVE

PUBLIEKSSAMENVATTING	I
1. INTRODUCTIE	1
1.1. Achtergrond wortelknobbel problematiek	1
1.2. Informatie over de pathogene bacterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1
2. AANPAK	4
2.1. Analyse	4
2.1.1. Kwalitatieve analyse	4
2.1.2. Verbetering van de gevoeligheid van de kwalitatieve analyse	4
2.1.3. (Semi)-kwantitatieve analyse	5
2.2. Infectieproeven	5
2.2.1. Infectieproeven tomaat	5
2.2.2. Infectieproeven roos en appel	6
2.2.3. Infectieproef roos, appel en kers	7
2.3. Overlevingsproeven <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in grond	7
2.3.1. Gecontroleerde laboratoriumopstelling met kunstmatig besmette grond	7
2.3.2. Buitenproef met kunstmatig en natuurlijk besmette grond	8
2.4. Veldscreening	9
2.5. Veldmonitoring	10
2.5.1. Monstername	10
2.5.2. Detectie van bacteriën in het grondmonster	11
2.6. Optimaliseren monsterverwerking	12
2.6.1. Samenvoegen van kweken	12
2.6.2. Groter oppervlakte bemonsteren	12
2.6.3. Groter monster analyseren	13
2.7. Veldhistorie	13
2.8. Correlaties / database	13
3. RESULTATEN	14
3.1. Analyse en monstername	14
3.2. Infectieproef <i>Agrobacterium</i>	14
3.2.1. Infectieproef tomaat	14
3.2.2. Infectieproef roos en appel	15
3.2.3. Infectieproef roos, appel en kers	15
3.3. Overlevingsproeven <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in grond	15
3.3.1. Laboratoriumopstelling met kunstmatig besmette grond	16
3.3.2. Buitenproef met kunstmatig en natuurlijk besmette grond	19
3.4. Veldscreening	22
3.5. Veldmonitoring	23
3.5.1. Monitoring perceel 12	24
3.5.2. Monitoring perceel 18	24
3.5.3. Monitoring perceel 20	24
3.6. Veldhistorie	28
3.6.1. Veldhistorie perceel 12	28
3.6.2. Veldhistorie perceel 18	28
3.6.3. Veldhistorie perceel 20	29
3.7. Optimaliseren monsterverwerking	29
3.7.1. Samenvoegen <i>Agrobacterium</i> kweken	29
3.7.2. Groter oppervlak bemonsteren	29
3.7.3. Groter monster analyseren	31

4. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	33
4.1. Ontwikkelde toets en bemonsteringsmethode	33
4.2. Overlevings- en infectieproeven	33
4.3. Aantonen van <i>A. tumefaciens</i> in de bemonsterde percelen	33
4.3. Aanbevelingen	34

BIJLAGEN:

Bijlage 1. De kwalitatieve *A. tumefaciens* analyse

Bijlage 2. De (semi)kwantitatieve analyse

Bijlage 3. Vragenlijst voor de telers

1. INTRODUCTIE

In deze rapportage wordt een overzicht gegeven van alle werkzaamheden die in opdracht van het Productschap Tuinbouw binnen het project 'Detectie van Agrobacterium in grond II' zijn uitgevoerd. Dit project is een vervolg op het project 'Detectie van Agrobacterium in grond I' dat zich richtte op het ontwikkelen van een moleculaire detectietoets voor *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*). Binnen het hier gerapporteerde project is gewerkt aan het verder verfijnen van de moleculaire detectiemethode en het in kaart brengen van de ecologie van *A. tumefaciens* in grond. Het project is verdeeld in 3 fasen waarin de volgende aspecten zijn behandeld:

Fase 1:

- kostenreductie van de *A. tumefaciens*-analyse;
- opstellen van een bemonsteringsstrategie;
- inventarisatie van de mogelijkheden voor verhoging van de betrouwbaarheid van de analyse.

Fase 2:

- verhoging van de betrouwbaarheid van de *A. tumefaciens*-analyse;
- bemonstering voor bepaling van het vóórkomen en de verspreiding van *A. tumefaciens*;
- bemonstering voor de vorm en ontwikkeling van besmettingshaarden en de overleving van *A. tumefaciens*.

Fase 3:

- bepaling van het vóórkomen en de verspreiding van *A. tumefaciens*;
- bepaling van de vorm en ontwikkeling van besmettingshaarden en de overleving van *A. tumefaciens*;
- inventarisatie van de relaties tussen aanwezigheid, aantallen en infectierisico's;
- preventie of verlaging van infectierisico's.

1.1. Achtergrond wortelknobbel problematiek

De bacterie *Agrobacterium tumefaciens* is de veroorzaker van wortelknobbels in wortels en stengels van fruitbomen en houtige siergewassen zoals rozen. Hierdoor kan ernstige galvorming optreden en kan dwerggroei en afsterven van de plant optreden. Vooral bij export naar landen waar een zogenaamde nultolerantie geldt, leidt dit tot grote economische schade. Een infectie aan een plant kan pas achteraf (aan het eind van de teelt) worden vastgesteld. Een teler is er dus bij gebaat om – voordat hij op een perceel een gewas gaat planten dat gevoelig is voor *A. tumefaciens* – te weten of op het perceel de pathogene *A. tumefaciens* aanwezig is. Hiermee kan hij een risico-inschatting maken voor het optreden van een wortelknobbel besmetting op het perceel. Met deze kennis kan de teler vervolgens beslissen om een ander perceel te gebruiken of om andere, minder gevoelige, gewassen te planten.

1.2. Informatie over de pathogene bacterie *Agrobacterium tumefaciens*

Voor het inschatten van de risico's op besmetting is het van belang een goed inzicht te hebben in de ecologie van de bacterie, oftewel hoe de bacterie zich gedraagt op een perceel. Of er sprake is van een risico op besmetting die resulteert in symptomen in een gewas hangt van een groot aantal factoren af. Uit andere onderzoeken en uit praktijkervaringen is al veel informatie te verkrijgen, maar veel cruciale informatie is tot nu onbekend gebleven.

Het huidige onderzoek geeft inzicht in een aantal factoren en levert daarmee een belangrijke bijdrage aan de kennis op het gebied van het voorkomen en verspreiden van *Agrobacterium* in percelen. In de volgende paragrafen zijn een aantal cruciale aspecten kort besproken om te laten zien waarom onderzoek hiernaar nodig was en is.

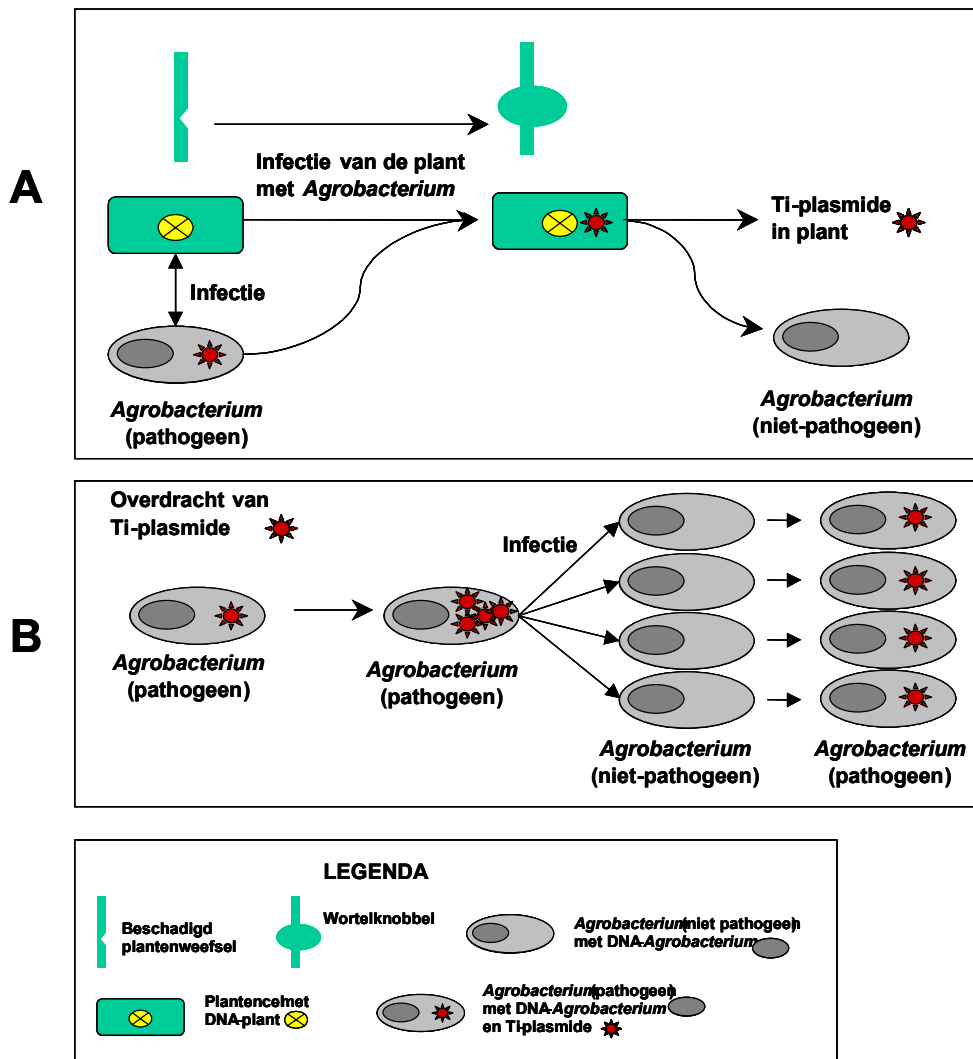
Er zijn ziekteverwekkende (pathogene) en niet-ziekteverwekkende (niet-pathogene) varianten van *A. tumefaciens*. Ziekteverwekkende varianten bevatten naast de standaard genetische informatie voor het organisme een extra stukje genetisch materiaal, het zogenaamde Ti-plasmide. Een gedeelte van het Ti-plasmide wordt bij infectie overgedragen naar de plant. Als gevolg hiervan gaan cellen in de plant ongeremd delen en ontstaan wortelknobbels. Daarnaast produceert de plant voedingsstoffen waarvan *A. tumefaciens* profiteert. Na infectie is *A. tumefaciens* het Ti-plasmide kwijt en dus niet meer pathogeen (zie figuur 1). Infectie vindt voornamelijk plaats na beschadiging van de plant, de bacterie kan dan gemakkelijk binnendringen.

Dat de bacterie de plant infecteert en tot tumorvorming aanzet is dus bekend; (grotendeels) onbekend is echter:

- welke aantallen nodig zijn om een infectie te veroorzaken (infectiedrempel);
- welke omstandigheden (behalve beschadiging) gunstig zijn voor een infectie;
- onder welke omstandigheden een infectie ook daadwerkelijk leidt tot aantasting (knobbelvorming) van de plant.

Daarnaast is onbekend hoe *A. tumefaciens* zich op een perceel gedraagt:

- in welke aantallen komt *A. tumefaciens* van nature in percelen voor;
- hoelang overleeft *A. tumefaciens* op een perceel;
- (hoe) verspreidt de besmetting zich over een perceel.



Figuur 1. Schematisch overzicht van de wijze van infectie door *A. tumefaciens*

2. AANPAK

Om een inschatting te maken van de mogelijke risico's op een *A. tumefaciens* besmetting is een meetmethode vereist die onderscheid maakt tussen pathogene en niet pathogene *A. tumefaciens*. Deze methode moet gevoelig zijn en werkzaam voor grondmonsters. Daarnaast is inzicht in de infectiedrempel en de overlevingskansen van *A. tumefaciens* op een perceel van belang. De aan- of afwezigheid van *A. tumefaciens* alleen bepaald nog niet of er een infectie zal optreden. Het is mogelijk dat *A. tumefaciens* slechts bij hoge concentraties een infectie veroorzaakt maar het is ook mogelijk dat dit al bij een lage concentratie plaatsvindt.

Middels monitoring van percelen met *A. tumefaciens* besmettingshaarden wordt meer inzicht verkregen in de natuurlijke achtergrondwaarden en de ontwikkeling van *A. tumefaciens* op percelen. Ter ondersteuning van deze monitoringsdata van de besmette percelen zijn infectieproeven en overlevingsproeven uitgevoerd. De infectieproeven moeten inzicht geven in de aantallen *A. tumefaciens* cellen die nodig zijn om een infectie te veroorzaken (infectiedrempel) en daarmee een risico vormen. De overlevingsproeven dienen meer inzicht te geven in de aard en mate waarin bepaalde factoren de overleving van *A. tumefaciens* kunnen beïnvloeden.

2.1. Analyse

Voor het aantonen van *A. tumefaciens* op percelen is een zogenaamde moleculaire detectiemethode ontwikkeld. Bij deze methode wordt het totale genetische materiaal (DNA) uit een grondmonster geïsoleerd waarna gezocht wordt naar het specifiek stukje DNA (het *iaam*-gen) dat afkomstig is van een ziekteverwekkende *A. tumefaciens* bacterie. Dit stukje wordt met een zogenaamde PCR (polymerase chain reaction) reactie vermenigvuldigt en aangetoond. Een gedetailleerde uitleg van de methode is opgenomen in bijlage 1. Tijdens het project zijn verschillende aanpassingen aan de methode uitgevoerd om de vraagstellingen zo goed mogelijk te beantwoorden.

2.1.1. Kwalitatieve analyse

Initieel is de methode in het project 'Detectie van Agrobacterium in grond I' ontwikkeld voor de directe detectie van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in grond. Deze methode is kwalitatief, dat wil zeggen dat alleen een antwoordt wordt gegeven op de vraag of de bacterie aan- dan wel afwezig is. De methode heeft een detectielimiet van 200 cellen per gram grond en is gericht op het aantonen van het *iaam*-gen. De analyse wordt uitgevoerd op een 0,5 gram grond.

De methode bevat 2 vermeerderingsstappen van het genetische materiaal, de eerste wordt de single en de tweede wordt de nested stap genoemd. Een signaal in de single stap duidt op de aanwezigheid van veel ziekteverwekkende cellen, een signaal in de nested stap duidt op minder ziekteverwekkende cellen in een monster.

2.1.2. Verbetering van de gevoeligheid van de kwalitatieve analyse

Vaak komen in monsters zeer lage aantallen *A. tumefaciens* voor zodat een aanvullende stap aan de toets is toegevoegd. De aanvullende stap bestaat uit het voorkweken van de aanwezige *A. tumefaciens* cellen alvorens de PCR analyse uit te voeren. Middels deze voorkweek worden levende *A. tumefaciens* cellen aangetoond en wordt door gebruik te maken van twee verschillende specifieke media tevens onderscheid gemaakt tussen de twee belangrijkste *A. tumefaciens* biovars.

Daarnaast wordt voor de voorkweek gebruik gemaakt van 10 gram grond in plaats van 0,5 gram grond. De methode met voorkweek heeft een detectielimiet van circa 10-30 *iaam*-genen/gram grond, de analyse is daarmee veel gevoeliger geworden.

2.1.3. (Semi)-kwantitatieve analyse

Voor kwantitatieve bepalingen van *A. tumefaciens* is in het laboratorium van Bioclear de Q-PCR methode opgezet en gevalideerd voor het *iaam*-gen (zie bijlage 2). Met deze methode is het mogelijk vast te stellen welke aantallen in een monster aanwezig zijn. De detectielimiet van deze analyse is 1.250 *iaam*-genen/gram grond.

Middels een combinatie van een voorkweek van in grond aanwezige *A. tumefaciens* en de (Q-) PCR analyse is een semi-kwantitatieve detectie mogelijk voor aantallen lager dan deze detectielimiet. De toets is hiermee geschikt voor kwantitatieve analyse van monsters met meer dan 1.250 *iaam*-genen per gram grond en geschikt voor semi-kwantitatieve analyse voor monsters met minder dan 1.250 *iaam*-genen per gram grond.

2.2. Infectieproeven

2.2.1. Infectieproeven tomaat

Om de symptoominducerende capaciteit van verschillende *A. tumefaciens* isolaten te controleren is een infectieproef uitgevoerd op tomaat, een proef die vroeger werd gebruikt om de pathogeniteit van isolaten vast te stellen. Hiervoor zijn tomatenplanten cv Moneymaker ingespoten met bacteriesuspensies van *A. tumefaciens* biovar I of biovar II van verschillende herkomst (tabel 1). De proef is uitgevoerd in duplo en het hele experiment duurde 3 weken.

Tabel 1. Overzicht van *A. tumefaciens* isolaten, aanwezig bij Naktuinbouw, gebruikt in de infectieproef in tomaat.

Code isolaat	Biovar	Oorspronkelijk gewas	Methode van opslag
4	II	Roos	kraal
6	II	Prunus	kraal
6	II	Prunus	buis
15	I	Chrysan	kraal
15	I	Chrysan	buis
20	I	Roos	kraal
20	I	Roos	buis
24	I	Aster	kraal
24	I	Aster	buis
33	I	Tomaat	kraal

Om te bepalen welke concentratie *A. tumefaciens* noodzakelijk is om tomaat te infecteren en symptomen te veroorzaken is de onderstaande proef uitgevoerd. *A. tumefaciens* werd in verschillende concentraties aan grond toegevoegd, variërend van 10^2 tot 10^8 cellen per gram grond.

Tabel 2. Overzicht van de infectieproeven in tomaat met in grond verschillende concentraties ziekteverwekkende *A. tumefaciens*

Concentratie <i>A. tum</i> (cfu/g grond)	onbesmet	biovar I	biovar II
0 (blanco)	5 planten		
10 ²		5 planten	5 planten
10 ⁴		5 planten	5 planten
10 ⁶		5 planten	5 planten
10 ⁸		5 planten	5 planten

Na 3 maanden zijn alle planten beoordeeld op symptomen en de aanwezigheid van *A. tumefaciens* in de plant is bij de hoogste concentraties bepaald. Hiervoor is de oude methode gebruikt: directe *A. tumefaciens* bepaling op de grond of aan het plantmateriaal, zonder voorkweek (paragraaf 2.1.1).

Om te bepalen op welke manier tomaat het best geïnoculeerd kon worden om symptomen te induceren is het volgende experiment opgezet:

1. *A. tumefaciens* (10⁸ cellen/gram grond) toegevoegd aan mengsel potgrond/zand. Hierin zijn tomatenplanten geplant met zwaar beschadigde wortels;
2. *A. tumefaciens* (10⁸ cellen/gram grond) toegevoegd aan mengsel potgrond/zand. Hierin zijn tomatenplanten geplant met zwaar beschadigde wortels én een ondergrondse inkeping aan de stamvoet;
3. *A. tumefaciens* toegevoegd aan een hydrocultuur waarop tomatenplanten met beschadigde wortels zijn gezet;
4. Tomaat geïnjecteerd met *A. tumefaciens*.

Aan het eind van het experiment zijn de planten beoordeeld op symptomen en getoetst op de aanwezigheid van het *iaam*-gen.

De bovenstaande experimenten zijn herhaald met behulp van tomatenstekken op hydrocultuur en in besmette grond. Daarnaast is het experiment nogmaals herhaald door opnieuw grote inkepingen aan de stamvoet te maken.

2.2.2. Infectieproeven roos en appel

Om symptoomontwikkeling te kunnen koppelen aan de hoeveelheid ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aanwezig in grond is gedurende de zomer een infectieproef uitgevoerd met behulp van de gewassen roos en appel. Voor roos is er gekozen om te werken met enten van *Rosa multiflora* cv. Burr, voor appel is gewerkt met appelzaailingen.

Schone grond (mengsel potgrond en zand) is besmet met verschillende concentraties ziekteverwekkende *A. tumefaciens*. In deze grond zijn stekken van *R. multiflora* cv Burr en appelzaailingen geplant. De wortels van de appelzaailingen werden beschadigd voordat ze in de besmette grond werden overgezet. Bemonstering van de grond heeft plaatsgevonden bij de start van het experiment en tijdens het experiment. Aan het eind van het experiment zijn de planten beoordeeld op symptomen.

2.2.3. Infectieproef roos, appel en kers

Een vergelijkbaar experiment is nogmaals uitgevoerd met *Rosa multiflora* cv Burr, met appelzaailingen en met *Prunus avium* 'Colt'. Bij dit experiment is een hoge concentratie ziekteverwekkende *A. tumefaciens* toegevoegd aan schone potgrond.

De stekken van roos zijn 1) direct in besmette grond gestoken of 2) eerst beworteld in schone grond en daarna met beschadigingen aan de wortels overgeplant in besmette grond. De wortels van appelzaailingen zijn eerst beschadigd voordat deze zijn geplant in besmette grond, dezelfde methode is toegepast voor *Prunus*.

Aan het eind van het experiment zijn de planten beoordeeld op symptomen en zijn grond en plantmateriaal onderzocht op de aanwezigheid van *A. tumefaciens*.

2.3. Overlevingsproeven *Agrobacterium tumefaciens* in grond

De overlevingsproef geeft inzicht in de overlevingskansen van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* cellen onder verschillende klimaatcondities. De proef is opgesplitst in een gecontroleerd laboratorium deel en een buitenproef. Tijdens de proeven is met behulp van de ontwikkelde Q-PCR analyse het aantal *iam*-genen in de tijd gevolgd. Aan de hand van de resultaten is bepaald of er groei of afsterving van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* optreedt.

2.3.1. Gecontroleerde laboratoriumopstelling met kunstmatig besmette grond

Tijdens de proef is kunstmatig besmette grond blootgesteld aan een aantal gevarieerde factoren zoals temperatuur, luchtvochtigheid en aanwezigheid van plantmateriaal. Er is geprobeerd om temperaturen en luchtvochtigheden te kiezen die tijdens een natte/warme zomer of droge winter kunnen voorkomen. Er is tevens een vries/dooi proef uitgevoerd waarbij temperaturen zijn gekozen die het bevriezen en ontdooien van de grond tijdens een winter simuleren. In tabel 3 is een overzicht van de verschillende proeven weergegeven. De overleving van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* is gedurende een jaar (12 juli 2006 – 6 juli 2007) gevolgd.

Kunstmatige condities zijn aangelegd om de onderstaande effecten te toetsen:

- effect van temperatuur, waaronder het effect van vriezen en dooien van de grond;
- effect van vochtigheid van de grond op overleving van *A. tumefaciens*;
- effect van aanwezigheid van restafval van een gerooid gewas in de grond op overleving van *A. tumefaciens*.

Voor de proef is een mengsel van potgrond en zandgrond (afkomstig van het perceel van Naktuinbouw in Horst) gebruikt. De grond is kunstmatig besmet met *A. tumefaciens* biovar II (nummer 4 uit roos uit de collectie van Naktuinbouw) tot een concentratie van $1 \cdot 10^6$ cellen per gram grond. Het mengsel van potgrond en zandgrond besmet met *A. tumefaciens* is verdeeld over 250 ml glazen flessen en in drievoud onder de verschillende omstandigheden zoals vermeld in tabel 3 geïncubeerd. Van alle experimentele condities zijn monsters genomen na 0, 2, 4, 8, 11, 28, 42 en 52 weken. Het vries-dooi experiment is na 19 weken verder geïncubeerd bij 10 graden om het effect van een verdere temperatuursverandering te bepalen.

Tabel 3. Overzicht van de gevarieerde parameters van gecontroleerde labopstelling

Simulatie	Temperatuur (°C)	Water (ml)	Toevoeging plantmateriaal (g)
lente/herfst, droog	10	0	-
lente/herfst, vochtig	10	20	-
lente/herfst, nat	10	40	-
zomer, droog	30	0	-
zomer,vochtig	30	20	-
zomer,nat	30	40	-
winter, droog	Vries dooi ¹⁾	0	-
winter, vochtig	Vries/dooi	20	-
winter, nat	Vries/ dooi	40	-
toevoeging plantmateriaal	10	20	+

¹⁾ Vries/dooi: de flessen zijn elke week 5 dagen ingevroren geweest (-20 °C) waarna ze 2 dagen zijn ontdooid bij kamertemperatuur.

Het is mogelijk dat bij het vriezen en dooien de grond leidt tot het afsterven van *A. tumefaciens* maar niet tot het afbreken van het DNA. Onder lage temperaturen blijft DNA namelijk langer intact dan onder hoge temperaturen. Ter controle hierop is 8 weken na incubatie een levensvatbaarheidbepaling uitgevoerd waarbij middels het opkweken van *A. tumefaciens* (uit de grond) wordt aangetoond welk percentage (%) van *A. tumefaciens* nog levensvatbaar is.

2.3.2. Buitenproef met kunstmatig en natuurlijk besmette grond

In de buitenproef is gekeken naar het effect van natuurlijke weersomstandigheden op de overleving van *A. tumefaciens* in grond. Voor deze buitenproef is gebruik gemaakt van zowel kunstmatig, met *A. tumefaciens*, besmette grond als van natuurlijk besmette grond afkomstig van perceel 18. De buitenproef is van 4 december 2006 tot 24 oktober 2007 uitgevoerd, waardoor het effect van wisselende seizoenen op het verloop van *A. tumefaciens* in de grond is vastgesteld.

Voor de kunstmatig besmette gronden is gebruik gemaakt van dalgrond of van een mengsel van potgrond en zandgrond (idem aan grond gebruikt in de laboratorium proeven, zie 2.3.1). Deze gronden zijn beënt met $1 \cdot 10^6$ cellen ziekteverwekkende *A. tumefaciens* biovar II (nr 4 roos) per gram grond. De proeven zijn in duplo uitgevoerd op het terrein van Bioclear te Groningen. De toe- of afname van *iaam*-genen is middels Q-PCR bepaald. Monsters zijn genomen na 0, 1, 4, 9, 14, 21, 30, 37 en 46 weken.

2.4. Veldscreening

Voor het krijgen van inzicht in de verspreiding en overleving van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in ruimte en tijd zijn percelen gezocht waar *A. tumefaciens* in eerdere teelten problemen heeft veroorzaakt.

Bij de keuze van deze percelen worden een aantal criteria meegenomen:

- zwaar- en lichtbesmette percelen;
- percelen met verschillende grondtypen;
- verschillende geografische locaties;
- verschillende gewassen (roos én appel/*Prunus* percelen);
- percelen moeten een aantal jaar in dezelfde handen zijn, zodat *A. tumefaciens* besmettingen in de tijd gevolgd kunnen worden.

In samenwerking met PPO Bollen, Bomen en Fruit, het bedrijfsleven en Naktuinbouw Toetscentrum Horst / Keuringen Boomkwekerij is gezocht naar dergelijke percelen. In eerste instantie zijn 17 percelen gevonden, waar in het verleden (mogelijk) *A. tumefaciens* symptomen zijn waargenomen. Voor fase 2 van het project zijn 9 percelen geselecteerd op basis van het gewas waarin symptomen optraden, de grondsoort en de geografische verspreiding (tabel 4).

Vanwege tegenvallende resultaten in fase 2, zijn voor fase 3 extra percelen gezocht en gevonden (tabel 4). Verscheidene telers hebben destijds grond, water en/of wortelknobbelmonsters aangeleverd. Deze monsters zijn getest op de aanwezigheid van *A. tumefaciens*. Er hebben 24 telers meegedaan aan de pre-screening. Naast monsters van roos zijn eveneens monsters van peer, Galanthus, Euonymus en kers onderzocht. In veel monsters is *A. tumefaciens* aangetoond, maar omdat het vaak om kas- dan wel containerteelten ging waren deze bedrijven niet geschikt voor de monitoring. Bij de percelen genoemd in tabel 4 is zowel in de knobbels aan het plantmateriaal als in de bijgeleverde grond ook daadwerkelijk de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in het laboratorium aangetoond. In fase 3 is daarom gefocust op deze nieuwe percelen. Perceel 12 is wel weer meegenomen, omdat er opnieuw een gevoelig gewas werd geplant (*Prunus domestica*).

Voor het waarborgen van de anonimiteit zijn details achterwege gelaten. De percelen konden allen in de loop van de tijd gevolgd worden en de betrokkenen wilden allen graag meewerken.

Tabel 4. Overzicht van geselecteerde percelen voor volgen van *Agrobacterium* besmetting.

Code	Provincie	Gewas met problemen		Soort grond	Gewas 2005-2007
		2003	2005		
1	Groningen	Appel		Dalgrond	-
2	Overijssel	Roos		Zand	-
3	Limburg	Roos		Zand	-
4*	Limburg	Roos		Zand	-
5	Limburg	Kers		Zand	-
6	Gelderland	<i>Euonymus</i>		Zand	-
7	Groningen	Fruit		dalgrond	-
8	Groningen	Fruit		dalgrond	-
9	Gelderland	Laanbomen		Gemengd	-
10	Gelderland	Laanbomen		Zand	-
11	Limburg	Appel		zand	-
12*	Limburg	Appel		Zavel	<i>Prunus</i>
13	Gelderland	Appel		Klei	-
14	Limburg	Appel		zand	-
15	Limburg	Appel		zand	-
16	Zuid Holland	?		klei op veen	-
17	Limburg	Appel		zand	-
18*	Limburg		Roos	Zand	Roos/braak
19	Noord Brabant		<i>Prunus</i>	Zavel	Braak/laanbomen
20*	Noord Brabant		<i>Prunus</i>	zavel	Braak/gras

* de in de tijd gevolgde percelen

2.5. Veldmonitoring

2.5.1. Monsternamen

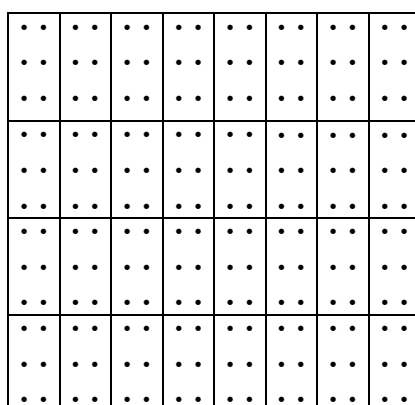
Voor het opstellen van een betrouwbare bemonsteringsstrategie is veel informatie nodig omtrent de ziekte en de detectie van de veroorzaker ervan. Uit de praktijk is bekend dat *A. tumefaciens* kan voorkomen in haarden en verslept kan worden in de bewerkingsrichting. Voor een aantal grondgebonden pathogenen zijn bemonsteringsstrategieën beschikbaar, zoals bijvoorbeeld voor *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* sp. *asparagi* en voor vrijlevende aaltjes. Vanuit de praktijk is een sterke voorkeur aangegeven om - indien mogelijk - bemonstering voor *A. tumefaciens* te laten samenvallen met bestaande bemonsteringen, bij voorkeur die op aaltjes.

Voor bemonstering op aaltjes wordt een perceel nauwkeurig opgemeten en onderverdeeld in plots van gelijke grootte. Bij het verslepen van grondgebonden pathogenen in de bewerkingsrichting is de verwachting dat de variatie in de bewerkingsrichting kleiner is dan in de richting dwars op de bewerkingsrichting (Been en Schomaker, 1998). Daarom is het verstandiger om met stroken te werken in plaats van met vierkante plots en wel zo dat de lengterichting van de te bemonsteren plots in de bewerkingsrichting ligt.

Per plot wordt een monster genomen langs een van tevoren uitgezette loopbaan. Dit monster wordt genomen met behulp van een grondboor en bestaat uit een vast aantal stekken dat via een zo regelmatig mogelijk patroon gestoken wordt langs de loopbaan. Het vaste aantal stekken uit een plot wordt samengevoegd tot één monster. Dit gecombineerde monster wordt vervolgens in het lab verder verwerkt.

De bovenstaande monsternamen leveren 1 of enkele monsters per perceel op en analyse in het laboratorium zal aangeven of een pathogeen aanwezig is in het perceel. Wil men informatie verzamelen over aanwezigheid van bijvoorbeeld haarden van *A. tumefaciens* in het veld, zal het veld voor onderzoek verder opgedeeld moeten worden. Deze detailinformatie is noodzakelijk voor het opzetten van een optimale bemonsteringsstrategie. Daarom is de bestaande bemonsteringsstrategie voor aaltjes aangepast en wordt het perceel in kleinere langwerpige plots ingedeeld. In eerste instantie wordt het perceel opgedeeld in 32 plots. Het patroon dat bestaat voor het nemen van steken wordt echter wel gehandhaafd, er worden nu alleen minder steken met elkaar gecombineerd.

Gezien het feit dat percelen zelden vierkant zijn zal bij elk perceel de berekening van de plots opnieuw moeten plaatsvinden om zo de plots vergelijkbaar te maken.



Figuur 2. Schematische voorstelling bemonsteringsschema, de punten geven de steken weer.

Per plot zullen 6 steken genomen worden van 25 gram, resulterend in een combinatiemonster van 150 gram (figuur 2). Percelen 1-3, 5, 9-10, 12-13 en 17 zijn op deze manier bemonsterd (in fase 2 van dit project).

Na de tegenvallende resultaten in tweede fase van het project is, naast het anders verwerken van de monsters (zie paragraaf 2.1.2), ook overgestapt naar een fijnmaziger patroon. De grootte van een plot is verkleind van 12,5 x 25 meter (fase 2) naar 10 x 15 meter (fase 3). Het aantal steken per plot en de grootte van de steken is gelijk gebleven.

2.5.2. Detectie van bacteriën in het grondmonster

Uit het mengmonster van 150 gram werd in fase 2 van het project een submonster getrokken van 0,5 gram. De bepaling op de aan- of afwezigheid van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* werd direct op het grondmonster gedaan, volgens de methode ontwikkeld door Bioclear in een eerder project (zie 2.1.1).

In fase 3 is de methode aangepast waarbij uit het mengmonster van 150 gram een submonster werd getrokken van 10 gram. Bij deze aangepaste methode worden de bacteriën eerst vermeerderd voordat de bepaling plaatsvindt. Doordat er een groter monster wordt verwerkt: 10 gram in plaats van 0,5 gram en doordat bacteriën worden vermeerderd is deze aangepaste methode veel gevoeliger geworden dan de oorspronkelijke methode (zie 2.1.2). Het nadeel van deze methode is dat er twee groeimedia moeten worden ingezet en dat er per medium een bepaling moet worden uitgevoerd. Dit komt door het feit dat *A. tumefaciens* uit twee verschillende biovars bestaat die verschillen in hun voorkeur wat betreft groeimedium.

2.6. Optimaliseren monsterverwerking

Het grote aantal plots per perceel geeft een goed beeld van haardvorming en verspreiding van *A. tumefaciens* over het perceel. Wil een teler informatie over *A. tumefaciens* besmetting van zijn perceel dan is een dergelijke aanpak echter onpraktisch. Om toe te werken naar een (betaalbare) monsternamen en monsterverwerking in het laboratorium zijn een aantal stappen gezet. Er zijn verschillende mogelijkheden die hieronder verder zijn uitgewerkt.

2.6.1. Samenvoegen van kweken

Voor vermeerdering van *A. tumefaciens* worden de twee biovars op verschillende media gekweekt. Dit betekent dat er twee keer een DNA-zuivering moet plaatsvinden en dat er twee keer een PCR uitgevoerd wordt. Door de kweken voor de DNA-zuiveringsstap samen te voegen kan men zich beperken tot één DNA zuivering en één PCR. Dit is in maart 2007 voor de drie percelen uitgevoerd.

2.6.2. Groter oppervlakte bemonsteren

Door een groter oppervlak te bemonsteren kan er met behulp van één analyse een uitspraak gedaan worden over bijvoorbeeld een heel perceel. In maart en november 2007 werden de drie percelen tijdens de monitoring extra bemonsterd:

- 1) de percelen zijn in 4 dan wel 5 stroken verdeeld en bemonsterd;
- 2) de percelen zijn als geheel bemonsterd.

Van deze grotere monsters variërend van 0,5 tot 2 kg werd 10 gram op kweek gezet. De verschillende kweken werden niet samengevoegd voor analyse.

2.6.3. Groter monster analyseren

Doordat het totaal monster toeneemt als er een groter oppervlak bemonsterd wordt, en er 10 gram op kweek gezet wordt, neemt de verhouding oorspronkelijk monster en te analyseren monster af. Dit kan gevolgen hebben voor de betrouwbaarheid van de uitslag.

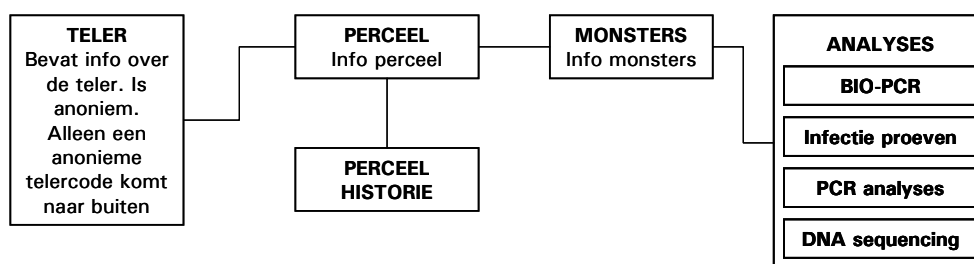
In november 2007 werd van de totaalmonsters van de drie percelen 2x 10 gram, 2x 100 gram en 2x 200 gram afgewogen. Deze monsters zijn op respectievelijk 20 ml medium, 100 dan wel 200 ml medium, of 200 dan wel 400 ml medium gezet. De verwachting is dat een groter monster een betrouwbaarder beeld van de veldsituatie zal geven.

2.7. Veldhistorie

Om gevonden resultaten te verklaren is aan de betrokken telers gevraagd een vragenlijst in te vullen. Hierin werd gevraagd naar de voorgaande gewassen, de grondbewerkingen, eventuele grondontsmettingen die zijn uitgevoerd, etc. De lijst is te vinden in bijlage 3a en 3b. Aan het eind van het project hebben de betrokken telers opnieuw een vragenlijst ingevuld.

2.8. Correlaties / database

Om de grote hoeveelheid data die binnen het project is gegenereerd goede toegankelijk te houden is een database gemaakt. Hierin zijn alle data die tijdens dit project zijn gegenereerd, opgeslagen. Deze database blijft ook na afloop van het project toegankelijk en wordt gebruikt voor het leggen van correlaties. Figuur 3 geeft een globale weergave van deze database. In deze database zijn gegevens omtrent monsternamen (zoals plaats, datum, soort monster, teler, etc.), gewas, grondsoort, bedrijfsvoering en resultaten van de verschillende *Agrobacterium* analyses opgenomen. De database bestaat uit 5 tabellen met informatie over de teler, de bemonsterde percelen, perceelhistorie, genomen monsters en uitgevoerde analyses.



Figuur 3. Globaal overzicht *Agrobacterium*-database.

3. RESULTATEN

3.1. Analyse en monsternamen

Op basis van alle openbare gegevens die bekend zijn van het Ti-plasmide van *A. tumefaciens* zijn kwalitatieve en een (semi)kwantitatieve analyse opgezet voor de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* (*iaam*-gen). De *iaam*-analyse bleek goed te werken; analyses van 38 stammen *A. tumefaciens* afkomstig van roos, aster, *Prunus*, chrysaant, *Solidago* en dahlia reageerden positief met de analyse. Met de analyse kunnen ook onbekende stammen worden opgepikt uit grond-, knobbel- en plantenmonsters.

De kwalitatieve analyse wordt uitgevoerd op 0,5 gram grond en heeft een detectielimiet van 200 cellen per gram grond. Voor monsters waarin zeer lage aantallen ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aanwezig zijn is een aanvullende stap aan de toets toegevoegd. De aanvullende stap bestaat uit het voorkweken van de aanwezige *A. tumefaciens* cellen alvorens de PCR analyse uit te voeren. De voorkweekstap wordt uitgevoerd met 10 gram grond en heeft een detectielimiet van circa 10-30 *iaam*-genen/gram grond.

Voor kwantitatieve bepalingen van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* is een Q-PCR methode opgezet en gevalideerd. De analyse wordt uitgevoerd op een 0,5 gram grond en de detectielimiet van deze analyse is 1.250 *iaam*-genen/gram grond.

De toets is hiermee geschikt voor kwantitatieve analyse van monsters met meer dan 1.250 *iaam*-genen per gram grond en door combinatie met een voorkweekstap ook geschikt voor semi-kwantitatieve analyse voor monsters met minder dan 1.250 *iaam*-genen per gram grond.

3.2. Infectieproef *Agrobacterium*

3.2.1. Infectieproef tomaat

Na 10 dagen waren de eerste symptomen al duidelijk zichtbaar in de vorm van een knobbel op de plek van injectie. Alle isolaten waren in staat symptomen te induceren in tomaat. De grote van de knobbel verschilde per isolaat. Een voorbeeld is weergegeven in figuur 4.



Figuur 4. Woekering in tomaat cv. Moneymaker, veroorzaakt door *A. tumefaciens* biovar I, geïsoleerd uit chrysaant (nr. 15, buis)

Om te bepalen welke concentratie *A. tumefaciens* aan de grond moet worden toegevoegd om tomaat te infecteren en symptomen te veroorzaken is ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in verschillende concentraties aan grond toegevoegd, variërend van 10^2 tot 10^8 cellen per gram grond.

Na 2 maanden zijn de planten beoordeeld, maar geen van de planten vertoonden symptomen. In de grond, in tomatenwortel en in de tomatenstam werd echter wel ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aangetoond. Het *iaam*-gen was in een hoge concentraties aanwezig, de bacterie kon namelijk zonder voorkweek al in de eerste PCR stap worden aangetoond.

Vervolgens zijn verschillende methodes voor inoculatie toegepast om te bepalen op welke manier symptomen het best geïnduceerd konden worden (*A. tumefaciens* toevoegen aan grond of hydrocultuur en tomaat op verschillende manieren beschadigen en *A. tumefaciens* in de plant injecteren). Het injecteren van *A. tumefaciens* leidde tot symptomen in de planten. De andere methoden waren minder succesvol: alleen enkele planten met een diepe inkeping vertoonden symptomen.

Bij herhaling van het experiment met de inkeping aan de stamvoet en het beschadigen van wortels konden echter de resultaten niet herhaald worden. Mogelijkerwijs moet de beschadiging aan de plant nog groter zijn om symptomen te induceren.

3.2.2. Infectieproef roos en appel

De concentratie ziekteverwekkende *A. tumefaciens* cellen in deze proef is uiteindelijk lager uitgevallen dan de bedoeling was (waarschijnlijk een factor 10^6 lager), de werkelijke concentratie was in de orde grote van 10^2 tot 10^3 cellen/ml. Er zijn in dit experiment dan ook geen symptomen in appel of roos aangetroffen. Wel kon in een aantal appelplanten de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* worden aangetoond.

3.2.3. Infectieproef roos, appel en kers

De concentratie ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aan de grond toegevoegd was erg hoog (tussen 10^6 - 10^8 cellen/ml). Dat *A. tumefaciens* zeer besmettelijk is, is uit dit experiment gebleken, want ook in een aantal van de controles is het *iaam*-gen aangetoond. In zowel roos, appel als kers is het *iaam*-gen in hoge concentraties aangetoond, in besmette controles lag de concentratie lager. Echter ondanks het aantonen van het *iaam*-gen in de planten, is nauwelijks symptoomvorming opgetreden.

3.3. Overlevingsproeven *Agrobacterium tumefaciens* in grond

Om in te schatten of een eenmaal besmet perceel in de toekomst opnieuw kan worden gebruikt voor de teelt van een gevoelig gewas is het van belang de overlevingskenmerken van *A. tumefaciens* vast te stellen. Naar verwachting wordt de overleving van *A. tumefaciens* beïnvloedt door verschillende klimaatfactoren zoals vochtgehalte en temperatuur, door het grondtype en door de aan- of afwezigheid van plantenresten. Deze factoren zijn onder gecontroleerde omstandigheden getest in het laboratorium (3.3.1) en onder meer natuurlijke omstandigheden in de buitenlucht (3.3.2).

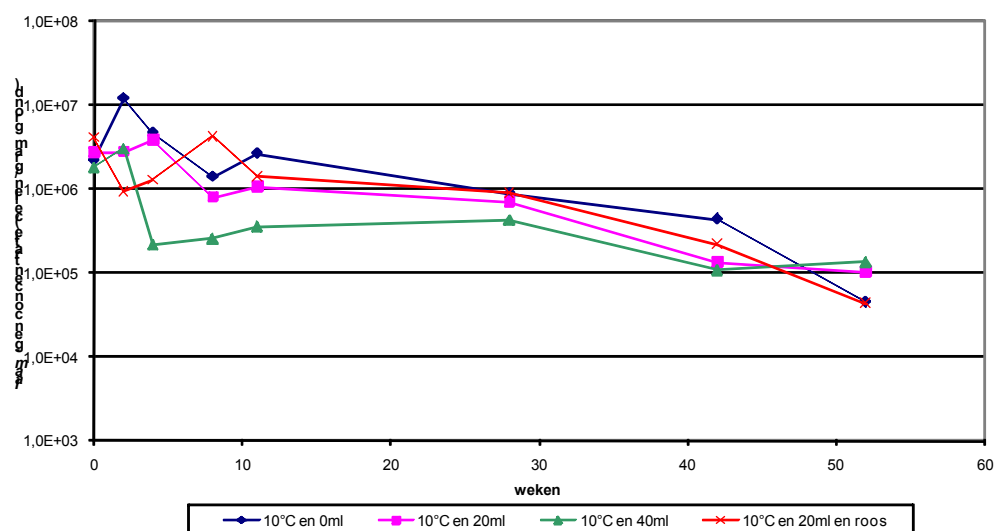
3.3.1. Laboratoriumopstelling met kunstmatig besmette grond

In figuur 5 zijn de resultaten weergegeven van de simulatie van de bodem in de lente/herfst periode (uitgevoerd bij 10°C) bij verschillende vochtigheden. In deze proef is de temperatuur constant gehouden terwijl de hoeveelheid toegevoegd water is gevarieerd, zie tabel 5.

In één van de opstellingen zijn fijngehakte rozentaken toegevoegd om het effect van de aanwezigheid van plantmateriaal te bepalen.

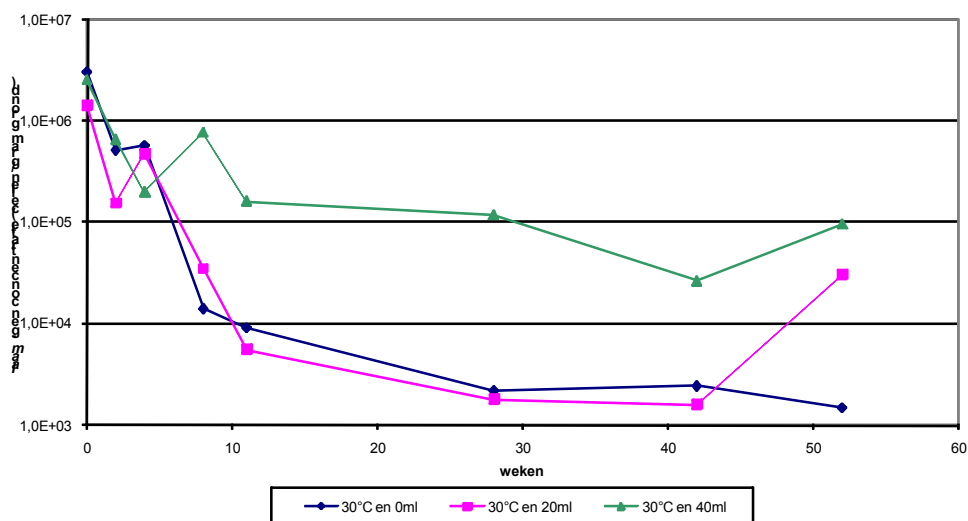
Tabel 5. Laboratorium omstandigheden tijdens simulaties van lente/herfst.

Simulatie	Temperatuur (°C)	Water (ml)	Toevoeging plantmateriaal (g)
lente/herfst, droog	10	0	-
lente/herfst, vochtig	10	20	-
lente/herfst, nat	10	40	-
toevoeging plantmateriaal	10	20	+



Figuur 5. Verloop in ziekteverwekkende *A. tumefaciens* (*iaam*-gen) concentratie tijdens simulatie van lente/herfst bodemtemperaturen (10°C) en verschillende vochtigheden, en in aanwezigheid van plantenmateriaal.

Bij langdurige incubatie bij 10°C neemt het aantal ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in de grond langzaam af tot een niveau van 10^5 *iaam*-genen per gram grond. In de eerste weken van de incubatie is er bij incubatie bij 10°C in droge of vochtige omstandigheden geen significante toe- of afname van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* (*iaam*-gen) waar te nemen. De concentratie ziekteverwekkende *A. tumefaciens* varieert tussen $1 \cdot 10^6$ tot $1 \cdot 10^7$ *iaam*-genen per gram grond. Later daalt dit aantal tot $1 \cdot 10^5$ *iaam*-genen/ gram grond. Onder natte omstandigheden is in het begin van de proef wel een afname van het *iaam*-gen waargenomen. Deze daling stabiliseert zich gedurende het experiment. Dit duidt erop dat de vochtigheid van de grond op korte termijn wel, maar op langere termijn geen significant effect heeft op de overleving van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens*. De aanwezigheid van plantmateriaal heeft geen effect op het aantal ziekteverwekkende *A. tumefaciens* cellen dat overleeft.



Figuur 6. Verloop in ziekteverwekkende *A. tumefaciens* (*iaam*-gen) concentratie bij simulatie van hoge temperaturen (30°C) bij verschillende vochtigheden.

In figuur 6 zijn de resultaten weergegeven van de simulatie van de bodem in de zomer periode (uitgevoerd bij 30°C) bij verschillende vochtigheden. In deze proef is de temperatuur constant gehouden op 30°C terwijl de hoeveelheid toegevoegd water is gevarieerd, zie tabel 6. Er is geen plantmateriaal toegevoegd.

Tabel 6. Laboratorium omstandigheden tijdens simulatie van de zomer

Simulatie	Temperatuur (°C)	Water (ml)	Toevoeging plantmateriaal (g)
zomer, droog	30	0	-
zomer, vochtig	30	20	-
zomer, nat	30	40	-

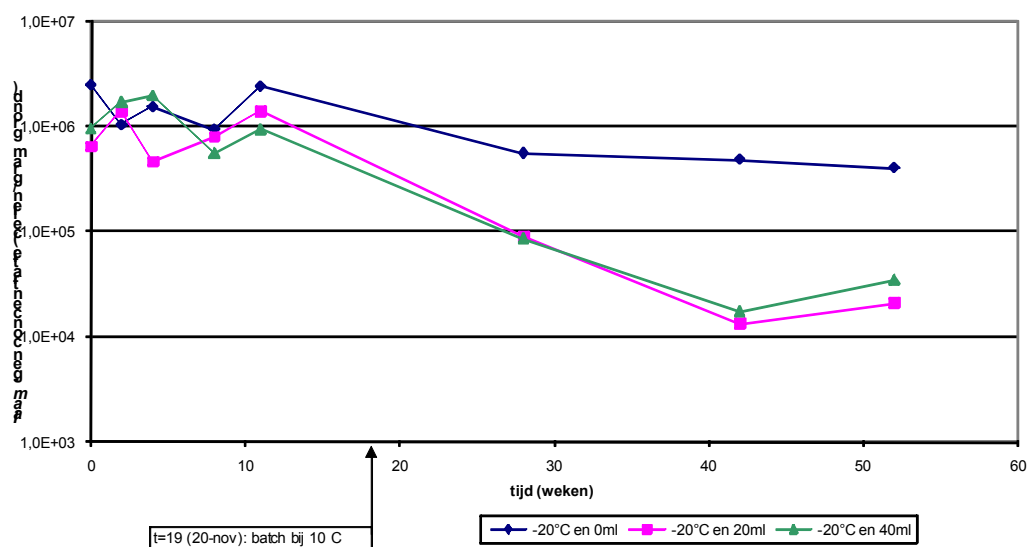
In alle drie de simulaties is een significante afname van het *iaam*-gen zichtbaar. Deze afname is het grootst in de droge en vochtige simulatie, terwijl de afname in het aantal *A. tumefaciens* cellen het minst is in de batch met het meeste water (40 ml water). Deze gegevens suggereren dat droogte gecombineerd met een hoge grondtemperatuur ongunstig zijn voor de overleving van *A. tumefaciens*.

Naast het simuleren van mogelijke omstandigheden tijdens lente/herfst en het zomerseizoen zijn experimenten uitgevoerd waarbij is vastgesteld wat het effect is van het bevriezen en ontdooien zoals dit tijdens de winter kan plaatsvinden. Hiertoe zijn besmette grondmonsters elke week blootgesteld aan 5 dagen bevriezing gevolgd door 2 dagen dooi bij kamertemperatuur, zie tabel 7. De resultaten van deze vries/dooi experimenten zijn weergegeven in figuur 7.

Tabel 7. Laboratorium omstandigheden tijdens simulaties van vries/dooi

Simulatie	Temperatuur (°C)	Water (ml)	Toevoeging plantmateriaal (g)
winter, droog	Vries dooi ¹⁾	0	-
winter, vochtig	Vries/dooi	20	-
winter, nat	Vries/ dooi	40	-

¹⁾ de flessen zijn elke week 5 dagen ingevroren geweest (-20°C) waarna ze 2 dagen zijn ontdooit worden bij kamertemperatuur.



Figuur 7. Verloop van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* (*iaam*-gen) concentratie bij simulatie van vries/dooi proef bij verschillende luchtvochtigheden. Op 19 weken is de temperatuur verhoogd naar 10°C.

Tijdens de vries/dooi simulatie is geen significante toe- of afname van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* waargenomen. De concentratie *iaam*-gen varieert tussen $5 \cdot 10^5$ en $5 \cdot 10^6$ *iaam*-genen per gram grond.

Na 19 weken is de temperatuur van de batches verhoogd naar 10°C om het effect van een verhoging van temperatuur te toetsen. Dit bleek voor de vochtige en natte batch te resulteren in een significante afname van het aantal cellen. Een vries/dooi periode gevolgd door een gemiddelde bodemtemperatuur van 10°C is bij hogere vochtigheden gunstig voor de afname van ziekteverwekkende *A. tumefaciens*.

Acht weken na incubatie is een levensvatbaarheidstoets uitgevoerd (zie 2.3.2) om de mogelijkheid uit te sluiten dat het gedetecteerde DNA van *A. tumefaciens* afkomstig is van dode bacteriën. De resultaten van de levensvatbaarheidstoets (resultaten niet weergegeven) tonen aan dat de hoeveelheid levende ziekteverwekkende *A. tumefaciens* bacteriën verschilt van de totale hoeveelheid ziekteverwekkende *A. tumefaciens* bacteriën (aangetoond met de Q-PCR analysemethode). Dit verschil is echter gering en valt binnen de foutenmarges van beide methodes.

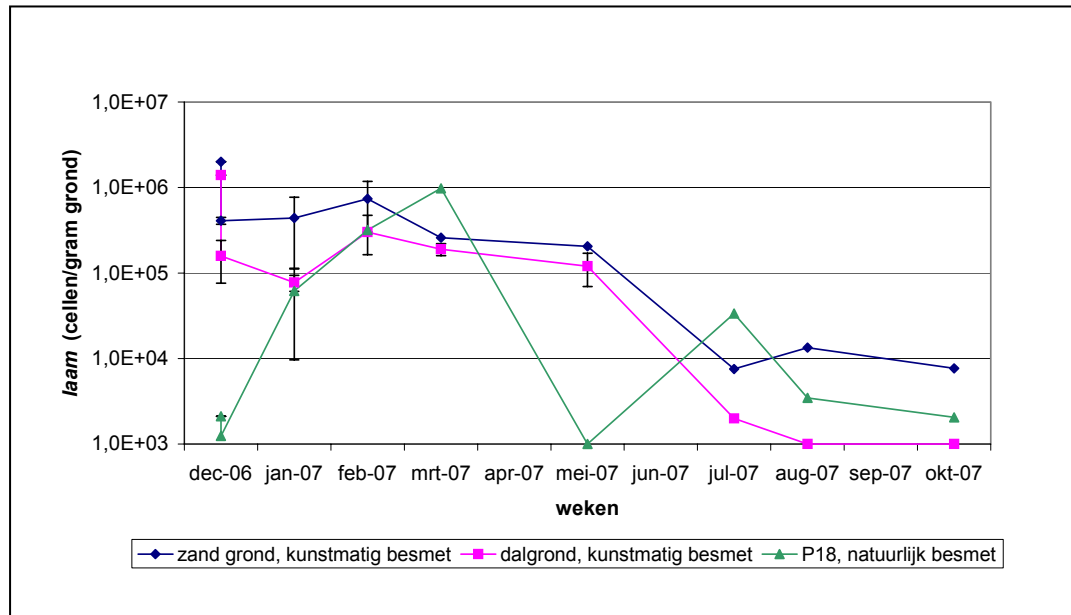
3.3.2. Buitenproef met kunstmatig en natuurlijk besmette grond

Om het effect van een willekeurig meteorologisch jaar op de overleving van *A. tumefaciens* te simuleren zijn twee kunstmatig besmette en één natuurlijk besmette grondmonsters gedurende een jaar blootgesteld aan buitencondities. In alle drie de grondmonsters werd de concentratie ziekteverwekkende *A. tumefaciens* cellen (*iaam*-gen) gemonitord. De gegevens zijn weergegeven in figuur 8. Voor de kunstmatig besmette grondmonsters was dit mogelijk met behulp van de directe Q-PCR terwijl aantallen in de natuurlijk besmette grond, met uitzondering van tijdstip $t = 1$ week, alleen detecteerbaar waren middels het uitvoeren van de semi-kwantitatieve analyse (analyse met een voorkweekstap).

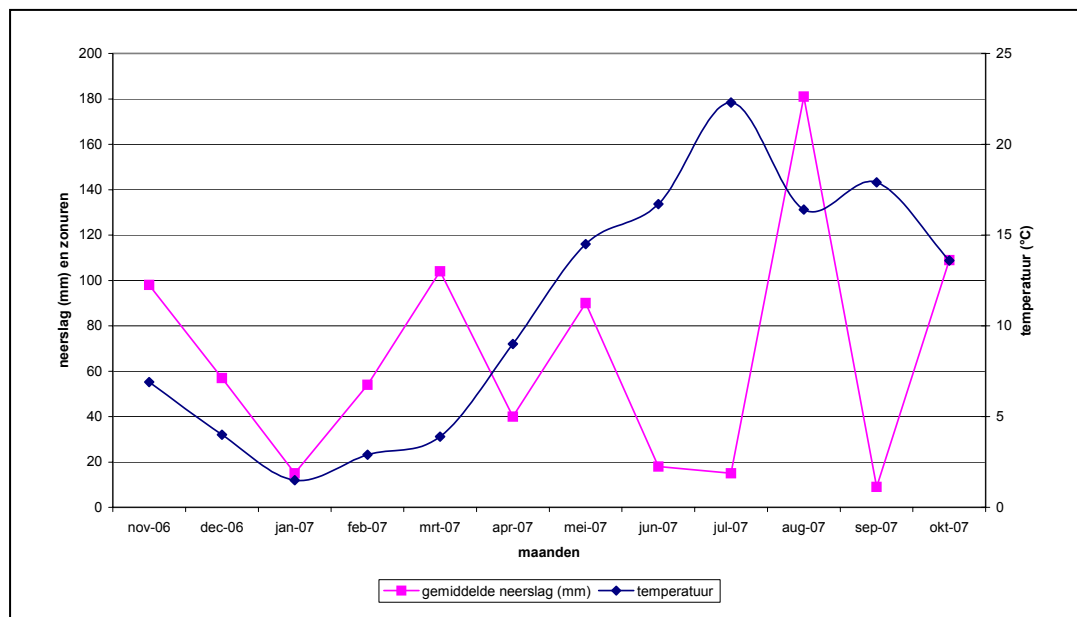
Uit figuur 8 blijkt dat de concentratie *iaam*-genen voor de kunstmatig besmette gronden meteen bij de eerste meting ($t = 1$ week) is afgenomen, daarna blijft de hoeveelheid *iaam*-genen nagenoeg gelijk. Na de meting in mei 2007 neemt de concentratie *iaam*-genen in beide gronden (A en B) sterk in concentratie af. Het *iaam*-gen in batch B is na de meting in augustus niet meer aantoonbaar met de directe analyse.

De natuurlijk besmette grond toont een ander verloop in *iaam*-genen dan de kunstmatig besmette grond. In de natuurlijk besmette grond (batch C) is er tijdens het begin van de proef (tot maart 2007) een toename in *iaam*-genen waarneembaar. Na maart 2007 neemt de concentratie in *iaam*-genen sterk af.

Om vast te stellen of er een directe correlatie te vinden is tussen het verloop van de concentratie *iaam*-genen en klimatologische omstandigheden is in figuur 9 het verloop van de temperatuur en hoeveelheid neerslag voor de Bilt (november 2006 tot november 2007) weergegeven. De weergegeven data zijn gemiddelde temperatuur en hoeveelheid neerslag van de desbetreffende maand. Een duidelijke correlatie tussen de gemeten effecten en de klimatologische parameters is niet te geven. Om meer inzicht in het effect van de temperatuur en de hoeveelheid neerslag op de overleving van *A. tumefaciens* te krijgen zijn de temperatuur en neerslag van het KNMI (www.knmi.nl) in detail vergeleken met de *A. tumefaciens* toe- en afname.



Figuur 8. Verloop van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* concentratie (iaam-gen) in de buitenproef gedurende 1 jaar; kunstmatig besmette potgrond en zand mengsel; kunstmatig besmette dalgrond en natuurlijk besmet grond van perceel 18 (behalve op t = 1 week, iaam-gen alleen aantoonbaar door semi-kwantitatieve methode met voorkweek).



Figuur 9. Verloop (gemiddelden per maand) temperatuur en hoeveelheid neerslag in de Bilt gedurende november 2006 tot november 2007

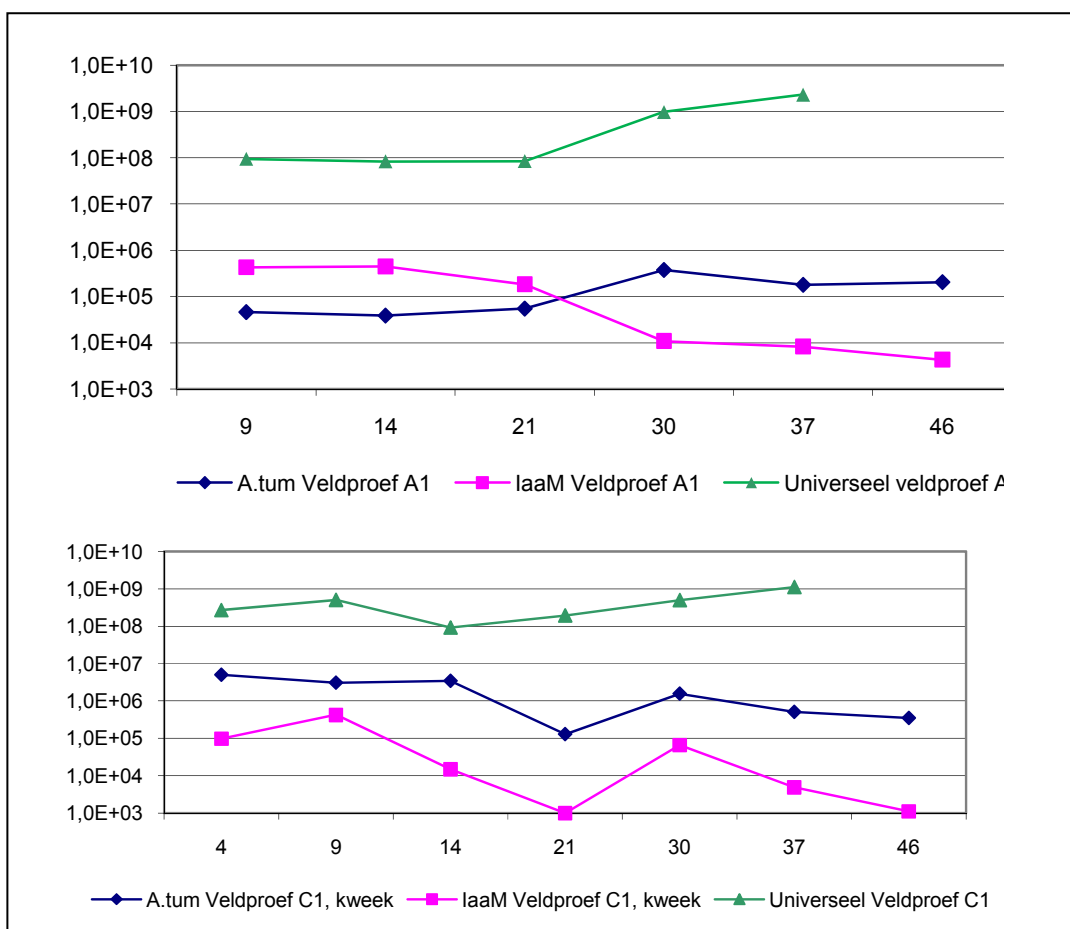
Afname van *A. tumefaciens* in de natuurlijk besmette proef treedt op vanaf maart 2007. Uit de KNMI gegevens blijkt dat maart koud en nat is geweest en begin april zeer droog. De afname in *A. tumefaciens* in de andere twee proeven (kunstmatig besmet) begint op te treden tussen mei en juli. Uit de KNMI gegevens blijkt dat het in juni warm en droog is geweest. De KNMI data zijn echter gemiddelden per maand terwijl de Q-PCR data op andere tijdstippen gemeten zijn (in het begin van de proef maandelijks, daarna minder vaak), hierdoor zijn de gegevens niet een op een te vergelijken.

De waarnemingen uit de buitenproef komen echter overeen met de resultaten behaald in de laboratorium overlevingsproef. Dit wijst erop dat de hierboven genoemde correlaties op zouden kunnen treden. Een (in de tijd) gecontinueerde monitoring van de aanwezigheid van *A. tumefaciens* in grond moet hier meer inzicht in geven. Er zullen echter meerdere factoren zijn die mede bepalend zijn voor de overleving van *A. tumefaciens* in grond.

Om meer inzicht te krijgen in het verschil in verloop van *A. tumefaciens* in natuurlijke en kunstmatig besmette gronden is een extra analyse uitgevoerd waarbij naast de standaard analyse op het *iaam*-gen ook een analyse wordt uitgevoerd voor het aantonen van het totaal aantal ziekteverwekkende en niet-ziekteverwekkende *Agrobacterium* cellen, zie figuur 10. Hieruit blijkt dat de stam die gebruikt is voor de besmetting van de A en B gronden zich anders gedraagt dan de stam die in de natuurlijk besmette grond aanwezig was.

Om de verandering in *A. tumefaciens* concentratie te relateren aan de verandering in concentratie van andere aanwezige bacteriën (eventuele concurrenten) is ook een analyse uitgevoerd om alle aanwezige bacteriën aan te tonen (universele PCR). In zowel de kunstmatig als natuurlijk besmette grond is er toename (factor 10) in totale bacteriën waargenomen in de loop van de tijd. Deze resultaten zouden erop kunnen duiden dat de bacterie *A. tumefaciens* weg wordt geconcentreerd door andere bacteriën.

In de kunstmatig besmette grond zijn per *A. tumefaciens* bacterie 10 *iaam*-genen aanwezig, terwijl in de natuurlijk besmette grond slechts 1 op de 10 *A. tumefaciens* bacteriën een *iaam*-gen bevat. In de kunstmatig besmette grond neemt de hoeveelheid *iaam*-gen sterk af terwijl de hoeveelheid *A. tumefaciens* bacteriën toeneemt. Hierdoor verandert de verhouding tussen *A. tumefaciens* en het *iaam*-gen. Tijdens de start van de proef bevat elke *A. tumefaciens* bacterie 10 *iaam*-genen terwijl aan het eind van de proef er per 10 tot 100 *A. tumefaciens* bacteriën 1 *iaam*-gen aanwezig is. In de natuurlijk besmette grond verandert de verhouding van *A. tumefaciens* bacterie en *iaam*-gen in de loop der tijd niet, indien er een afname is in *A. tumefaciens* is er ook een afname in *iaam*-gen. Dit betekent dat de labstammen zich ondanks dat ze van een natuurlijk isolaat afkomstig zijn zich anders gedragen dan de natuurlijk stam. Het verdient de voorkeur om de natuurlijke stam te gebruiken voor de meest accurate simulaties.



Figuur 10. Verloop van de concentraties *A. tumefaciens* cellen, het *iaam*-gen en totale hoeveelheid bacteriën voor kunstmatig en natuurlijk besmette buiten proef; A (boven): kunstmatig besmet; B (onder): natuurlijk besmet (resultaten behaald met semi-kwantitatieve analyse). Op de x-as zijn de weken en op de y-as is de *A. tumefaciens* concentratie weergegeven.

3.4. Veldscreening

In mei/juni van 2005 zijn negen velden met een vermoedelijke *A. tumefaciens* besmetting bemonsterd. Deze velden verschillen in grootte, variërend van 9 tot 32 plots per perceel (tabel 8). De velden zijn ingemeten en grondmonsters zijn gestoken. De grootte van het plot was ongeveer 3 are (12,5 x 25 m).

In december 2005 – maart 2006 is knobbelmateriaal van de drie nieuwe percelen (tabel 8) positief bevonden voor ziekteverwekkende *A. tumefaciens*. Hierna zijn de nieuwe percelen ingemeten en zijn er grondmonsters gestoken. Ook perceel P 12 is opnieuw ingemeten en er zijn grondmonsters gestoken. Het aantal plots per perceel varieerde nu van 17 t/m 60 plots. De grootte van een plot was ongeveer 1,5 are (10 x 15 m).

Er is besloten in eerste instantie met perceel P 18 en P 20 door te gaan, en zodra perceel 12 beplant werd met een gevoelig gewas (*Prunus domestica*) ook dit perceel verder te volgen in tijd.

Tabel 8. Overzicht van geselecteerde percelen voor *Agrobacterium* bemonstering in 2003 en 2005.

Code	Provincie	Gewas 2003	Soort grond	Huidige gewas	Aantal plots (3 are)		
					totaal	verwerkt	<i>A. tum?</i>
1	Groningen	Appel	Dalgrond	mais	25	12	0
2	Overijssel	Roos	Zand	div. planten	32	16	0
3	Limburg	Roos	Zand	mais	29	13	0
5	Limburg	Kers	Zand	appel	32	20	0
9	Gelderland	Laanbomen	Gemengd	div. bomen	30	-	
10	Gelderland	Laanbomen	Zand	div. bomen	9	-	
12	Limburg	Appel	Zavel	mais	32	30	2 / 0
13	Gelderland	Appel	Klei	bomen	31	15	0
17	Limburg	Appel	zand	mais	32	16	1 / 0

Code	Provincie	Gewas 2005	Soort grond	Gewas 2005-2007	Aantal plots (1,5 are)		
					totaal	verwerkt	<i>A. tum?</i>
12	Limburg	<i>Prunus domestica</i>	Zavel	Mais	60	-	
18	Limburg	Roos	Zand	Roos/braak	60	60	23
19	Noord Brabant	<i>Prunus avium</i>	Zavel	Braak/laanbomen	17	17	2
20	Noord Brabant	<i>Prunus avium</i>	zavel	Braak/gras	40	40	16

3.5. Veldmonitoring

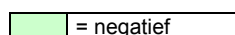
In eerste instantie werd een hectare onderverdeeld in 32 plots, later is de plotgrootte verkleind waardoor er ongeveer 60 plots per hectare ontstonden. De gegevens van percelen P 12, P 18 en P 20 over de afgelopen 2 jaar zijn weergegeven in figuren 11 t/m 13.

Er worden 3 rijen plots weergegeven:

- in de eerste rij zijn de resultaten van groeimedium 1 weergegeven, op dit medium groeit *A. tumefaciens* biovar I het best;
- in de tweede rij zijn de resultaten van medium 2 weergegeven waarop *A. tumefaciens* biovar II het best groeit;
- in de derde rij worden de gegevens van rij 1 en 2 gecombineerd.

Boven de plots is de maand van bemonstering weergegeven, onder de plots de gewassen weergegeven die op het moment van bemonstering op het perceel aanwezig waren indien er verschillende gewassen op het perceel aanwezig waren.

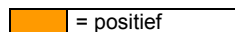
In deze figuren zijn de plots met verschillende kleuren weergegeven:



In deze plots is geen *iaam*-gen aangetoond. Dit betekent dat de concentratie van *A. tumefaciens* onder de detectiegrens ligt of gemist is in de steekproef.



In de rood gekleurde vakken werd na de eerste (single) PCR stap al een reactie met *iaam*-gen gevonden.



In de oranje gekleurde vlakken werd naar uitvoering van de tweede (nested) PCR stap een reactie met *iaam*-gen gevonden, dit betekend dat de concentratie van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in deze plots lager is dan in de rode plots.

3.5.1. Monitoring perceel 12

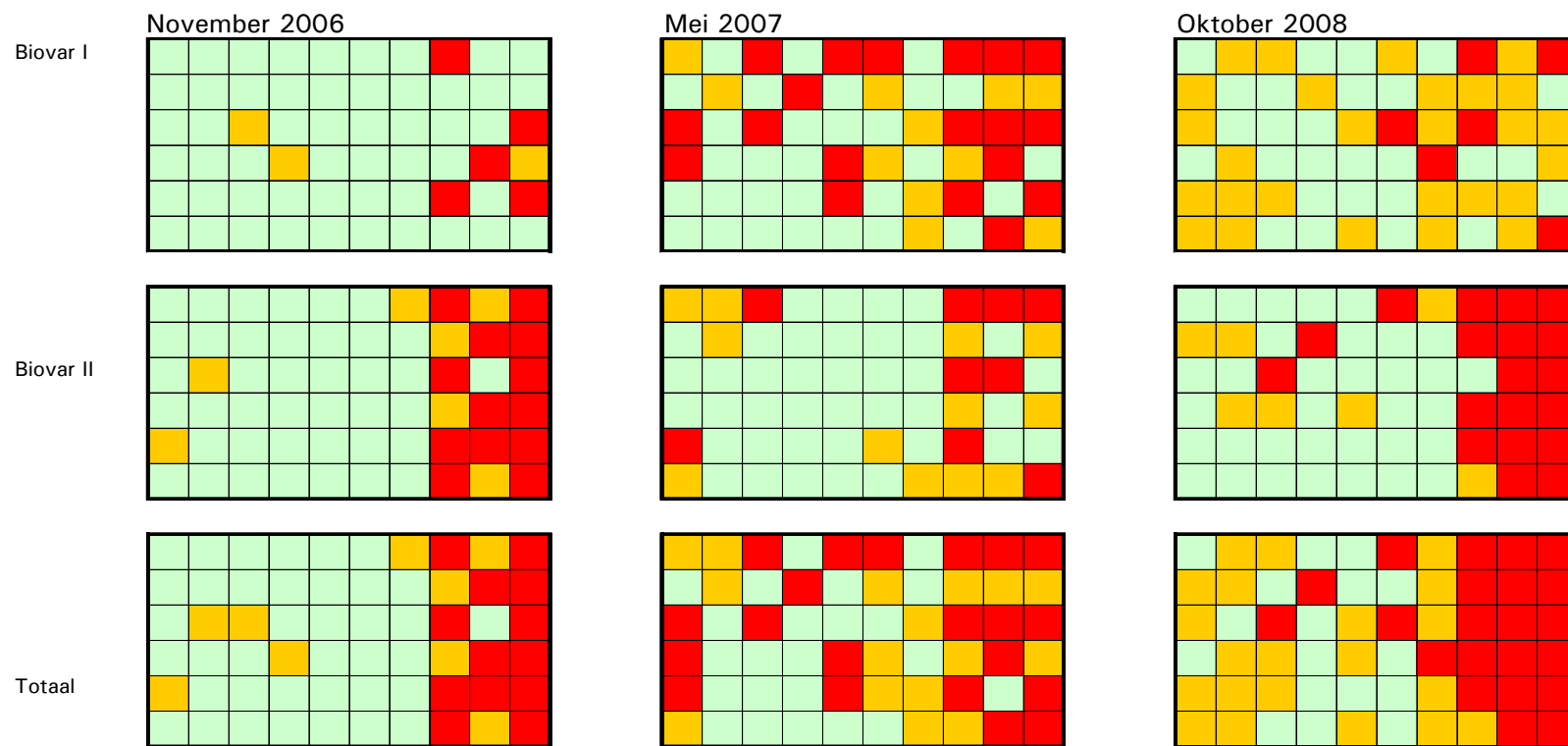
Uit de bemonstering van perceel 12 in november 2006 is naar voren gekomen dat met name de rechterkant van het veld zwaar besmet was met *A. tumefaciens*. Dit patroon komt in de verschillende bemonsteringen elke keer naar voren en de besmettingsgraad neemt toe. Samen met de teler is naar mogelijke verklaringen van dit patroon gezocht. De meest aannemelijke verklaring is dat dit te maken heeft met het feit dat aan de ene kant winterstek (rechterkant) en aan de andere kant van het perceel zomerstek is geplant. In de winterstek zijn ook de meeste symptomen waargenomen (zie ook paragraaf 3.7 veldhistorie). Op het perceel waar de winterstek van afkomstig was, zijn ook een aantal grondmonsters genomen. In deze grondmonsters is echter geen ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aangetoond.

3.5.2. Monitoring perceel 18

In december 2005 lag de hoge besmettingsgraad met name in het midden van het veld, waar de rozen net gerooid waren. In juli 2006 wordt een hoge concentratie gevonden aan de rechterkant van het veld waar op dat moment nog rozen stonden. De aantasting is over het hele perceel verspreid en dit zelfde beeld blijft gehandhaafd over tijd. De besmetting blijft gelijk, neemt niet echt toe, neemt niet echt af.

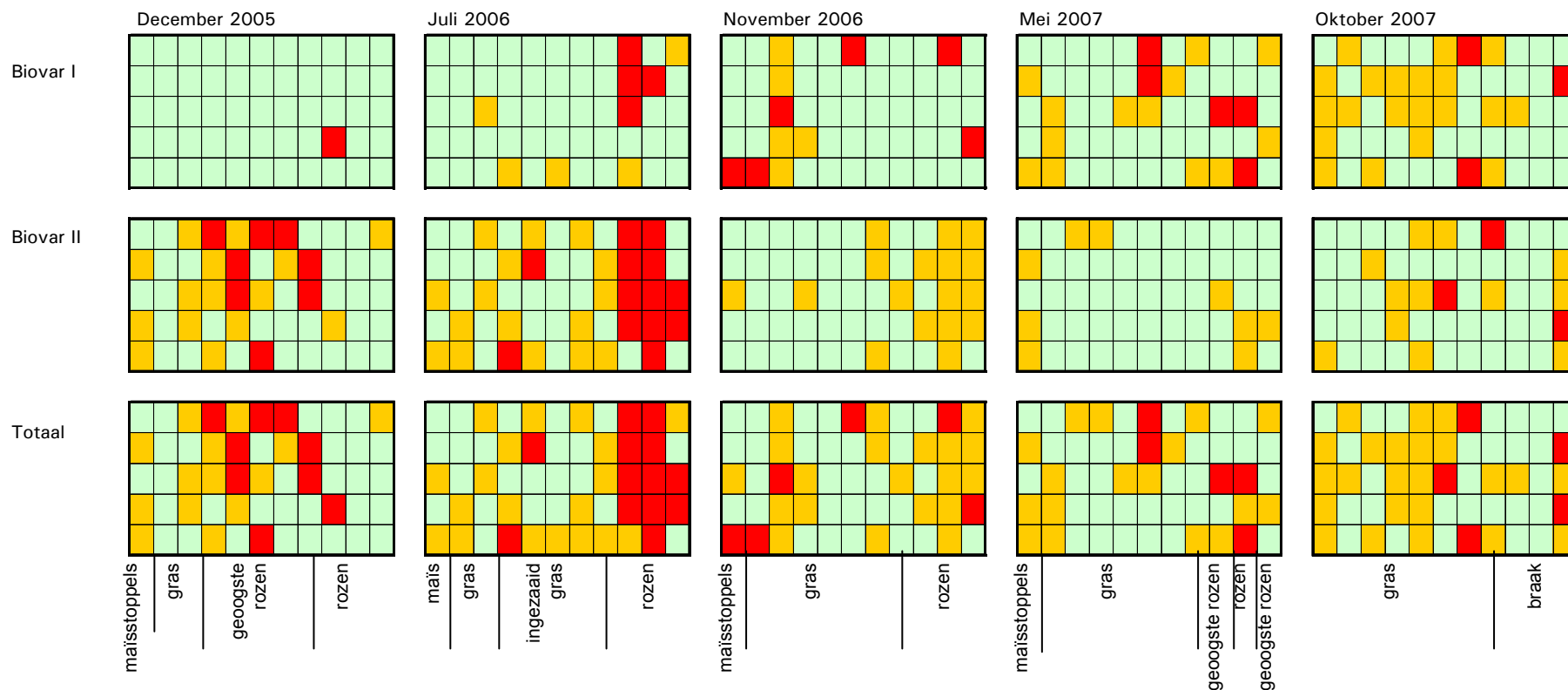
3.5.3. Monitoring perceel 20

De besmetting is in maart 2006 met name te vinden aan de rechterkant van het perceel. Hier hebben 2 rijen *Prunus avium* 'Colt' gestaan, deze hadden duidelijke symptomen. Ook aan de linkerkant van het veld hebben enkele planten *P. avium* 'Colt' gestaan. Ook bij deze planten zijn symptomen waargenomen.



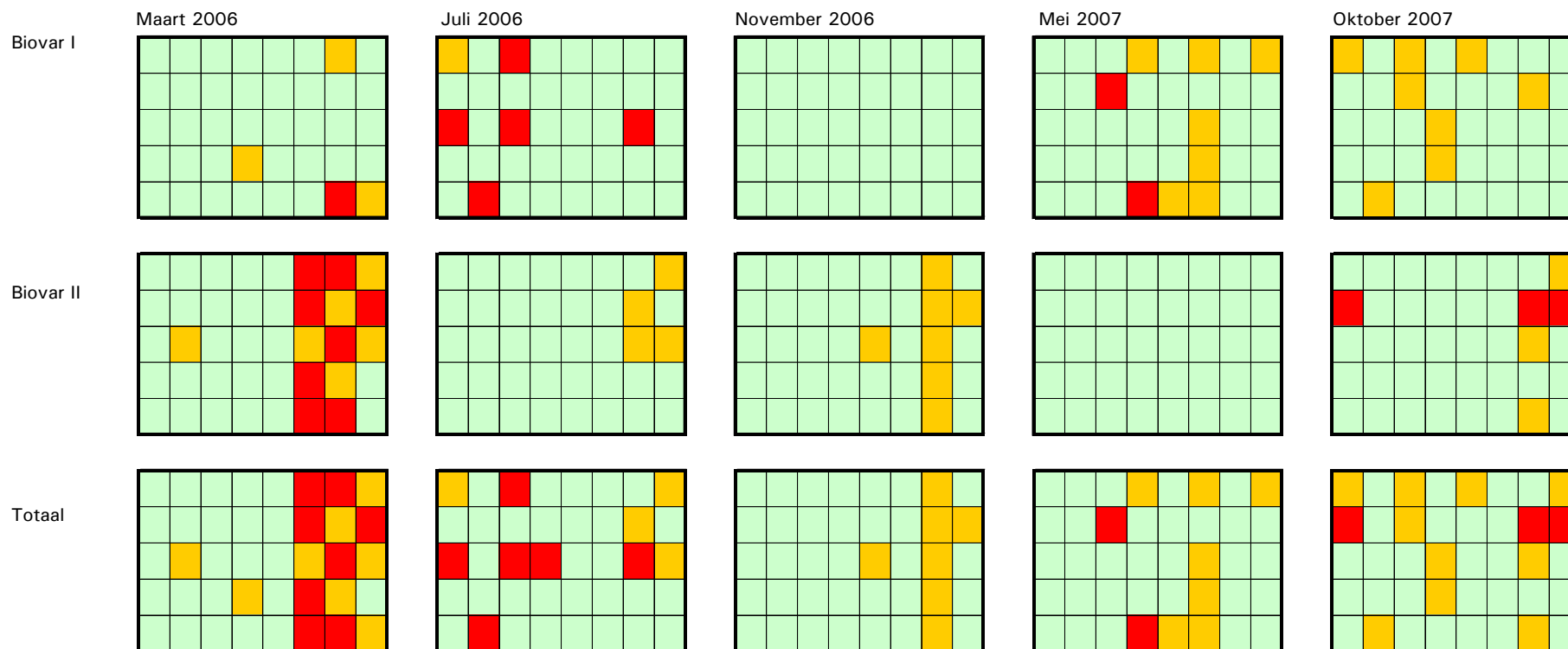
Periode	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Gewas	Mais	Appel		Mais	Pruim	
Opmerkingen	-	winter- en zomerstek geplant	50% van de planten aangetast, knobbel (3 cm) op wortel	-	bemonstering	bemonstering bemonstering

Figuur 11. Teelthistorie en besmettingsgraad van perceel 12 met *Agrobacterium tumefaciens* biovar I en II; groene vlakken: geen *iaam*-gen aangetoond, oranje vlakken: positief voor *iaam*-gen, rode vlakken: sterk positief voor *iaam*-gen.



Periode	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Gewas	Tagetes		stamrozen		Zie bovenstaande grafiek	
Opmerkingen	-		bemonstering	20-25% v/d planten kleine knobbels bij afgesneden wortels	bemonstering	bemonstering

Figuur 12. Teelthistorie en besmettingsgraad van perceel 18 met *Agrobacterium tumefaciens* biovar I en II; groene vlakken: geen *iaam*-gen aangetoond, oranje vlakken: positief voor *iaam*-gen, rode vlakken: sterk positief voor *iaam*-gen.



Periode	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Gewas	gras - mais	es - linde		<i>Fraxinus, Tilia, Betula, Prunus</i>			
Opmerkingen	-	-		gerooidde <i>Prunus</i> : 50% v/d planten aangetast, vuistgrote knobbel onder hart v/d stam			
						bemonstering	bemonstering
						bemonstering	bemonstering

Figuur 13. Teelthistorie en besmettinggraad van perceel 20 met *Agrobacterium tumefaciens* biovar I en II; groene vlakken: geen *iaam*-gen aangetoond, oranje vlakken: positief voor *iaam*-gen, rode vlakken: sterk positief voor *iaam*-gen.

3.6. Veldhistorie

In onderstaande paragrafen is de historie per perceel weergegeven. Aan de hand van de gegevens die zijn verstrekt door de betrokken telers wordt geprobeerd een verklaring te vinden voor de gevonden ziekteverwekkende *A. tumefaciens* concentraties in het veld.

3.6.1. Veldhistorie perceel 12

Op dit perceel is in 2002 maïs verbouwd, in 2003 en 2004 heeft hier appel gestaan, waarna in 2005 weer maïs is verbouwd. In 2006 is opnieuw een gevoelig gewas geplant, te weten pruim (*Prunus domestica*), er is zowel winter- als zomerstek geplant (zie figuur 11).

Bij appel vertoonde in 2004 meer dan 50% van de planten wortelknobbels. Merendeel van de knobbels waren knikkervormig, sommige knobbels ter grote van een golfbal. De kleinere knobbels kwamen over het hele wortelstelsel voor, de grotere knobbels in de buurt van de stam. Van west naar oost werd de aantasting minder ernstig.

Bij pruim vertoonde in 2007 50% van de plantenknobbels, dit kon direct niet gerelateerd worden aan een specifieke plek op het perceel, terwijl aan de rechterkant van het perceel de concentratie *iaam*-gen het hoogst bleek. Bij navraag bleek op deze plek met het planten van de winterstek begonnen te zijn.

Op het perceel zijn de normale handelingen als ploegen en zaaibed klaarmaken van de grond uitgevoerd. Er is geen grond van elders opgebracht, er zijn geen gewasresten versnipperd en ondergeploegd. Eind 2005 is de grond behandeld met Metamnatrium. Dit is in verschillende etappes uitgevoerd. Ook dit kan volgens de teler een mogelijke verklaring zijn voor de hogere *iaam*-gen concentratie die aan de rechterkant van het veld gevonden is.

3.6.2. Veldhistorie perceel 18

In mei 2002 en 2003 is *Tagetes* gezaaid. In maart 2004 zijn stamrozen geplant op het perceel. In 2005 is men begonnen met het oogsten van de planten in het middengedeelte van het perceel. Bij deze rozen is bij 25-50% van de planten knobbels gevonden, meestal op plekken waar de wortels beschadigd waren. De knobbels varieerden in grote van 1 tot 8 cm. In 2006 en 2007 zijn in etappes de andere rozen geoogst met vergelijkbare symptomen. De plekken die vrij kwamen lagen eerst braak en zijn later ingezaaid met gras (zie figuur 12).

In 2002 is het perceel geploegd en is er GFT toegepast. In 2003, 2004 en 2005 is er eveneens geploegd waarbij in 2003 een diepere grondbewerking (tot \pm 30 cm) is uitgevoerd.

In 2005 is er ook geëgd (rotorkoep) en zijn er sleuven getrokken. Dit is in 2006 en 2007 eveneens uitgevoerd. Alleen in 1997 is een grondontsmetting uitgevoerd met Metamnatrium.

De teler geeft zelf aan dat met de afname van het Metamnatrium gebruik en mogelijk de toename van GFT gebruik de aantasting met *A. tumefaciens* is vergerd.

3.6.3. Veldhistorie perceel 20

Voor 2002 heeft er op dit perceel gras en mais gestaan. In 2002 en 2003 hebben op dit perceel es en linde gestaan. In 2004 zijn er naast es en linde ook berk en sierkers (*Prunus avium* cv Colt, *P. serrulata*) geplant. In 2005 is *Prunus* geoogst en bleek dat in meer in 95% van de planten knobbels aanwezig waren. De knobbels waren vuistgroot en bevonden zich net onder de stam.

In 2002 is de grond is voor het planten gespit. Op plaatsen waar planten geoogst zijn, is de cultivator gebruikt en is gras ingezaaid. Het perceel is – zover de teler weet – nooit ontsmet.

De teler wijt het plaatselijk voorkomen van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aan besmet plantmateriaal. De strook waarin in maart en november 2006 *iaam*-gen is aangetoond (figuur 13) komt overeen met de plek waar *Prunus* 'Colt' gestaan heeft. In andere *Prunus* soorten/cv's had de teler geen problemen. De teler is veranderd van leverancier en heeft op dit moment nauwelijks problemen.

Hoewel de telers aangeven dat zij geen materiaal versnipperen en onderploegen blijft er regelmatig (besmet) materiaal achter op het perceel. Dit kan mogelijk gevolgen hebben voor de aanwezigheid van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in de grond.

3.7. Optimaliseren monsterverwerking

Als een teler meer informatie over *A. tumefaciens* besmetting van zijn perceel wil hebben dan is de bovenstaande aanpak onpraktisch. Er zijn verschillende mogelijkheden onderzocht om de grootte van het aan te leveren monster en de verwerking op het laboratorium te vergemakkelijken (kosten terug te brengen).

3.7.1. Samenvoegen Agrobacterium kweken

Na de aparte kweekstap voor de twee *A. tumefaciens* biovars, kunnen de vloeistoffen samengevoegd worden. Op dit mengsel wordt dan één DNA zuivering en één PCR uitgevoerd, dit scheelt aanzienlijk in de tijd die nodig is om een monster te verwerken.

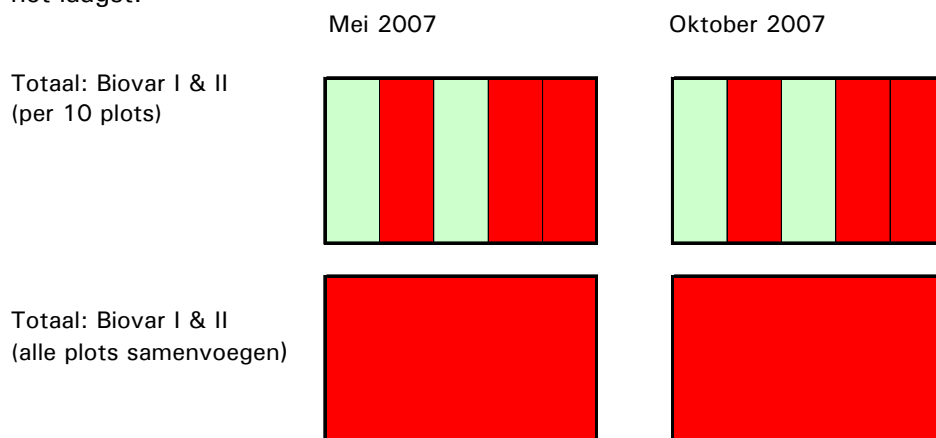
Uit de resultaten komt echter naar voren dat het samenvoegen van de vloeistoffen geen betrouwbare uitslag oplevert. In monsters waarin bij aparte verwerking *A. tumefaciens* wordt aangetoond, wordt bij samenvoegen in sommige gevallen geen *A. tumefaciens* aangetoond. De omgekeerde situatie komt echter ook voor. Het is op dit moment te vroeg om een dergelijke versimpeling van het protocol in het laboratorium door te voeren.

3.7.2. Groter oppervlak bemonsteren

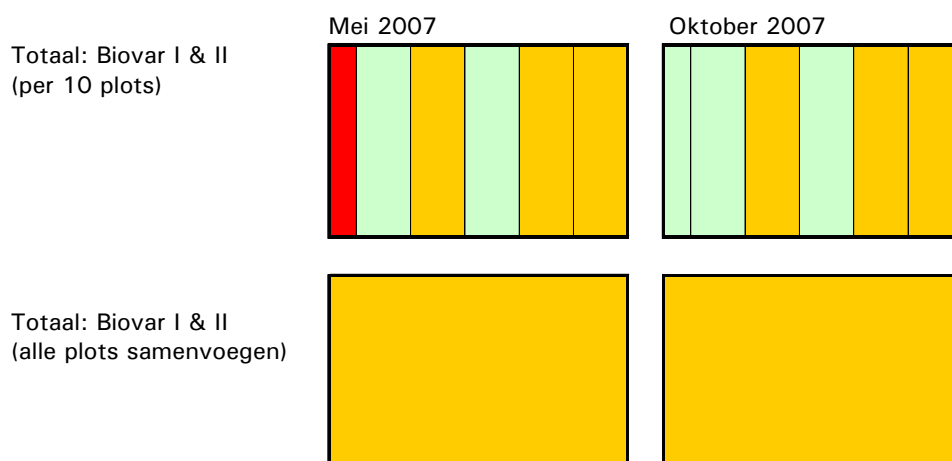
Door meer stekken samen te voegen, met andere woorden een groter oppervlak te bemonsteren, kan het aantal monsters per perceel worden teruggebracht. Dit soort monsters zijn gestoken tijdens de bemonstering voor de veldmonitoring. De percelen zijn in gedeeltes bemonsterd en de percelen zijn als geheel bemonsterd. Op het laboratorium zijn er wel twee verschillende kweken opgezet en twee analyses uitgevoerd.

Ondanks dat er relatief een kleiner monster wordt genomen uit het totaal: 10 gram uit 0,5-2 kg, in tegenstelling tot 10 gram uit 150 gram grond, blijkt dat ziekteverwekkende *A. tumefaciens* nog steeds kan worden aangetoond (figuren 14, 15 en 16). Het blijkt dat de bemonstering voor perceel 12 en 18 zowel in het voorjaar als in het najaar nagenoeg dezelfde gegevens oplevert.

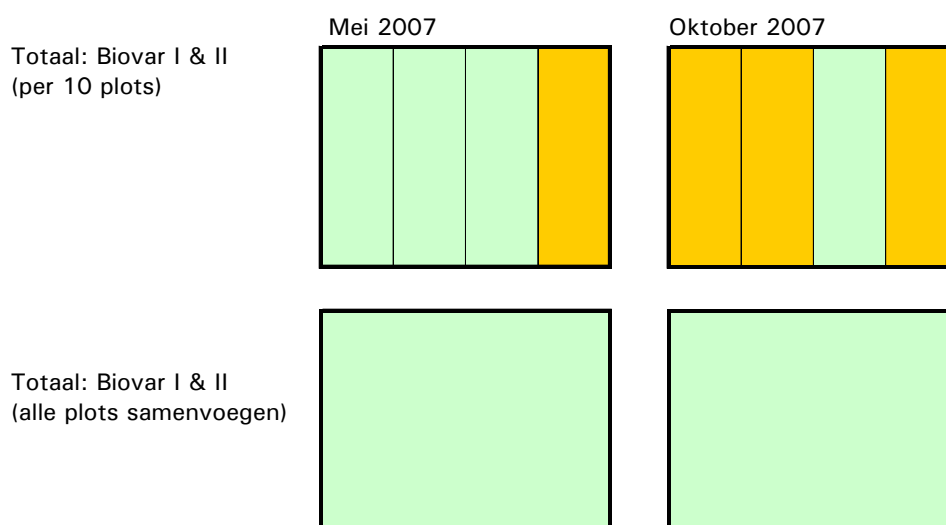
Bij perceel 20 blijkt het signaal bij het totaal monster (hele perceel in 1 monster) te verdwijnen, hier is de concentratie van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* echter het laagst.



Figuur 14. Aanwezigheid van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in percelen 12 bij het samenvoegen van grond van 10 plots en bij samenvoeging van alle plots, voor twee bemonsteringstijdstippen



Figuur 15. Aanwezigheid van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in perceel 18 bij het samenvoegen van grond van 10 plots en bij samenvoeging van alle plots, voor twee bemonsteringstijdstippen.



Figuur 16. Aanwezigheid van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in perceel 20 bij het samenvoegen van grond van 10 plots en bij samenvoeging van alle plots, voor twee bemonsteringstijdstippen

3.7.3. Groter monster analyseren

Bij het aanleveren van grotere hoeveelheden grond voor analyse kan overwogen worden om een groter submonster te gebruiken om op kweek te zetten, zodat de verhouding oorspronkelijk monster ten opzichte van het submonster voor analyse gelijk blijft. Hiervoor zijn van de totaal monsters per perceel naast 10 gram ook 100 en 200 gram grond afgewogen en op kweek gezet (aparte analyse van de kweken). Ook de hoeveelheid kweekmedium kan gevarieerd worden. De verwachting is dat een groter monster een betrouwbaarder beeld van de veldsituatie zal geven.

Uit de gegevens gepresenteerd in tabel 9. komt naar voren dat een grotere hoeveelheid grondmonster op medium te zetten niet tot een beter resultaat leidt. De huidige methode met 10 gram grond op 20 ml medium kweken, werkt goed.

Tabel 9. Analyse van grond op ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aan verschillende hoeveelheden grond variërend van 10, 100 en 200 gram grond op respectievelijk 20, 100/200 of 200/400 ml groeimedium.

Perceel		Grond [g]	Groeimedium [ml]	biovar I	biovar II	Totaal
P12	1	10	20	+	++	++
	2	10	20	++	++	++
	3	100	100	++	++	++
	4	100	200	++	++	++
	5	200	200	-	++	++
	6	200	400	++	++	++
P18	7	10	20	-	++	++
	8	10	20	+	+	+
	9	100	100	-	+	+
	10	100	200	-	-	-
	11	200	200	-	-	-
	12	200	400	+	-	+
P20	13	10	20	-	++	++
	14	10	20	++	-	++
	15	100	100	-	++	++
	16	100	200	-	++	++
	17	200	200	+	++	++
	18	200	400	-	-	-

Uit deze gegevens komt echter ook naar voren dat de herhaalbaarheid met name voor monsters met een lagere concentratie ziekteverwekkende *A. tumefaciens* minder betrouwbaar is dan voor monsters met een hoge concentratie ziekteverwekkende *A. tumefaciens*. Dit blijkt uit analyse 13 en 14 (tabel 9), waarbij de monsters zwaar positief worden bevonden terwijl in figuur 16, in dit monster kon geen *iaam*-gen worden aangetoond. Aangetekend moet worden dat de verschillende kweken niet op hetzelfde moment zijn ingezet.

4. CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

4.1. Ontwikkelde toets en bemonsteringsmethode

Er is een gevoelige en betrouwbare analyse ontwikkeld voor de detectie van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in grond. Deze analyse is gebaseerd op de PCR methode in combinatie met een selectieve kweekstap. De methode maakt het mogelijk om (semi)kwantitatieve uitspraken te doen over de aanwezigheid van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* op een perceel. De methode heeft een detectielimiet van ca 10-30 *iaam*-genen per gram of ml monster. De methode is qua ontwerp en uitvoering geschikt om te worden toegepast binnen de bestaande laboratoriumpraktijk.

Binnen het project is een bemonsteringsmethode ontwikkeld en geoptimaliseerd. Gekozen is voor een monsternamegrid dat aansluit bij de aaltjes bemonstering, het grid voor de Agrobacterium besmonstering is was voor onderzoek fijnmaziger. Uit bemonstering van stroken en hele percelen is naar voren gekomen dat de bemonstering niet fijnmazig hoeft en het sluit daardoor aan bij de bestaande bemonstering voor aaltjes. Het is met de ontwikkelde methode mogelijk om ziekteverwekkende *A. tumefaciens* te detecteren op percelen die verdacht worden van een *A. tumefaciens* besmetting.

4.2. Overlevings- en infectieproeven

Door het vergelijken van de gegevens van de laboratorium- en buiten overlevingsproeven is er inzicht verkregen in het effect van verschillende klimaatomstandigheden op de afsterving van de ziekteverwekkende *A. tumefaciens* in grond. De bacterie lijkt zich onder verschillende klimaatcondities prima in grondmonsters te handhaven. Deze gegevens worden ondersteund door de blijvende aanwezigheid van ziekteverwekkende *A. tumefaciens* op de verschillende percelen. Eveneens zijn er indicaties dat tijdens erg warme droge periodes (april en juni 2007) *A. tumefaciens* zich minder goed in grond handhaaft, dit geldt ook voor koude natte omstandigheden (maart 2007).

Uit de infectieproeven blijkt dat het mogelijk is om planten te besmetten met ziekteverwekkende *A. tumefaciens* via de grond, ziekteverwekkende *A. tumefaciens* wordt in de wortels en stam van de plant aangetoond, hoewel er niet altijd symptomen ontstaan.

4.3. Aantonen van *A. tumefaciens* in de bemonsterde percelen

Uit de resultaten van dit project blijkt dat het mogelijk is om ziekteverwekkende *A. tumefaciens* aan te tonen op besmette percelen. Het bemonsteringspatroon maakt bij hoge concentraties niet uit, ziekteverwekkende *A. tumefaciens* is altijd aantoonbaar. Bij lagere concentraties (rond de detectielimiet) wordt de aantoonbaarheid minder. De aantoonbaarheid kan weer worden verbeterd door meerdere analyses per perceel uit te voeren.

Uit de perceel monitoring blijkt eveneens dat ziekteverwekkende *A. tumefaciens* gedurende een lange periode op het veld aantoonbaar blijft (zie resultaten op perceel P 12), ook bij braakliggende velden. Dit betekent dat op deze velden *A. tumefaciens* nog steeds een probleem kan veroorzaken.

Op perceel 20 heeft een gevoelig gewas gestaan. Ziekteverwekkende *A. tumefaciens* blijft op dit perceel in belangrijke mate aanwezig. Er lijkt daarmee een duidelijk verband te bestaan tussen aanwezigheid van een vatbaar gewas op het perceel en de aanwezigheid van ziekteverwekkende *A. tumefaciens*.

4.3. Aanbevelingen

Er wordt aanbevolen om middels vervolg monitoring bij praktijktoepassingen van de toets meer informatie te vergaren over aantallen, overleving en optreden van infectie en symptomen. Om meer inzicht te krijgen in specifieke factoren die infectie en symptomen veroorzaken is echter een meer fundamentele studie nodig.

Met de ontwikkelde toets is het mogelijk te beoordelen of een perceel zwaar besmet, besmet of niet besmet is. De teler kan met deze resultaten in de hand een risico-inschatting maken. Zo kan de teler er voor kiezen wel een (gevoelig) gewas te telen, of juist besluiten hiervoor liever gebruik te maken van een ander perceel. Aanbevolen wordt dat indien *A. tumefaciens* op een perceel wordt aangetroffen, geen gevoelige rassen of waardplanten worden geteeld gedurende een aantal jaren. De daadwerkelijke keuze om een perceel wel of niet te gebruiken ligt echter bij de teler.

BIJLAGEN

Bijlage 1. De kwalitatieve *A. tumefaciens* analyse

Alle levende organismen bevatten DNA dat uniek is voor dat soort organisme. Dit is te vergelijken met streepjescodes op artikelen in de supermarkt. De bacterie *A. tumefaciens* bevat dus DNA dat alleen bij deze bacterie voorkomt. De detectiemethode voor *A. tumefaciens* is gebaseerd op het aantonen van een specifiek stukje van dit DNA en kan worden onderverdeeld in drie stappen.

Stap 1: Monstername en monstervoorbehandeling;

Voor de analyse wordt door de teler een grondmonster genomen. Dit monster wordt vervolgens gekoeld naar het laboratorium gestuurd voor de uitvoer van de analyse. Bij de monstername is een fixatiestap mogelijk.

Stap 2: DNA extractie;

Uit het monster wordt vervolgens het DNA geïsoleerd. Om de juiste stukjes DNA terug te kunnen vinden is het noodzakelijk dat alle DNA uit de teelaarde wordt geïsoleerd zodat ook al het aanwezige *A. tumefaciens* DNA in handen gekregen wordt. Aan de zuiverheid van het geïsoleerde DNA worden zeer hoge eisen gesteld. (An)organische verontreinigingen kunnen namelijk een storende werking hebben op de analyse. Gedurende de DNA extractie wordt alle DNA uit teelaarde monsters geïsoleerd en wordt het vervolgens via verschillende stappen gezuiverd. Hierna is het DNA geschikt om te gebruiken om naar het specifieke stukje *A. tumefaciens* DNA te zoeken. Dit gebeurt met de PCR analyse.

Stap 3: PCR analyse;

Tijdens de PCR stap wordt specifiek de aanwezigheid van *A. tumefaciens* DNA in het monster vastgesteld. Hiervoor wordt een tweestaps (nested) PCR analyse gebruikt. Hierbij wordt in twee stappen het specifieke stukje DNA vermeerderd en met een kleurreactie zichtbaar gemaakt. Is *A. tumefaciens* aanwezig dan wordt het product zichtbaar, de reactie is positief. Is geen product te zien dan is *A. tumefaciens* niet aanwezig.

Bijlage 2. De (semi)kwantitatieve analyse

Voor zowel de infectie en overlevingsproeven als de monitoring in het veld is het van belang om *A. tumefaciens* niet alleen kwalitatief maar ook (semi-)kwantitatief aan te kunnen tonen. Hiervoor is een kwantitatieve toets opgezet middels Q-PCR (kwantitatieve PCR) waarmee het aantal aanwezige *iam*-genen en daarmee het aantal pathogene *A. tumefaciens* aangetoond kan worden.

De Q-PCR methode is gebaseerd op de zelfde techniek als de (niet kwantitatieve) PCR methode. Tijdens een Q-PCR analyse wordt middels fluorescentiemetingen de toename van de hoeveelheid PCR product in de tijd gemeten. Indien er veel start materiaal (DNA) aanwezig is in het oorspronkelijke monster neemt deze hoeveelheid al vroeg in de reactie toe. Is er weinig startmateriaal aanwezig dan gebeurt dit pas later. Door vast te stellen wanneer het product in de tijd is gevormd kan de originele hoeveelheid DNA, en daarmee het aantallen cellen, in een monster worden berekend.

Deze analyse biedt de mogelijkheid betrouwbaar de aantallen *A. tumefaciens* vast te stellen voor de uitvoer en interpretatie van de overlevings- en infectieproef. Daarnaast kan deze analyse in combinatie met de voorkweekstap ingezet worden. Aangezien de snelheid van groei kan variëren geeft de methode dan een semi-kwantitatief resultaat.

Bijlage 3. Vragenlijsten voor de telers

VRAGENLIJST

Grondsoort:

1. Welke grondsoort heeft het perceel? _____
- Percentage afslibbaar? _____ %
- Percentage organische stof? _____ %
- Zuurgraad (pH)? _____ %

Teelthistorie van perceel en symptomen van wortelknobbel:

2. Welke gewassen zijn in voorgaande jaren op dit perceel aangeplant of geteeld:

2002	gewas	_____
	plant/zaai datum	_____
2003	gewas	_____
	plant/zaai datum	_____
2004	gewas	_____
	plant/zaai datum	_____

3. Zijn er in deze gewassen problemen geweest met *Agrobacterium tumefaciens* (wortelknobbel) en zo ja in welke mate?

De mate van aantasting globaal weergeven in percentage van de planten aangetast.

Percentage van planten aangetast:

2002	ja / nee	1-5%	5-15%	15-25%	25-50%	>50%
2003	ja / nee	1-5%	5-15%	15-25%	25-50%	>50%
2004	ja / nee	1-5%	5-15%	15-25%	25-50%	>50%

Specifieke aantasting:

Grote knobbel, kleine knobbels, welke plek aan de plant

4. Kwam de aantasting pleksgewijs (haarden) voor? Ja / Nee

Zo ja:

Kunt u aangeven waar in het perceel een grote concentratie aan wortelknobbels is gevonden? _____

Grondbewerking/bemesting:

5. Kunt u globaal aangeven welke grondbewerkingen/bemesting u de afgelopen jaren op het perceel heeft uitgevoerd?

Hierbij wordt gedacht aan ploegen e.d., eventueel opbrengen van grond van elders, versnipperen en onderwerken van gewasresten, etc.

2002 _____

2003 _____

2004 _____

6. Zijn er grondontsmettingen uitgevoerd? Ja / Nee

Zo ja:

Wanneer? _____

Welke methode? _____

Overig

7. Overige opmerkingen, suggesties, informatie:

Verzoek

Mocht u wortelknobbels vinden op dit bewuste perceel zou u willen aangegeven waar U deze symptomen heeft aangetroffen, en zou U deze knobbels willen opsturen aan:

Naktuinbouw
Afdeling Onderzoek en Ontwikkeling
t.a.v. R. Butôt / E. Meekes
Sotaweg 25
2371 GA Roelofarendsveen

VRAGENLIJST "Agrobacterium tumefaciens-project" (de gegevens zullen zeer vertrouwelijk worden behandeld)

Perceel: _____

1 - Welke grondbewerkingen/-ontsmettingen zijn er vanaf 2005 uitgevoerd op het betreffende perceel en welke gewassen hebben er vanaf 2005 op het perceel gestaan?

2005:

gewas: _____

grondbewerking: _____

grondbewerkingsrichting aangeven op bijgevoegde plattegrond.

grondontsmetting: _____

2006:

gewas: _____

grondbewerking: _____

grondbewerkingsrichting aangeven op bijgevoegde plattegrond.

grondontsmetting: _____

2007:

gewas: _____

grondbewerking: _____

grondbewerkingsrichting aangeven op bijgevoegde plattegrond.

grondontsmetting: _____

VRAGENLIJST "Agrobacterium tumefaciens-project" (de gegevens zullen zeer vertrouwelijk worden behandeld)

2 - Zijn er op het gewas woekeringen waargenomen? Ja / Nee

3 - Zo ja: - welk gewas betrof het hier? Gewas: _____

4 - - in welk jaar was dit? Jaar: _____

5 - Wat was de grootte van de woekering (doorsnede): _____ cm

6 - In welk deel van de plant zat de woekering: wortel / onderstam / tak / anders, nl: _____

7 - Hoeveel % van de planten vertoonden woekeringen? _____

8 - Kwamen de planten met woekeringen pleksgewijs voor op het perceel? Ja / Nee
Zo ja, waar (aangeven op de bijgevoegde plattegrond)

9 - Zijn de plaatjes met Agrobacterium tumefaciens besmettingen verklaarbaar?

- afhankelijk van gewas (soort, ras): Ja / Nee

toelichting: _____

- afhankelijk van teelthistorie (bijv. in verleden geteeld gewas): Ja / Nee

toelichting: _____

- afhankelijk van herkomst van gewas: Ja / Nee

toelichting: _____

- afhankelijk van behandelingen van het perceel/gewas (grondbewerkingen, bespuitingen) : Ja / Nee

toelichting: _____
