

Pseudomonas syringae en vorst: een gevaarlijke combinatie / M. de Kam

R.B.L. „De Dorschkamp”, Wageningen

Inleiding

In de fytopathologische literatuur wordt vaak verband gelegd tussen het optreden van ziekten bij verschillende planten, veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* en vorstschade. Veelal werden konklusies getrokken op grond van veldwaarnemingen, waarbij werd vastgesteld dat de betreffende ziekte heviger optrad op plaatsen waar gewoonlijk meer nachtvorst voorkwam. Daarnaast werden doelgerichte proeven uitgevoerd om de relatie tussen *P. syringae* en vorst aan te tonen.

Ook bij populier is enkele malen verband gelegd tussen het optreden van de zogenaamde „Pseudomonas kanker” en vorst, maar de konklusies waren niet eensluidend. Zo suggereert Day (1948), dat vorstschade bij populier de inleiding vormt voor een aantasting door *P. syringae*. Sabet (1953) kwam na een aantal inokulatieproeven evenwel tot de konklusie dat de bacterie *P. syringae* éérst in de populier aanwezig moet zijn, waarna de aantasting wordt gestimuleerd door vorst. Ook sterk wisselende temperaturen blijken een gunstige invloed te hebben op de ontwikkeling van *P. syringae*, zoals onder andere door Klement (1974) en zijn medewerkers werd aangetoond bij het onderzoek naar de bacterieziekte van abrikoos.

Een belangrijke bijdrage aan het onderzoek naar de relatie tussen *P. syringae* en vorstschade werd geleverd door een groep onderzoekers aan de universiteit van Wisconsin. Tijdens hun onderzoek naar een bladvlekkenziekte van maïs, veroorzaakt door de schimmel *Helminthosporium turcicum*, werden zij geheel onverwachts met dit probleem geconfronteerd. Na een nachtvorst was een deel van hun proefplanten bevroren, waarbij duidelijk bleek dat de maïs die met genoemde schimmel was geïnokuleerd, veel meer vorstschade vertoonde dan de niet behandelde planten (Hoppe, Arny en Martens, 1964). Deze konklusie was wel wat voorbarig, gezien het feit dat de maïs niet met een reinkultuur van deze schimmel geïnokuleerd werd, maar bestoven met gedroogde, gemalen maïsbladeren die door de schimmel waren aangetast.

Uit hun verdere onderzoek bleek later dat het niet de schimmel *Helminthosporium* was die de planten gevoeliger had gemaakt voor vorst, maar de bacterie *Pseudomonas syringae*, die eveneens op dit fijngemalen blad aanwezig was.

Proeven in klimaatkamers toonden aan, dat maïsplanten die vooraf werden bespoten met een reinkultuur van *P. syringae*, bevroren bij een temperatuur van -4°C , terwijl de planten die geen *P. syringae* op hun bladeren hadden, pas bij -8°C bevroren. Hiermee was het bewijs geleverd dat de vorstgevoeligheid van maïs sterk wordt beïnvloed door de aanwezigheid van *Pseudomonas syringae* op het blad (Arny, Lindow en Upper, 1976).

Hoewel nog steeds niet is opgehelderd hoe dit merkwaardige mechanisme precies werkt, is intussen wel bekend geworden dat veel bacteriën van het geslacht *Pseudomonas* kernen produceren, waaromheen zich ijskristallen kunnen vormen (Maki en medewerkers, 1974). Gebleken is, dat het uitsluitend deze „ijskernvormers” zijn, die de vorstgevoeligheid van planteweefsels verhogen (Arny en anderen, 1976).

In hun studie naar de vorming van ijskernen door soorten van het geslacht *Pseudomonas* onderzochten Hirona en anderen (1978) ook een viertal *P. syringae* isolaten van populier, waarvan er drie in staat bleken ijskernen te vormen.

Vorstschade bij populieren is een veel voorkomend verschijnsel. Joachim (1957) heeft hierover uitvoerig bericht en noemt daarbij ook de rol van sterk wisselende temperaturen, evenals Van

Pseudomonas syringae and frost: a dangerous combination**Summary**

An optimal ELISA has been developed for use in the detection of soluble antigens of *Erwinia salicis* in leaves of *Salix alba*. Alkaline phosphatase-conjugate proved to be more suitable than horse radish peroxidase to detect *E. salicis* antigens. An aspecific reaction in the ELISA due to unknown substances in willow leaf extracts could be eliminated by adding 2.0 % polyvinyl pyrrolidone to the extraction buffer (cf. Clark and Adams, 1977).

The highest antigen concentrations were detected in the lower leaves of the shoots. Antigen transport through the xylem was obviously better in *S. alba* 'Liempde' than in *S. alba* 'Lichtenvoorde' and the antigen concentration in leaves fluctuated strongly during the growing season. Not only *E. salicis* suspensions, but also ultrafiltrates of these suspensions caused wilting of leaves, as was shown in experiments with excised willow twigs and with 3-year old trees in the field. The experiments suggest, that in case of Watermark disease the wilting symptoms are brought about by *E. salicis* bacteria which block the xylem vessels and by soluble antigens released from these bacteria, which disturb the water economy of the leaves in situ.

The described technique of detecting soluble antigens in leaves is abbreviated to "SAL-detection method".

der Meiden (1965), die de ernstige vorstschade aan populieren in 1962 vooral toeschrijft aan sterk fluktuerende temperaturen in de eerste vier maanden van dat jaar.

Uit al dit onderzoek is onweerlegbaar gebleken dat er een duidelijk verband bestaat tussen het optreden van vorstschade en het vóórkomen van *P. syringae*. Het onderzoek dat in dit artikel wordt beschreven had ten doel na te gaan, of ook bij populier dit verband kon worden aangetoond.

Eigen onderzoek**1 Ziektesymptomen**

In 1978 bleken een groot aantal 1 jaar oude *Populus trichocarpa* kruisingen in de kwekerij van het R.B.L. „De Dorschkamp” het volgende ziektebeeld te vertonen. In de bast van de stammetjes zaten kleine overlangse scheurtjes die tot ongeveer 30 cm hoogte aan de zuidkant van de planten voorkwamen. Uit deze scheurtjes droop sap langs de stam, dat later zwart werd. De bast naast de scheurtjes zag er bij aansnijden glazig uit en het cambium was lichtbruin verkleurd. De aangetaste bast stierf vervolgens af maar later in het jaar trad herstel op: er werd callus gevormd, dat de ontstane wonden weer gedeeltelijk overgroeide (figuur 1). De algemene opvatting is, dat de hier beschreven symptomen door vorst worden veroorzaakt.

2 De rol van *Pseudomonas syringae*

Isolaties toonden aan, dat in het glazige weefsel en het verkleurde cambium zeer veel bacteriën van de soort *Pseudomonas syringae* voorkwamen. In het najaar van 1978 werden met 2 isolaten, de nummers 111 en 112, acht 1-jarige *P. trichocarpa*'s geïnokuleerd, door 30 cm boven de grond een wondje in de bast te maken en daar wat bacteriesuspensie in te brengen. De inokulaties werden uitgevoerd aan de zuidzijde van de planten. Vier andere planten werden op dezelfde manier verwond, maar met water behandeld.

Het jaar daarop vertoonden alle geïnokuleerde planten dezelfde symptomen als hierboven werd beschreven, terwijl de wondjes waar geen bacteriën in waren gebracht, helemaal overgroeiden (figuur 2). Herisolaties uit de aangetaste weefsels leverden opnieuw *P. syringae* op.

Hiermee was aangetoond, dat *P. syringae* de oorzaak was van de beschreven symptomen. Waarom de bacterie echter de planten steeds aan de zuidzijde aantast was nog niet bewezen, al gaven de literatuurgegevens (zie inleiding) duidelijke aanwijzingen dat het antwoord moest worden gezocht in de richting van vorst of fluktuerende temperaturen.

3 Toename van de vorstgevoeligheid veroorzaakt door *P. syringae*

In 1980 werden 46 drie maanden oude *P. trichocarpa* zaailingen, die in een kas waren gekweekt, onderzocht op aanwezigheid van *P. syringae* bacteriën op het blad. Nadat was vastgesteld dat deze bacterie niet in aantoonbare hoeveelheden voorkwam, werden 23 planten bespoten met een suspensie van *P. syringae* stam 112, terwijl de andere 23 met water werden bespoten.

Vervolgens werden van beide behandelingen 18 planten 1 of 2 uur blootgesteld aan een temperatuur van -3 tot -4 °C. De andere planten bleven in de kas bij $+20$ °C.

Zodra ze uit de koelcel gehaald werden bleek, dat de met *P. syringae* bespoten planten totaal bevroren waren, waarbij het geen verschil maakte of ze 1 of 2 uur koud hadden gestaan. De met water bespoten planten vertoonden nauwelijks enige vorstschade (figuur 3). Een soortgelijke proef met *Populus nigra* zaailingen leverde dezelfde resultaten op.

Fig. 1 *Pseudomonas syringae* of vorst? Natuurlijke aantasting van 2▷ jaar oude *Populus trichocarpa*, Wageningen.

Fig. 1 *Pseudomonas syringae* or frost? Natural attack of 2-year-old *Populus trichocarpa*, Wageningen.



▽ Fig. 2 Twee jaar oude *P. trichocarpa*, 1 jaar na kunstmatige inokulatie. Links: kontrôleplanten; midden en rechts: geïnokuleerd met *P. syringae*.
Fig. 2 Two-year-old *Populus trichocarpa*, one year after artificial inoculation. Left: control; middle and right: inoculated with *P. syringae*.





Fig. 3 *P. nigra* zaailingen na 2 uur vorst (-3 tot -4 °C). Links onbehandeld, rechts voorafgaande aan de koudebehandeling bespoten met *P. syringae*.

Fig. 3 *P. nigra* seedlings exposed to frost for 2 hours (-3 to -4 °C). Left untreated, right sprayed with *P. syringae* prior to the frost-treatment.

Fig. 4 Bastnecrose bij *P. trichocarpa*, 3 weken na inokulatie met *P. syringae*; de invloed van wisselende temperaturen.

Fig. 4 Bark necroses in *Populus trichocarpa*, 3 weeks after inoculation with *P. syringae*; influence of fluctuating temperatures.

	temperatuurbehandeling/ temperature treatment		aantasting/attack		
	inoculatie/inoculation		planten behandeld plants treated	planten aangetast plants attacked	lengte necrose*) length of necrosis*)
groep I group I	+ 15	—	15	1	10 mm
groep II group II	+ 15	+ 2	15	3	14 mm
groep III group III	+ 15	+ 2	15	0	—
groep IV group IV	+ 15	- 2	15	3	28 mm
groep V group V	+ 15	- 2	15	7	49 mm

*) gemiddelde van de positief reagerende planten
mean of the positively reacting plants

4 Toename van de activiteit van *P. syringae*, veroorzaakt door sterke wisseling van de temperatuur

In november 1980 na de bladval werden 100 *P. trichocarpa* zaailingen, die buiten waren opgekweekt en ongeveer 30 cm hoog waren, in de kas gezet. Vijfzeventig planten werden daarna met een injectienaald halverwege het stammetje geïnokuleerd met *P. syringae* stam 112, terwijl de overige 25 op dezelfde manier werden behandeld met water. Vervolgens werden de planten in 5 groepen verdeeld, waarbij elke groep bestond uit 15 geïnokuleerde en 5 met water behandelde planten. Elke groep kreeg een andere temperatuurbehandeling, te weten:

groep I:
21 dagen $+15$ °C.

groep II:
7 dagen $+15$, daarna 5 dagen $+2$, daarna 9 dagen $+15$ °C.

groep III:
7 dagen $+15$, daarna wisselde de temperatuur 5 dagen lang elke dag van $+17$ naar $+2$, daarna 9 dagen $+15$ °C.

groep IV:
7 dagen $+15$, daarna 5 dagen -2 , daarna 9 dagen $+15$ °C.

groep V:
7 dagen $+15$, daarna wisselde de temperatuur 5 dagen lang elke dag van $+17$ naar -2 , daarna 9 dagen $+15$ °C (zie figuur 4).

De eerste week na de inokulatie, toen de planten bij $+15$ °C stonden, was er nog geen reactie te zien, maar zodra de planten werden blootgesteld aan temperatuurschommelingen, begon een aantal ervan zwarte plekken op de bast te vertonen, die zich vanaf de inokulatieplaats uitbreidden. Deze zwarte plekken zijn typisch voor een aantasting door *P. syringae*. De met water behandelde planten reageerden niet.

Figuur 4 laat zien hoe de geïnokuleerde planten reageerden op de temperatuurbehandeling. Het minst aangetast werden de groepen I en III. Iets meer planten werden aangetast in de groepen II en IV, waarbij de zwarte plekken in groep IV gemiddeld twee keer zo groot waren als in groep II. De meeste planten werden ziek in groep V en daar waren de zwarte plekken ook het grootst. Opmerkelijk was het verschil tussen groep III en V: in groep III (geen aantasting) had de temperatuur sterk gefluktueerd, maar was niet onder nul geweest, terwijl bij groep V (sterkste aantasting) bij eenzelfde fluktuatie-frequentie de temperatuur wél voorbij het vriespunt was geweest.

Hieruit blijkt, dat fluktuatie van de temperatuur de ontwikkeling van *P. syringae* bevordert, maar vooral dan, als het vriespunt binnen de fluktuatie ligt.

Konklusies

Uit het bovenstaande blijkt, dat bij populieren minstens twee factoren een rol spelen bij het ontstaan van vortschade en aantasting door *P. syringae*.

1 De vorstgevoeligheid van de populier neemt toe bij aanwezigheid van *P. syringae*.

2 Een aantasting door *P. syringae* wordt gestimuleerd door sterke temperatuurwisselingen, vooral als het vriespunt binnen de fluktuatie valt.

Hieruit blijkt, dat *P. syringae* en vorst een gevaarlijk duo vormen: de bacterie verhoogt de vorstgevoeligheid van de plant, terwijl vorst het risico van een aantasting door *P. syringae* doet toenemen. Het is nu ook duidelijk, waarom de „vorstschade” aan de zuidkant van de planten vlak boven de grond het hevigst is. In het vroege voorjaar, als de plant uit zijn winterrust komt maar nog geen bladeren heeft, kan de zon direct op de bast schijnen. Hierdoor loopt de temperatuur bij helder weer overdag sterk op, terwijl juist bij dit weertype 's nachts sterke uitstraling plaatsvindt. Daardoor kan de temperatuur met name vlak boven de grond tot onder het vriespunt dalen. Dat zijn precies de omstandigheden waaronder *P. syringae* zich optimaal kan ontwikkelen en waarbij bovendien de vorstgevoeligheid van de weefsels toeneemt, zodat bij voldoende lage temperatuur er eerder vorstschade optreedt. Op deze wijze ontstaat een ziektebeeld dat door *P. syringae* en vorst samen wordt veroorzaakt.

Literatuur

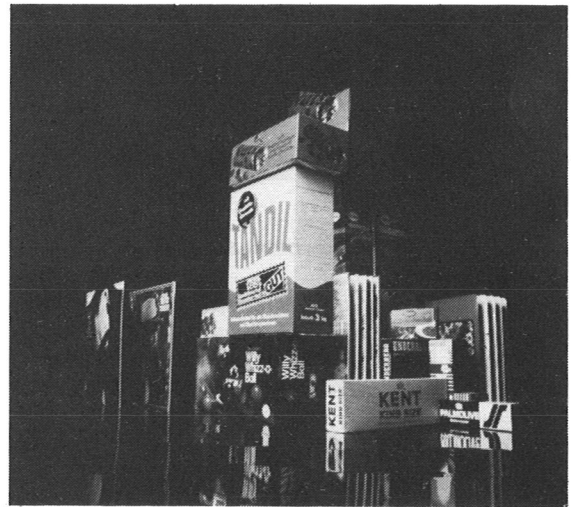
- Arny, D. C., S. E. Lindow & C. D. Upper. 1976. Frost sensitivity of Zea mays increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature* 262: 282-284.
- Day, W. R. 1948. A note on canker development in poplars and willows. *Ned. Bosb. Tijdschr.* 20: 323-330.
- Hirano, S. S., E. A. Maher, A. Kelman e.a. 1978. Ice nucleation activity of fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. In: *Proc. 4th Int. Conf. Pl. Path. Bact., Angers, part 2, 717-724.*
- Hoppe, P. E., D. C. Arny & J. W. Martens. 1964. Frost susceptibility in corn increased by leaf blight infections. *Plant Dis. Reporter* 48: 815-816.
- Joachim, H. F. 1957. Ueber Frostschaden an der Gattung *Populus*. *Arch. Forstw.* 6: 601-678.
- Klement, Z., D. S. Rozsnyay & M. Arsenyevic. 1974. Apoplexy of apricots III. Relationship of winter frost and the bacterial canker and die-back of Apricots. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 9: 35-45.
- Maki, L. R., E. L. Galyan, M-M. Chang-Chien & D. R. Caldwell. 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.* 28: 456-459.
- Meiden, H. A. van der. 1965. Schade door late wintervorst bij populier. *Populier* 2: 6-8.
- Sabet, K. A. 1953. Studies on the bacterial die-back and canker disease of poplar III. Freezing in relation to the disease. *Ann. Appl. Biol.* 40: 645-650.



KNP vouwkarton

De Verenigde Papierfabrieken Eerbeek B.V. is producent van meerlagig vouwkarton en handelt onder de naam KNP VOUWKARTON.

Het KNP vouwkarton is een hoogwaardig, gespecialiseerd produkt dat o.m. gebruikt wordt voor verpakkingen en grammofonplathoezen.



Bij de fabricage van dit produkt wordt voor een belangrijk deel gebruik gemaakt van inlands populierenhout.

De Verenigde Papierfabrieken zijn daarom geïnteresseerd in de aankoop van populierenhout op stam of geveld.

Wij willen in contact komen met bezitters of beheerders van populieren die willen verkopen.

Nadere informatie willen wij graag geven via de heer W. Boot, hoofd inkoop van de Verenigde Papierfabrieken te Eerbeek. Het telefoonnummer is 08338-9133.