

Beheersing van *Pseudomonas syringae* pathovar *porri*, de veroorzaker van bacterievlekkenziekte in prei, onder Nederlandse teeltomstandigheden

Leo van Overbeek, Johnny Visser, Els Nijhuis en Gijs van Kruistum

Dit onderzoek is tot stand gekomen door samenwerking tussen Plant Research International Wageningen, Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Lelystad, LTO Groeiservice en preitellers, NAK tuinbouw, Plantum, zaad veredelingsbedrijven, prei-adviseurs, gewasspecialisten en preitellers en leden van de stuurgroep (G. Govers, M. Hermans, C. den Braven, J. Baltussen, E. Blok, P. v.d. Haas, J. v. Hammont, H. Koenraad, A. v.d. Sijde, B. Silvertand, G. van Kruistum, J. Visser, E. Nijhuis en L. v. Overbeek).

© 2003 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, 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 Plant Research International B.V.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 60 41
Fax : 0317 - 42 31 10
E-mail : leo.vanoverbeek@wur.nl
Internet : <http://www.wur.nl>

Conclusies van het onderzoek.

Naar aanleiding van de geplande werkzaamheden in het oorspronkelijke onderzoeksvoorstel (cursief) worden de conclusies weergegeven.

1.1 *“Bedrijven met een in 2002 optredende aantasting van de bacterievlekkenziekte worden geregistreerd. Gegevens die mogelijk gerelateerd zijn aan de ziekte worden verzameld zoals teeltgegevens, gewasbehandelingen, grondsoort en herkomst en behandeling van zaad- en plantenmateriaal. Voor het signaleren van deze bedrijven wordt een beroep gedaan op kwekers, telers van prei en voorlichters en andere deskundigen op het gebied van preiteelt in Nederland.”*

- Uit meldingen van preiplantenkwekers en preitelers bleek dat bacterievlekkenziekte het meest voorkomt in het ras Flextan.
- Zowel in kas- en tunnelplanten als in zaaiprei werd bacterievlekkenziekte gemeld

1.2 *“De herkomst van gebruikte zaadpartijen zal worden achterhaald en geanalyseerd op aanwezigheid van het pathogeen m.b.v. plaattechnieken en moleculaire detectie technieken. De NAK tuinbouw toetst de voor het onderzoek te gebruiken (handels)zaadpartijen volgens 2 methoden.”*

- Het zaaizaad dat gebruikt is voor opkweek van prei op de proeflocatie te Neer was vrij van *P. syringae* pathovar *porri*, zoals aangetoond door een onafhankelijke keuringslaboratorium (NAK tuinbouw), met een standaardtoets (uitplaten op semiselectief medium en natoetsen met IF en *P. syringae* pathovar *porri*-specifieke PCR) en een geavanceerde, gevoelige toetsmethode (IFC methode).
- Planten van alle rassen vertoonden zichtbare symptomen van bacterievlekkenziekte tijdens opkweek en productie in Neer en sommige waren latent geïnfecteerd.
- Als de infectie niet vanuit het zaad komt, moet de bron van infectie vanuit de bodem zijn gekomen, maar mogelijk spelen secundaire factoren ook een rol zoals verspreiding van *P. syringae* pathovar *porri*, bijvoorbeeld via wind, vogels en regen.

1.3 *“Bestaande methoden binnen PRI, welke voorhanden zijn voor detectie van bacteriën in de bodem, plant en water, worden aangepast voor detectie van *P. syringae* pathovar *porri*, zoals semi-selectieve media voor *P. syringae* pathovar *porri*-specifieke plaattelingen, immunofluorescence colony staining (IFC), immunofluorescentie (IF) celtellingen, genotypische kolonie karakterisering via REP, ERIC of BOX PCR en moleculaire detectie via Polymerase Chain Reaction (PCR) in total community (TC) DNA extracten uit bodem, plant en water, m.b.v. specifieke primers. Voor de aanpassing van deze technieken is ontwerp van *P. syringae* pathovar *porri*-specifieke primers en aanschaf van reeds bestaande antisera tegen *P. syringae* pathovar *porri* noodzakelijk. Detectie via een polyfasische aanpak, d.w.z. simultane toepassing van verschillende detectietechnieken, is noodzakelijk voor het vaststellen van het ecofysiologische gedrag van het pathogeen (van Overbeek et al., 2001).”*

- Voor routinematige karakterisatie van diverse isolaten uit bodem en prei is gekozen voor eerste selectie op basis van koloniemorfologie op MSPB1 gevolgd

door selectie m.b.v. BOX_PCR in combinatie met *P. syringae* pathovar *porri*-specifieke PCR

1.4 “Preivelden (gelegen op 2 kweekbedrijven en 2 teeltbedrijven) met recente uitbraken in 2001 worden onderzocht op mate en uniformiteit van besmettingen. Geselecteerde stukken van besmette velden met hoge incidentie van bacterievlekkenziekte worden uitgezet en bemonsterd in de tijd. De aanwezigheid en overleving van het pathogeen zal worden bepaald in aangetaste, alsmede gezonde planten (symtoomloze besmettingen), in bodem en rhizosfeer, en in irrigatie en drainage water. De frequentie van bemonsteren zal regelmatig plaatsvinden vanaf de eerste waarneming van bacterievlekkenziekte inclusief minimaal één winterperiode.”

- *P. syringae* pathovar *porri* is aangetroffen en geïsoleerd uit zieke preiplanten (tussen 10^4 tot 10^{10} kve/ g plant).
- *P. syringae* pathovar *porri* is in grond aangetroffen, maar aantallen zijn zeer laag (tussen 10^2 en 10^3 kve/ g droge grond).
- In preiplanten en grondmonsters zijn ook isolaten aangetroffen met sterke gelijkenis, maar geen overeenkomst met *P. syringae* pathovar *porri*. Hun betrokkenheid bij bacterievlekkenziekte is niet duidelijk, en zal onderzocht moeten worden.
- Latente infecties zijn waargenomen in preiplanten, waarbij zeer hoge aantallen voorkwamen. De rol van latente infecties in prei is verontrustend omdat hierdoor ongemerkt besmettingen in stand worden gehouden.
- Oppervlaktewater is niet onderzocht op aanwezigheid van *P. syringae* pathovar *porri*, maar zal in een later stadium onderzocht moeten worden, alsmede water gebruikt bij wassen van geschoonde prei.

1.5 “Isolaten van *P. syringae* pathovar *porri* worden geïsoleerd en bewaard in de collectie van PRI. De isolaten worden geïdentificeerd d.m.v. metabolische (API ne20 of BioLog) en moleculair-genetische (sequentie analyse 16S ribosomaal RNA) analyses. Daarnaast worden verkregen isolaten vergeleken met elkaar en met isolaten uit bestaande collecties teneinde zekerheid te verkrijgen over de identiteit van het pathogeen in de onderzochte locaties.”

- 16S rDNA gen van isolaat P55 (identiek aan *P. syringae* pathovar *porri* isolaten IPO 1672, Psp 22 en Psp 24) bleek *P. syringae* pathovar *atropurpureae* te zijn, een pathovar met zeer nauwe verwantschap (1 bp verschil) aan *porri*. Pathovar *porri* komt tot op heden niet voor in openbare databestanden.

1.6 “Kleinschalig onderzoek wordt verricht naar mogelijkheden tot ziekte onderdrukking m.b.v. bacteriewerende maatregelen. Dit onderzoek wordt verricht onder meer geconditioneerde omstandigheden in opkweekbakjes (100 planten/ bakje). Hierbij wordt de invloed van diverse factoren die relevant zijn voor de uitbraak onderzocht zoals vatbaarheid van cultivars, beschadiging van planten tijdens opwek en temperatuurfluctuaties. Maatregelen welke besmetting door het pathogeen en expressie van het ziektebeeld kunnen onderdrukken worden onderzocht zoals: composttoevoegingen, management van bodemnutriënten, en diverse

bacteriewerende maatregelen zoals waterstofperoxide, kalifosfiet en toepassing van GNO/plantversterkers. De overleving in bodem en preiplanten zal worden bepaald m.b.v. bovengenoemde detectietechnieken.”

- *P. syringae* pathovar *porri* overleeft 60 dagen in gewasresten van prei toegevoegd aan grond. Het pathogeen overleeft in prei-afval in het veld en vormt daardoor mogelijk een bron van infectie in het volgende seizoen.
- Uitplant van aangetaste planten voor productieteelt leidde tot verhoogde incidentie van bacterievlekkenziekte.
- Er is geen uitgesproken effect waargenomen van bewaring van planten in koelcellen, ‘behagelen’ van preiplanten en bemesting.
- Uit inoculatie-experimenten bleek dat het ras Flextan, naast de rassen Parker, NZ Q1 en Bluetan, het meest gevoelig waren voor *P. syringae* pathovar *porri*. In de praktijk lijkt Parker minder gevoelig te zijn voor het pathogeen dan Flextan, Bluetan en NZ Q1.
- Onder gecontroleerde omstandigheden bleek stikstofbemesting, ‘behageling’ en de opkweekomstandigheden (buiten opkweken met of zonder ‘nachtvorst’) een licht effect te hebben op incidentie van bacterievlekkenziekte.
- Middel X heeft een zwak onderdrukkende werking op bacterievlekkenziekte in prei. Verder onderzocht zou moeten worden of dit middel de kans op infectie vermindert.

2 Aanbevelingen voor de praktijk

- De grootste kans op bacterievlekkenziekte is waargenomen in het ras Flextan. Dit wil niet zeggen dat dit het enige gevoelige ras is. In alle geteste rassen in Neer is latente infectie aangetroffen en het is nog onbekend wanneer latente infectie overgaat tot expressie van symptomen. Een duidelijke aanbeveling voor het gebruik van bepaalde rassen is daarom nog niet mogelijk.
- Latente infectie van *P. syringae* pathovar *porri* is een groot risico. Verspreiding van het pathogeen vanuit gezond-ogende planten gaat onopgemerkt. Integrale screening van gewasmonsters van niet-aangetaste percelen op aanwezigheid van het pathogeen in het laboratorium is belangrijk om inzicht te krijgen van de omvang van infectie.
- Door de mogelijkheid van latente infectie zal terughoudendheid moeten worden betracht met het terugbrengen van preiafval en spoelwater afkomstig van geschoonde prei. Prei geoogst van percelen met symptomen van bacterievlekkenziekte moeten als potentieel besmet worden aangemerkt en afval van deze planten moeten zeker niet terug worden gebracht op het veld.
- Herhaalde toediening van besmet materiaal aan de bodem kan uiteindelijk ook tot wering leiden. Deze aanbeveling lijkt in tegenspraak tot de vorige bewering, maar de teler moet bij deze benadering rekening houden met oogstverliezen in de eerste jaren waarna opbouw van een werende (antagonistische) populatie van micro-organismen zal volgen. Het is nog niet duidelijk of wering in alle grondsoorten kan optreden.
- Vanwege potentiële besmetting van de bodem met prei-afval moeten bedrijfshygiënische maatregelen zoveel mogelijk in acht worden genomen.

Verwondingen aan planten door afsnijden en uitplanten vormen een verhoogd risico in besmette bodems. Desinfectie van materialen en werktuigen, maar ook beperking van overdracht via menselijk contact, zal versmering naar niet-geïnfecteerde prei kunnen voorkomen.

- Opkweek van prei in de kas leidt tot sterk gereduceerde incidentie van bacterievlekkenziekte terwijl opkweken onder niet-geconditioneerde omstandigheden, daarentegen, leidt tot verhoogde incidentie. De aanbevolen opkweek is onder geconditioneerde omstandigheden in de kas, maar deze aanbeveling zal voor de praktijk niet realistisch zijn vanwege de hoge kosten die gemoeid gaan met kasopkweek.
- Extra N gift leidt tot een lichte verhoging van aantasting door *P. syringae* pathovar *porri* en het advies is om niet meer N toe te dienen dan noodzakelijk. Echter, het effect van extra N gift op besmetting is nog onbekend en daarom kan er geen uitspraak worden gedaan of verminderde N gift zal leiden tot verminderde (latente) infectie.
- De zeer hoge dichtheden van *P. syringae* pathovar *porri* (oplopend tot 10^{10} kve/plant) in latent geïnfecteerde prei geeft aanleiding tot speculatie over endofytische kolonisatie van prei. Het feit dat oppervlakte-ontsmetting m.b.v. waterstofperoxide niet werkt wijst op endofytische kolonisatie van het pathogeen. Endofytische kolonisatie zal in een vervolgstudie moeten worden aangetoond. Indien endofytische kolonisatie optreedt door *P. syringae* pathovar *porri* in prei zou dat aanleiding kunnen geven tot herziening van zaadtoetsingsprotocollen vanwege mogelijke embryonale besmettingen.

3 Aanbevelingen voor verder onderzoek.

Vervolgonderzoek zal zich op de volgende punten moeten richten:

1. Fundamentele kennis over de overleving van *P. syringae* pathovar *porri*, met name overleving in bodem met preiafval, gedurende langere periode bij lage temperatuur. Hierbij zal uitsluitel moeten worden gegeven over jaar-rond overleving van het pathogeen in Nederlandse bodems. Mogelijk zullen nieuwe detectiemethodes en inzicht in niet-cultiveerbare vormen van *P. syringae* pathovar *porri* een belangrijke rol spelen.
2. Kennis over de mogelijkheid tot ziekte-onderdrukkende maatregelen in bodems. Inzicht zal moeten worden verkregen in welke mate organische verrijking kan leiden tot reductie van de pathogeenpopulatie in grond. Verder zal kennis nodig zijn over natuurlijke wering in bodems die gedurende lange tijd blootgesteld zijn geweest aan *P. syringae* pathovar *porri*. Inzicht in onderdrukkende populaties van micro-organismen en/ of middelen die *P. syringae* pathovar *porri* onderdrukken of de weerbaarheid van prei verhogen, zullen een belangrijke rol spelen in dit onderzoek. Deze kennis zal in nauwe samenwerking met de praktijk toepasbaar moeten worden gemaakt.
3. Latente infecties van *P. syringae* pathovar *porri* in prei. Inzicht in de populatieopbouw van het pathogeen in prei zal moeten leiden tot verbeterde beheersmaatregelen, bijvoorbeeld via screening van het pathogeen in productiegewassen. Een belangrijk aspect is mogelijke endofytische kolonisatie van *P. syringae* pathovar *porri* in prei en de consequentie daarvan op inwendige besmetting van het zaad. Dit onderzoek zal in een vervolgstudie moeten worden verricht

4. Een integrale screening naar latente infecties in niet-aangetaste percelen zal inzicht moeten geven over de mate van besmetting binnen het total preiteeltgebied van Nederland. Een kleine voorzet op dit onderzoek zal worden uitgevoerd in 2003, medio Augustus en September, wanneer de verwachte infectie door *P. syringae* pathovar *porri* in prei maximaal zal zijn.
5. Invalsroutes van het pathogeen in de plant. Dit onderzoek zal leiden tot inzicht in de meest waarschijnlijke route waarmee het pathogeen prei binnendringt. Deze informatie is belangrijk om hygiënische maatregelen te kunnen treffen. Uit voorlopig onderzoek in 2003 is gebleken dat besmetting van prei vanuit de bodem en besmet water in de schacht minder realistisch is dan via verwondingen. Opvallend was daarentegen dat binnendringing m.b.v. een surfactant zeer efficiënt verloopt. Voor telers is dit belangrijk om rekening mee te houden bij het gebruik van uitvloeiers of middelen die de waslaag aantasten.
6. Ontwikkeling van toetsmodellen om de gevoeligheid van verschillende preirassen voor *P. syringae* pathovar *porri* vast te kunnen stellen.