

Onbekende bacterie in
Zantedeschia-knol

Onbekende bacterie in Zantedeschia-knol

DLV Plant

Postbus 7001

6700 CA Wageningen

Agro Business Park 65

6708 PV Wageningen

T 0317 49 15 78

F 0317 46 04 00

E info@dlvplant.nl

www.dlvplant.nl

In opdracht van

Landelijke Commissie Zantedeschia van LTO Groeiservice

Gefinancierd door

Productschap Tuinbouw

Postbus 280

2700 AG Zoetermeer

Uitgevoerd door

DLV Plant - Leontiene van Genuchten - Rob de Groot

Postbus 7001

6700 CA Wageningen

Projectnummer

PT: 14588

DLV Plant: 448584

Versie

1

Dit document is auteursrechtelijk beschermd. Niets uit deze uitgave mag derhalve worden veeleelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch door fotokopieën, opnamen of op enige andere wijze, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLV Plant. De merkrechten op de benaming DLV komen toe aan DLV Plant B.V.. Alle rechten dienaangaande worden voorbehouden. DLV Plant B.V. is niet aansprakelijk voor schade bij toepassing of gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Uw sector investeert in dit project via het  Productschap  Tuinbouw

Inhoudsopgave

SAMENVATTING	3
1 INLEIDING EN DOEL	4
2 MATERIAAL EN METHODE	6
2.1 Monstername	6
2.2 Analyse	6
2.3 Informatie over de onbekende bacteriën	7
3 RESULTATEN	8
3.1 Analyses PPO Lisse	8
3.1.1 Monster 20 april 2012	8
3.1.2 Monsters juni 2012	9
3.1.3 Monsters juli 2012	11
3.2 Op naam stellen onbekende bacteriën	13
3.3 Informatie over de onbekende bacteriën	14
3.3.1 Bacillus firmus	14
3.3.2 Paenibacillus ginsengisoli / Paenibacillus anaericanus	14
3.3.3 Xanthomonas malthophilia / Pseudomonas malthophilia	15
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	16
BIJLAGE 1 REGISTRATIEFORMULIER PER MONSTER	17
BIJLAGE 2 LITERATUURLIJST	18

Samenvatting

In 2011 heeft DLV Plant een onderzoek uitgevoerd naar de invloed van uitgangsmateriaal, klimaat, gewasbescherming en substraat op uitval tijdens de teelt van *Zantedeschia*. Tijdens dit project zijn 71 knollen en planten en 10 spoelmonsters geanalyseerd op de aanwezigheid van ziekteverwekkers. Tijdens dit onderzoek is gebleken tijdens de analyse van een knol met uiterlijke symptomen van bacterieziekte soms geen ziekteverwekkende bacterie wordt aangetoond. Omdat uit de visuele beoordeling naar voren kwam dat het hier vrijwel zeker een bacterie aanwezig moest zijn, zou er dus sprake kunnen zijn van een bacterie die uitval kan veroorzaken die niet is opgenomen in de standaard DNA-scan. In het project van 2012 is gezocht naar de onbekende bacterie in relatief jong knolmateriaal. Door jong materiaal te nemen zijn er weinig vervuilende onschadelijke bacteriën aanwezig wat het makkelijker maakt om bacteriën te isoleren.

Er zijn 3 onbekende pectine-afbrekende bacteriën gevonden:

- *Bacillus firmus*
- *Paenibacillus ginsengisoli* / *Paenibacillus anaericanus*
- *Xanthomonas malthophilia* / *Pseudomonas malthophilia*

Vanuit literatuur en achtergrondinformatie is niet te vinden dat deze bacteriën schadelijk zijn voor planten of specifiek voor *Zantedeschia*. Dit is in tegenspraak met het feit dat uit de analyses van PPO Lisse blijkt dat deze bacteriën wel celwanden van planten kunnen afbreken.

Het is dus aan te bevelen om een infectietoets uit te voeren op *Zantedeschia*-knollen om vast te stellen of deze bacteriën werkelijk een knol kunnen aantasten en bacterierot kunnen veroorzaken.

1 Inleiding en doel

In 2011 heeft DLV Plant een onderzoek uitgevoerd naar de invloed van uitgangsmateriaal, klimaat, gewasbescherming en substraat op uitval tijdens de teelt van Zantedeschia. Tijdens dit project zijn 71 knollen en planten en 10 spoelmonsters geanalyseerd op de aanwezigheid van ziekteverwekkers.

Uit dit onderzoek blijkt dat vroeg in de teelt *Erwinia* nog geen rol speelt in de uitval van Zantedeschia-knollen. Bij de DNA-scan komt *Fusarium* veelvuldig naar voren, al vroeg in de teelt en ook voor het planten. Bacteriën spelen in dat stadium nog geen rol. Dit wordt tevens bevestigd voor de analyseresultaten van PPO Lisse. Het voorkomen en bestrijden van diverse schimmelziektes dus een belangrijk aandachtspunt, met de nadruk op bestrijding van *Fusarium*. Zowel tijdens de knollenteelt (beschadiging voorkomen, goed drogen, uitzoeken aangetaste knollen) als bij de bloemeteelt (gewasbescherming, kasklimaat).

Eén van de doelstellingen van het onderzoek in 2011 was om de primaire aantaster te achterhalen. Daarom zijn tijdens dat onderzoek verschillende knollen en planten geanalyseerd op de aanwezigheid van ziekteverwekkers. Tijdens het verzamelen van de monsters in het onderzoek in 2011 is bijgehouden welke symptomen zichtbaar waren en de vermoedelijke groep van de aantaster (bacterie of schimmel). In sommige gevallen was het vermoeden dat een bacterie als ziekteverwekker aanwezig zou moeten zijn. Echter tijdens de analyse is geen bacterie aangetoond. De analyse is uitgevoerd met een DNA-scan waarin de volgende bacteriën waren opgenomen:

<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Erwinia carotovora subsp. atroseptica</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. porri</i>
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Xanthomonas fragariae</i>
<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>

Omdat uit de visuele beoordeling naar voren kwam dat het hier vrijwel zeker een bacterie aanwezig moest zijn, zou er dus sprake kunnen zijn van een bacterie die uitval kan veroorzaken die niet is opgenomen in de standaard DNA-scan. Om dit te achterhalen is het monster uitgeplaat. Na uitplaten van een monster bleek dat er inderdaad een bacterie werd aangetroffen die niet in de DNA-scan is opgenomen. Ook bij analyses door PPO Lisse is twee keer een bacterie in een knol aangetroffen die geen bekende *Erwinia* of *Pseudomonas* bleek te zijn.

De 6 monsters die hierna zijn genomen, zijn door een ander laboratorium geanalyseerd omdat die meer mogelijkheden bood voor nadere analyse. In die 6 monsters is echter iedere keer de bekende *Erwinia*-bacterie gevonden. Als het monster dan wordt uitgeplaat voor nadere analyse, zal er altijd veel bacteriegroei aanwezig zijn van de bekende bacterie, wat het isoleren van onbekende kolonies zeer lastig maakt. Oorzaak hiervan is ook dat deze monsters laat in de teelt zijn genomen, waardoor altijd veel (on)schadelijke bacteriën aanwezig zijn.

Om het goed mogelijk te maken om alle aanwezige bacteriën te isoleren, zijn knollen met een beginnende aantasting nodig. Hoe vroeger een monster wordt genomen, hoe minder ziekteverwekkers aanwezig zijn, en hoe beter de primaire ziekteverwekker te isoleren is.

De Landelijke Commissie Zantedeschia heeft tijdens de vergadering van 9 november 2011 aangegeven dat zij graag nader onderzoek willen om te achterhalen welke tot nu toe nog onbekende bacterie hier een rol kan spelen, en of deze pathogeen is voor Zantedeschia en primair voor uitval kan zorgen.

Te bereiken resultaten voor het onderzoek in 2012:

- Benoemen van de bacterie waardoor beter inzicht wordt verkregen in de aanwezigheid van diverse bacteriën in knollen van Zantedeschia.
- Kennis en inzicht over pathogeniteit van de bacterie en mogelijkheden voor preventie/aanpak.

2 Materiaal en methode

2.1 Monstername

Dit project heeft zich gericht op het opsporen en benoemen van de onbekende bacterie in Zantedeschia-knollen. Tijdens het teeltseizoen 2012 zijn voor het planten en tijdens de teelt diverse monsters verzameld uit diverse Zantedeschia-partijen van diverse knollen-leveranciers en diverse cultivars. De herkomst van de knollen is in overleg met de BCO bepaald. Bij de cultivars zat in ieder geval Crystal Blush aangezien in het "Onderzoek naar de oorzaak van uitval in Zantedeschia" dat is uitgevoerd door DLV Plant in 2011, in die cultivar de onbekende bacterie aanwezig was. Er is duidelijk opgeschreven welk monster uit welke partij komt, zodat nadat de analyseresultaten bekend waren, de herkomst van de knol was te achterhalen. Voor het inzenden zijn de monsters visueel beoordeeld op aanwezige ziekteverwekkers (schimmel, bacterie). Per monster is een formulier (Bijlage 1) ingevuld met gegevens van het monster.

Op 20 april 2012 is 1 monster van 4 knollen bij 1 teler verzameld. Deze teler gaf zelf aan dat het een partij betrof met veel uitval welke hij graag wilde indienen voor het project.

Tussen 5 en 7 juni 2012 zijn 8 monsters afkomstig van 3 telers met 5 verschillende cultivars verzameld. Dit betrof ook 2 monsters van een Aethiopica-gewas. Dit gewas heeft een wortelstok in tegenstelling tot de knol van Zantedeschia. Aangezien de problematiek vergelijkbaar is, is de LC Zantedeschia ermee akkoord gegaan om deze monsters in het project op te nemen.

Tussen 13 en 16 juli 2012 zijn nog een keer 10 monster afkomstig van 5 andere telers met 10 verschillende cultivars verzameld.

Deze monsters zijn door DLV Plant bezorgd bij PPO Lisse waar ze geanalyseerd zijn.

2.2 Analyse

De monsters zijn geanalyseerd door PPO Lisse. De analyse-procedure die is gevolgd zag er als volgt uit:

Allereerst is een isolatie gemaakt uit verschillend type weefsel en/of water. Deze isolatie heeft men laten groeien op een petrischaal met NYA (nutriënt yeast agar). Dit is een algemene agar waar in principe alle bacteriën heel goed op groeien. Hiervan zijn vier verdunningen gemaakt (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5}) van elke isolatie om individuele kolonies over te kunnen zetten ten behoeve van reïnculturen.

Ook doorgesneden knollen zijn 'gestempeld' op deze agar.

Per isolaat is van de koloniën die er visueel verschillend uit zien, een reïncultuur gemaakt, dit wil zeggen dat de kolonie is overge-ent zodat er nog maar één bacterie op een petrischaal groeit. Als dat is gelukt worden de bacteriën overgezet op CVP medium (Crystal Violet Pectate) en een medium dat pectine als voedingsbodem bevat. Op deze twee bodems groeien alleen bacteriën die celwanden kunnen afbreken. De bacteriën die op één van de twee (of beide) voedingsbodems groeien, worden daarna via PCR-toetsen (DNA-toetsen) onderzocht of het de bekende bacteriën Pcc (Pectobacterium carotovorum

ssp carotovorum voorheen *Erwinia carotovorum*) of een *Pseudomonas* zijn. Zodra dat niet het geval is, is er sprake van een onbekende potentiële ziekteverwekker. Indien dergelijke afwijkende bacteriën zijn gevonden, is daar het DNA van geïsoleerd en gesequencet (volgorde van basenparen bepalen). Daarna is in een databank gezocht of het een in de databank bekende bacterie is en zo ja, hoe de bacterie heet en wat de eigenschappen van deze bacterie zijn.

2.3 Informatie over de onbekende bacteriën

Van de gevonden onbekende bacteriën, is kennis rondom deze bacterie vanuit de literatuur, praktijk en eerder uitgevoerd onderzoek verzameld. Vanuit die kennis is geprobeerd om te bepalen of deze bacterie pathogeen is voor *Zantedeschia* en primair een aantasting kan veroorzaken.

Wanneer er meer duidelijkheid is over de achtergrond van de onbekende bacterie, kunnen hierop gericht maatregelen worden genomen.

Vragen die hierbij spelen zijn bijvoorbeeld:

- Primaire of secundaire aantaster?
- Hoe verloopt infectie?
- Wat is de wijze van overleven en verspreiden?
- Wat zijn de optimale klimaatomstandigheden?
- Welke hygiëne- of bestrijdende maatregelen zijn mogelijk?

3 Resultaten

3.1 Analyses PPO Lisse

3.1.1 Monster 20 april 2012

In tabel 1 is aangegeven van welk deel van de plant een monster is genomen voor de analyse. Van elke isolatie is daarna een reïncultuur gemaakt van 5 of 6 visueel verschillende bacteriën.

Tabel 1. Type geïsoleerd materiaal, gevonden pathogene bacteriën en afwijkende bacteriën.

Plaats isolatie	Aangetroffen ziekteverwekkende bacteriën	Aangetroffen afwijkende bacteriën
Rotte knol	Pectobacterium carotovorum Pseudomonas	Geen
Rot plekje op knol	Pectobacterium carotovorum Pseudomonas	Geen
Verslijmende scheut	Pectobacterium carotovorum Pseudomonas	Geen
Gezonde knol	Geen	Geen
Stempelen gezonde knol	Geen	Geen

Bij het stempelen van de gezonde knol kwamen zeer veel bacteriën op de plaats van stempelen tot groei. Deze bacteriën groeien in de petrischaal direct allemaal over elkaar heen. Er zijn daaruit verschillende keren isolaties gemaakt om zuivere kolonies uit te kunnen kweken. Dit is zeer arbeidsintensief en leverde geen afwijkende bacteriën op.

Conclusie uit dit monster:

- Uit elk isolaat groeiden vele bacteriën, ook uit de gezonde en gestempelde knol.
- Alleen uit de zichtbaar aangetaste knollen of bladeren/scheuten groeiden bekende ziekteverwekkende bacteriën zoals *Pectobacterium carotovorum* en *Pseudomonas*.
- Alle bacteriën die het vermogen hebben om celwanden af te breken en in dit monster aanwezig waren, bleken tot deze twee bekende groepen van bacteriën te behoren.
- Er waren geen afwijkende bacteriën aanwezig die plantpathogeen kunnen zijn.

3.1.2 Monsters juni 2012

In tabel 2 is een beschrijving gegeven van de uiterlijke kenmerken van de 8 monsters die tussen 5 en 7 juni verzameld zijn.

Tabel 2. Codering en typering monster.

Code monster	Cultivar	Omschrijving monster
DLV-1 1b = blad 1 = zieke knol	Crystal blush	2 knollen met scheuten van paar cm boven de grond. Van elke knol valt een spruit weg. Knollen geheel rot.
DLV-2	Crystal blush	3 droge knollen die nog geplant moeten worden, visueel gezond.
DLV-3	Crystal blush	2 potten met elk 1 knol, spruit net boven de knol. Na spoelen knollen + wortel + spruit visueel gezond.
DLV-4	Allure	2 potten met elk 1 knol, spruit net boven de knol. Na spoelen knollen + wortel + spruit visueel gezond.
DLV-5	Odessa	2 potten met elk 1 knol, spruit net boven de knol. Na spoelen knollen + wortel + spruit visueel gezond.
DLV-6	Flame	2 potten met elk 1 knol, spruit net boven de knol. Na spoelen knollen + wortel + spruit visueel gezond.
DLV-7 g = gezonde wortelstok z = zieke wortelstok	Aethiopica Avalanche	Kleine planten met meerdere scheuten met rotverschijnselen aan blad (slijmerig) en wortelstok. Weinig blad en weinig wortel. Stinkt.
DLV-8 bz = blad ziek (verslijming) wz = wortelstok ziek v = verdachte wortelstok	Aethiopica Avalanche	Kleine planten met meerdere scheuten met rotverschijnselen aan blad (bruin-geel/slijmerig) en wortelstok. Stinkt.

Daar waar een "w" achter de code van het monsters staat (tabel 3) wordt het watermonster bedoeld.

De vijf visueel gezonde knollen (monsters DLV-2 t/m DLV-6) zijn na afspoelen met kraanwater gedurende één uur in een bekerglas met PBS-oplossing (Phosphate Buffered Saline) ondergedompeld. Dit is een waterige oplossing waarin bacteriën gemakkelijk kunnen overleven. Van dit water zijn ook monsters genomen.

De knollen zijn na het spoelen met kraanwater volgens standaard protocol gedurende 15 minuten gedompeld in 1% chloor oplossing om uitwendige bacteriën te doden. Daarna zijn knollen afgespoeld met steriel water en zijn van binnenuit isolaties gemaakt.

De visueel gezonde knollen zijn gestempeld zoals ook in het eerste monster van 20 april 2012.

De resultaten van de bemonstering zijn weergegeven in tabel 3. De knollen die zijn gestempeld lieten weer zeer veel bacteriën zien die direct allemaal over elkaar heen groeiden op het groeimedium in de petrischaal. Omdat het bij het vorige monster zeer veel tijd kostte om hier reïnculturen uit te kweken die vervolgens geen ziekteverwekkende bacteriën opleverde is besloten om deze procedure bij deze monsters niet te herhalen. Van elk isolaat zijn meerdere visueel verschillende bacteriën onderzocht, in tabel 3 zijn deze aangegeven met een bacterienummer. Daar waar de bacterie groeide op de pectine-plaat is een PCR-toets uitgevoerd om te toetsen of het een *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* (afgekort Pcc) of *Pseudomonas* (afgekort Pseudo) betrof. Als het geen

Pectobacterium carotovorum ssp carotovorum of Pseudomonas blijkt te zijn, is het een andere pectine-afbrekende bacterie.

Tabel 3. Gevonden bacteriën per monster en isolaat (= bacterienummer).

Code monster	Type monster	Bacterie nummer	Groei op pectine-plaat	PCR	
				Pcc	Pseudo
DLV-1 (1)	knol	1 t/m 6	-		
	knol	7	+	+	-
DLV-1 (1b)	blad	1, 4	-		
	blad	2, 3, 5, 6	+	+	-
DLV-2 (2)	knol	1, 2, 3	-		
	knol	4, 5	+	-	+
DLV-2 (2w)	knolwater	1 t/m 7	-		
DLV-2 (Stempel)	knol	nb			
DLV-3	knol	1 t/m 7	-		
DLV-3 (3w)	knolwater	1 t/m 6	-		
DLV-3 (Stempel)	nb				
DLV-4	knol	1, 3, 4	-		
	knol	2, 5, 6	+	-	+
DLV-4 (4w)	knolwater	1 t/m 4 + 6 t/m 9	-		
	knolwater	5	+	-	+
DLV-4 (Stempel)	nb				
DLV-5	knol	1	+	-	+
	knol	2 t/m 4	-		
DLV-5 (5w)	knolwater	1 t/m 6	-		
DLV-5 (Stempel)	nb				
DLV-6	knol	1, 5, 6, 7	-		
	knol	2, 3, 4	+	+	-
DLV-6 (6w)	knolwater	1 t/m 7	-		
DLV-6 (Stempel)	nb				
DLV-7 (7z)	wortel "ziek"	1, 3, 4, 5	-		
	wortel "ziek"	2	+	-	-
DLV-7 (7g)	wortel "gezond"	1, 2, 4, 5	-		
	wortel "gezond"	3	+	-	-
DLV-8 (8bz)	blad "ziek"	1, 2, 6, 7, 8	-		
	blad "ziek"	3, 4, 5	+	+	-
DLV 8 (8wz)	wortel "ziek"	1 t/m 6	-		
DLV 8 (8v)	wortel "verdacht"	1	+	-	-
	wortel "verdacht"	2 t/m 10	-		

Uit de resultaten die staan weergegeven in tabel 3 blijkt dat het in de meeste gevallen waar een pectine-afbrekende bacterie wordt gevonden het de bekende Pectobacterium carotovorum ssp carotovorum of Pseudomonas betreft. Alleen in het monster met code DLV-7 wortel "ziek", DLV-7 wortel "gezond" en DLV-8 wortel "verdacht" is in ieder monster 1 van de isolaten van een pectine-afbrekende bacterie maar betreft het geen Pectobacterium carotovorum ssp carotovorum of Pseudomonas. Het betreft hier dus een andere bacterie met de mogelijkheid om pectine af te breken, en dus potentieel schadelijk voor Zantedeschia-knollen.

3.1.3 Monsters juli 2012

In tabel 4 is een beschrijving gegeven van de uiterlijke kenmerken van de 8 monsters die tussen 13 en 16 juli verzameld zijn.

Tabel 4. Codering en typering monster.

Code monster	Cultivar	Omschrijving monster
DLV-21	Oranje	2 knollen met korte spruit + afgebroken wortels (kort geleden op zandgrond geplant)
DLV-22	Mozart	2 knollen met 10 cm grote spruit + afgebroken wortels (kort geleden op zandgrond geplant)
DLV-23	Serrada	3 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring Penicillium zichtbaar.
DLV-24	Romance	3 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring Penicillium zichtbaar.
DLV-25	Safari	3 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring Penicillium zichtbaar.
DLV-26	Twitter	3 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring
DLV-27	Dordogne	3 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring
DLV-28	Elegan Swan	2 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring
DLV-29	Promise	2 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring
DLV-30	Romance	2 knollen met 1 cm grote spruit, knol droog uit bewaring

De monsters DLV-21 en 22 zijn eerst gespoeld om al het zand van de knollen te verwijderen. Daarna zijn alle knollen volgens standaard protocol gedurende 15 minuten gedompeld in 1% chloor oplossing om uitwendige bacteriën te doden. Daarna zijn knollen afgespoeld met steriel water en zijn van binnenuit isolaties gemaakt. Omdat alle knollen visueel gezond waren zijn isolaties gemaakt van de onderkant van de knol en de spruit en knolweefsel onder/rond de spruit.

Er zijn geen watermonsters gekomen en geen knollen gestempeld. Er zat geen meerwaarde in de watermonsters. Via het stempelen zijn geen pectine-afbrekende bacteriën gevonden en lijkt daarom ook geen meerwaarde te hebben.

De resultaten van de bemonstering zijn weergegeven in tabel 5.

Van elk isolaat zijn een aantal visueel verschillende bacteriën onderzocht. In tabel 5 zijn die aangegeven met bacterienummer.

Tabel 5. Gevonden bacteriën per monster en isolaat (= bacterienummer).

Code monster	Bacterie nummer	Groei op pectine-plaat	PCR	
			Pcc	Pseudo
DLV-21	1, 3 t/m 8	-	-	-
	2, 7	+	-	-
DLV-22	1, 3, 4, 5, 6, 8	-	-	-
	2	+	+	-
	7	+	-	-
DLV-23	1, 2, 3, 4, 6, 8	-	-	-
	5	+	-	+
	7	+	-	+
DLV-24	1 t/m 8	-	-	-
DLV-25	1, 2, 4, 5, 7, 8	-	-	-
	3	+	-	+
	6	+	-	+
DLV-26	1	+	-	-
	2, 4, 5, 7	-	-	-
	3, 6	+	-	-
	8	+	-	+
DLV-27	1 t/m 6, 8	-	-	-
	7	+	-	-
DLV-28	1 t/m 8	-	-	-
DLV-29	1 t/m 8	-	-	-
DLV-30	1 t/m 8	-	-	-

Uit de resultaten die staan weergegeven in tabel 5 blijkt dat het in de meeste gevallen waar een pectine-afbrekende bacterie wordt gevonden het de bekende *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* of *Pseudomonas* betreft. Alleen in het monster met code DLV-21, DLV-22, DLV-26 en DLV-28 is in ieder monster 1 of 2 van de isolaten van een pectine-afbrekende bacterie maar betreft het geen *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* of *Pseudomonas*. Het betreft hier dus een andere bacterie met de mogelijkheid om pectine af te breken, en dus potentieel schadelijk voor Zantedeschia-knollen.

3.2 Op naam stellen onbekende bacteriën

Nadat door PPO Lisse in enkele monsters één of meer onbekende bacteriën zijn gevonden die niet tot de bekende *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* of *Pseudomonas* behoren, zijn enkele monster geanalyseerd op DNA. Door middel van deze analyse kan een naam gegeven worden aan de onbekende bacterie.

In totaal is DNA geïsoleerd uit elf bacteriekolonies afkomstig van alle drie de monsterinzendingen. In tabel 6 is weergegeven welke bacteriën nader zijn onderzocht en welke bacteriën dit bleken te zijn. Naast de onbekende bacteriën zijn ook enkele bekende bacteriën onderzocht die positief reageerden op de toetsen bij PPO maar er morfologisch iets anders uitzagen dan normaal. Dit kan worden gezien als een controle op de uitslagen van de PPO toetsen.

Tabel 6. Naam van de bacterie per monsternummer en bacterienummer.

Code Monster	Bacterie-nummer	Uitslag PPO	Uitslag DNA-analyse
Bekende bacterie			
DLV-1 (1b)	2	Pcc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp <i>carotovorum</i>
DLV-6	2	Pcc?	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp <i>carotovorum</i>
DLV-2	5	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
DLV-25	6	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
DLV-26	8	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
Onbekende bacterie			
DLV-22	2	Onbekend	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp <i>carotovorum</i>
DLV-26	1	Onbekend	<i>Pseudomonas</i>
DLV-8 (8v)	1	Onbekend	<i>Bacillus (firmus)</i>
DLV-26	3	Onbekend	<i>Paenibacillus (ginsengisoli</i> of <i>Paenibacillus anaericanus)</i>
DLV-26	6	Onbekend	<i>Paenibacillus (ginsengisoli</i> of <i>Paenibacillus anaericanus)</i>
DLV-27	7	Onbekend	<i>Xanthomonas/Pseudomonas malthophilia</i>

De bacteriën die volgens de PRC-toetsen van PPO *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* of *Pseudomonas* zouden zijn, bleken dit ook werkelijk te zijn ook al zagen de kolonies er op een petrischaal afwijkend uit (vooral kleur).

In één geval (DLV-6/2) bleek de bacterie die zeer licht reageerde in de toets op *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* toch wel *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* te zijn. Blijkbaar kan de spreiding binnen dit soort zo groot zijn dat de toetsuitslag soms ten onrechte twijfelachtig is.

Van de zes onbekende bacteriën die wel pectine kunnen afbreken bleek er één (DLV-22/2) toch *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* te zijn en één (DLV-26/1) toch een *Pseudomonas*. Blijkbaar waren deze te afwijkend om in de PCR-toets van PPO Lisse herkend te worden als *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* of *Pseudomonas*.

De nog vier overblijvende onbekende bacteriën bleken te zijn:

- *Bacillus firmus* (DLV-8v/1)
- *Paenibacillus ginsengisoli* / *Paenibacillus anaericanus* (DLV-26/3 en 6)
- *Xanthomonas malthophilia* / *Pseudomonas malthophilia* (DLV-27/7)

3.3 Informatie over de onbekende bacteriën

3.3.1 *Bacillus firmus*

B. firmus is een gram-positieve, lange, staafvormige en sporulerende bacteriën. De habitat van de bacterie is de bodem en ontbindend materiaal. De bacteriën kunnen ook worden gevonden als een verontreiniging in een laboratorium. De optimale groei van de bacterie vindt plaats tussen 28 en 33°C. Boven de 50°C is er geen groei (Breed et al., 1957).

De bacteriën bleek pathogeen te zijn voor *Eligma narcissus* (een Lepidoptera; rups) die een plaag kan vormen op de boom *Ailanthus triphysa* die in het regenwoud voorkomt (Varma en Mohamed, 1986). Pengnoo et al. (2006) heeft gemeld dat *B. firmus* kan zorgen voor de remming van myceliumgroei van *Rhizoctonia solani*, de veroorzaker van bladvlekken in Bambara grondnoot.

Tevens kan *B. firmus* de wortelgroei stimuleren van zaailingen van koolzaad (*Brassica campestris*).

Agro-Green, ontwikkelde een bio-nematicide met *B. firmus* met de naam BioNem. Het zou werkzaam zijn tegen diverse aaltjes zoals *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne hapla*, *Heterodera spp.*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema index*, *Ditylenchus dipsaci* en *Radopholus similis* (Keren-Zur et al., 2000; Terefe et al., 2009; Mendoza et al., 2008). Bayer heeft een product voor zaad-behandeling ontwikkeld dat *B. firmus* bevat. Het product is genaamd Poncho/VoTiVo en het combineert een insecticide voor maïs (Poncho) met *B. firmus* als nematicide (VoTiVo). Zowel BioNem, Poncho als VoTiVo hebben in Nederland geen toelating als gewasbeschermingsmiddel.

Indien *B. firmus* verschillende stammen heeft kan het zijn dat hier verschillen in pathogeniteit tussen bestaan. Veel *Bacillus*-soorten zijn ziektemakend voor schimmels en bacteriën waarvan ze de celwanden lek maken maar zijn juist vriendelijk voor planten.

3.3.2 *Paenibacillus ginsengisoli* / *Paenibacillus anaericanus*

In twee gevallen is *Paenibacillus anaericanus* aangetroffen. In 2010 is in Polen melding gedaan dat de bacterie *Paenibacillus polymyxa* bacterierot in *Zantedeschia* kan veroorzaken (Mikieinski et al, 2010).

De officiële benaming is *Paenibacillus anaericanus* met *Paenibacillus ginsengisoli* als synoniem. (Kim et al., 2011).

P. anaericanus is een gram-positieve, aërobe of facultatief anaerobe, sporevormende, onbeweeglijke spore-vormende bacteriële stam (Lee et al., 2007). Het groeit goed op agar-medium met nutriënten, maakt gebruik van een vrij smal spectrum van koolstof-bronnen en tolereert 10% NaCl. Het isolaat was positief voor katalase en oxidase tests maar negatief voor de afbraak van macromoleculen zoals caseïne, collageen, zetmeel, chitine, CM-gemengd met cellulose, Xylaan en DNA.

3.3.3 *Xanthomonas malthophilia* / *Pseudomonas malthophilia*

Stenotrophomonas malthophilia is ook bekend onder de namen *Xanthomonas malthophilia* of *Pseudomonas malthophilia*. *S. malthophilia* is een gram-negatieve, niet-sporulerende bacterie. De bacterie is motile met diverse flagellen (Palleroni en Bradbury, 1993). Het is niet bekend dat *S. malthophilia* pathogeen is voor planten. Mguni et al. (1999) heeft verschillende bacteriën geïsoleerd en getest op pathogeniteit bij zaailingen van kool, maar *S. malthophilia* bleek niet pathogeen te zijn. Mehnaz et al. (2010a) heeft geen pectinase, de activiteit van cellulase of chitinase in *S. malthophilia* isolaten gevonden, waarmee wordt aangegeven dat de bacteriën niet in staat zijn om celwanden aan te tasten. Een negatief effect van de bacteriën op plantengroei werd gemeld door Wenke et al. (2012). Zij vonden dat vluchtige stoffen van *S. malthophilia* significant de groei remden en H₂O₂ productie verhoogden in Arabidopsis.

S. malthophilia wordt hoofdzakelijk beschouwd als een bio-control-agent. De antagonistische potentie van bacteriële vluchtige stoffen tegen de pathogene schimmel *Rhizoctonia solani* werd aangetoond voor *S. malthophilia* (Kai et al., 2007). In Chili is de meest agressieve wortel parasiet van wijnstokken is *Xiphinema index*. *S. malthophilia* verminderde schade aan de wortel en onderdrukte de populatie van *Xiphinema index* (Aballay et al., 2011). Er zijn echter ook gunstige effecten van de bacteriën gemeld in situaties zonder dat ziekteverwekkers aanwezig waren. In experimenten door Mehnaz et al. (2010b) toonde *S. malthophilia* gunstige effecten op wortel- en scheut-gewicht van twee maïs-rassen, onder gesteriliseerd en niet-gesteriliseerde omstandigheden in experimenten in een kas. Alsanius en Gertsson (2004) melden een hogere opbrengst bij tomaat geteeld op steenwol waartoe een mengsel van bacteriën met daarin ook *S. malthophilia* is toegevoegd.

4 Conclusies en aanbevelingen

Er zijn drie onbekende bacteriën gevonden:

- Bacillus firmus
- Paenibacillus ginsengisoli / Paenibacillus anaericanus
- Xanthomonas malthophilia / Pseudomonas malthophilia

Vanuit literatuur en achtergrondinformatie is niet te vinden dat deze bacteriën schadelijk zijn voor planten of specifiek voor Zantedeschia. Dit is in tegenspraak met het feit dat uit de analyses van PPO Lisse blijkt dat deze bacteriën wel celwanden van planten kunnen afbreken.

Het is dus aan te bevelen om een infectietoets uit te voeren op Zantedeschia-knollen om vast te stellen of uit te sluiten dat deze bacteriën werkelijk een knol kunnen aantasten en bacterierot kunnen veroorzaken.

Bijlage 1 Registratieformulier per monster

Datum:	
Bedrijfsnaam:	
Adres:	
Telefoonnummer:	
E-mail (voor uitslag):	
Code Monster: (= 3 letters van naam teler en 2 cijfers volgnummer)	
Soort /Cultivar:	
Herkomst:	Vermeerderaar..... Zelf vermeerderd
Partij-code vermeerderaar:	
Stadium knol (T1, T2,.....):	
Plantdatum:	
Teeltsysteem:	Bakken / vollegrond /
Behandeling met gewasbeschermingsmiddelen:	Nee / Ja, welke....
Foto van ziekteverschijnsel en/of omschrijving:	

Bijlage 2 Literatuurlijst

- Aballay, E., Mårtensson, A. and Persson, P. (2011). Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on in vitro grape plants. *Plant and Soil* 347 (1), pp. 313-325.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. and Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology* 187 (5), pp. 351-360.
- Keren-Zur, M., Antonov, J., Bercovitz, A., Feldman, K., Husid, A., Kenan, G., Markov, N. and Rebhun, M. (2000). *Bacillus firmus* formulations for the safe control of root-knot nematodes. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases*, vol. 2A, pp. 47-52.
- Kim, K.K., Lee, K.C. and Lee, J.-S. (2011). Reclassification of *Paenibacillus ginsengisoli* as a later heterotypic synonym of *Paenibacillus anaericanus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (9), pp. 2101-2106.
- Lee, M., Ten, L.N., Baek, S.-H., Im, W.-T., Aslam, Z. and Lee, S.-T. (2007). *Paenibacillus ginsengisoli* sp. nov. a novel bacterium isolated from soils of a ginseng field in Pocheon province, South Korea. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 91 (2), pp. 127-135.
- Mehnaz, S., Baig, D.N. and Lazarovits, G. (2010a). Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20 (12), pp. 1614-1623.
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B. and Lazarovits, G. (2010b). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 42 (10), pp. 1848-1856.
- Mendoza, A.R., Kiewnick, S. and Sikora, R.A. (2008). In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology* 18 (4), pp. 377-389.
- Mguni, C.M., Mortensen, C.N., Keswani, C.L. and Hockenhull, J. (1999). Detection of the black rot pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and other xanthomonads in Zimbabwean and imported *Brassica* seed. *Seed Science and Technology* 27(2), pp. 447-454.
- Mikieinski, A., Sobiczewski, J., Pulawska, J., Treder, J., (2010). Involvement of *Paenibacillus polymyxa* in the etiology of bacterial soft rot of calla lily. *Journal of Plant Pathology* 92 (2), pp. 375-380.
- Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for maltophilia (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43 (3), pp. 606-609.
- Pengnoo, A., Wiwattanapattapee, R., Chumthong, A. and Kanjanamaneesathian, M. (2006). Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22 (1), pp. 9-14.

- Terefe, M., Tefera, T. and Sakhuja, P.K. (2009). Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of Invertebrate Pathology* 100 (2), pp. 94-99.
- Varma, R.V. and Mohamed, A.M.I. (1986). *Bacillus firmus* as a new insect pathogen on a Lepidopteran pest of *Ailanthus triphysa*. *Journal of Invertebrate Pathology* 47 (3), pp. 379-380.
- Wenke, K., Wanke, D., Kilian, J., Berendzen, K., Harter, K. and Piechulla, B. (2012). Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY18 function. *Plant Journal* 70 (3), pp. 445-459.
- Mikieinski, A., Sobiczewski, J., Pulawska, J., Treder, J., (2010). Involvement of *Paenibacillus polymyxa* in the etiology of bacterial soft rot of calla lily. *Journal of Plant Pathology* 92 (2), pp. 375-380.