

Onderzoek naar een onbekende bladafwijking in gladiool

Voortgezet diagnostisch onderzoek uitgevoerd in juli en augustus 2006

Peter Vink, Trees Hollinger en Khanh Pham

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen
Maart 2007
PPO nr. 3234009700-3

© 2007 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: 12399

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Cluster Bollen, bomen en fruit

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen

: Postbus 16, 6700 AA Wageningen

Tel. : 0317 - 47 83 00

Fax : 0317 - 47 83 01

E-mail : info.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING	5
1 INLEIDING.....	7
2 EXPERIMENT IN DE KAS	9
3 RESULTATEN KASEXPERIMENT	11
4 <i>IN VITRO</i> EXPERIMENT	13
5 RESULTATEN <i>IN VITRO</i> EXPERIMENT.	15
6 KARAKTERISERING GEBRUIKTE ISOLATEN	17
7 DISCUSSIE.....	19
8 CONCLUSIE	21

Samenvatting

Al verschillende jaren kent men een ziekte bij gladiolen waarbij tijdens de bloemeteelt te velde het blad plotseling grijs verkleurt omdat het epidermis los komt te liggen op het onderliggende bladweefsel en waardoor het blad tevens gemakkelijk open scheurt. Tot nu toe was niet bekend welke organisme daarvoor verantwoordelijk is. Wel zijn regelmatig bacteriën in het afwijkende bladweefsel gevonden.

Met deze bacteriën is nu een infectieproef gedaan om na te gaan of deze ook werkelijk verantwoordelijk zijn voor de bladafwijkingen.

Het is gebleken dat de bacterie *Burkholderia gladioli*, die destijds ook uit de grijze bladvlekken is geïsoleerd, in staat is om onder vochtige en warme omstandigheden dezelfde symptomen bij gladiolen te veroorzaken. Daarmee is nu dus bekend geworden welk organisme werkelijk verantwoordelijk is voor de grijze bladvlekken en opengescheurde epidermis bij gladiolen.

Vervolgonderzoek zal duidelijk moeten maken hoe de bacteriën in een teelt terecht komen en hoe deze eventueel zijn te bestrijden.

1 Inleiding

In de afgelopen jaren zijn regelmatig monsters gladiolenplanten afkomstig uit de bloementeelt gebracht bij DiagnostiekService voor onderzoek naar de oorzaak van een onbekende bladafwijking. Daarbij was steeds sprake van zilvergrijs verkleurd blad als gevolg van het feit dat de epidermis los lag op het onderliggende bladweefsel. Het grijze bladweefsel was bij aanraking vaak gemakkelijk open te scheuren. Rond de voet van de planten was soms sprake van bruin verkleurd weefsel.

Uit het afwijkende bladweefsel zijn regelmatig isolaties gemaakt waarbij vooral bacteriën werden geïsoleerd die tot de Pseudomonas-groep konden worden gerekend. Tot nu toe is echter nooit in een infectieproef aangetoond of de geïsoleerde bacteriën ook werkelijk verantwoordelijk zijn voor de ziekteverschijnselen in gladiolen.

Daarom is binnen het voortgezet diagnostisch onderzoek in het teeltseizoen 2006 geprobeerd om middels een infectieproef na te gaan of en welke soort bacterie verantwoordelijk is voor de onbekende bladafwijking in gladiolen.

2 Experiment in de kas

Eind juni 2006 zijn gezonde gladiolenknollen van cultivar Frosty White, afkomstig uit de 5 graden bewaring, opgeplant op potten met een standaard potgrondmengsel en in een kas bij 18°C geplaatst. Vooraf aan de planting zijn de knollen ontsmet in 0.4% Sportak + 0.2% Sumisclex om een aantasting door schimmelziekten als o.a. Fusarium en droogrot te voorkomen. Per behandeling zijn vier potten beplant met 9 knollen.

Nadat het bovengrondse gewas een lengte had bereikt van ongeveer 30 cm zijn volgens het behandelingsschema in twee sessies bacteriën op het blad aangebracht. In de eerste sessie werd het blad licht bepoederd met carborundumpoeder om het binnendringen van de bacteriën te bevorderen. Na het aanbrengen van de bacteriën zijn de potten met gladiolen geplaatst in een plastic kooi op een vochtige mat om de luchtvochtigheid voldoende hoog te kunnen houden en de bacteriën de gelegenheid te geven om eventueel aan te kunnen tasten.

Na vier dagen zijn de bladeren opnieuw bespoten met de desbetreffende verse isolaten in tien maal hogere verdunningen. Dit is gedaan omdat de temperatuur onder de plastic kooien de eerste dagen overdag dermate hoog was opgelopen (ca. 40 graden) dat mogelijk de in de eerste sessie aangebrachte bacteriën waren afgestorven.

Zes dagen na de tweede inoculatie zijn alle gladiolenplanten visueel beoordeeld. Daarbij zijn alle planten geteld waarbij sprake was van grijze bladvlekken waarin het weefsel gemakkelijk openscheurde. Tevens is aangegeven in een index of sprake was van een lichte of zware aantasting. Bij de beoordeling bleek dat de voorbehandeling van de planten met carborundum geen directe schade had veroorzaakt.

De benodigde bacterie-isolaten zijn drie dagen gekweekt op standaard medium. Met behulp van een spectrofotometer zijn de optische dichtheden bepaald. Alle isolaten zijn zodanig verdund dat ongeveer eenzelfde aantal kolonies per millimeter (cfu/ml) werden gegenereerd. Ter controle zijn de verdunningen uitgeplaat op standaard medium om het werkelijke aantal kolonies per milliliter (cfu/ml) te bepalen.

Behandelingen:

- 1 = Controle niet behandeld (droog) en niet geplaatst onder een plastic kooi
- 2 = Controle behandeld met buffer+ water 1:1 en geplaatst onder een plastic kooi
- 3 = Isolaat PD 2012 en geplaatst onder een plastic kooi
- 4 = Isolaat 38844 en geplaatst onder een plastic kooi
- 5 = isolaat 39007 en geplaatst onder een plastic kooi

Bacterie isolaten:

Burkholderia gladioli (voorheen *Pseudomonas gladioli*) PD 2012

Burkholderia gladioli uit monster 38844 (2005)

Pseudomonas fluorescens uit monster 39007 (2005)

3 Resultaten kasexperiment

Tabel 1: Aantal planten per pot met grijze bladvlekken en gemiddelde aantastingsindex

Behandeling:	Gem. aantal planten met grijze bladvlekken:	Gem. aantastingsindex*:
1	0	0
2	0	0
3	4,8	1,8
4	8,5	4,1
5	5,5	2,4

*** Aantastingsindex:**

0 = gezond

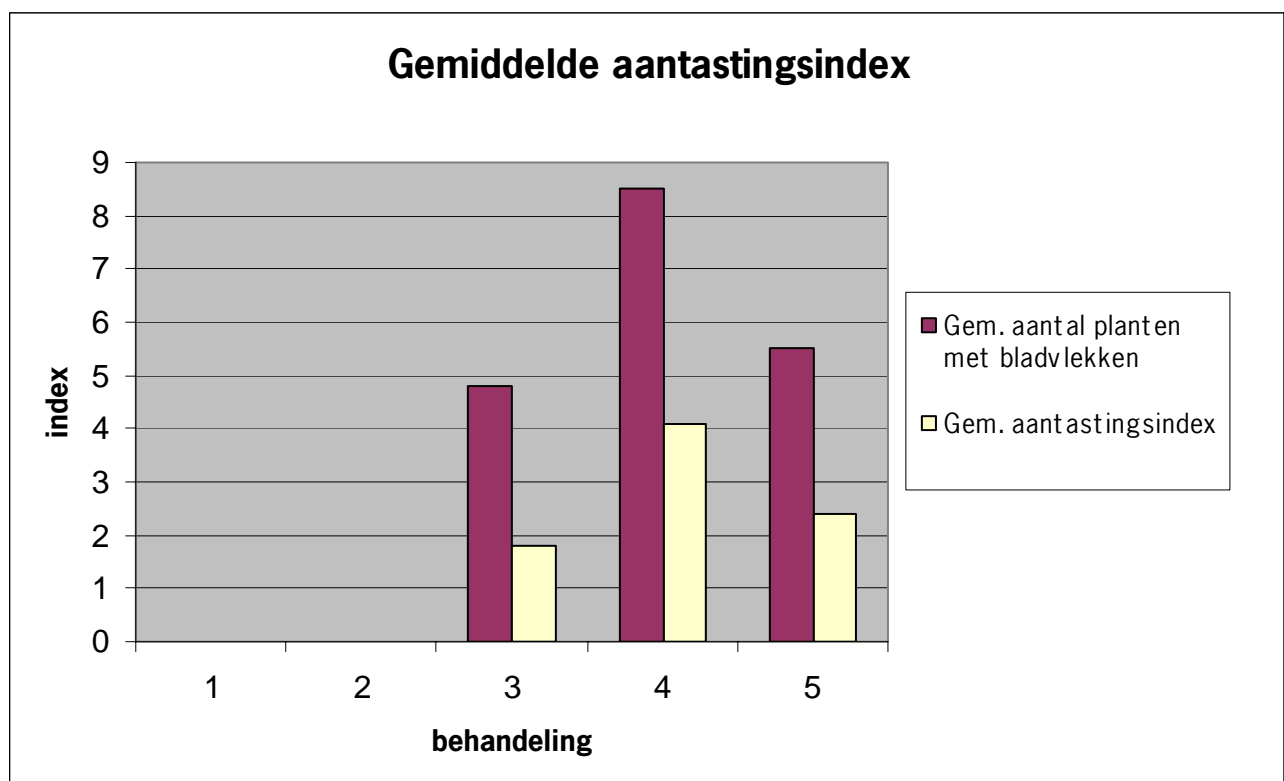
1 = zeer licht aangetast (enkele kleine grijze vlekjes)

2 = licht aangetast (enkele groepjes van grijze vlekjes)

3 = matig aangetast (verspreid groepjes grijze bladvlekken op de bladeren)

4 = zwaar aangetast (alle bladeren met grijze bladvlekken)

5 = zeer zwaar aangetast (alle bladeren met grijze bladvlekken en bruin afgestorven bladweefsel)



Figuur 1: Gemiddelde aantastingsindex van gladiolenblad

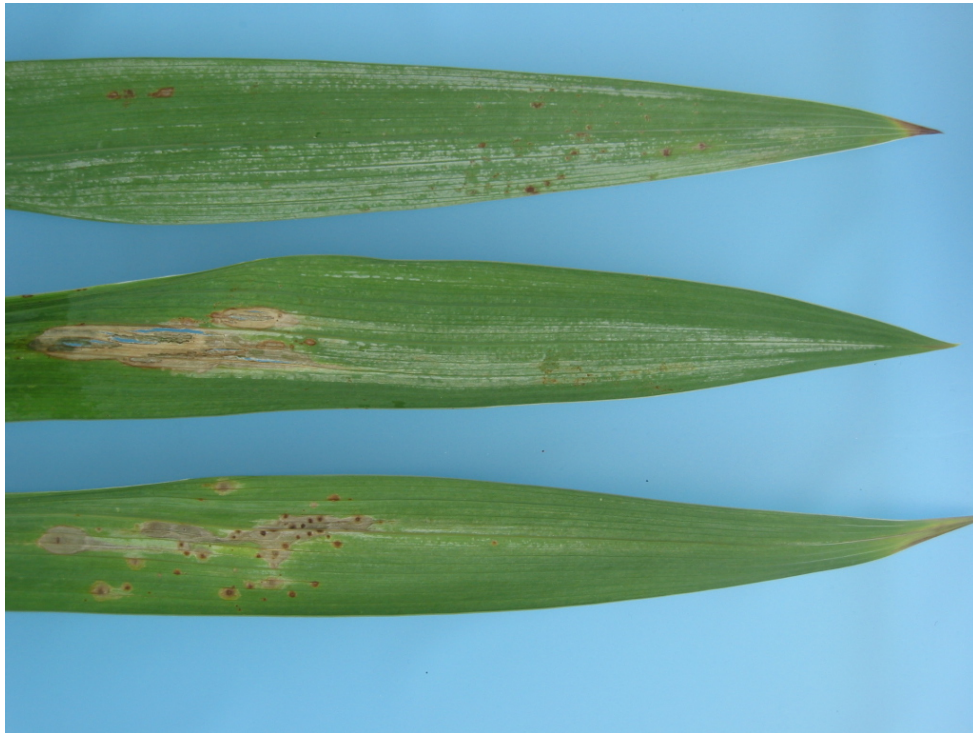


Foto 1: Gladiolenblad wat na infectie met *Burkholderia gladioli* grijs is geworden en gemakkelijk scheurt.



Foto 2: Detail van grijs- en gescheurd bladweefsel a.g.v. aantasting door *Burkholderia gladioli*.

4 *In vitro* experiment

In aansluiting op het kasexperiment zijn losse, gezonde gladiolenbladeren van cultivar Frosty White geïnoculeerd met dezelfde isolaten als in de *in vivo* proef. Daartoe is in kunststof dozen vochtig filtreerpapier gelegd. Hierop zijn per doos drie volkomen gezonde, afgesneden bladeren van 15 cm lengte gelegd en deze zijn op 3 plaatsen met een injectienaald aangeprikt. Hierop zijn druppels van 20 µl gepipetteerd met de volgende bacteriesuspensies:

- | | |
|-----------------------------|---------------------|
| 1. controle PBS+ water 1:1 | |
| 2. Isolaat PD 2012 | verdunning O.D. 1.0 |
| 3. Idem | verdunning O.D. 0.1 |
| 4. Isolaat monsternr. 38844 | verdunning O.D. 1.0 |
| 5. Idem | verdunning O.D. 0.1 |
| 6. Isolaat monsternr. 39007 | verdunning O.D. 1.0 |
| 7. Idem | verdunning O.D. 0.1 |

Per behandeling zijn twee dozen (= herhalingen) gebruikt.

Alle dozen zijn, nadat de gladiolenbladeren waren geïnoculeerd, afgesloten met een deksel en bij 27°C geplaatst.

Vier dagen na inoculatie zijn de afzonderlijke bladeren beoordeeld volgens onderstaande index:

- 0 = gezond
- 1 = zeer licht aangetast (minder dan 1 cm rond de aanprikplaats)
- 2 = licht aangetast (1- 2 cm rond de aanprikplaats)
- 3 = zwaar aangetast (grote plekken rond de aanprikplaats)

5 Resultaten *in vitro* experiment

Behandeling	Aantal bladeren met index:			
	0	1	2	3
1	6			
2		4	1	1
3		4	2	
4			4	2
5		4	1	1
6	6			
7	6			

Tabel 2: Aantal bladeren met aantasting volgens index 0 t/m 3



Foto 3: Grijs bladweefsel rond infectieplaatsen met *Burkholderia gladioli*.

6 Karakterisering van de gebruikte isolaten

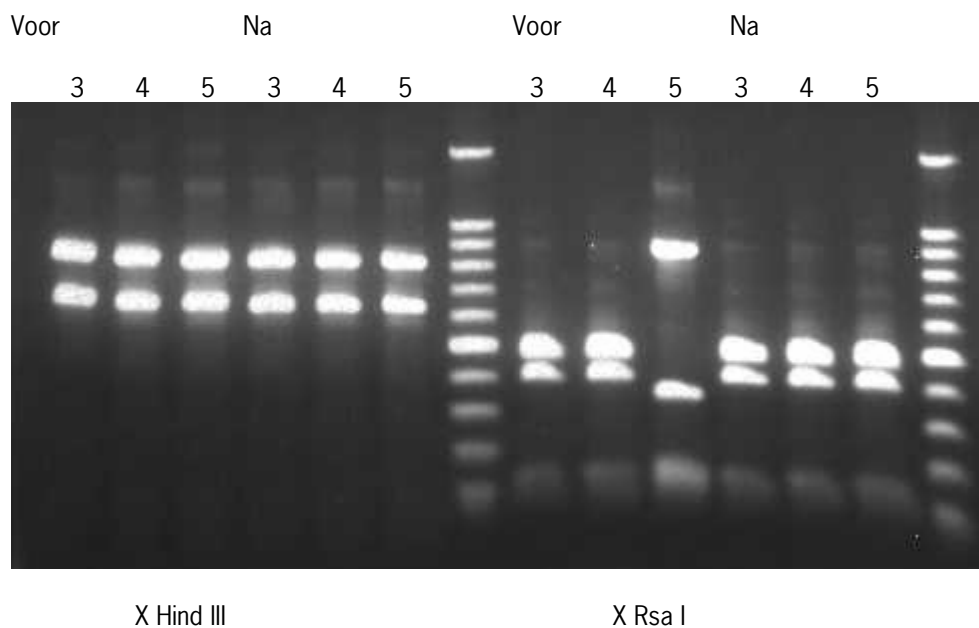
Aan het einde van de infectie-experimenten zijn per behandeling isolaties gemaakt uit de bladsymptomen en zijn de gevonden bacteriën gekarakteriseerd samen met de oorspronkelijke bacterie-isolaten.

Fragmenten van 16S gen werden geamplificeerd en geknipt met Hind III en Rsa I.

Uit de karakterisaties bleek dat isolaat PD2012 (behandeling 3) correspondeerde met *Burkholderia gladioli* evenals isolaat 38844 (behandeling 4).

Bij isolaat 39007 bleek de oorspronkelijke isolaat *Pseudomonas fluorescens* te zijn, maar de “terug gekweekte” isolaat een ander knippatroon te laten zien dat overeen kwam met die van *Burkholderia gladioli* (Figuur 2).

Het terug gekweekte bacterie-isolaat van 39007 was mogelijk geen reïncultuur of er is sprake geweest van contaminatie vanaf behandeling 3 en 4.

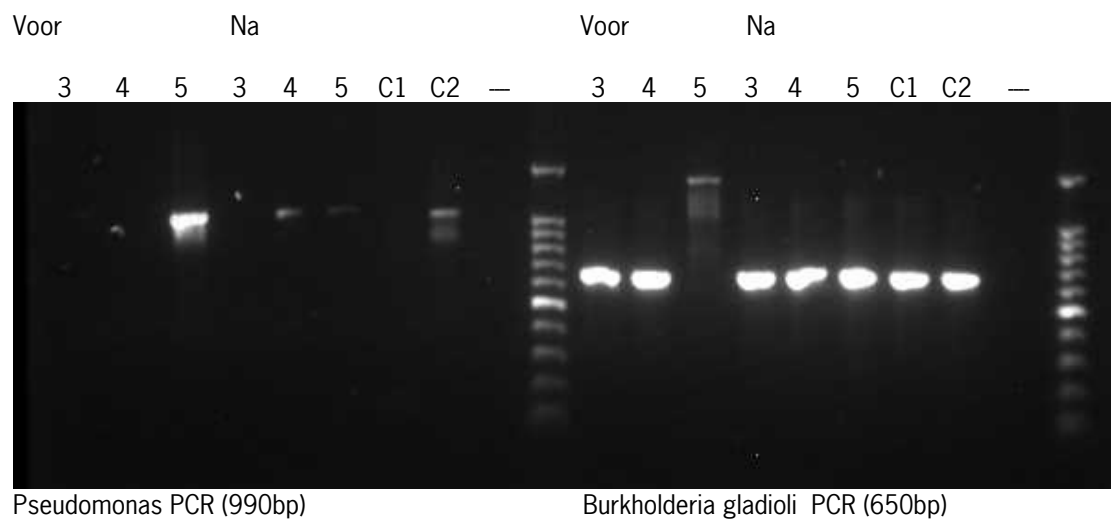


Figuur 2: Fragmenten van 16S gen geknipt met Hind III en Rsa I.

Met specifieke primers voor detectie van de genus *Pseudomonas* (sensu stricto) en *Burkholderia gladioli* zijn PCR 's uitgevoerd met de bacterie-isolaten van behandeling 3, 4 en 5 (voor en na inoculatie) naast de bacterie-isolaten PD2013 (C1) en 36759 (C2) als referentie-isolaten (Figuur 3).

De bacterie-isolaten van behandeling 3 (PD2012) en behandeling 4 (38844) evenals de referentie-isolaten PD2013 (C1) en 36759 (C2) bleken allen te reageren als *Burkholderia gladioli*.

Het bacterie-isolaat van behandeling 5 (voor inoculatie) was positief met primers voor *Pseudomonas*.



Figuur 3: Detectie van *Pseudomonas* (1) en *Burkholderia gladioli* (2), C1= PD2013, C2= 36759

7 Discussie

Uit de resultaten van de kasexperiment (tabel en figuur 1) blijkt dat de controle-behandelingen 1 en 2, die niet zijn besmet met bacteriën, volkomen gezond zijn gebleven zonder grijsverkleuringen en loslatende epidermis. Alle behandelingen waarbij bacteriën op het blad zijn aangebracht (behandeling 3,4 en 5) hebben onder de gekozen proefomstandigheden in meer of mindere mate geleid tot grijze bladvlekken waarvan het weefsel gemakkelijk scheurde. Ook werden in een later stadium bruine bladvlekken vastgesteld. Met name isolaat 38844, afkomstig van gladiolenplanten met destijds dezelfde bladsymptomen, heeft een zware aantasting gegeven. Een referentie-isolaat PD2012 afkomstig van de PD (*Burkholderia gladioli* volgens vetzuuranalyse bij PD) heeft duidelijk een minder zware aantasting veroorzaakt.

De bacterie-isolaat 39007 van behandeling 5 (*Pseudomonas fluorescens* volgens PCR-karakterisering) heeft echter ook een duidelijke aantasting in de kasexperiment gegeven. Na de proef zijn uit de bladeren met symptomen weer isolaties gemaakt en zijn de geïsoleerde bacteriën bij PPO gekarakteriseerd. Daarbij bleek dat in behandeling 5 geen *Pseudomonas fluorescens* werd vastgesteld maar dat duidelijk sprake was van dezelfde bandenpatroon als bij *Burkholderia gladioli* (figuur 2 en 3). Blijkbaar is in de kasexperiment de gebruikte bacteriesuspensie voor behandeling 5 niet 100% zuiver geweest en mogelijk gecontamineerd geweest met *Burkholderia*. Ook kan mogelijk sprake zijn geweest van verspreiding in de kas van *Burkholderia*-bacteriën vanaf de behandelingen 3 en 4 naar de gladiolenplanten van behandeling 5. In ieder geval is in het kasexperiment voldoende duidelijk geworden dat de bacterie *Burkholderia gladioli* verantwoordelijk is voor een ziekte in gladiolen waarbij het blad grijs wordt omdat de opperhuid loslaat van het onderliggende bladweefsel, en waardoor het blad gemakkelijk open scheurt. Deze symptomen komen precies overeen met dat wat bij DiagnostiekService in gladiolenmonsters is aangetroffen.

Uit de resultaten van de *in vitro*-experiment (tabel 2) blijkt dat alleen de bacterie *Burkholderia gladioli* (behandeling 2 t/m 5) in staat was om rond de plaats van inoculatie grijs bladweefsel te doen ontstaan. In de controle (behandeling 1) en inoculatie met *Pseudomonas fluorescens* (behandeling 6 en 7) bleek dat het bladweefsel rond de plaats van inoculatie niet grijs werd.

Ook daarmee is nog eens extra bewezen dat de bacterie *Burkholderia gladioli* in staat is om op het blad van gladiolen grijze bladvlekken te veroorzaken waarin het bladweefsel gemakkelijk openscheurt.

Nu bekend is dat de bacterie *Burkholderia gladioli* verantwoordelijk is voor een bladziekte bij gladiolen is het ook interessant om te weten of deze bacterie met het knolmateriaal kan meekomen en hoe een aantasting van het bovengrondse gewas is te voorkomen danwel te bestrijden.

8 Conclusie

In twee experimenten is aangetoond dat de bacterie *Burkholderia gladioli* in staat is om onder vochtige en warme groeiomstandigheden het blad van gladiolen aan te tasten waardoor grijze bladvlekken ontstaan a.g.v. losrakend epidermis en waardoor het blad gemakkelijk open scheurt.