

Nieuwe inzichten in de biologie en bestrijding van *Ralstonia solanacearum*

Nevein Anwar

Op 4 december 2006 promoveerde Nevein Anwar Messiha aan Wageningen Universiteit op het proefschrift met de titel: 'Bacterial Wilt of Potato (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2): Disease Management, Pathogen Survival and Possible Eradication'. Promotor was prof. dr.ir. Ariena van Bruggen van de onderzoeksgroep Biologische Landbouwsystemen WU. Co-promotoren waren dr. Jaap Janse van de afdeling Bacteriologie van de Plantenziektenkundige Dienst (PD) en dr.ir. Aad Termorshuizen van de onderzoeksgroep Biologische Landbouwsystemen, WU. Het onderzoek werd gefinancierd door het EU project 'EU technical assistance to Egypt for the control of potato brown rot, Potato Brown Rot Project Phase II' (SEM 03/220/51A, EGY 1B/1999/0192)' over bruinrotbeheersing samen met de Egyptische overheid.

Inleiding

Aardappelen komen in de Europese Unie heel vroeg in het seizoen voor het merendeel uit Egypte en dan alleen maar uit woestijngebieden die berekend worden met water uit de ondergrond. Waarom komen ze uit de woestijngebieden en niet uit de Nijldelta, waar toch juist veel aardappelteelt plaats vindt? Een voor aardappelen gevaarlijke bacterieziekte ligt daaraan ten grondslag. De ziekte bruinrot van aardappel, veroorzaakt door de bacterie *Ralstonia solanacearum*, komt algemeen voor in de oude landbouwgronden langs de Nijl, maar nog niet in de woestijn. Het is een wijdverbreide ziekte in de tropen, die, als hij optreedt, grote economische gevolgen kan hebben. Voor de EU is het daarom een quarantaineziekte die bij een vondst onderhevig is aan wettelijke (bestrijdings) maatregelen. *R. solanacearum* kan geruime tijd

in grond en water overleven en ook in enkele onkruiden. In Nederland en verscheidene andere Europese landen wordt de ziekte een enkele maal nog aangetroffen, nadat in de jaren '90 een uitbarsting plaats vond waarvoor in Nederland de PD een intensief bestrijdingsprogramma heeft uitgevoerd. Wanneer de ziekte wordt ontdekt gaan de betreffende velden in quarantaine en worden de aangetaste aardappelen vernietigd. Er mag dan 4 tot 5 jaar geen aardappelteelt op deze velden plaatsvinden. Wanneer de bacterie in het oppervlaktewater voorkomt, kan deze via irrigatie een aardappelgewas besmetten. Daarom is in Nederland een irrigatieverbod ingesteld voor oppervlaktewater waarin de bacterie is aangetoond. Voor pootgoed geldt zelfs een landelijk irrigatieverbod. Om betere aanbevelingen te kunnen doen over de periode die nodig is om geïnfecteerde velden weer helemaal ziektevrij

te krijgen is in dit promotieonderzoek de overleving van *R. solanacearum* onderzocht in diverse Egyptische en Nederlandse grondsoorten. In een poging bestrijdingsmaatregelen te ontwikkelen voor die gebieden waar de ziekte voorkomt zijn verschillende strategieën onderzocht: gangbaar en biologisch beheer, gangbare en biologische bemesting, biologische bestrijding met goedaardige bacteriën en biologische grondontsmetting. Wortelziekten die door schimmels veroorzaakt worden zijn meestal minder ernstig in biologische beheerde grond in vergelijking met gangbare grond, maar het effect van bodembeheer op de bruinrotbacterie was nog nooit onderzocht. Het was al wel bekend dat mest of compost bruinrot kon onderdrukken. Ook waren er al allerlei antagonistische bacteriën getest op hun vermogen om aardappelbruinrot te onderdrukken, maar zonder veel succes. Tot slot was bekend dat biologische grondontsmetting (door ondergeploegd gras te bedekken met plastic) een nieuw en effectief middel is ter bestrijding van schimmelziekten en nematoden, maar deze methode was nog niet getest voor de bruinrotbacterie.

PROMOTIES

Overleving van *Ralstonia solanacearum* in gronden uit Egypte en Nederland

De overleving van *R. solanacearum* is vergeleken in gronden onder biologische en conventionele teelt, in zand- en kleigronden, en in gronden uit verschillende landen (Egypte en Nederland) en bij twee verschillende temperaturen (15°C en 28°C). In sommige gronden resulteerde biologisch beheer in een 50% kortere verdwijntijd. Voor andere gronden was er geen verschil. De bacteriële diversiteit in de grond, geschat op basis van denaturerende gradiënt gel electrophorese (DGGE) aan direct uit de grond geïsoleerd eubacterieel 16S rDNA, was hoger in biologische gronden dan in conventionele gronden in de meeste van de onderzochte grondsoorten. Over het algemeen waren er duidelijke verschillen tussen de bacteriële populaties in de biologische en conventionele gronden. In de Nederlandse gronden overleefde *R. solanacearum* beter bij 15°C (Figuur 1), terwijl in de Egyptische gronden de pathogeen net beter overleefde bij 28°C. In het algemeen overleefde de pathogeen beter in de Nederlandse gronden dan die uit Egypte en beter in klei- dan in zandgrond. De overleving was positief gecorreleerd met de hoeveelheid opgeloste organische koolstof (DOC) en negatief gecorreleerd met de totale hoeveelheid organisch materiaal (OM) in de grond.

Overleving van *Ralstonia solanacearum* onder conventioneel of biologisch management en het effect op bruinrotziekte

Het effect van bemesting met kunstmest (NPK) in conventi-

onele gronden en toevoeging van compost of koeienmest aan biologische gronden op de overleving van *R. solanacearum* is getest bij 15°C. Zowel het toevoegen van kunstmest als het toevoegen van koeienmest versnelde de afname van *R. solanacearum* in veel van de gronden. Gebruik van een compost met houtsnippers bleek echter ineffectief in het verminderen van de overleving van de pathogeen. Over het algemeen veroorzaakte het toevoegen van kunstmest geen veranderingen in de bacteriële populaties, behalve in de Nederlandse kleigrond. Het toevoegen van compost en vooral het toevoegen van koeienmest veroorzaakten echter wel een duidelijke verschuiving in de bacteriepopulatie. De overleving van de pathogeen werd vooral bepaald door grondsoort en herkomst van de grond en in mindere mate door management en toevoegingen.

Het voorkomen van de ziekte onder verschillend management en verschillende toevoegingen aan de bodem is onderzocht in dezelfde gronden als die gebruikt zijn voor de experimenten waarin overleving van de pathogeen werd onderzocht. De ziekte werd in lichte mate onderdrukt in de Egyptische biologische zandgrond in vergelijking met de soortgelijke conventionele grond. Aan de andere kant trad de ziekte sterker op in de Nederlandse biologische zand- en kleigronden dan in de vergelijkbare conventionele gronden. Dit hing samen met het hogere gehalte aan totaal oplosbaar organisch koolstof (TOC) in deze biologische gronden. De ziekte kwam het vaakst tot uiting in de Nederlandse zandgronden wat opnieuw bleek samen te hangen met de hoge TOC in deze gronden en aangeeft dat de mate

van ziekteontwikkeling positief gecorreleerd is met de beschikbaarheid van voedingsstoffen. In de Nederlandse kleigrond werd de ziekte juist onderdrukt en dat was gecorreleerd met de hoge gehalten aan calcium en kalium in deze gronden, die mogelijk werken door de weerstand van de plant te verhogen. Er was geen verband tussen de rhizosfeerbiodiversiteit en het voorkomen van ziekte of de mate waarin de ziekte optrad. De hoeveelheid aminozuren en ammonium in het xyleem en de apoplastische vloeistof geëxtraheerd van planten geteeld op gronden met verschillend management is ook onderzocht. De hoeveelheid aminozuren en ammonium was over het algemeen hoger in biologische dan in conventionele gronden, maar niet significant, terwijl de groeisnelheid van *R. solanacearum* in het xyleem en de apoplastische vloeistof van planten van biologische gronden wél significant hoger was dan onder conventionele omstandigheden. Bemesting met kunstmest onderdrukte de ziekte in Egyptische gronden, maar had geen effect op de ziekte in Nederlandse kleigrond. Koeienmest werkte bruinrotonderdrukkend in alle geteste gronden, behalve in de Nederlandse kleigrond. De bacteriële diversiteit liet een duidelijke verschuiving zien als koeienmest werd toegevoegd. Dit was het sterkst in de zand- en kleigronden.

Biologische bestrijding van *Ralstonia solanacearum* met behulp van *Stenotrophomonas maltophilia*

Een microorganisme met antagonistische activiteit tegen *R. solanacearum* werd geïsoleerd uit de rhizosfeer van auber-

PROMOTIES

gine in de Egyptische Nijldelta en geïdentificeerd als *Stenotrophomonas maltophilia*. De werking van deze antagonist bleek niet afhankelijk te zijn van de productie van siderophoren. In kasexperimenten werd de antagonist toegevoegd aan de bodem of door het inoculeren van aardappelogen. De antagonist bleek effectief in het bestrijden van de ziekte in Egyptische kleigrond, maar niet in Nederlandse kleigrond. De overleving van *S. maltophilia* is bestudeerd in biologische en conventionele kleigronden uit Egypte en Nederland alsmede het effect van de antagonist op de overleving van *R. solanacearum*. De antagonist overleefde significant minder lang in Nederlandse dan in Egyptische gronden. Het tegendeel gold voor de overleving van het pathogeen, wat in overeenstemming was met de kasexperimenten. Overleving van de antagonist bleek positief gecorreleerd met het OM gehalte. *S. maltophilia* overleefde langer en was effectiever in het reduceren van de *R. solanacearum* overleving in biologische dan in conventionele Egyptische gronden. Het OM gehalte was hoger in de biologische gronden waar de bacteriële diversiteit lager was dan in de conventionele gronden. Daarentegen overleefde *S. maltophilia* korter in de Nederlandse biologische gronden en stimuleerde daar zelfs de overleving van *R. solanacearum* in vergelijking met de conventionele gronden. De bacteriële biodiversiteit was hoger in de biologische dan in de conventionele Nederlandse grond. Al met al bevestigden de overlevingsexperimenten van *S. maltophilia* en *R. solanacearum* de resultaten uit de biocontrole-experimenten in de kas.

Bestrijding van *Ralstonia solanacearum* door middel van biologische grondontsmetting (BSD)

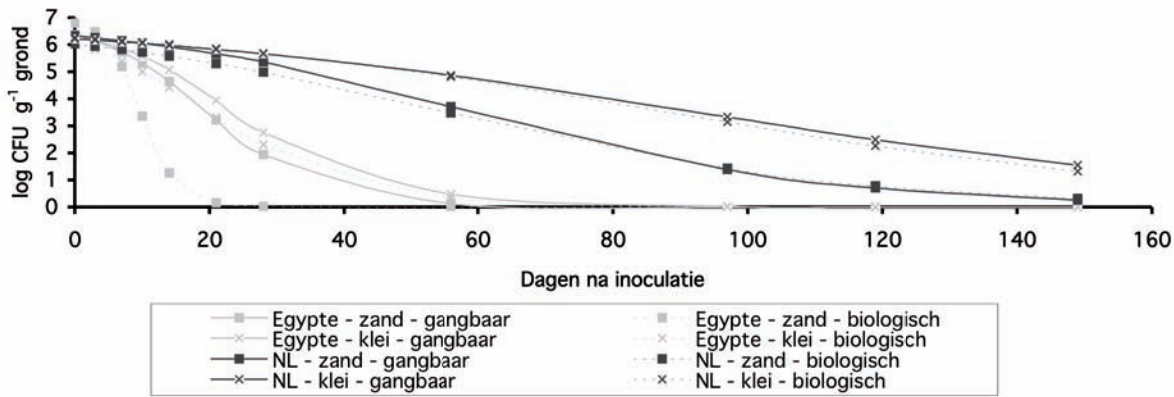
De overleving van *R. solanacearum* onder anaërobe omstandigheden is onderzocht door middel van biologische grondontsmetting (BSD). De anaërobe omstandigheden werden gestimuleerd door verhoging van de microbiële respiratie na incorporatie in de grond van vers organisch materiaal (Italiaans raaigras) en het verhinderen van zuurstoftoevoer aan de bodem door afdekken met luchtdicht plastic. De controlebehandelingen bestonden uit potten of veldjes met onbedekte grond zonder toevoeging van Italiaans raaigras, bedekte grond zonder toevoeging en onbedekte grond met toevoeging. Het effect van BSD op de overleving van *R. solanacearum* is bepaald op drie verschillende niveaus: in mesocosmos in een liter glazen potten in het laboratorium, in microplots met een diameter van 1.2 meter in een openlucht quarantaineveld en in een van nature besmet commercieel perceel. BSD was effectief in het significant verminderen van populaties *R. solanacearum* en zelfs in het bijna elimineren van de pathogeen in veel gevallen op alle drie de niveaus van het experiment (Figuur 2). BSD verminderde niet alleen in hoge mate het aantal kolonievormende eenheden (CFU; *colony forming units*) in de bodem maar ook in ondergrondse geïnfecteerde aardappelknollen in het veldexperiment. Er was geen effect op de overleving van de pathogeen als alleen gras werd geïncorporeerd of als de bodem alleen werd afgedekt. BSD had een duidelijke verschuiving in de bacteriële

bodemgemeenschap tot gevolg, die zelfs na drie weken zonder plastic afdekking van de bodem niet hersteld was.

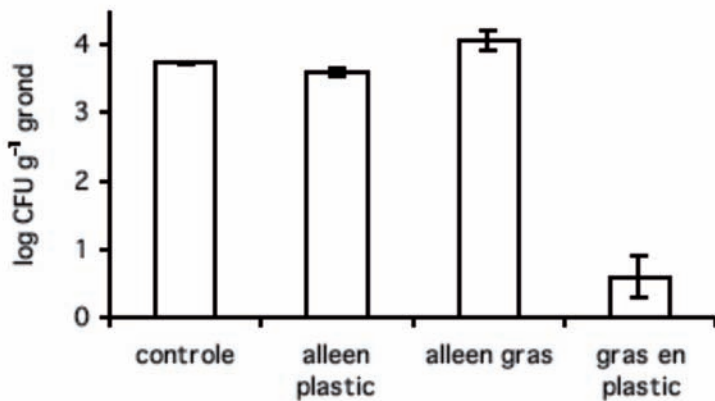
Conclusies en vooruitblik

De belangrijkste bijdragen van het onderzoek zijn dat (1) overleving van de bacterie maximaal 180 dagen is in zand- en kleigronden zonder planten; (2) overleving het kortst is in biologisch beheerde Egyptische zandgrond uit de woestijn, maar het langst in biologisch beheerde Nederlandse kleigrond; (3) de bacterie en de bruinrotziekte soms, maar niet altijd, meer onderdrukt worden in biologische dan in gangbare gronden, ondanks het feit dat de bacteriële diversiteit geschat met DNA analyses gewoonlijk hoger is in biologische gronden; (4) overleving van en aantasting door de bacterie positief gecorreleerd zijn met de concentratie opgeloste organische koolstof in de grond; (5) overleving van de bruinrotbacterie en de mate van aantasting verminderd worden door toevoeging van kunstmest en koemest (behalve in Nederlandse kleigrond), waarschijnlijk door het vrijkomen van ammoniak; en (6) in Nederlandse kleigrond de ziekte onderdrukt wordt door hoge gehalten aan calcium en kalium, mogelijk omdat de plant een verhoogde weerstand krijgt bij voldoende opname van deze mineralen.

Biologische grondontsmetting (inwerken van vers gras in combinatie met afdekken met plastic) is in staat de bruinrotbacterie uit te roeien, maar als het plastic beschadigd wordt, bv. door vogels, is de bestrijding een stuk minder. Deze methode vermindert ook drastisch de overleving van de bruinrotbacterie in geïnfecteerde aardap-



Figuur 1. Dichtheid van *Ralstonia solanacearum* (in log CFUs g⁻¹ droge grond) in verschillende bodemtypen (zand en klei) van verschillende herkomst (Egypte en Nederland (NL)) op bedrijven met twee managementstrategieën (gangbaar en biologisch), geïncubeerd bij 15°C.



Figuur 2. Effect van biologische grondontsmetting in het potexperiment.

pelknollen in de grond. Alleen gras of afdekking met plastic had geen effect op de overleving van de bruinrotbacterie.

Er werd een nieuwe antagonistische bacterie *Stenotrophomonas maltophilia* geïsoleerd uit de rhizosfeer van aubergine in de Egyptische Nijldelta. De antagonist is effectief in het bestrijden van de bruinrotziekte in Egyptische maar niet in Nederlandse kleigrond, waarschijnlijk doordat deze korter overleeft in de Nederlandse dan in de Egyptische gronden, terwijl het omgekeerde het geval is voor de bruinrotbacterie.

Zandgronden zijn niet in deze testen meegenomen.

Voor Europa, en dus ook Nederland, is het van belang dat *Ralstonia solanacearum* het best blijkt te overleven in gronden met veel beschikbare voedingsstoffen voor de bacterie en het slechtst in kleigronden rijk aan calcium en kalium. De quarantaine periode van vier of vijf jaar kan op basis van de in het onderzoek vastgestelde overlevingstijden waarschijnlijk met een jaar verminderd worden, zeker als biologische grondontsmetting wordt toegepast op onverhoopt besmette gronden.

Daarnaast moet besproeiing met oppervlaktewater vermeden worden. Voor Egypte en tropische landen waar de verbouw van o.a. groenten, tabak, pinda en aardappelen vaak beperkt wordt door de bruinrotbacterie, zijn er naast een lange vruchtwisseling en het gebruik van kippenmest nu ook mogelijkheden om biologische grondontsmetting en een antagonistische bacterie te gebruiken. Voor de productie van exportaardappelen zijn de geïrrigeerde woestijngebieden, zoals die van Egypte, uitermate geschikt, omdat de maagdelijke gronden daar vrij zijn van ziektekiemen en het (oppervlakte) water vrij is van de bacterie. Zelfs als *R. solanacearum* onverhoopt deze gebieden binnen zou komen, zou deze bacterie waarschijnlijk minder dan een jaar overleven in de woestijngrond.

PROMOTIES