



# Internationale kennisoriëntatie op “overmatige wortelgroei” in komkommer, tomaat en aubergine

Daniël Ludeking, Jan Janse



## Referaat

Deze kennisoriëntatie is uitgevoerd in opdracht van het Productschap Tuinbouw om kennis uit wetenschappelijke literatuur en bij internationale instituten over *Agrobacterium rhizogenes* toegankelijk te maken en de hiaten in kennis aan te geven. Duidelijk moet worden waar mogelijke oplossingen liggen voor de almaar toenemende problematiek rond 'overmatige wortelgroei'. Deze ziekte wordt veroorzaakt door *Agrobacterium rhizogenes* en speelt vooral een rol bij de gewassen aubergine, komkommer en tomaat.

De kennisoriëntatie moet leiden tot onderzoeksthema's over mogelijke factoren die van invloed zijn op de infectie, groei, ontwikkeling van *Agrobacterium rhizogenes* (of andere vectoren van het Ri-plasmide) onder praktijkomstandigheden.

Deze kennisoriëntatie heeft geleid tot de volgende 4 thema's voor onderzoek:

1. Vatbaarheid voor *Agrobacterium rhizogenes* vroeg in de teelt
2. Weerbaar substraat
3. Screening van technieken en middelen tegen *A. rhizogenes*
4. Biologische bestrijding van *A. rhizogenes*

## Abstract

This inventory is executed on behalf of the Dutch Horticultural Board to gather knowledge about the pathogenic bacterium *Agrobacterium rhizogenes*. Knowledge will be gathered out of scientific literature, experts and (research)institutes. This inventory must lead to opportunities to solve the problem of root mat in cucumber, tomato and egg plant.

Based on this inventory some research themes are formed about possible parameters that are influencing infection, growth, development of *Agrobacterium rhizogenes* under practical circumstances.

This has led to four themes for further research on the subject:

1. Susceptibility for *Agrobacterium rhizogenes* in an early stage of the cultivation
2. A 'defensive' substrate
3. Screening of techniques and treatments
4. Biological control of *A. rhizogenes*

© 2011 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

## Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk  
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk  
Tel. : 0317 – 48 56 06  
Fax : 010 – 522 52 93  
E-mail : [glastuinbouw@wur.nl](mailto:glastuinbouw@wur.nl)  
Internet : [www.glastuinbouw.wur.nl](http://www.glastuinbouw.wur.nl)

# Inhoudsopgave

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Samenvatting |   | 5  |
| 1            | Inleiding   | 7  |
|              | 1.1 Probleemstelling  | 7  |
|              | 1.2 Aanpak  | 8  |
| 2            | Bestaande kennis in literatuur over <i>Agrobacterium rhizogenes</i>                         | 9  |
|              | 2.1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>   | 9  |
|              | 2.2 Symptomen en schade   | 10 |
|              | 2.3 Biologie en epidemiologie   | 11 |
|              | 2.3.1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en de rol van het Ri-plasmide                         | 11 |
|              | 2.3.2 Incubatietijd en overleving van <i>Agrobacterium rhizogenes</i><br>en het Ri-plasmide | 12 |
|              | 2.3.3 Infectiebronnen   | 12 |
|              | 2.3.4 Het effect van rassen en onderstammen op overmatige wortelgroei                       | 13 |
| 3            | Resultaten  | 15 |
|              | 3.1 Inventarisatie van de internationale omvang van<br>"overmatige wortelgroei"             | 15 |
|              | 3.2 Verspreiding <i>Agrobacterium rhizogenes</i>  | 15 |
|              | 3.3 Respons op de inventarisatie  | 15 |
|              | 3.4 Onderzoek   | 17 |
|              | 3.5 Gaten in kennis, onderzoeksvragen en<br>oplossingsrichtingen                            | 17 |
| 4            | Geraadpleegde literatuur  | 19 |



# Samenvatting

Deze kennisoriëntatie is uitgevoerd in opdracht van het Productschap Tuinbouw om kennis uit wetenschappelijke literatuur en bij internationale instituten over *Agrobacterium rhizogenes* toegankelijk te maken en de hiaten in kennis aan te geven. Duidelijk moet worden waar mogelijke oplossingen liggen voor de almaar toenemende problematiek rond 'overmatige wortelgroei'. Deze ziekte wordt veroorzaakt door *Agrobacterium rhizogenes* en speelt vooral een rol bij de gewassen aubergine, komkommer en tomaat. De symptomen geven forse schade als gevolg van productieverlies en leiden in sommige gevallen tot uitval van het gewas. Overmatige wortelgroei wordt veroorzaakt doordat *Agrobacterium rhizogenes* een Ri-plasmide bij zich draagt. Een deel van dit extra stukje circulair DNA (het T-DNA) kan worden geïntroduceerd in het genoom van wortelcellen van het gewas. Het gevolg is dat door de plant zelf een enorme productie van wortels in gang wordt gezet.

De kennisinventarisatie moet aangeven wat de hiaten zijn en welke onderzoeksvragen er bestaan over de mogelijke factoren die van invloed zijn op de infectie, groei, ontwikkeling van *Agrobacterium rhizogenes* (of andere vectoren van het Ri-plasmide) onder praktijkomstandigheden.

De kennisoriëntatie heeft geleid tot de volgende 4 thema's. Deze onderwerpen vergen nader onderzoek:

1. **Vatbaarheid voor *Agrobacterium rhizogenes* vroeg in de teelt:** Mogelijk zijn de planten het meest vatbaar voor de bacterie en de introductie van het plasmide in een zeer jong stadium. Vindt de infectie al plaats in de eerste weken na zaaien? Is bij een vroege infectie de kans op 'excessieve groei' het grootst? Welke rol speelt het jong plantmateriaal bij de verspreiding van de ziekte. Vergroot het enten van plantmateriaal de kans op 'overmatige wortelgroei'?
2. **Weerbaar substraat:** Kan door het toevoegen van bijvoorbeeld plantenextracten (verwarring van het mechanisme), compostthee (toevoegen van antagonistische en concurrerende bacteriën en compost- en plantenextracten) of chitine (stimulering van bodembacteriën) het substraat weerbaar gemaakt worden tegen *Agrobacterium rhizogenes*?
3. **Screening van technieken en middelen tegen *A. rhizogenes*:** Welke middelen of technieken hebben een effect tegen *Agrobacterium rhizogenes* op labschaal? Snelle screening van middelen die voor en tijdens de teelt en bij teeltwisseling worden toegepast.
4. **Biologische bestrijding van *A. rhizogenes*:** Kunnen de symptomen worden beheerst met behulp van inoculatie van de jonge plant met voor *Agrobacterium (rhizogenes)* specifieke antagonisten?



# 1 Inleiding

Aan het einde van de het onderzoek 'Aanpak van overmatige wortelgroei in groentengewassen' vielen de resultaten van de behandelingen in de kasproeven tegen. In de experimenten met de gewassen komkommer en tomaat, is gewerkt met een hoge en lage dosering natriumhypochloriet, waterstofperoxide en een antagonistische *Pseudomonas* stam (Proradix). De oplossing voor het beheersen van de ziekte is met behulp van dit onderzoek niet gevonden. De getoetste middelen remmen de verspreiding niet beter dan de onbehandelde controle en in sommige gevallen treedt er zelfs fytotoxiciteit op van de toegepaste middelen. Daarnaast is de verspreiding van de ziekte en opbouw van de symptomen niet bevredigend geweest. Symptomen kwamen zeer laat op gang en hebben nooit de omvang van een praktijksituatie aangenomen. Ondanks tegenvallende resultaten van deze proef kan niet worden gezegd dat het toepassen van middelen tijdens de teelt, geen functie heeft. In de beschreven proef, waarin het drainwater niet is gecirculeerd, is geen direct effect op de verspreiding in de steenwolmat waargenomen. Echter drainwater is een grote bron van besmetting. Het is daarom van groot belang om in een kas (tussen de steenwolmatten) verspreiding te voorkomen door drainwater te ontsmetten alvorens het te recirculeren.

Om te komen tot oplossingen voor het probleem overmatige wortelgroei is het daarom van belang om te zoeken naar andere werkzame stoffen, methodes of een andere aanpak voor de behandeling van de bacteriën, om de groei en verspreiding voor en tijdens de teelt te kunnen beheersen.

Sinds in 2000 de eerste gevallen met overmatige wortelgroei in komkommer zich in Nederland hebben voorgedaan, is het probleem qua omvang alleen maar toegenomen. De uitbreiding van geïnfecteerde bedrijven heeft zich niet beperkt tot Steenbergen, het Westland, het Oostland (De Kring), maar heeft ook geïsoleerde glastuinbouwgebieden in Noord-Holland en Friesland bereikt. Dit in tegenstelling tot de situatie in Groot Brittannië waar het aantal bedrijven met symptomen sinds een piek in 2000 zich lijkt te stabiliseren. Het probleem is in Engeland niet onder controle, maar van een 'outbreak' is geen sprake. Ook in Frankrijk zijn de symptomen al langer aan de orde. Vooral telers in Bretagne kampen met de symptomen van een *Agrobacterium rhizogenes* infectie. Ook in Bretagne is sprake van een serieuze situatie en hebben coöperaties, onderzoekstations en een laboratorium de handen ineen geslagen om de toename van het aantal geïnfecteerde bedrijven een halt toe te roepen.

In deze kennisorientatie zal een overzicht worden gegeven van de omvang van de internationale problematiek betreffende dit fenomeen, van het lopende onderzoek met overmatige wortelgroei als onderwerp en zal er op basis van een literatuurstudie geprobeerd worden om enkele onderzoeksthema's te formuleren die kunnen dienen als aanknopingspunten voor vervolgonderzoek, om te komen tot een oplossing van de problematiek in tomaat, komkommer en aubergine.

## 1.1 Probleemstelling

Wageningen UR Glastuinbouw is, op verzoek van het Productschap Tuinbouw, gevraagd een inventarisatie te doen bij internationale instituten om bestaande kennis bij deze instituten toegankelijk te maken en waar mogelijk te gebruiken om het alsmat toenemende probleem met "overmatige wortelgroei" op te lossen. De doelen bij deze inventarisatie zijn:

1. Internationaal informatie verzamelen en hiaten in de bestaande kennis over "overmatige wortelgroei" aan te geven.
2. Formuleren van onderzoeksthema's over de mogelijke factoren die van invloed zijn op de infectie, groei, ontwikkeling van *Agrobacterium rhizogenes* (of andere vectoren van het plasmide of het plasmide) onder praktijkomstandigheden.

## 1.2 Aanpak

Er is geïnventariseerd bij nationale en internationale instituten (met de nadruk op de ons omringende landen Frankrijk, Groot Brittannië, België en Duitsland) om ervaring en kennis over het fenomeen overmatige wortelgroei te verzamelen.

Daarbij is de volgende aanpak gevolgd:

1. De bestaande kennis in literatuur is geïnventariseerd en toegankelijk gemaakt
2. Nationale en internationale kenners (onderzoek, veredeling en advies) met kennis en ervaringen uit onderzoek en praktijk naar ervaringen, bestaande kennis en denkrichting naar de oplossing van het probleem.
3. Er is geïnventariseerd in welke landen symptomen van overmatige wortelgroei zijn waargenomen.
4. De verzamelde bestaande kennis uit literatuur, onderzoek, veredeling en praktijk heeft geleid tot nieuwe onderzoeksvragen, waaruit 4 onderzoeksthema's zijn gekristalliseerd. Deze thema's zijn aanknopingspunten voor vervolgonderzoek om de telers van aubergine, tomaat en komkommer dichterbij de oplossing voor "overmatige wortelgroei" te brengen.



## 2 Bestaande kennis in literatuur over *Agrobacterium rhizogenes*

### 2.1 *Agrobacterium rhizogenes*

Het verschijnsel van overmatige wortelgroei wordt in vrijwel alle gevallen veroorzaakt door een de bacterie *Agrobacterium rhizogenes*. De bacterie *Agrobacterium* is voor het eerst geïdentificeerd 1930 (Riker et al., 1930). Diverse soorten *Agrobacterium* komen allen in de grond voor en kunnen verschillende soorten tweezaadlobbigen planten aantasten. Het is een Gram-negatieve, staafvormige bacterie, 0,8 tot 1,5-3 µm in grootte (Conn, 1942).

*Agrobacterium rhizogenes* is nauw verwant aan de bekendere *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tumefaciens* veroorzaakt gezwellen van ongedifferentieerd weefsel, die zich voornamelijk bovengronds tonen. Vooral houtige Rosaceae worden door deze bacterie aangetast (Gelvin, 1990). Kenmerkend voor beide soorten is dat ze een plasmide dragen. Een plasmide is kleine stukje circulair DNA dat vrij in het cytoplasma van de bacterie aanwezig is. De bacteriën zijn in staat om dit extra stukje DNA zeer efficiënt te 'implanteren' in de erfelijke eigenschappen van de gastheerplant. De overdracht van DNA gebeurt bij beide *Agrobacterium* soorten op identieke wijze (Veena & Taylor, 2007). *Agrobacterium rhizogenes* wordt aangetrokken door beschadigde cellen als gevolg van fenolische stoffen die door de plantcel worden uitgescheiden. Vervolgens hechten de bacteriën zich op de wond, gevolgd door het inbrengen van het stukje genetisch materiaal in de gastheer cel. Als gevolg van deze introductie van DNA in de erfelijke eigenschappen van de plant gaat de plant snel grote hoeveelheden sterk vertakte wortels produceren. De deling van de getransformeerde cellen gaat snel, net zo snel als in ongedifferentieerd callus, echter mate van differentiatie is nog steeds hoog (geproduceerde cellen zijn functioneel; het zijn echte wortelcellen) (Tepfer, 1984, Veena & Taylor, 2007).

Van nature kan *A. rhizogenes* slechts enkele plantsoorten infecteren. Appel, komkommer, tomaat en meloen worden genoemd (Weller et al., 2000, 2004, 2006). Echter onder laboratoriumcondities kunnen meer dan 450 planten soorten waaronder dicotylen, monocotylen en naaktzadigen (Veena & Taylor, 2007). Daarbij is aangetoond dat praktisch alle plantorganen, zowel bovengronds als ondergronds, geïnfecteerd kunnen worden door *A. rhizogenes*, waarna vervolgens, nadat de organen genetisch te zijn getransformeerd, overmatige wortelgroei wordt waargenomen (Veena & Taylor, 2007).

De naamgeving van de bacteriën is mede gebaseerd op de groei op een specifiek groeimedium. De ziekteverwekkende soort van overmatige wortelgroei behoort tot het biotype of biovar 1 en bevat een Ri-plasmide ofwel pRi. Ri staat voor 'root inducing', wat staat voor 'wortelstimulerend' (Weller et al., 2000). Vanuit ziektekundig oogpunt is de classificering van minder belang omdat de bacterie slechts drager is van het symptoombepalende plasmide. Zonder het plasmide is de bacterie onschadelijk. Weller, Stead en Young (2005) toonden aan dat een bepaalde *Rhizobium* stam die een cucumopine Ri-plasmide bevat, ook overmatige wortelgroei kan veroorzaken.

## 2.2 Symptomen en schade



Figuur 1 en 2: Foto's van overmatige wortelgroei bij komkommer (M. Schenk, J. Janse).



Figuur 3 en 4: Foto's van overmatige wortelgroei bij tomaat (Foto's Blgg AgroXpertus).

De symptomen zijn inmiddels ook in de praktijk bekend. Veel telers hebben de symptomen vaak ongewild met eigen ogen mogen aanschouwen. Bij aubergine, komkommer en bij tomaat zijn op de pot vaak spinnenwebachtige formaties van fijne, witte wortels waarneembaar, die enkele centimeters boven de steenwolpot uit kunnen steken. De wortels kunnen druppelaars ingroeien, inkapselen en daarmee verstoppert. Bij het opensnijden van het plastic is het opmerkelijk dat wortels bovenop de steenwolmat worden aangetroffen. In een later stadium kunnen zich extreme symptomen voordoen waarbij enorme massa's aan wortelmateriaal worden gevormd. Er ontstaat een wirwar aan dunne, helder witte wortels aan één of meer zijden van het steenwolblok en aan de verschillende zijden van de steenwolmat. Deze symptomen kunnen uitmonden in volle, opgezwollen matten, die nog nauwelijks indringbaar is voor het benodigde water. Daarnaast is de waterhoudende capaciteit van het steenwol in dat stadium van de ziekte ook onvoldoende om verwelking en verdroging van het gewas te voorkomen. Ook zuurstof gebrek in de mat kan een rol gaan spelen. Geïnfecteerde wortels zijn lijken gevoelig te zijn voor *Pythium* spp. (Weller, 2007).

Over het algemeen gaat een plant niet dood als er een infectie met *Agrobacterium rhizogenes* heeft plaats gevonden en het plasmide is overgedragen aan de gastheer. Overmatige wortelgroei heeft als gevolg dat de plant extra cytokinine gaat produceren. Een vol en vegetatief gewas, extra scheut vorming en grote bladeren zijn daarvan het gevolg. Dit levert direct schade op als gevolg van productieverlies bij tomaat. Bij komkommer worden daarbij meer afwijkende kromme vruchten waargenomen (Weller, 2000).

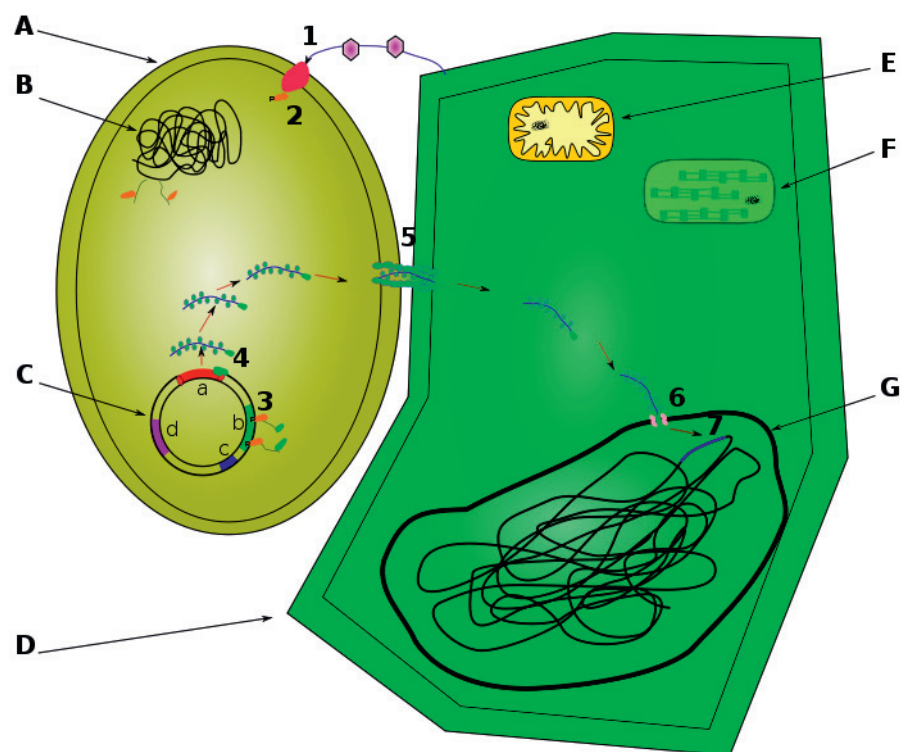
Engelse voorlichters schatten de opbrengstderiving bij komkommer als gevolg van overmatige wortelgroei op zo'n € 20.000 per ha. (Janse, 2008). Voor tomaat kan een infectie, waarbij 90% van de planten in meer of mindere mate is geïnfecteerd leiden tot een productie verlies van zo'n 3 kilogram per m<sup>2</sup>. Bij Aubergine kan een infectie van 40% van de planten leiden tot 1,5-2 kilogram per m<sup>2</sup> (Van Marwijk, 2010).

## 2.3 Biologie en epidemiologie

### 2.3.1 *Agrobacterium rhizogenes* en de rol van het Ri-plasmide

*Agrobacterium rhizogenes* treedt op als vector voor het Ri-plasmide. Om overmatige wortelgroei te kunnen veroorzaken moet de bacterie een Ri-plasmide bevatten (Weller et al., 2000). Zonder plasmide wordt de bacterie *A. radiobacter* genoemd.

De vorming van overmatige wortelgroei wordt uitsluitend bewerkstelligd door het Ri-plasmide. De bacterie wordt door de plantencel aangetrokken doordat de plantencel chemische stoffen uitscheidt. De bacterie kan met behulp van een flagel (zweepstaart) actief de beschadigde cel of cellen bereiken. Vervolgens zal een deel van het DNA van het plasmide worden overgebracht naar de plantencel onder invloed van virulentiegenen die ook op het plasmide aanwezig zijn. Het deel dat wordt overgebracht van het plasmide naar de erfelijke eigenschappen wordt T-DNA genoemd ('transferred' DNA). De eerder genoemde virulentiegenen spelen een rol in herkenning van wondexudaten, hechting van bacterie aan plantencel en de bescherming en geleiding van het T-DNA in de gastheercel en vervolgens in de celkern van de gastheercel. Vooral GALLS-genen blijken essentieel bij inductie van overmatige wortelgroei en zijn ook het grote verschil met Ti-plasmides, die verantwoordelijk zijn voor ongedifferentieerde knolvorming (Hodges et al., 2009; Veena & Taylor, 2007). GALLS genen zijn nodig voor de productie van 'trans-acting' eiwitten die belangrijk zijn voor de transformatie van de plantencel (Davioud et al., 1988; Zabel, 2005; Weller et al., 2006).



Figuur 5. Schematische weergave van de T-DNA overdracht: A *Agrobacterium rhizogenes*, B *Agrobacterium* genome, C Ri-plasmide (a T-DNA, b Vir genes, c replicatiestart, d opine afbraak), D Plantencel, E Mitochondrion, F Chloroplast, G Celkern (Bron: wikipedia).

Zodra het T-DNA in de erfelijke eigenschappen van de gastheercel is opgenomen, zetten genen op het geïntegreerde T-DNA (*rol*-genes (root oncogenic loci)) de wortelcellen aan tot een overproductie aan hormonen. De cellen gaan zich hierdoor abnormaal snel vermenigvuldigen. Door andere genen op het ingebouwde T-DNA worden in de getransformeerde cellen stofwisselingsproducten aangemaakt. Deze aminozuren worden opines genoemd en dienen ondermeer als voedsel voor de betreffende bacteriën. Het aminozuur dat gevormd wordt bij overmatige wortelgroei wordt 'cucumopine' genoemd (Davioud et al., 1988, Veena & Taylor, 2007, Gelvin, 2003).

Weller, Stead en Young (2005) vonden dat de verschijnselen van overmatige wortelgroei in komkommerplanten ook opgevoerd konden worden door een *Rhizobium* stam. Deze *Rhizobium*-stam bleek een even sterke veroorzaker van overmatige wortelgroei te zijn als de ziekteverwekkende *A. radiobacter* (biovar 1) stam met cucumopine pRi. Hoogstwaarschijnlijk kan de Ri-plasmide overgedragen worden van *A. radiobacter* bacteriën naar de *Rhizobium*-bacteriën en andersom. Op bedrijven met overmatige wortelgroei is de cucumopine Ri-plasmide ook gevonden in *Ochrobacterium* en *Sinorhizobium* bacteriën. Deze bacteriën konden de ziekte in planten echter niet opwekken.

Toch kunnen niet ziekteverwekkende bacteriestammen die een Ri-plasmide bevatten wel een belangrijke epidemiologische rol vervullen. Ze kunnen namelijk dienen als reservoir voor Ri-plasmides, die kunnen worden overgebracht naar bacteriën met genetische eigenschappen die geschikter zijn om de plant binnen te dringen (Weller, Stead en Young, 2005).

Hoewel *Agrobacterium radiobacter* biovar 1 isolaten zonder Ri-plasmide niet geacht worden ziekteverwekkend te zijn, kan hun overvloedige aanwezigheid in steenwolmatten wel gevaarlijk zijn, omdat ze Ri-plasmiden op kunnen nemen en zo de ziekte kunnen verspreiden (Weller et al., 2000).

Het soort Ri-plasmide kan van invloed zijn op de uiting van de symptomen. In 2000 vonden Weller, Stead & Young op een tomatenbedrijf met een milde uitbraak van overmatige wortelgroei, wortels met een plasmide die niet van het cucumopine type was. Op een bedrijf één kilometer verderop, met een ernstige vorm van overmatige wortelgroei, werden wel plasmides van het cucumopine type gevonden. Op deze bedrijven is er dus een verband tussen de ernst van de symptomen en het pRi-type.

### 2.3.2 Incubatietijd en overleving van *Agrobacterium rhizogenes* en het Ri-plasmide

De incubatietijd, dat is de periode tussen infectie van de plant en het zichtbaar worden van de eerste symptomen van overmatige wortelgroei, is 5 tot 8 weken of langer (Gaag en Janse, 2000). Weller et al. (2000) zagen 5 weken na kunstmatige besmetting de eerste komkommerplanten met symptomen van overmatige wortelgroei. Na 8 weken vertoonden 17 van de 18 geïnoculeerde planten symptomen. In de geïnfecteerde wortels toonde men ook veel *A. radiobacter* met Ri-plasmiden aan. In wortels van gezonde, niet opzettelijk besmette planten vond men zeer veel *A. radiobacter*, maar dan zonder Ri-plasmide.

De bacterie en het plasmide hebben een lange levensduur. In Engeland bleek de Ri-plasmide zo'n 15 jaar vitaal te blijven zonder symptomen te geven tussen twee uitbraken van overmatige wortelgroei in komkommer. Het ontbreken van de ziekteverschijnselen kan mogelijk te maken hebben met de opbouw van een onderdrukkende microflora in grond (Weller, Stead en Young, 2006). Ook uit ander onderzoek is bekend dat *Agrobacterium* stammen erg lang kunnen overleven zonder gastheer. In een veld met alleen symptoomloze onkruiden, kon 16 jaar na het verwijderen van zieke planten in de grond de bacteriestammen met een Ti-plasmide nog worden aangetoond (Krimi et al., 2002). De bacterie kan minstens 35 dagen overleven in een voedingsoplossing voor een substraatteelt (Anonymous, 2004).

### 2.3.3 Infectiebronnen

*Agrobacterium*-soorten, inclusief de ziekteverwekkende isolaten, komen algemeen voor in de grond. In een onderzoek op een tomatenbedrijf met overmatige wortelgroei, werd de ziekteverwekker (*A. radiobacter* en de Ri-plasmide) in grond in en buiten de kas én in verschillende onkruiden, zoals muur, kruiskruid en paardenbloem gevonden. Dit geeft aan dat zowel

grond, als onkruid een continue bron van infectie kan zijn. Bij de onkruiden is geen extreme wortelontwikkeling gevonden, maar de onkruiden kunnen dienen als reservoirs van de ziekmakende bacterie dienen. (Anonymous, 2004).

*Agrobacterium* biovar 1 isolaten werden door Weller et al. (2000) gevonden in grond, steenwolpotten en steenwolmatten, wortels, de onderste 5 cm van de stengel en in drainwater.

Groen Agro Control heeft in 2009 in een bronnenonderzoek de bacterie *Agrobacterium rhizogenes* kunnen detecteren in monsters van grond, wortels en drainwater uit geïnfecteerde kassen. De bacterie is destijds niet gedetecteerd in grond van buiten de kas, uitgangswater, stof op het kasdek of uit stengels van geïnfecteerde planten.

Overmatige wortelgroei komt zowel voor bij de teelt in grond als op diverse substraten. In een vergelijkend onderzoek met cherrytomaten op steenwol, kokos, kokosvezels met toevoeging van de antagonistische schimmel *Trichoderma* en op boomschors, toonden tomaten op alle substraten verschijnselen van overmatig wortelgroei. Vier weken nadat de eerste symptomen waren waargenomen, was de aantasting zelfs erger in de organische substraten dan in steenwol (Anonymous, 1994). Ook in onderzoek dat in Frankrijk is uitgevoerd, komt naar voren dat het gebruik van kokos gunstig is voor de ontwikkeling van overmatige groei (Craddock et al., 2011).

Er zijn verschillende aanwijzingen dat de infectie al zeer vroeg in de teelt plaats vindt, mogelijk zelfs al bij de planten-opkweekbedrijven. De symptomen worden ook ernstiger hoe eerder de infectie heeft plaats gevonden. (Weller 2011, personal communication). In Frankrijk zijn monsters genomen bij plantenkwekers, in deze monsters is *Agrobacterium rhizogenes* aangetoond. Deze resultaten versterken de hypothese dat een vroege infectie afkomstig kan zijn van plantenkwekers (Craddock et al., 2011). Teeltadviseur Derek Hargreaves stelt dat de infectie afkomstig kan zijn vanuit de draingoten in eb-vloedvloeren bij plantenkwekers (Hargreaves, 2010).

Infectie bij komkommer kan ondermeer plaatsvinden tijdens de opkweek of bij het uitplanten als gronddeeltjes die met de bacterie verontreinigd zijn op de wortels worden geblazen of gespetterd. Beschadiging van de wortelpunten stimuleert hoogstwaarschijnlijk de infectie. O'Neill en Yarham (1993) denken hierbij vooral aan mechanische beschadiging door bijvoorbeeld plantstokjes, stekers of vraat van insectenlarven. Mechanische wortelbeschadiging is echter niet altijd noodzakelijk om infectie door de bacterie te verkrijgen. Weller, Stead, en Young (2005) konden zonder de komkommerplanten te beschadigen toch symptomen van overmatig wortelgroei opwekken. Bij wortelknobbel in roos is bekend dat voor infectie wel altijd een beschadiging noodzakelijk is (Wubben, 1999).

Niet alle komkommerplanten die op zieke steenwolmatten worden geplant, blijken te worden aangetast. In een juni-planting traden na drie, vier, vijf en zeven weken na het planten respectievelijk bij 0, 0.5, 7 en 16% van de planten aantasting van overmatig wortelgroei op. Er was toen echter nog geen productieverlies zichtbaar (O'Neill, 1994).

De aanwezigheid in de steenwolmat van *A. radiobacter* met Ri-plasmide leidt dus niet altijd tot symptomen van overmatig wortelgroei. Mogelijk moet het aantal bacteriën een bepaalde drempelwaarde overschrijden voordat de plant overmatig wortelgroei gaat vertonen (Weller et al., 2000).

### 2.3.4 Het effect van rassen en onderstammen op overmatige wortelgroei

Het ras lijkt geen invloed te hebben op de mate van aantasting (Yarham en Perkins, 1978; O'Neill, 1994). Enten van komkommers op de onderstam *Cucurbita ficifolia* gaf minder overmatig wortelgroei bij een grondteelt, maar het enten zelf leidde tot een lagere productie (Yarham en Perkins, 1978). Onderzoek met onderstammen uitgevoerd door het CATE instituut (2009) liet een grotere gevoeligheid voor *Agrobacterium rhizogenes* zien van onderstammen met een energieke groei (Optifort, Emperador, Maxifort) dan de minder groeiachtige rassen (Beaufort, Unifort en Arnold). Het ras 'Efialto', dat qua groeiacht ligt tussen beide eerder genoemde groepen, was zeer gevoelig voor *A. rhizogenes*. Echter de beste productiviteit werd toch toegeschreven aan Beaufort en aan de drie gevoelige, maar groeiachtige onderstammen Optifort, Emperador, Maxifort. (Craddock, 2011)



## 3 Resultaten

### 3.1 Inventarisatie van de internationale omvang van “overmatige wortelgroei”

Gebruik makend van het persoonlijke netwerk is er in een aantal landen navraag gedaan naar het voorkomen van de problematiek. Per mail zijn in totaal 25 adviseurs, onderzoekers van kennisinstituten, medewerkers van laboratoria, medewerkers van toeleveranciers en medewerkers van overheden benaderd om te vragen naar het voorkomen van de symptomen in het desbetreffende land. Er is gevraagd of men bekend is met de symptomen, in welke teelten de symptomen zijn waargenomen, wat de betreffende bedrijven als remedie hebben gekozen, welke hypothese men had over de bron van de aantasting en of er in het betreffende land of bij het betreffende instituut onderzoek wordt uitgevoerd met *A. rhizogenes* als onderwerp. Per persoon en per instantie zijn de vragen toegespitst op de persoon en zijn of haar achtergrond.

### 3.2 Verspreiding *Agrobacterium rhizogenes*

De symptomen van *Agrobacterium rhizogenes* zijn Nederland waargenomen in:

- België
- Ierland
- Groot Brittannië
- Duitsland
- Canada
- USA (Arizona)
- Mexico
- Spanje
- Polen
- Frankrijk (Bretagne en rondom Metz)

Symptomen worden primair genoemd bij de teelt van komkommer en tomaat

### 3.3 Respons op de inventarisatie

Hieronder samenvattend de reacties van de bevroegde personen:

- Er wordt vooral nadruk gelegd op hygiëne tijdens de teeltwisseling, vaak zonder afdoende resultaat.
- Verder worden ontsmetting van recirculatiewater (UV, verhitting) en het doseringen van middelen aan druppel(voedings) water genoemd: ECA water, Natriumhypochloriet (5 ppm aan de druppelaar), Hyperclean, Chloor met doseerpompje, pH verlaging en zelfs het doseren van chloorbleekloog in de mestbak (A bak) zonder zuurtoevoeging is genoemd (er trad wel gasvorming op).
- De gevallen in Canada zijn opmerkelijk genoeg twee incidenten geweest in 2004 en 2008. In beide gevallen ging het om een tomatengewas. In deze gevallen is hygiëne tijdens de teeltwisseling afdoende geweest om symptomen niet terug te laten keren. Foto's van de symptomen tonen dat ze onmiskenbaar veroorzaakt zijn door *A. rhizogenes*.



Figuur 6. Aantasting van overmatige wortelgroei in Canada 2008 (foto: Gillian Ferguson)

- Ook wordt een aantal keren droger telen, minder frequent gieten genoemd, waardoor matten kunnen indrogen.
- Er wordt bij de geen van de benaderde personen gewerkt met compostthee, concurrerende bacteriepreparaten of andere biologische bestrijding (bijvoorbeeld *A. radiobacter* stam K84).
- In Groot Brittannië wordt het middel Glutaaraldehyde als ontsmettingsmiddel gebruikt tussen teelten. Het middel is in Nederland niet als gewasbeschermingsmiddel toegelaten. Tijdens de teelt verwacht men eerder een stimulans van de bacterie en de symptomen door het afdoden van antagonistische en concurrerende organismen. Het middel Glutaaraldehyde is een kleurloos sterk geurend ontsmettingsmiddel met biocide werking. Wordt veel gebruikt als desinfectie of sterilisatiemiddel. De stof is biologisch afbreekbaar en heeft een laag potentieel voor bio-accumulatie.
- Ook een teeltadviseur uit Groot Brittannië noemt het middel Glutaaraldehyde in combinatie met een quaternaire ammoniumverbinding in een presentatie als goed ontsmettingsmiddel tussen teelten.
- Verschillende mensen wijzen meer of minder uitgesproken in de richting van opkweek van plantmateriaal als bron van de besmetting. Er zijn teeltadviseurs die vastbesloten zijn over de rol van de plantenkwekers. Er zijn aanwijzingen dat gerichte bemonstering naar 'hot spots' en door op die plekken een actieve bestrijding toe te passen en een strikte hygiëne toe te passen, op plantenopkweekbedrijven heeft bijgedragen aan de vermindering van de problematiek. In Frankrijk wordt ook gekeken naar en onderzoek uitgevoerd bij plantenkwekers. Ook in Nederland wordt er gespeculeerd over de rol van plantenkwekers.
- Een onderzoeker in Groot Brittannië denkt dat een natuurlijke biologische controle heeft gezorgd voor de controle van de grote problemen in Groot Brittannië. Er wordt als voorbeeld een bedrijf genoemd waar de problemen zich in tijd van zelf oplossen doordat deze teler van gangbaar overschakelde op biologisch telen. De oplossing ligt niet in nog meer ontsmetten tijdens de teelt. Men ziet eerder kansen in het stimuleren van een brede antagonistische (bacterie) populatie. Dosereren van chloor heeft nauwelijks een effect tijdens de teelt.
- Verder wordt door diverse personen gemeld dat bij een infectie het praktisch ondoenbaar is om van de problemen af te komen. Een Nederlandse teeltadviseur meldde dat hij twee bedrijven kent die in 2009 tegelijkertijd met *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en overmatige wortelgroei kampten. *Clavibacter* is in 2010 verdwenen, maar overmatige wortelgroei niet.
- Ook wordt het ontbreken van de problemen bij paprika een aantal keren genoemd.
- Een onderzoeker in Groot Brittannië ziet men de oplossing in een geduldige aanpak, waarbij gemonitord wordt bij plantenkwekers en met natuurlijke middelen wordt getracht de bacterie te voorkomen of te beheersen.
- Vanuit Scandinavië zijn bij geraadpleegde personen geen gevallen bekend. Er zijn geen Noorse, Zweedse of Deense bedrijven die te maken hebben met overmatige wortelgroei of in het verleden met deze ziekte zijn geconfronteerd. Dit geeft in ieder geval aan dat het probleem niet bestaat of in ieder geval klein is ten opzichte van de problemen in Nederland.
- pH schokken (onder 6) bij komkommer en tomaat veroorzaken een kwetsbare wortel.
- Effect van doorgewortelde steenwolpotten wordt genoemd. Bij het plaatsen van de planten op de mat treedt er direct veel beschadiging op. Dit kunnen infectiepoorten zijn voor de bacterie.
- Ook worden enkele gevallen van een spontane verdwijning van de symptomen genoemd.
- Detectie technieken zijn niet optimaal, aldus FERA (UK). Ideaal zou zijn om het T-DNA in de getransformeerde cel te kunnen detecteren. In dat geval kan een infectie direct in het plantmateriaal worden vast gesteld en kwantitatief worden gemaakt. Op zich geen nieuw idee, maar door de recente ontwikkeling op het gebied van de genoombepaling biedt dit een nieuwe kans. ([www.agrobacterium.org](http://www.agrobacterium.org))



## 3.4 Onderzoek

Ondanks het feit dat aan dit organisme veel onderzoek is verricht op het gebied van de toepassing bij genetische modificatie, is er nog veel onbekend over de biologie van de bacterie tijdens teeltomstandigheden. Op dit moment wordt het genoom van *Agrobacterium rhizogenes* stam A4 'gesequenced' ([www.agrobacterium.org](http://www.agrobacterium.org)). In de ons omringende landen wordt geen onderzoek gedaan aan de teeltproblematiek. Bij de proefstations en universiteiten in België lopen geen projecten. Ook in de UK zijn geen lopende onderzoeken gemeld. In Canada ziet men de noodzaak voor onderzoek vanwege het beperkte aantal incidenten op dit moment niet. Over Duits onderzoek is niets gevonden. Wel wordt er in samenwerking met coöperaties (Saveol, Sica en UCPT), proefstations CATE en SECL en een laboratorium (Vegenov BBV) in Frankrijk (Bretagne) aan dit onderwerp gewerkt.

## 3.5 Gaten in kennis, onderzoeksvragen en oplossingsrichtingen

Na het lezen van de literatuur en contact te hebben gehad met diverse kenners in het veld zijn er nog veel vragen waar nog geen direct antwoord op is:

### Vatbaarheid

- Wanneer is het gewas het gevoeligst voor infectie met de bacterie (voor de overdracht van het T-DNA)? Kan worden bepaald wanneer het gewas het kwetsbaarst is en kan daar een mogelijke behandeling op worden afgestemd? In Engeland (Weller en McPherson) heeft men in een kleine proef aangetoond dat het gewas het kwetsbaarst is zo'n 4 weken na zaaien. De proef is niet herhaald en McPherson geeft aan dat er geen publicatie over bestaat. Het lijkt hem zinvol om dit gegeven te valideren.
- Ligt de bron voor de problemen bij de plantenkwekers?
- Wordt de infectie bespoedigd door enten? Is enten de oorzaak van de problemen? Kan *Agrobacterium rhizogenes* via enten verspreid worden?
- Is *Agrobacterium rhizogenes* zaad overdraagbaar?
- Waarom krijgt *Agrobacterium rhizogenes* op het moment zoveel kansen om te infecteren? Zijn er mogelijk andere (onbekende) bacteriën, aaltjes of andere beschadigers die wortels beschadigen voor de snelle verspreiding zorgen?
- Zijn plasmiden op dit moment virulenter? De aanwezigheid van Vir-genes en de gerelateerde introductie in de plant kan verschillend zijn.

### Weerbaar substraat, antagonisme en concurrentie

- Heeft ontsmetten tijdens de teelt wel zin? Ook de concurrentie van *A. rhizogenes* wordt daarmee weggenomen.
- Wat is het effect van een weerbaar substraat, antagonisme en concurrentie van andere bacteriën.
- Wat is het effect van weerbaarheidsverhogers (compostthee)? In Engeland zijn bedrijven over geschakeld een biologische teelt en de problemen met de overmatige wortelgroei namen af en verdwenen na ongeveer 3 jaar (Weller, personal communication)?
- Zijn er stoffen in het drainwater die stimulerend kunnen zijn voor de ontwikkeling van de bacterie? Is de biologische of chemische samenstelling van het recirculatie water stimulerend voor de ontwikkeling van de ziekte?

### Bestrijding van *Agrobacterium rhizogenes*

- Wat zijn de effecten van nieuwe waterbehandelingstechnieken zoals Aquanox, ECA water, chloordioxide en Aquahort? Ontsmetting gedurende de teelt (meedruppelen) en als ontsmetting van het recirculatiewater.
- Welke middelen hebben een direct effect op het pathogeen en kunnen worden gescreend in een labtest?
- Wat is het effect van vocht in en de structuur van de mat.
- Minder druppelbeurten, drogere mat, minder problemen?

### Biologische bestrijders

- Is inoculatie met een getransformeerde stam optioneel in Nederland? Denk aan Nogall, Galltrol. Een onderzoeker in Groot Brittannië heeft goede resultaten gezien met Galltrol (ongepubliceerd onderzoek). Een andere onderzoeker geeft aan alleen effect te zien tegen *A. tumefaciens*. Zijn er andere biologische bestrijders die direct effect hebben op *Agrobacterium rhizogenes*?

Uit deze lijst met vragen, die zeker niet volledig is, zijn 4 hoofdthema's te kristalliseren. Gezien de kennisoriëntatie van de literatuur, de inventarisatie bij onderzoek en advies en de mogelijkheden voqor een oplossing voor de problematiek van de Nederlandse glasgroenteteler zijn dit de hoofdthema's waaraan onderzoek aan zou kunnen worden gedaan:

1. **Vatbaarheid voor *Agrobacterium rhizogenes* vroeg in de teelt:** Mogelijk zijn de planten het meest vatbaar voor de bacterie en de introductie van het plasmide in een zeer jong stadium. Vindt de infectie al plaats in de eerste weken na zaaien? Is bij een vroege infectie de kans op 'excessieve groei' het grootst? Welke rol speelt het jong plantmateriaal bij de verspreiding van de ziekte. Vergroot het enten van plantmateriaal de kans op 'overmatige wortelgroei'?
2. **Weerbaar substraat:** Kan door het toevoegen van bijvoorbeeld plantenextracten (verwarring van het mechanisme), compostthee (toevoegen van antagonistische en concurrerende bacteriën en compost- en plantextracten) of chitine (stimulering van bodembacteriën) het substraat weerbaar gemaakt worden tegen *Agrobacterium rhizogenes*?
3. **Screening van technieken en middelen tegen *A. rhizogenes*:** Welke middelen of technieken hebben een effect tegen *Agrobacterium rhizogenes* op labschaal? Snelle screening van middelen die voor en tijdens de teelt en bij teeltwisseling worden toegepast.
4. **Biologische bestrijding van *A. rhizogenes*:** Kunnen de symptomen worden beheerst met behulp van inoculatie van de jonge plant met voor *Agrobacterium (rhizogenes)* specifieke antagonisten?

## 4 Geraadpleegde literatuur

- Agrobacterium.org, a public web resource for the Agrobacterium research community; www.agrobacterium.org  
Anonymous 1998.  
Root mat: tomatoes next? Grower, 20 augustus, p. 24.
- Anonymous 2000.  
Root mat. Problem disorder heads north and turns up in tomato crops. Grower, 17 Augustus, p. 6.
- Anonymous 2004.  
Improved control of novel *Agrobacterium* induced diseases in hydroponic through risk assessment and biological control. Final Project Report, Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), Central Science Laboratory, York, 23 p.
- Cleene, M. De & Ley, J. De, 1980)  
The Host Range of Infectious Hairy-Root. Botanical Review, Vol. 47, No. 2: 147-194.
- Craddock, C., Corre, D. Le & Hamon, C. 2011.  
The bacterial disease known as hairy root disease has been found in greenhouse crops in Brittany, prompting regional organisations to conduct test. Vertaald uit Réussir Fruits & Légumes : No. 302
- Davioud, E., A. Petit., M.E. Tate, M.H. Ryder en J. Pempe 1988.  
Cucumopine – a new T-DNA encoded opine in hairy root and crown gall. Phytochemistry 27: 2429-2433.
- Escobar, M.A. & Dandekar, A.M. 2003.  
*Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. TRENDS in Plant Science Vol.8 No.8: 380-386.
- Gaag, D.J. en J. Janse 2000.  
'Gekke wortels' geconstateerd in Nederland. Gewasnieuws komkommer, LTO- Groeiservice 3(4): 1.
- Gelvin, S.B. 1990.  
Crown Gall Disease and Hairy Root Disease. A sledgehammer and a tackhammer. Plant Physiology 92, 281-285.
- Gelvin, S.B. 2003.  
*Agrobacterium*-Mediated Plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 67, No. 1: 16-37.
- Haas, J.H., L.W. Moore, W. Ream en S. Manulis 1995.  
Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology, 61: 2879-2884.
- Hargreaves, D. 2010.  
Don't let Root Mat drive you crazy! Oral presentation, Grodan expert meeting in Amsterdam
- Hodges, L. D., Lee, L.-Y., McNett, H., Gelvin, S.B. & Ream, W. 2009.  
The *Agrobacterium rhizogenes* GALLS Gene Encodes Two Secreted Proteins Required for Genetic Transformation of Plants. Journal Of bacteriology Vol. 191, No.1: 355–364.
- Janse, J. 2008.  
Gekke wortels bij komkommers en andere vruchtgroenten. Een consultancy onderzoek. Wageningen UR Glastuinbouw, 170.
- Krimi, Z., A. Petit, C. Mougél, Y. Dessaux en X. Nesme 2002.  
Seasonal fluctuations and long-term persistence of *Agrobacterium* spp. in soils. Applied Environmental Microbiology, 68: 3358-3365.
- Marwijk, I. van 2010.  
Root mat disorder in tomato and cucumber from Dutch perspective. Oral presentation, Grodan expert meeting in Amsterdam
- O'Neill, T.M. 1993.  
The cucumber root mat mystery. Grower, 120: 8-9.
- O'Neill, T.M. 1994.  
Cucumber: Investigation of root mat disease – 1993. Final Report. ADAS Cambridge, 19 p.

- Petit, A., Davis, C.Dahl, G., Ellis, J. & Guyon, P. 1983.  
Further Extension of the opine Concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation.  
Mol Gen Genet 190: 204-214.
- Sagen, H. E., Riker, A. J., Baldwin, I.L., 1934.  
Studies on Certain Physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Bacillus radiobacter*: 571-595.
- Smith, I.M., Dunez, J., Lelliot, R.A. Philips, D.H. en Archer, S.A. 1988.  
European Handbook of Plant Diseases, Blackwell Scientific Publications, London p 176-179.
- Starr, M. P. 1946.  
The Nutrition of Phytopathogenic bacteria; II. The genus *Agrobacterium*. Vol. 52 187-194.
- Stijger, H. 2007.  
Mark Zwinkels: 'We hebben geen vervuilde druppelaars meer'. Hyperclean voor een schoon druppelsysteem. Onder Glas 4(8): 40-41.
- Tepfer, D., 1984.  
Transformation of Several Species of Higher Plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual Transmission of the Transformed Genotype and Phenotype. Cell, Vol. 37, 959-967.
- Veena, V. & Taylor, C.G. 2007.  
*Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications, In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant 43: 383-403
- Vermunt, A. 2009.  
Aanpak van overmatige wortelgroei in groentegewassen veroorzaakt door *Agrobacterium rhizogenes*. PT rapportage 13566.
- Visser, P. 1999.  
'Gekke wortels' verhinderen vruchtzetting in Engeland, Groenten en Fruit, 9(17): 6-7.
- Weller, S.A., D.E. Stead, T.O. O'Neill, D. Hargreaves en G. M. McPherson 2000.  
Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 and cucumber root mat in the UK. Plant Pathology 49: 43-20.
- Weller, S.A., D.E. Stead, T.O. O'Neill en P.S. Morley 2000.  
Root mat in tomato caused by rhizogenic strains of *Agrobacterium* biovar 1 in the UK. Plant Pathology 49: 799.
- Weller, S. A. en D. E. Stead 2002.  
Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. Journal of Applied Microbiology 92(1): 118-126.
- Weller, S. A., D. E. Stead en J.P.W. Young 2004.  
Acquisition of an *Agrobacterium* Ri-plasmid and pathogenicity by other *Proteobacteria* in cucumber and tomato crops affected by root mat. Applied and Environmental Microbiology, 70(5): 2779-2785.
- Weller, S.A. 2005.  
PhD-thesis. Improved control of novel *Agrobacterium* induced diseases in hydroponic crops through risk assessment and biological control. University of York, department of Biology.
- Weller, S. A., D. E. Stead en J.P.W. Young 2005.  
Induction of root-mat symptoms on cucumber plants by *Rhizobium*, but not by *Ochrobactrum* or *Sinorhizobium*, harbouring a cucumopine Ri-plasmid. Plant Pathology, 54(6): 799-805.
- Weller, S. A., D. E. Stead en J.P.W. Young 2006.  
Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various *Alphaproteobacteria*. FEMS Microbiology Letters 258(1): 136-143.
- Weller, S. A., Elphinstone, J.G. Parkinson, N. & Thwaites, R. 2006.  
Moleculair diagnosis of plant pathogenic bacteria. Arab J. Pl. Prot. 24:143-146
- White F. F. & Nester E. W. 1980.  
Hairy Root: Plasmid Encodes Virulence Traits in *Agrobacterium rhizogenes*. Journal Of Bacteriology Vol.141, No.3: 1134-1141.

Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Agrobacterium>

Wubben, J.P. 1999.

*Agrobacterium tumefaciens*: de veroorzaker van wortelknobbel bij roos. Een literatuurstudie. Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente, Aalsmeer, 17 p.

Yarham, D. J. en S. W. Perkins 1978.

Cucumber's mystery root mat disorder still spreading. *Grower* 90(1): 18, 20, 22.

Zabel, P. 2005.

Gene technology. Laboratory of Molecular Biology, Department of Plant Sciences, Wageningen University, p. 144.





