

BACTERIEZIEKTEN BIJ AMERIKAANSE ANJERS IN NEDERLAND¹

With a summary: Bacterial diseases of carnations in the Netherlands

DOOR

MARTHA BAKKER² en G. SCHOLTEN³

INLEIDING

Eerder (BAKKER & SCHOLTEN, 1955) werd bericht over het optreden van een bacterieziekte in anjers in Nederland. Toen werd de conclusie getrokken dat de bacterie, die hier sedert 1951 werd aangetroffen, identiek is met de soort *Pseudomonas caryophylli* Burk.

Voortgezet onderzoek deed twijfel rijzen aan deze conclusie. Reeds in 1955 kwam vast te staan, dat er twee verschillende soorten bacteriën als oorzaak van verwelking bij anjers kunnen optreden (SCHOLTEN, 1955). Vergelijking van de beide soorten heeft een aantal duidelijke verschillen in eigenschappen aan het licht gebracht. Gebleken is, dat *Pseudomonas caryophylli*, die in Nederland slechts een enkele maal is aangetroffen, in onze streken geen wezenlijk gevaar voor de anjernteelt oplevert. De andere bacterie, een *Erwinia*-soort, is in staat in elk stadium van de cultuur grote schade aan te richten.

DE ONTDEKKING VAN *ERWINIA*

Met bacterie-isolaties uit zieke anjerplanten werden infectieproeven verricht op nagenoeg alle anjervariëteiten die in Nederland in cultuur waren (SCHOLTEN, 1953, 1954). Hierbij kwamen geen duidelijke verschillen in gevoeligheid aan het licht. De resultaten van THOMAS (1954), volgens welke de variëteit Durango volledig resistent zou zijn tegen *Pseudomonas caryophylli*, waren aanleiding om nog een vergelijkende infectieproef uit te voeren. Toen bleek, dat de geïnfecteerde Durango-stekken na beworteld en opgepot te zijn als eerste begonnen te verwelken, lag de conclusie voor de hand, dat er belangrijke verschillen in eigenschappen bestaan tussen de Amerikaanse en de Nederlandse bacterie-isolaties.

Inmiddels was door HELLMERS (1955a) een aantasting door *Pseudomonas caryophylli* beschreven, die in 1953 grote schade had aangericht bij de variëteit Harvest Moon op een exportkwekerij bij Kopenhagen. Toen we echter tijdens het XIVe Internationaal Tuinbouwkundig Congres te Scheveningen in 1955 in de gelegenheid waren onze ervaringen uit te wisselen met die van onderzoekers uit Denemarken en Engeland, bleek ons dat ook daar een andere bacterie was gevonden die verwelking van anjers veroorzaakte.

Zowel LELLIOTT (1956) in Engeland als HELLMERS in Denemarken deter-

¹ Aangenomen voor publikatie 13 mei 1961.

² Mevr. M. POST-BAKKER was ten tijde van het onderzoek werkzaam bij het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (I.P.O.), Wageningen.

³ I.P.O., Wageningen, gedetacheerd bij het Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland, Aalsmeer.

mineerden deze bacterie als een *Erwinia (Pectobacterium)*-soort. Door HELLMERS (1958) werd aan deze bacterie de naam *Pectobacterium parthenii* var. *dianthicola* gegeven. Bij vergelijking van de eigenschappen van de door ons geïsoleerde bacterie met die van een isolatie van de *Erwinia*-soort afkomstig van LELLIOTT (nr. R 10) bleek, dat deze bacteriën identiek zijn. Tot dezelfde conclusie kwam HELLMERS (1958), die onze isolatie nr. 254 vergeleek met zijn eigen isolaties en met een isolatie van LELLIOTT. Wij zullen de door HELLMERS gegeven naam overnemen, met dien verstande, dat wij de in Nederland algemeen gebruikte geslachtsnaam alsnog zullen handhaven in navolging van BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology (1957). De naam van de bacterie luidt dan *Erwinia parthenii* var. *dianthicola*.

Bij onze eerste beschrijving van deze bacterie (BAKKER & SCHOLTEN, 1955) gaven wij weliswaar enkele verschillen aan tussen onze isolaties en de door BURKHOLDER (1942) beschreven *Pseudomonas caryophylli*, doch wij werden op een dwaalspoor gebracht door een onduidelijke zweepdraadkleuring, waarbij de peritriche ciliën zich als bipolair voordeden. Dit bracht ons er toe de door ons geïsoleerde bacterie te beschouwen als een wat afwijkende vorm van *P. caryophylli*. Dit is niet juist. De bacterie heeft peritriche ciliën en is identiek met de isolaties van HELLMERS en LELLIOTT.

In 1956 werd door ons werkelijk *P. caryophylli* geïsoleerd uit het ras Harvest Moon. Deze isolatie werd vergeleken met de van HELLMERS ontvangen isolatie nr. 88 en bleek hiermee identiek te zijn.

BESCHRIJVING VAN DE BACTERIËN

Pseudomonas caryophylli is uitvoerig beschreven door BURKHOLDER (1942) en later door HELLMERS (1958), *Erwinia parthenii* var. *dianthicola* door LELLIOTT (1956) en HELLMERS (1958). Wij willen daarom nu volstaan met een beperkte beschrijving van beide bacteriën.

Voor de determinatie is in het algemeen de methodiek gevolgd, beschreven in het „Manual of Methods” van de „Society of American Bacteriologists” (1954). Voor alle reacties werd steeds met verscheidene isolaties gewerkt; alle proeven werden voor elke isolatie steeds in duplo gedaan. Bovendien werden onze isolaties vergeleken resp. met een isolatie van *P. caryophylli* van HELLMERS (nr. 88) en een isolatie van *E. parthenii* var. *dianthicola* van LELLIOTT (nr. R 10).

Pseudomonas caryophylli

De bacterie is staafvormig met ronde uiteinden, dikwijls iets gebogen van vorm. De ciliën zijn polair, soms bipolair. De ciliënkleuring geschiedde volgens de methode van GRAY. De bacterie is Gramnegatief.

Op bouillonagar is de groei slecht; na ongeveer een week bij 28 °C zijn de bacteriën dood. In bouillon is de groei beter. Na één dag bij 28 °C treedt reeds troebeling op. Na enkele dagen ontstaat een dun vlies, waarvan op de tiende dag alleen een ring is overgebleven. Aardappelglucoseagar is één goed medium voor deze bacterie. Na twee dagen wordt de groei zichtbaar van cremekleurige kolonies; na enkele dagen beginnen de kolonies in het centrum bruin te verkleuren. Na één tot twee weken zijn de kolonies donkerbruin met een lichte

rand en met een dun, licht gekleurd laagje over het bruine centrum van de kolonie. Door deze bruinkleuring is de bacterie altijd gemakkelijk te onderscheiden van *Erwinia parthenii* var. *dianthicola*. De bacterie blijft op aardappelglucoseagar ongeveer een maand in leven.

De optimum-temperatuur ligt bij 30-33 °C.

Bouillongelatine wordt zeer langzaam vervloeid: na tien dagen is in de gelatine een kleine holte ontstaan. Dit komt overeen met de waarnemingen van BURKHOLDER (1942); volgens HELLMERS (1958) wordt gelatine niet vervloeid.

Nitriet wordt gevormd in nitraatbouillon (na twee dagen aangetoond met reagens van GRIESZ-ROMIJN).

Er treedt geen H₂S-vorming op, noch wanneer loodacetaatpapier werd opgehangen boven een bacteriecultuur in bouillon, noch wanneer de bacterie werd geënt op Difco's peptonijzeragar of Difco's loodacetaatagar.

Indol wordt niet gevormd in Difco's bacto-trypton (aangetoond volgens de methode van EHRLICH).

Er heeft geen zetmeelsplitsing plaats na enting op bouillonagar, waaraan 0,2 % zetmeel is toegevoegd (na acht dagen aangetoond met Lugol's jodiumoplossing).

Voor het onderzoek van afbraak van koolhydraten werd steeds 1 % van het betreffende koolhydraat gevoegd bij een basisoplossing van zouten; bovendien werd broomthymolblauw toegevoegd als indicator en een Durhambuisje in de reageerbuis gebracht om eventuele gasvorming aan te tonen. Meestal werden de oplossingen na samenvoegen van de bestanddelen gesteriliseerd in een autoclaaf gedurende 1/2 uur bij 105 °C. Een uitzondering vormden maltose, lactose en saccharose. Om afbraak tijdens het steriliseren te voorkomen werden deze suikers niet in de autoclaaf gesteriliseerd, doch via een ultrafilter direct gebracht in buizen met basisoplossing en broomthymolblauw, die tevoren in de autoclaaf waren gesteriliseerd. Zuurvorming, doch geen gasvorming is aangetoond in buizen met arabinose, glucose, lactose (langzaam), maltose, saccharose en ethanol. In buizen met natriumcitraat wordt de pH hoger.

Lakmoesmelk wordt alkalisch; binnen een week is blauwkleuring duidelijk waarneembaar. Na een week ontstaat een grauwwit neerslag onderin de buis. Na verloop van twee maanden is de melk gepeptoniseerd.

Erwinia parthenii var. *dianthicola*

De bacterie is staafvormig met ronde uiteinden, soms gepaard. De ciliën zijn peritrich (gekleurd werd volgens de methode van GRAY). De bacterie is Gramnegatief.

Goede groei op bouillonagar. De vuilwitte kolonies hebben op deze voedingsbodem een rechte tot iets gegolfde rand. Op aardappelglucoseagar is de groei zeer karakteristiek. De kolonies zijn aanvankelijk vuilwit, later worden ze in het centrum licht geelbruin van kleur. De randen zijn na enkele dagen duidelijk gegolfd, na ongeveer vijf dagen sterk geveerd (coralloïd). In bouillon goede groei, er ontstaat een sterke troebeling met weinig neerslag en een dun vlies wordt gevormd. Groei in Clara's en Fermi's oplossingen vrij goed, in Cohn's oplossing zwak, in citraatmedium vrij goed. Geen groei in bouillon met 5 % NaCl.

De optimum-temperatuur is 25 °C. Er is echter weinig verschil in groei bij

temperaturen tussen 15 en 30 °C. Maximum-temperatuur ongeveer 35 °C.

Bouillongelatine wordt vervloeid, aanvankelijk komvormig, later langs de hele steek.

Nitriet wordt gevormd uit nitraat. H₂S-vorming kon bij de meeste isolaties van deze bacterie niet worden aangetoond; bij een paar isolaties werd echter wel een zwakke H₂S-vorming waargenomen wanneer loodacetaatpapier gehangen werd boven de cultuur van de bacterie in bouillon.

Bij de meeste isolaties kon in Difco's bacto-trypton indolvorming aangetoond worden volgens de methode van EHRLICH.

De Voges-Proskauer reactie is positief; de methylroodproef is aanvankelijk positief, na ongeveer een week echter negatief.

Zetmeel wordt niet gesplitst.

In basisoplossing met 1 % koolhydraat en broomthymolblauw ontstaat zuur en gas bij galactose, glucose, saccharose, lactose (bij laatstgenoemde suiker langzaam; na ongeveer tien dagen begon de zuurvorming zichtbaar te worden, na twee maanden hadden alle isolaties gas gevormd). Met maltose geringe zuurvorming, doch geen gasvorming na twee maanden. Met natriumacetaat, -tartraat en -citraat wordt het medium alkalischer, na enkele dagen is de blauwkleuring waar te nemen.

Lakmoesmelk wordt aanvankelijk blauw, doch later neemt de zuurvorming de overhand. De lakmoes begint onderin de buis te reduceren en is na ongeveer een week geheel gereduceerd. Coagulatie („soft curd”) begint na enkele dagen; boven het coagulaat ontstaat een enkele mm brede, paarse serumzone. Deze serumzone wordt geleidelijk breder naarmate het coagulaat vaster wordt; de kleur van het serum wordt vuilroze. Na twee tot vier weken is een stevig coagulaat ontstaan en beslaat de serumzone ongeveer de helft tot een derde van het medium.

DE SYMPTOMEN

Nadat wij de beschikking hadden gekregen over de beide bacteriesoorten, was het ook mogelijk door middel van inoculatieproeven het verloop van de aantasting en de symptomen op de plant te vergelijken.

Een *Erwinia*-aantasting van jonge planten heeft meestal na korte tijd een sterke groeiremming ten gevolge. De gevormde zijscheuten en bloemstengels blijven zeer kort; vaak worden de internodiën geheel door de bladeren bedekt. De planten krijgen een vale, grijsgroene kleur; de bladeren worden rimpelig met dode punten. Als oudere planten worden aangetast is de groeiremming meestal minder duidelijk en heeft de ziekte dikwijls een meer acuut verloop.

Het meest typerende verschijnsel bij een aantasting door *Pseudomonas* is het splijten van de internodiën, waardoor diepe, overlangse wonden in de stengel ontstaan. De ziekte had in onze proeven steeds een zeer traag verloop en breidde zich niet uit naar de omringende planten. Ook op de bedrijven in Nederland heeft deze ziekte geen schade meer aangericht en in de andere landen van West-Europa waar *Pseudomonas caryophylli* geïmporteerd is heeft deze zich evenmin gehandhaafd.

DE BESTRIJDING VAN *ERWINIA*

Een groter probleem vormde de bestrijding van *Erwinia parthenii* var. *dianthicola*. Deze ziekte had op een aantal bedrijven vaste voet gekregen en veroorzaakte belangrijke schade. Teneinde na te gaan op welke wijze een verdere uitbreiding kon worden tegengegaan, werd een gecombineerd onderzoek ingesteld op het Proefstation voor de Bloemisterij te Aalsmeer en op het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek en de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen. Hierbij kwam het volgende naar voren:

Erwinia kan met het stekmes van zieke op gezonde stekken worden overgebracht. De meest effectieve ontsmetting van het mes werd verkregen met 15% lysol. De ziekte kan worden verspreid als zieke en gezonde stekken gezamenlijk in water worden gezet, als er besmet gietwater wordt gebruikt, of als er zieke stekken op het stektablet tussen de gezonde staan. Hieruit blijkt hoe belangrijk het zou zijn, als bij het begin van een nieuwe cultuur de zekerheid kon worden verkregen dat men van volledig gezond plantenmateriaal uitgaat. Dit is ook het doel van de verplichte N.A.K.S.-keuring, waarbij de handel in stek, afkomstig uit kassen waarin vaatziekten zijn geconstateerd, wordt verboden. Door de lange incubatietijd van *Erwinia* is het echter mogelijk, dat geruime tijd zieke stekken worden geplukt van moerplanten, die ogenschijnlijk nog gezond zijn. Waarschijnlijk moet aan deze omstandigheid en aan het gebruik van besmet gietwater de snelle verbreiding van de ziekte in de eerste jaren van zijn optreden worden toegeschreven. Het toetsen van de stekken voor de teelt van moerplanten (HELLMERS, 1955a,b, 1958; TAMMEN, BAKER & HOLLEY, 1956) zou hier uitkomst kunnen brengen, wanneer met een dergelijke methode iedere geïnfecteerde stek kan worden opgespoord. Uitgebreide proeven hebben evenwel aangetoond, dat langs deze weg nooit alle stekken, die met *Erwinia* zijn besmet, kunnen worden gevonden. De verdeling van de bacteriën in de plant is nl. zo onregelmatig, dat ze zelfs bij ernstig aangetaste planten niet uit elk stukje van de stengel kunnen worden geïsoleerd.

Toch worden er sedert 1957 op grote schaal anjerstekken getoetst ten behoeve van de praktijk. Hierbij worden alleen stekken uit goedgekeurde kassen geaccepteerd. Op deze wijze is het mogelijk, dat een infectie van de moerplanten wordt ontdekt vóórdat de symptomen aan de planten zichtbaar worden. Krachtens de bepalingen van de keuringsdienst mogen dan geen stekken van deze moerplanten meer worden verhandeld. De praktische waarde van het toetsen is belangrijk toegenomen sinds de stekken ook op de aanwezigheid van schimmelziekten — speciaal *Phialophora cinerescens* — worden gecontroleerd.

DE STAND VAN ZAKEN OP DE BEDRIJVEN

De resultaten van het onderzoek hebben geleid tot adviezen aan de praktijk, waardoor de bedrijfshygiëne nog verder is verbeterd. Zo is men er vrijwel algemeen toe overgegaan de moerplanten te kweken in gesloten tabletten. Op de vermeerderingsbedrijven wordt uitsluitend met wel- of leidingwater gegoten. De stekken worden niet meer gemeenschappelijk op water gezet en het toetsen heeft een grote vlucht genomen. Daarnaast wordt grote aandacht geschonken aan geïmporteerde partijen (in 1955 werd in 40 % van deze zendingen een *Erwinia*-infectie vastgesteld!).

Het aantal besmette bedrijven is dientengevolge de laatste jaren sterk afgenomen. Als deze ontwikkeling zich voortzet, zullen bacterieziekten in anjers in Nederland weldra geen rol van betekenis meer spelen.

SUMMARY

Two species of bacteria can cause a wilt disease of carnations viz. *Pseudomonas caryophylli* Burkh. and *Erwinia parthenii* var. *dianthicola* Hellmers. *P. caryophylli*, which has been found in The Netherlands only occasionally, is not a real danger for the culture of carnations. The *Erwinia* species on the other hand, is more widely distributed and may cause serious damage to carnation plants in all stages of growth.

In a former article (BAKKER & SCHOLTEN, 1955) it was wrongly concluded that the bacterium found in carnations in The Netherlands since 1951 was a somewhat aberrant form of *P. caryophylli*. Later, the results of inoculation experiments made us doubt the correctness of this conclusion. The carnation variety Durango, which according to THOMAS (1954) is completely resistant to *P. caryophylli*, was severely attacked by the bacterium we isolated.

When during the XIVth International Horticultural Congress at Scheveeningen in 1955 we had the opportunity to discuss our experiences with research workers from Denmark and England we found that in these countries, too, a second bacterium causing wilt of carnations had been found viz. a species of *Erwinia*, later named by HELLMERS (1958) *Pectobacterium parthenii* var. *dianthicola*. Upon closer examination our isolate appeared to be identical with this *Erwinia* species. The flagella are not polar as was stated in our first publication, but peritrichous. An indistinct flagellum staining led us astray at the time. We have adopted the name given by HELLMERS on the understanding that we shall maintain for the present the generic name *Erwinia*, this being the one in common use in The Netherlands. The name of the bacterium will thus be *Erwinia parthenii* var. *dianthicola*.

Infection with this species of *Erwinia* causes a stunted growth, especially in young plants, and the plants turn a greenish grey. In plants infected with *P. caryophylli* on the other hand, deep longitudinal cracks arise in the internodes and the wilting process develops rather slowly. In The Netherlands, as well as in the other countries of Western Europe to which it has been introduced, the latter bacterium has not been able to establish itself fully. *E. parthenii* var. *dianthicola*, on the other hand, spreads easily and rapidly and has caused important damage in our country.

To control this disease the method of HELLMERS (1955a,b, 1958) for testing the cuttings has been used. Large numbers of mother plants are now propagated from cuttings tested in this way and they are generally grown in closed propagation benches to prevent the spread of infection through the soil. The cuttings are no longer stood together in water because when this is done, infection may pass between the cuttings via the water. Care is also taken that the water used for spraying is not infected.

Application of these measures has resulted in a sharp decrease of the number of infected nurseries in the last few years. If this development continues, it should not be long before the bacterial diseases of carnations no longer play a prominent part in The Netherlands.

LITERATUUR

- BAKKER, MARTHA & G. SCHOLTEN, - 1955. Een bacterieverwelkingsziekte in Amerikaanse anjers. T.Pl.-ziekten 61: 7-10.
- BURKHOLDER, W. H., - 1942. Three bacterial plant pathogens: *Phytomonas caryophylli* n.sp., *Phytomonas allicola* n.sp., and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthel et Bondar) Viegas. Phytopathology 32: 141-149.
- HELLMERS, E., - 1955a. Bacterial wilt of carnations. Gardeners Chronicle 137 nr. 3567: 194-195.
- HELLMERS, E., - 1955b. Bacterial wilt in carnations and its control. Rep. XIVth Int. hort. Congr., Netherlands: 985-995.
- HELLMERS, E., - 1958. Four wilt diseases of perpetual-flowering carnations in Denmark. Thesis, Copenhagen.
- LELLIOTT, R. A., - 1956. Slow wilt of carnations caused by a species of *Erwinia*. Pl. Pathology 5: 19-24.
- LELLIOTT, R. A. & J. J. E. JENKINS, - 1956. Slow wilt is attacking carnations. Grower 21 Jan.: 155-157.
- SCHOLTEN, G., - 1953-1956. Jaarverslag Proefstation Bloemisterij, Aalsmeer. 1953: 17; 1954: 28-29; 1955: 23-25, 85; 1956: 34-39.
- SCHOLTEN, G., - 1955. Wilting diseases of carnations in the Netherlands. Rep. XIVth Int. hort. Congr., Netherlands: 995-1003.
- SOCIETY AMERICAN BACTERIOLOGISTS, Committee on Bacteriological Technique, - 1954. Manual of Methods for pure culture study of bacteria, Geneva, New York.
- TAMMEN, J., R. R. BAKER & W. D. HOLLEY, - 1956. Control of carnation diseases through the cultured-cutting technique. Pl. Dis. Rep., Suppl. 238: 72-76.
- THOMAS JR., W. D., - 1954. The reaction of several carnation varieties to bacterial wilt. Phytopathology 44: 713-715.