

Toepassing van *Pseudomonas* bacteriën ter bestrijding van *Pythium* in bloembollen

Praktijkproef Hyacint

Marjan de Boer, Rik de Werd, Suzanne Breeuwsma

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
juni 2004

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervaelvoudigd, 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: 320728

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Bollen

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 - 462121
Fax : 0252 - 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	4
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODEN	7
3 RESULTATEN	8
4 CONCLUSIES	11
5 PRODUCTEN	12
6 LITERATUUR.....	13
BIJLAGE 1 MAATVERDELING GEOOGSTE BOLLEN 2001-2002.....	20
BIJLAGE 2 GEWASSTANDEN 2002-2003.....	15
BIJLAGE 3 MAATVERDELING GEOOGSTE BOLLEN 2002-2003.....	16

Samenvatting

PPO Bloembollen doet onderzoek naar alternatieve beheersingsstrategieën om schade door Pythium wortelrot in bloembolgewassen tegen te gaan. Naar aanleiding van positieve resultaten uit eerdere proeven op kleine schaal is in opdracht van de productgroep Hyacint bestrijding met Pseudomonas bacteriën getest op een drietal percelen. Deze proef moet duidelijk maken of met de huidige kennis eerdere positieve resultaten te reproduceren zijn onder diverse praktijk omstandigheden. De toepassing van Pseudomonas heeft de gewasstand en bolopbrengst op een perceel dat niet met Pythium was besmet niet beïnvloed. Op twee percelen die wel met Pythium besmet waren zijn wel positieve effecten van de bacteriën gevonden. Het gewas bleef langer groen en/of de bolopbrengst werd hoger. Deze positieve effecten kwamen echter niet consequent terug over de twee proefjaren en de verschillende percelen. Op dit moment lijkt een behandelingen met Pseudomonasbacteriën onvoldoende betrouwbaar om als enige maatregel tegen Pythiumschade te gebruiken. De werking is echter wel zodanig goed dat Pseudomonas bacteriën kunnen worden ingezet als onderdeel van een Pythium beheersstrategie waar momenteel aan gewerkt wordt. In deze Pythium beheersstrategie worden verschillende maatregelen, zoals b.v. een fungicide, een biofumigatie gewas en de Pseudomonas bacterie, zodanig met elkaar gecombineerd dat dit zal resulteren in een goede Pythium beheersing.

1 Inleiding

Aantasting van de wortels door het bodempathogeen *Pythium* is in de hyacintenteelt een groot probleem. Het leidt voornamelijk tot slechte groei van de bol en dus tot opbrengstderving. Er zijn momenteel geen middelen beschikbaar waarmee *Pythium* volledig kan worden bestreden. PPO Bloembollen zoekt daarom naar verschillende, alternatieve maatregelen zoals antagonisten om deze ziekte te kunnen beheersen. De afgelopen 4 jaar is uit onderzoek samen met Wageningen Universiteit (Jos Raaijmakers, Laboratorium voor Fytopathologie) gebleken dat een aantal specifieke ziekteonderdrukkende *Pseudomonas* bacteriën *Pythium* wortelrot in diverse bolgewassen ook onder veldomstandigheden kunnen onderdrukken (de Boer *et al*, 2000, de Boer *et al*, 2002). De verantwoordelijke ziekteonderdrukkende mechanismen, optimale dosering, toepassingmethoden en toepassingstijdstippen zijn onderzocht in het kader van het LNV-Gewasbeschermingsprogramma. Momenteel wordt in dit programma onderzocht of het combineren van *Pseudomonas* bacteriën met bestaande en nieuwe bestrijdingsmethoden (o.a. chemische middelen) leidt tot een goede beheersing van *Pythium* wortelrot in verschillende gewassen. Gezien de grote problemen met *Pythium* wortelrot in de hyacintenteelt zijn hoopgevende resultaten uit de eerste twee jaar van bovenstaand onderzoek (fig. 1) de aanleiding geweest een project te formuleren waarin deze bacteriën op grotere schaal onder praktijkomstandigheden worden getest tegen *Pythium* wortelrot van hyacint.

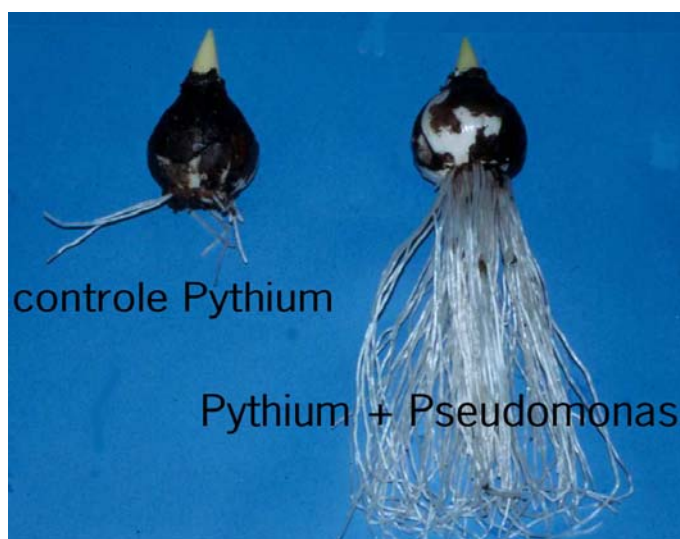


Fig.1: Effect van *Pseudomonas* in eerdere proeven. Links: *Pythium*-controle, rechts: *Pythium* + *Pseudomonas*bacterie

Het doel van dit project is te bepalen of het gebruik van ziekteonderdrukkende *Pseudomonas* bacteriën onder de praktische omstandigheden van een hyacintenteelt hetzelfde effect kunnen hebben als in de eerder uitgevoerde toetsen. Hiertoe zullen een aantal aspecten onder veldomstandigheden worden onderzocht zoals het effect van de *pythium* ziektedruk, manier van toepassing (veurbehandeling, boldompeling) en tijdstip van behandeling.

Voor deze veldproeven is gekozen voor de *Pseudomonas* bacterie die in eerdere toetsen (waarvan een gedeelte onder veldomstandigheden) *Pythium* het beste onderdrukte. Deze *Pseudomonas* bacterie is in staat oppervlakte spanning verlagende stoffen te produceren, zogenaamde biosurfactants. Uit aanvullend onderzoek is gebleken dat deze biosurfactants (mede-)verantwoordelijk zijn voor de ziekte onderdrukking door deze *Pseudomonas* bacterie (J. T. de Souza *et al*, 2003). Het is mogelijk dat deze bacterie als éénmalige en enige bestrijdingsmaatregel onvoldoende effect geeft op een zwaar besmet perceel, maar

wel afdoende werkt in combinatie met andere (teelt)maatregelen of op een lichter besmet perceel. De werking van de behandelingen wordt op twee praktijkpercelen getest omdat variatie tussen percelen mogelijk een invloed kan hebben op het resultaat. Verder wordt de Pseudomonas bacterie ook getest op een onbesmet perceel, om eventuele groeibevordering en dus opbrengstverhoging in deze situatie zichtbaar te kunnen maken. Biologische middelen kunnen net als chemische niet op de markt gebracht worden zonder een toelating, afgegeven door het College voor Toelating van Bestrijdingsmiddelen (CTB). De resultaten uit deze proef zouden een bijdrage kunnen leveren aan het verkrijgen van een toelating.

2 Materiaal en Methoden

Om de betrouwbaarheid van de bevindingen te vergroten, is de werking van de *Pseudomonas* bacterie in twee jaren getoetst, in seizoen 2001/2002 en 2002/2003. De proefopzet is vergelijkbaar voor beide jaren, met een extra behandeling met Ridomil Gold in 2002 (Ridomil was niet toegelaten in 2001). De proeven zijn uitgevoerd op drie percelen waarvan één perceel onbesmet was (perceel 1: proeftuin PPO in Lisse) en twee percelen die een natuurlijke *Pythium*-besmetting hebben (perceel 2; besmet perceel proeftuin Lisse, perceel 3; besmet praktijk perceel).

Tabel 1. Behandelingen in de veldproeven

Behandeling	Bolontsmetting	Bestrijding	Toediening
1	Formaline 1%	-	-
2	Formaline 1%	<i>Pseudomonas</i>	Veurbehandeling
3	Formaline 1%	<i>Pseudomonas</i>	Boldompeling
4	standaard fungiciden	-	-
5	standaard fungiciden	<i>Pseudomonas</i>	Veurbehandeling
6 ¹	standaard fungiciden	Ridomil Gold	Veurbehandeling

¹Alleen in seizoen 2002/2003 toegepast

De behandelingen (Tabel 1) zijn uitgevoerd op alle drie de proefvelden.

De bollen zijn standaard ontsmet (0,5% captan 546 g/l + 1% formaline 40% a.i. + 0,2% prochloraz 450 g/l + 0,2% carbendazim 500 g/l) of in alleen 1% formaline. Op deze manier is het mogelijk te bepalen of de standaard-bolontsmetting met een mix van fungiciden samen met *Pseudomonas* toegediend kan worden zonder de werking van de één of de ander te schaden. De bollen van alle behandelingen zijn na ontsmetting teruggedroogd. Op deze manier wordt directe schade van de formaline op de bacteriën voorkomen. Behandeling 6, met Ridomil Gold, is in seizoen 2002/2003 toegevoegd om het effect van de verschillende behandelingen te kunnen vergelijken met een chemische behandeling zoals die in de praktijk veel toegepast wordt.

Alle behandelingen zijn aangelegd op veldjes van 1.5 m² in 4 herhalingen waarbij in 2001/2002 140 bollen en in 2002/2003 104 bollen per veldje zijn geplant. Hyacint cv. 'Pink Pearl' (zifmaat 12-13) is geplant als toetsgewas. In april, mei en juni zijn gewasstanden beoordeeld om groei en tijdstip van afsterven waar te nemen. Na het rooien is de bolopbrengst bepaald. Alle gegevens zijn statistisch verwerkt om de betrouwbaarheid van behandelingseffecten aan te tonen.



Figuur 2. Opzet proefveld op het PPO in Lisse

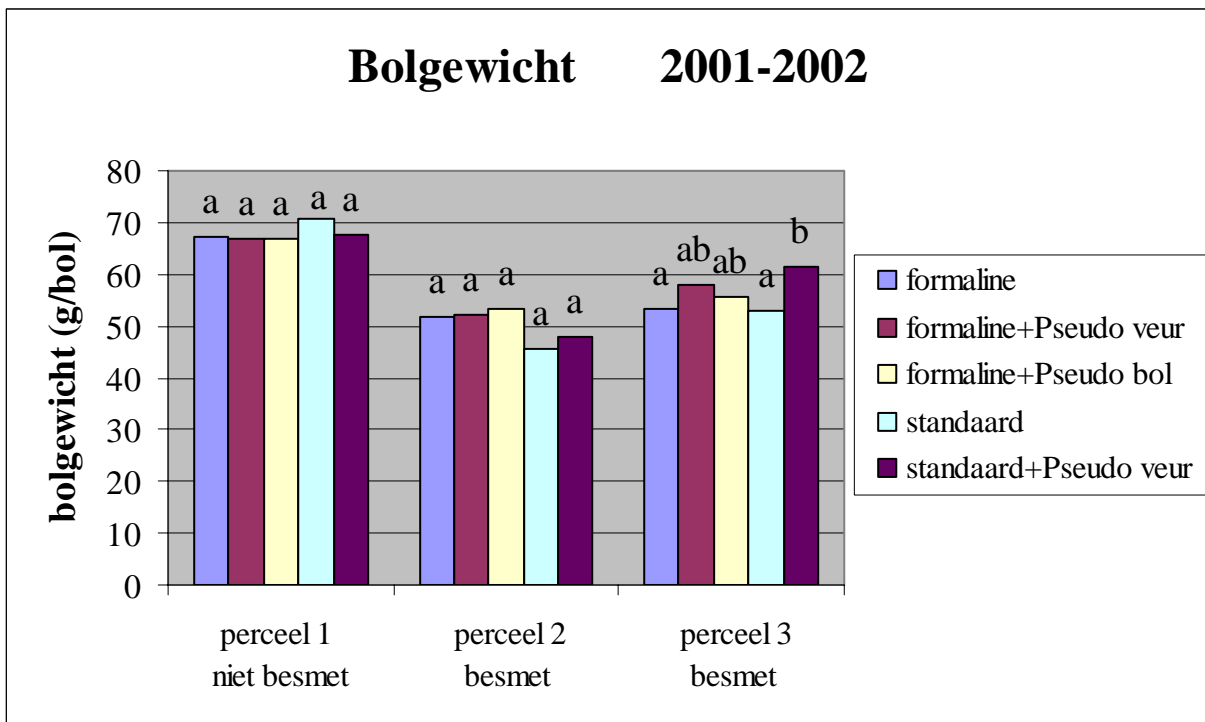
3 Resultaten

2001-2002:

Op het onbesmette perceel (perceel 1) zijn geen statistisch significante verschillen in zowel de gewasstand als de bolopbrengst ontstaan tussen de verschillende behandelingen (fig.3). Er is dus geen schadelijk of groeistimulerend effect waargenomen als gevolg van de toepassing van de Pseudomonas bacteriën.

Op perceel 2 (besmet Lisse) bleef het gewas van de drie Pseudomonas behandelingen twee weken langer groen dan de onbehandelde veldjes. Maar deze bovengrondse effecten resulteerden niet in betrouwbaar hogere bolopbrengsten (fig. 3).

Op perceel 3 (besmet praktijkperceel) hadden de Pseudomonas behandelingen geen duidelijk effect op de gewasstand. De veurbehandeling met Pseudomonas van de standaard ontsmette bollen resulteerde echter wel in een significant hogere bolopbrengst. Het uiteindelijke gewicht per bol na de teelt was na toediening van Pseudomonas 16% hoger vergeleken met de standaard ontsmette controle (fig.3).



Figuur 3: Bolgewicht van hyacint na teelt op 3 percelen waarvan 2 besmet met Pythium. Er zijn verschillende combinaties van bolontsmetting (formaline ontsmetting of standaard bolontsmetting met fungiciden) en toepassing van Pseudomonasbacteriën (boldompeling of veurbehandeling) toegepast. De letters geven aan of de resultaten statistisch significant van elkaar verschillen (ANOVA, P<0.05).

2002-2003

In het tweede jaar zijn op perceel 1, het onbesmette perceel, wederom geen verschillen in gewasstand of bolopbrengst ontstaan tussen de verschillende behandelingen (fig. 4).

Op perceel 2, het besmette perceel in Lisse, waren wel verschillen in afsterving waar te nemen. Een dompeling in alleen formaline gaf de snelste afsterving. Toevoegen van *Pseudomonas* hield het gewas wat langer groen, zowel in combinatie met formaline- als met standaardontsmetting. Het verloop van de gewasstand tijdens dit seizoen wordt weergegeven in bijlage 2. De verschillen in gewasstand zijn (in mindere mate) terug te zien in de bolopbrengsten. Er treedt geen verschil in bolgewicht op tussen de controle en de *Pseudomonas* behandelingen waarbij de bollen alleen met formaline ontsmet zijn. In de behandelingen waarbij de bollen een standaard ontsmetting hebben gekregen resulteerde de standaardontsmetting alleen in een lager bolgewicht vergeleken met de behandeling waarbij Ridomil Gold is toegepast in de veur. Toedienen van *Pseudomonas* bacteriën bij het planten, resulteerde in een statistisch vergelijkbaar bolgewicht als toepassing van Ridomil Gold. Het bolgewicht van de met *Pseudomonas* behandelde bollen verschilde echter ook niet met de standaard ontsmette controle (fig.4).

Op perceel 3, het besmette praktijkperceel, resulteerden alle behandelingen eind juni in een groener gewas vergeleken met de formaline ontsmetting alleen (fig.4). Wanneer zowel standaard bolontsmetting en *Pseudomonas* bacteriën ingezet waren verliep de afsterving vergelijkbaar met wanneer slechts één van beiden toegepast was. Uit eerder onderzoek is gebleken dat fungiciden geen negatief effect hebben op *Pseudomonas* bacteriën. Of de *Pseudomonas* bacteriën een effect hebben op de werking van de fungiciden is niet bekend, maar niet waarschijnlijk. De behandeling met standaard bolontsmetting in combinatie met Ridomil Gold hield het gewas het langst groen. De verschillen in gewasstand tussen de behandelingen waren op dit perceel niet éénduidig terug te vinden in de bolopbrengsten.

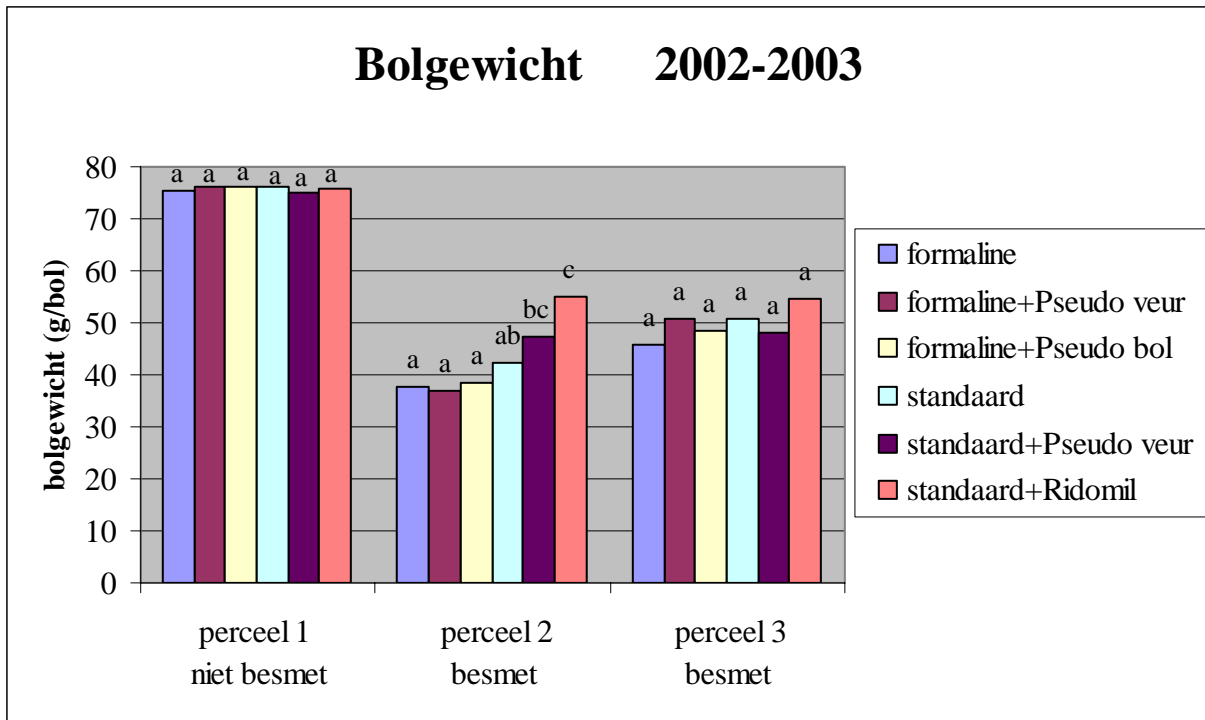
De positieve effecten van Ridomil Gold op deze percelen zijn tegenstrijdig met berichten uit de praktijk waar regelmatig geen ziekteonderdrukkend effect van Ridomil Gold wordt gezien. Een verklaring voor de goede effecten in deze proef kan zijn dat Ridomil of Ridomil Gold niet eerder op deze percelen is toegepast.

Ter extra informatie wordt in bijlagen 1 en 3 de maatverdeling van de geoogste bollen weergegeven. De maatverdeling verandert richting de grote maten naarmate de bollen beter gegroeid zijn, dus als ze minder last van *Pythium* hebben gehad. Dit effect is zichtbaar in de maatverdeling van de bollen van de verschillende behandelingen op de verschillende percelen, maar het bolgewicht en % toename van het totaalgewicht bleken betere parameters te zijn om de effecten van de behandelingen het meest duidelijk naar voren komen.

Samenvatting

Beide jaren samengenomen is op het onbesmette perceel geen effect van de *Pseudomonas* bacteriën gevonden. Op de besmette percelen zijn er positieve effecten van de toepassing van *Pseudomonas* bacteriën te zien op zowel de gewasstand als op de bolopbrengsten. Er zijn geen duidelijke verschillen gevonden tussen een veurbehandeling en een boldompeling met *Pseudomonas*. Er is echter wel een trend zichtbaar waarbij de veurbehandeling resulteert in hogere bolopbrengsten vergeleken met de boldompeling. Daarnaast is er geen negatief effect zichtbaar van een standaard ontsmetting op de werking van de *Pseudomonas* bacteriën.

Uit de tabel in bijlage 4 waarin voor elk van de 4 herhalingen van de behandeling aangegeven staat wat het bolgewicht is en het % toename van het totaal gewicht blijkt dat er erg veel variatie bestaat in het % toename van het totaalgewicht (geoost ten opzichte van geplant) en dus ook in het bolgewicht. Over het algemeen genomen resulteren de *Pseudomonas* behandelingen vaker in een hoger bolgewicht binnen één behandeling dan de controles. Echter bijna altijd resulteren niet alle herhalingen binnen één *Pseudomonas* behandeling in een hoger bolgewicht vergeleken met de controle.



Figuur. 4: bolgewicht van hyacint na teelt op 3 percelen waarvan 2 besmet met Pythium. Er zijn verschillende combinaties van bolontsmetting (formaline ontsmetting of standaard bolontsmetting met fungiciden), toepassing van Pseudomonas bacteriën (boldompeling of veurbehandeling) en chemische grondbehandeling met Ridomil Gold toegepast. De letters geven aan of de resultaten statistisch significant van elkaar verschillen (ANOVA, $P < 0.05$).

4 Conclusies

In de proeven zijn herhaaldelijk positieve effecten van de Pseudomonas bacteriën op de gewasstand en/of bolopbrengst gevonden op met Pythium besmette percelen. Effecten op gewasstand resulteerden niet in alle gevallen in effecten op de bolopbrengsten. De grote variatie die vaak voorkwam tussen de herhalingen van een behandeling kan meerdere oorzaken hebben. Het kan met het grillig voorkomen van Pythium te maken hebben of met variatie in het effect van de Pseudomonas behandeling. Daarnaast kan een tekort aan nutriënten de groei van de bollen beïnvloeden.

Er zijn dus hoopgevende resultaten gevonden, maar deze keerden niet consistent terug over verschillende jaren en percelen. Deze variatie, die overigens ook bij chemische middelen tegen bodemschimmels voorkomt, maakt de toepassing van Pseudomonas bacteriën alleen niet voldoende betrouwbaar om als enige maatregel tegen Pythium wortelrot in te zetten.

In gerelateerd onderzoek in opdracht van LNV wordt onderzocht of de toepassing van Pseudomonas bacteriën alleen verbeterd kan worden. Daarnaast wordt onderzocht of Pseudomonas bacteriën kunnen worden toegepast in combinatie met andere beheersmaatregelen (zoals chemische middelen en ziekteonderdrukkende tussengewassen) resulterend in een zogenaamde Pythium beheersstrategie. Afhankelijk van de resultaten van dit onderzoek zal er binnenkort ook weer worden getracht een dergelijke beheersstrategie op praktijk percelen verder uit te testen.

5 Producten

Vakbladartikelen

Boer, M. de, Breeuwsma, S., Leeuwen P. van (2002) Pythium geïntegreerd beheersen.
Bloembollencultuur **22**, 9

Posters

M. de Boer, A.S. van Bruggen. Bodemmanagement voor beheersing ziekten en plagen. Open dagen Broeierij, PPO-bollen, februari 2002

M. de Boer. Ontwikkeling biologische beheersingsstrategie schimmels, in de bollenteelt. Voor de Kennismanifestatie Biologische Teelten, Horst-Meterik, 19 september 2002

M.de Boer, S. J. Breeuwsma and J. M. Raaijmakers, International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch, Nieuw Zeeland. Biological control of Pythium root rot in flowerbulbs by *Pseudomonas* spp.

Lezingen

M. de Boer, S. Breeuwsma. Pythium bestrijding; Studieclub oud EVTO(74-75), Anna Paulowna, 22 januari 2002

M. de Boer, G. van Os. Beheersing Bodempathogenen; Studieclub Theorie en Praktijk, Lisse, 19 februari 2002

M. de Boer, A.S. van Bruggen. Beheersing Bodempathogenen; Studieclub Teelttechniek T&P, Lisse, 4 maart 2002

M. de Boer, S. Breeuwsma. Pythium; oorzaak en bestrijding; Tuinbouwstudieclub, Limmen, 22 maart 2002

M. de Boer. Biologische bestrijding van Pythium wortelrot in de toekomst met *Pseudomonas* bacteriën?; Jaarvergadering Productgroep Hyacint, Lisse, 26 maart 2002

M.de Boer, A.S. van Bruggen, G.van Os. Beheersing Bodempathogenen: Bollensoos Bollennoord het Zand, 5 maart 2003

M.de Boer, A.S. van Bruggen, G.van Os. Beheersing Bodempathogenen, Studieclub Anna Paulowna, in het kader van verlenging spuitlicentie i.s.m. A.O.C, 25 maart 2003

M. de Boer, P. Vreeburg. Jaarvergadering Productgroep Hyacint, Keukenhof Lisse 26 maart 2003

M. de Boer, V. Bijman, G. van Os, S. Breeuwsma, J.M. Raaijmakers. Inzet antagonisten in beheersing van diverse pathogenen in de bollenteelt. KNPV Gewasbeschermingsdag: Hoogtepunten 2002. Wageningen 27 maart 2003

M. de Boer Presentatie voor leerlingen van het Wellant College over onderzoek naar Alternatieve beheersmaatregelen in de bollenteelt, Lisse, 14 mei 2003

Open dag

S. Breeuwsma, M. de Boer Demonstratie veldproef en Posterpresentatie, Lisse 20 mei 2003

Demonstraties van het veldexperiment voor de productgroep Hyacint, voorjaar 2002 en voorjaar 2003;

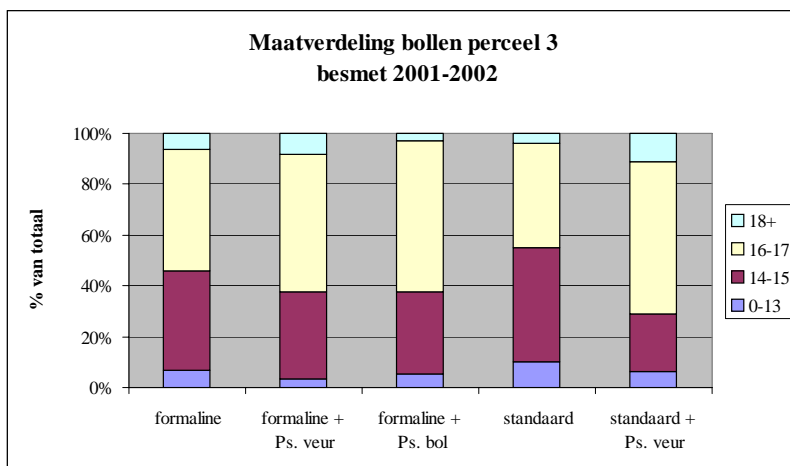
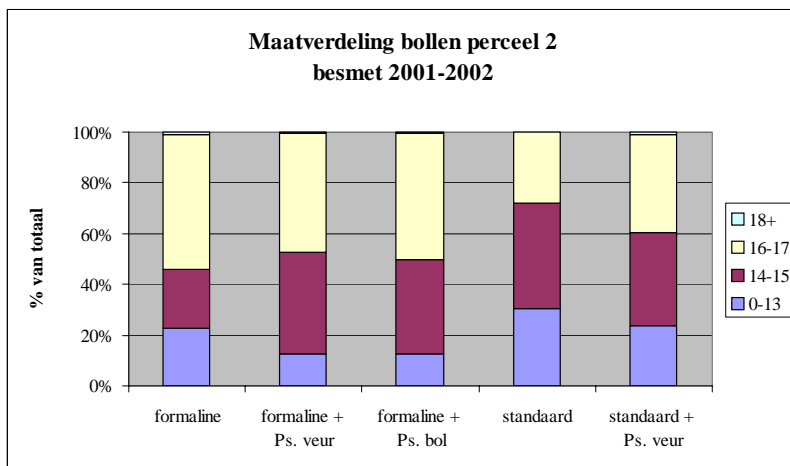
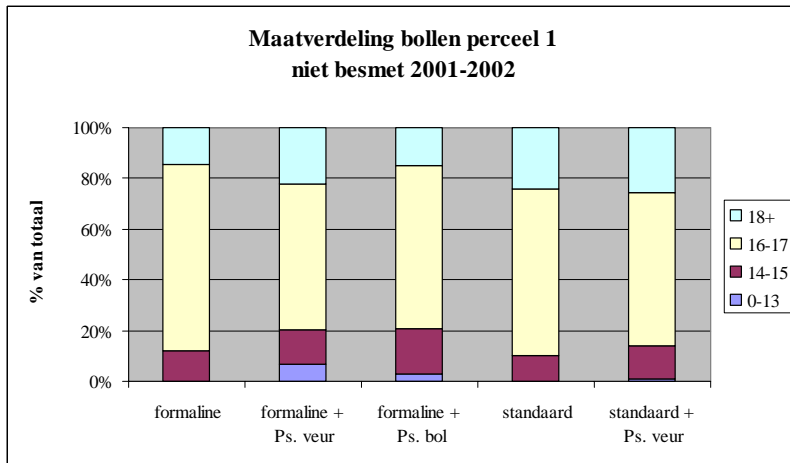
6 Literatuur

Boer, M. de, Breeuwsma, S., Leeuwen P. van (2002) Pythium geïntegreerd beheersen. *Bloembollencultuur* **22**, 9

Boer, M. de, Breeuwsma, S., Raaijmakers J.M. (2000) Pseudomonasbacteriën ingezet tegen Pythium. *Bloembollencultuur* **24**, 33

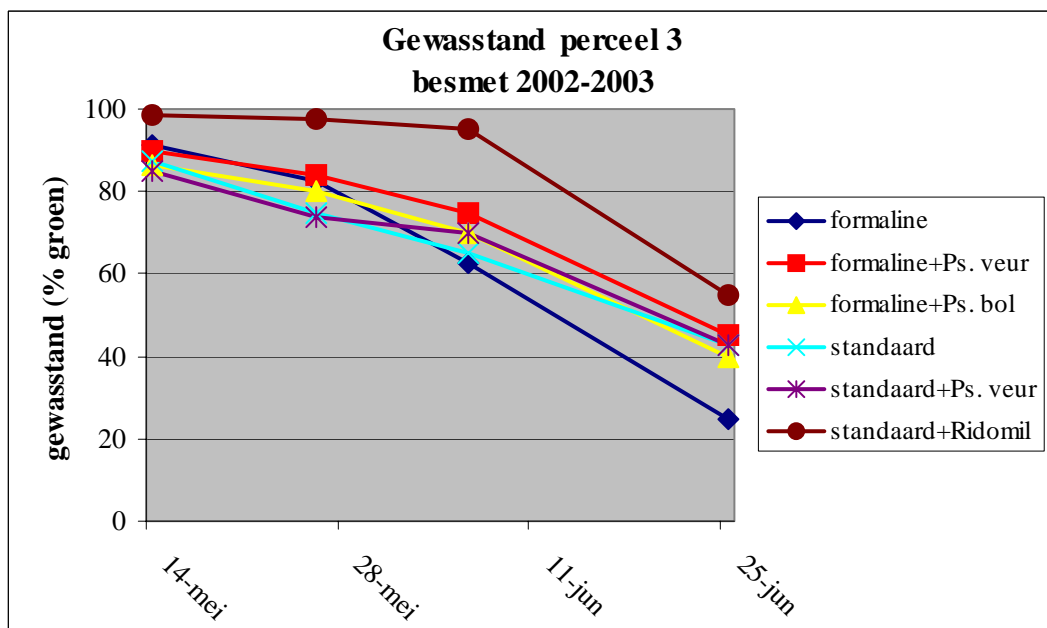
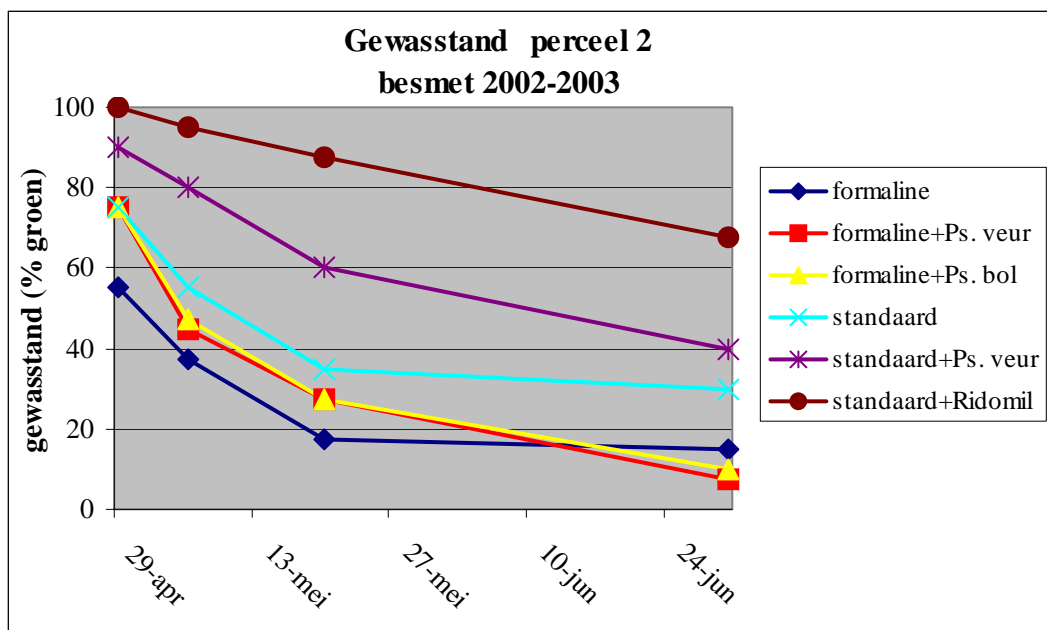
Jorge T. de Souza, Marjan de Boer, Pieter de Waard, Teris A. van Beek and Jos M. Raaijmakers (2003). Biochemical, Genetic and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* (69), 7161-7172.

Bijlage 1 Maatverdeling geogste bollen 2001-2002

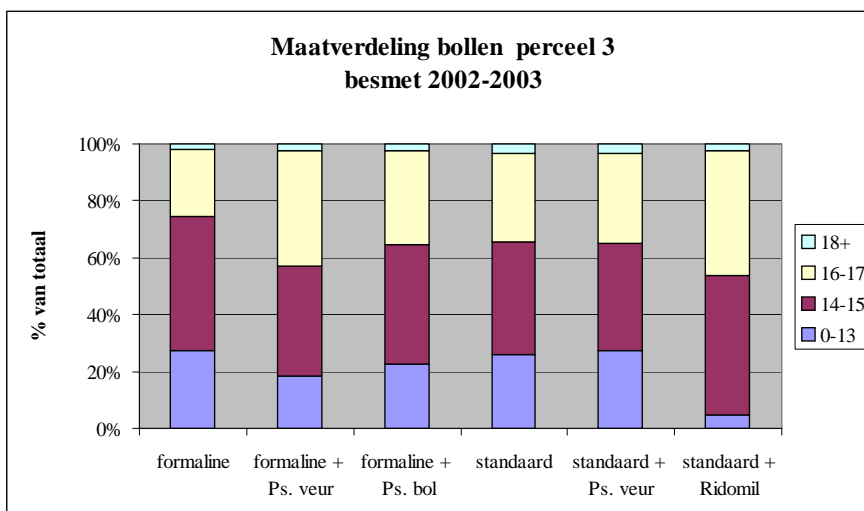
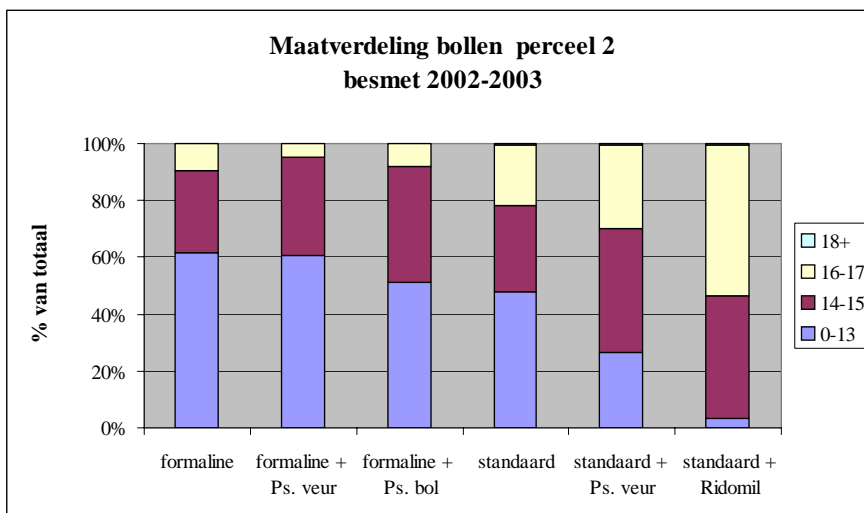
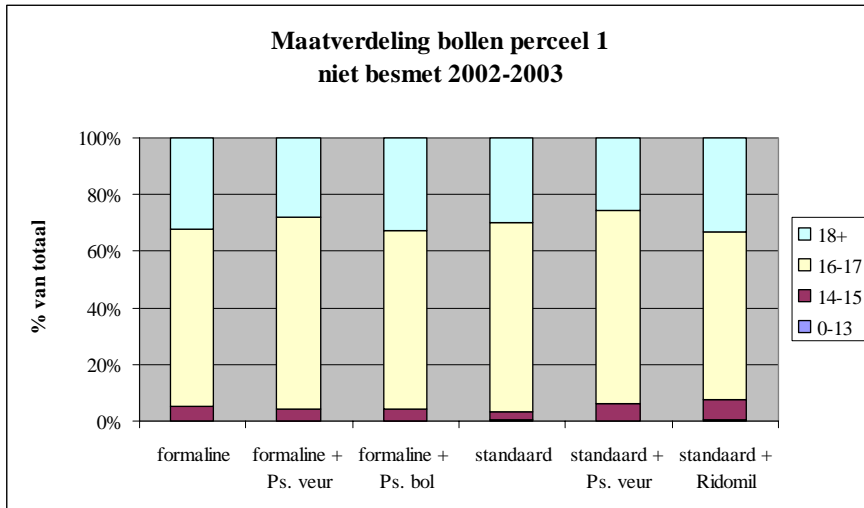


Bijlage 2 Gewasstanden 2002-2003

Gewasstanden 2002-2003 op met Pythium besmette percelen na toepassing van verschillende combinaties van chemische en biologische middelen toegepast als boldompeling of veurbehandeling.



Bijlage 3 Maatverdeling geogste bollen 2002-2003



Bijlage 4 Tabel met ruwe gegevens