



# Detectie en beheersing van bacterierot veroorzaakt door *Pseudomonas cattleyae* in Phalaenopsis

Daniël Ludeking<sup>1</sup>, Roel Hamelink<sup>1</sup>, Arca Kromwijk<sup>1</sup>, Martijn Schenk<sup>1</sup>, Adriaan Vermunt<sup>2</sup> & Frank Woets<sup>2</sup>



## Referaat

Telers van Phalaenopsis hebben vooral in de opkweekfase last van infecties met de bacterie *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. In de praktijk spreekt men nog vaak over *Pseudomonas*. De bacterie veroorzaakt bladvlekken die bestaan uit zwarte ingezonken plek met een gele rand. In sommige gevallen kan de uitval oplopen tot wel 20%. De bacterieziekte is zeer besmettelijk en wordt door hoge temperaturen en veel vocht in de hand gewerkt. Groen Agro Control heeft in dit project een analysemethode ontwikkeld om de bacteriën met behulp van DNA technieken te detecteren. Tijdens het onderzoek is gekeken naar de invloed van relatieve luchtvochtigheid op de ontwikkeling van *Pseudomonas cattleyae*. Uit de resultaten blijkt dat een relatieve luchtvochtigheid van 90% de bacterieverspreiding enorm stimuleert en dat de mate van de aantasting ook veel ernstiger is dan bij lagere relatieve luchtvochtigheden. Een relatieve luchtvochtigheid van 75% toont geen extra verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* ten opzichte van de verspreiding in een kascompartiment waar een relatieve luchtvochtigheid van continu 60% wordt gerealiseerd. Met deze kennis kan bij de teelt Phalaenopsis een energiebesparing worden gerealiseerd. In dit onderzoek zijn ook de effecten van gietwaterbehandelingen op de verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* bekeken. Uit de resultaten komt een behandeling met waterstofperoxide van 20 ppm als beste naar voren. Deze behandeling is beter dan de onbehandelde controle en de andere behandelingen. Dit onderzoek heeft geleid tot nieuwe inzichten in de verspreiding en optimale groeiomstandigheden van de bacterie, maar geeft ook weer aanleiding tot het stellen van nieuwe vragen. Vragen over andere doseringen en nieuwe gietbehandelingen, maar ook over de uiterste grens voor de relatieve luchtvochtigheid waarbij geen extra verspreiding optreedt zullen in een vervolgonderzoek moeten worden onderzocht.

## Abstract

Phalaenopsis growers suffer from mayor losses up to 20% due to bacterial spot. This bacterial infection is caused by the *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. In practice this bacterial disease is also known as *Pseudomonas*. This bacterium is causing black leaf spots with a yellow border. *Pseudomonas cattleyae* is very contagious and is promoted by high temperatures and moist conditions. In this project Groen Agro Control laboratory (Delfgauw) has developed a molecular analysis method to detect *Pseudomonas cattleyae* in different matrices. The influence of the relative humidity on the development of *Pseudomonas cattleyae* is investigated during this research. The results show that a relative humidity of 90% strongly promotes infection of the bacteria. A relative humidity of 75% shows no extra dispersion of *Pseudomonas cattleyae* compared to a greenhouse compartment with a continuous relative humidity of 60%. This knowledge offers the opportunity to save energy in the cultivation of Phalaenopsis. During this research the effects of water treatments on the dispersion of *Pseudomonas cattleyae* have been investigated. The results show that a treatment with hydrogen peroxide (20 ppm) offers the best reduction of dispersion. This treatment turns out to be better than the control and all other treatments. This research has led to new insights about the dispersal and optimal growing conditions of this bacteria, but leads to new questions. Questions, about other different dosages and the effects of other water treatments, but also about the optimal level to promote plant growth and reduce bacterial infections, have to be investigated in new research.

© 2011 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

## Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk  
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk  
Tel. : 0317 - 48 56 06  
Fax : 010 - 522 51 93  
E-mail : [glastuinbouw@wur.nl](mailto:glastuinbouw@wur.nl)  
Internet : [www.glastuinbouw.wur.nl](http://www.glastuinbouw.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
	1.1 Probleemstelling	7
	1.2 Doel van het onderzoek	7
2	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	9
	2.1 Infectie en verspreiding	9
	2.2 Symptomen en ziekteontwikkeling	9
	2.3 Waardplanten	10
	2.4 Bestrijding	10
	2.4.1 Curatieve gewasbeschermingsmiddelen	10
	2.4.2 Preventieve (hygiënische) maatregelen	10
	2.4.3 Preventieve gewasbeschermingsmiddelen	11
	2.4.3.1 Biologische antagonisten	11
	2.4.3.2 Plantversterkende middelen	11
	2.4.3.3 Ontsmettingsmiddelen	11
3	Verzamelen en inventariseren van <i>Pseudomonas cattleyae</i> op bedrijven, ontwikkelen DNA-toets (Groen Agro Control)	13
	3.1 Materiaal en Methodes	13
	3.1.1 Monsters	13
	3.1.2 DNA-toets	13
	3.1.3 Extractiemethodes	13
	3.2 Resultaten	14
	3.2.1 Specificiteit DNA-toets	14
	3.2.2 Gevoeligheid DNA-toets	15
	3.2.3 Besmettingsbronnen	15
	3.3 Conclusie en Discussie	15
4	Kasexperiment	17
	4.1 Opzet en uitvoering kasexperiment	17
	4.1.1 Gietwaterbehandelingen	17
	4.1.2 Waarnemingen	18
	4.1.3 Relatieve luchtvochtigheid behandelingen	18
	4.1.4 Temperatuur	19
	4.2 Het effect van relatieve luchtvochtigheid op de ontwikkeling en verspreiding van <i>Pseudomonas cattleyae</i> ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> )	20
	4.2.1 Doel van het experiment	20
	4.2.2 Resultaten	20
	4.2.2.1 Effect van relatieve luchtvochtigheid op het aantal aangetaste planten	20
	4.2.2.2 Effect van relatieve luchtvochtigheid op de mate van aantasting bij aangetaste planten	22

4.3	Het effect van gietwaterbehandelingen op de ontwikkeling en verspreiding van <i>Pseudomonas cattleyae</i> ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> )	22
4.3.1	Doel van het experiment	22
4.3.2	Resultaten	23
4.3.2.1	Effect van de waterbehandelingen op het aantal aangetaste planten	23
4.3.2.2	Effect van de waterbehandelingen op de mate van aantasting	24
4.4	Het effect van de cultivar op de ontwikkeling en verspreiding van <i>Pseudomonas cattleyae</i> ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> )	25
4.4.1	Doel van het onderzoek	25
4.4.2	Resultaten	25
4.4.2.1	Effect van Phalaenopsis cultivars op het aantal aangetaste planten	25
4.4.2.2	Effect van Phalaenopsis cultivars op de mate van aantasting	26
5	Conclusies en discussie	27
5.1	Conclusies	27
5.1.1	Het effect van relatieve luchtvochtigheid op de ontwikkeling en verspreiding van <i>Pseudomonas cattleyae</i> ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> )	27
5.1.2	Het effect van gietwaterbehandelingen op de ontwikkeling en verspreiding van <i>Pseudomonas cattleyae</i> ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> )	27
5.1.3	Het effect van de cultivar op de ontwikkeling en verspreiding van <i>Pseudomonas cattleyae</i> ( <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> )	28
5.2	Discussie	28
6	Literatuur	31

# Samenvatting

Telers van Phalaenopsis hebben vooral in de opkweekfase last van infecties met de bacterie *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. Voorheen was deze bacterie bekend onder de naam *Pseudomonas cattleyae*, maar na een nadere taxonomische analyse is de naam in 1992 gewijzigd. In de praktijk spreekt men nog vaak over *Pseudomonas*. De bacterie veroorzaakt bladvlekken die zich snel kunnen verspreiden in een gewas. De vlekken bestaan uit zwarte ingezonken plek met een gele rand. In sommige gevallen kan de uitval in de praktijk oplopen tot wel 20%.

De bacterieziekte is zeer besmettelijk en wordt door hoge temperaturen en veel vocht in de hand gewerkt.

Groen Agro Control heeft in dit project een analysemethode ontwikkeld om de bacteriën met behulp van DNA technieken te detecteren.

Tijdens het onderzoek is gekeken naar de invloed van relatieve luchtvochtigheid op de ontwikkeling van *Pseudomonas cattleyae*. Uit de resultaten blijkt dat een relatieve luchtvochtigheid van 90% de bacterieverspreiding enorm stimuleert en dat de mate van de aantasting ook veel ernstiger is dan bij lagere relatieve luchtvochtigheden. Ook als er een relatieve luchtvochtigheidsregime van 3 dagen 90% en daarna geleidelijk afbouwend naar 60% wordt gehandhaafd in een kascompartiment, kan worden gezegd dat de verspreiding van de bacterie gestimuleerd wordt.

Een relatieve luchtvochtigheid van 75% toont geen extra verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* ten opzichte van de verspreiding in een kascompartiment waar een relatieve luchtvochtigheid van continu 60% wordt gerealiseerd. Als gevolg van dit resultaat vervalt de noodzaak voor de telers om de relatieve luchtvochtigheid na een gietbeurt snel terug te brengen naar een waarde van rond de 60% en kan vooral in de opkweekfase van Phalaenopsis een energiebesparing worden gerealiseerd. In de opkweekfase van de teelt kan er zo 2 m<sup>3</sup> gas/m<sup>2</sup>/jaar worden bespaard. Voor de koeling- en afkweekfase, waar de planten voor bloeminductie koeler worden geteeld, is dat 0,2 m<sup>3</sup> gas/m<sup>2</sup>/jaar.

In dit onderzoek zijn ook de effecten van gietwaterbehandelingen op de verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* bekeken. Uit de resultaten komt een behandeling met waterstofperoxide van 20 ppm als beste naar voren. Deze behandeling is beter dan de onbehandelde controle en de andere behandelingen.

Dit onderzoek heeft geleid tot nieuwe inzichten in de verspreiding en optimale groeicondities van de bacterie, maar geeft ook weer aanleiding tot het stellen van nieuwe vragen. Vragen over andere doseringen en nieuwe gietbehandelingen, maar ook over de uiterste grens voor de relatieve luchtvochtigheid waarbij geen extra verspreiding optreedt zullen in een vervolgonderzoek moeten worden onderzocht.





# 1 Inleiding

## 1.1 Probleemstelling

Phalaenopsis-telers hebben in de opkweekfase (bij hoge teelttemperaturen) last van infecties met de bacterie *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. Voorheen was deze bacterie bekend onder de naam *Pseudomonas cattleyae*, maar na een nadere taxonomische analyse is de naam sinds 1992 gewijzigd. In de praktijk spreekt men nog vaak over *Pseudomonas*. Omdat in de praktijk nog steeds de naam *Pseudomonas* gebruikt wordt en iedereen met deze naam bekend is, wordt er in dit verslag vastgehouden aan de 'oude' en in de praktijk gangbare naam.

*Acidovorax* species komen voor in grond, water en plantmateriaal. De optimale temperatuur ligt tussen de 30 en 35 °C (Willems et al, 1992). Deze bacterie kan in korte tijd een plant in het geheel aantasten. Kenmerkend voor de symptomen op het blad zijn zwarte ingezonken lesions, omrand met een gele zone. Op sommige bedrijven kan de uitval door deze bacterie oplopen tot 20% van de planten. Het probleem is groter bij kwekers met semigesloten afdelingen, enerzijds doordat ze minder ventileren dan hun collega's om energiezuinig te kunnen telen en anderzijds doordat ze vanwege de verminderde ventilatie geen gebruik willen maken van gangbare ontsmettingsmethodes.

Wat de herkomst van een initiële aantasting is en hoe de bacterie zich in de kas vestigt en verspreidt, is onbekend. In de meeste gevallen bestaat wel een vermoeden waar de aantasting vandaan komt, maar het vermoeden is niet te onderbouwen met analyses of wetenschappelijke kennis. In de praktijk leeft het idee dat de aanwezigheid van *Pseudomonas* in de kas verband houdt met de herkomst van de planten (plantenleverancier), substraat, water of zieke planten die al op het bedrijf aanwezig zijn. De indruk bestaat het kasklimaat, maar ook de 'hardheid' van de planten een rol spelen bij de ontwikkeling van de ziekte in het gewas. Om de besmettingsbron van *Pseudomonas* aan te kunnen wijzen is het noodzakelijk een snelle, specifieke en betrouwbare test te ontwikkelen. Deze test moet drie matrices kunnen analyseren: plantmateriaal, bark en water. Een DNA analysemethode is hiervoor het meest geschikt.

*Pseudomonas* is zeer besmettelijk en kan zich snel verspreiden over een kas. Er zijn meerdere routes denkbaar waarlangs de bacterie zich kan verspreiden. Welke routes belangrijk zijn bij de verspreiding in de praktijk is nog onduidelijk. De eerste route van bacterieverspreiding loopt via besmet (drain)water. De tweede besmettingsroute is dat de bacterie zich verspreidt via opspattende druppels tijdens het bovenlangs watergeven. Zijn deze druppels afkomstig van besmette planten dan kan de bacterie zich hierin bevinden. Hogere RV's als gevolg van isolerende kasdekken (stegdoppel) en het vrije water op het blad na de watergift (duurt langer voordat het gewas weer droog is) maken het gemakkelijker voor de bacterie om zich te verspreiden. Een derde route van verspreiding zou mogelijk ook nog via gewashandelingen kunnen zijn, zoals bv. het wegsnijden van voortakken of onvoldoende zorgvuldigheid (hygiëne) bij het verwijderen van aangetaste planten. Tenslotte bestaat de mogelijkheid dat de bacterie zich vanuit besmet bark kan verspreiden.

De aanleiding voor dit onderzoek is dat in de praktijk deze bacterie ziekte alom verspreid is en dat een groot deel van het klimaat, de teelt en het hygiëne beleid wordt bepaald door de mogelijke kans op infectie met *Pseudomonas*. Dit geeft aanleiding om in een onderzoek te kijken naar mogelijke verspreiding, detectie en voorkoming van de infectie ziekte.

## 1.2 Doel van het onderzoek

Het doel van het onderzoek is het ontwikkelen van een goede preventiestrategie en een goede ontsmettingsmethode om de verspreiding van de bacterie *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* in te perken. Daarbij is het van belang dat de toegepaste ontsmettingsmethode geen negatieve impact heeft op de werkomstandigheden in de kas.





## 2 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

Het onderwerp van dit onderzoek is de bacterie *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Pavarino) in de praktijk beter bekend als *Pseudomonas cattleyae*. In 1992 is er gekozen om de naam *Pseudomonas cattleyae* aan te passen in de taxonomie, waarna de bacterie de officiële naam *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Pavarino) heeft gekregen. Op basis van DNA onderzoek is bepaald dat er een sterke genetische verwantschap bestaat tussen de bacterie en de bacterie *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en is de bacterie taxonomisch gereclassificeerd (Willems *et al.* 1992). Echter in de praktijk, bij de teelt van orchidee staat het ziekte beeld veroorzaakt door de bacterie beter bekend als '*Pseudomonas*'-aantasting.

### 2.1 Infectie en verspreiding

*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Pavarino) is een staafvormige bacterie. De bacterie groeit op de meeste media uit als een witte tot crème-achtige kolonie en is niet fluorescent. De bacterie is mobiel en heeft 1-2 flagellen. *Acidovorax* is zuurstofminnend (Aeroob). De optimale temperatuur voor de groei van de bacterie ligt tussen de 25 en 35 °C, bij een temperatuur van 48 °C stopt de groei en ontwikkeling.

Plantpathogene bacteriën verspreiden zich gemakkelijk via geïnfecteerd plantmateriaal, water, lucht (aerosolen) en via de grond. In het algemeen kan worden gezegd dat bacteriën zich eenvoudig vermeerderen door deling. De snelheid van deze deling is sterk afhankelijk van temperatuur, vocht en voeding. Onder optimale omstandigheden kan de groei exponentieel toenemen. Dit geldt ook voor *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Pavarino); een hoge temperatuur en klimaatsomstandigheden die zorgen voor lange vochtige periodes, werken de bacterie waarschijnlijk in de hand.

### 2.2 Symptomen en ziekteontwikkeling

De eerste tekenen van een infectie zijn vaak kleine ingezonken zones ter grootte van een millimeter. Deze zones hebben soms een wat donkerder uiterlijk ten opzichte van de kleur van de rest van het blad. Ook kunnen deze eerste plekje een waterig uiterlijk vertonen. Vervolgens wordt het groepje van cellen donkerbruin tot zwart van kleur.

In een later stadium zullen aangrenzende cellen afsterven, een eerste teken daarvan is een felgele rand rond om de zwarte vlekken. De initiële infectie zal groter worden en het aantal vlekken op het blad zal toenemen. De vlekken liggen ingezonken in het blad en hebben over het algemeen een ingedroogd uiterlijk. Vervolgens zullen de vlekken nat en zacht worden en beginnen te rotten als gevolg van secundaire infecties. De plant zal sterven als het groeipunt wordt geïnfecteerd door de bacterie.

Over het algemeen vindt er verspreiding naar andere bladeren plaats vanuit het blad dat het eerst wordt aangetast.



Afbeelding 1-4. Diverse stadia van *Pseudomonas cattleyae* in *Phalaenopsis* (foto's: Wageningen UR Glastuinbouw).

## 2.3 Waardplanten

De problemen in de Nederlandse tuinbouw spitsen zich voornamelijk toe op de teelt van *Phalaenopsis* soorten en hybriden. Daarbij speelt het feit dat het areaal *Phalaenopsis* het grootst is ook een rol. Maar ook andere orchideeën soorten, zoals *Cambria*, *Oncidium*, *Cattleya*, *Vanda*, *Miltonia*, *Cypripedium*, *Dendrobium* en *Vanilla* soorten kunnen gevoelig zijn voor *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*.

## 2.4 Bestrijding

### 2.4.1 Curatieve gewasbeschermingsmiddelen

Er zijn geen middelen voor handen die bacteriën in een geïnfecteerde plant kunnen doden of de groei van de bacterie kunnen stoppen en daarmee de ontwikkeling van symptomen kunnen beperken. De bacterie is niet te behandelen zonder voor het gewas destructieve maatregelen te nemen.

### 2.4.2 Preventieve (hygiënische) maatregelen

Bij plantenziekten die te maken hebben met bacteriën is de rol van hygiënisch werken van enorm belang. Als de bacterie de plant eenmaal is binnengedrongen, is herstel van de plant niet meer mogelijk. Daarom moet de nadruk liggen op preventieve (hygiënische) handelingen om een infectie te voorkomen. Bij hygiënische maatregelen kan gedacht worden aan: Werkoppervlakken, vloeren en teelttafels schoonhouden, regelmatig ontsmetten en starten met gezond uitgangsmateriaal. Als er zieke planten zijn aangetroffen op het bedrijf is het noodzakelijk aangetaste planten direct in zakken van het bedrijf verwijderen en de hygiënemaatregelen nog verder aanscherpen.

Andere preventieve maatregelen kunnen bestaan uit maatregelen die de bacterie mogelijk kans geven om te verspreiden, zich in stand te houden of te vermeerderen. Hierbij kan gedacht worden aan teeltwijze, teelttechnieken, teeltsystemen en klimaatsomstandigheden in de kas. In dit onderzoek is het effect van vocht op de ontwikkeling van *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* onderzocht.

## 2.4.3 Preventieve gewasbeschermingsmiddelen

### 2.4.3.1 Biologische antagonisten

Op dit moment is er geen kennis over de mogelijkheid om met biologische antagonisten een aantasting met *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* te voorkomen. Er zijn middelen op basis van verschillende *Pseudomonas* soorten die worden toegepast in andere teelten en die potentie hebben, maar daar is in relatie tot *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* nog geen ervaring mee opgedaan. Geen van deze antagonisten hebben een toelating voor de teelt van potplanten.

### 2.4.3.2 Plantversterkende middelen

Er worden diverse middelen als plantversterker of weerstandverhogend preparaat op de markt gebracht. In relatie tot *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* zijn geen ervaringen opgedaan met plantversterkende middelen. In dit onderzoek wordt wel gekeken naar de effecten van een aangepaste stikstof-gift en aangepaste pH in relatie tot de ontwikkeling van de bacterie. Door aanpassingen te doen in de concentratie van bepaalde voedingselementen, EC of pH kunnen planten worden versterkt en de omstandigheden voor een optimale bacteriegroei worden verstoord.

### 2.4.3.3 Ontsmettingsmiddelen

Ontsmettingsmiddelen kunnen worden gebruikt om teeltsystemen te reinigen en weer gebruiksklaar te maken voor vervolgteelten. Daarnaast worden veel chemische ontsmettingsmiddelen gebruikt om water te ontsmetten en daarmee te voorkomen dat water een bron van verspreiding is voor de bacterie. De meest toegepaste middelen vallen onder een van de volgende groepen. De meeste middelen of methoden hebben geen toelating als gewasbeschermingsmiddel en mogen als zodanig ook niet worden ingezet. Alleen Menno Clean is toegelaten als gewasbeschermingsmiddel, alle andere hieronder genoemde stoffen hebben een biocide -'status'.

1. Waterstofperoxide (Jet 5 en andere waterstofperoxide houdende verbindingen)
2. Natriumhypochloriet
3. Chloordioxide
4. Menno Clean (benzoëzuur)
5. Virkon (kaliummonoperoxisulfaat)
6. Quaternaire ammonium verbindingen
7. Elektrochemisch water zoals Aquanox, ECA water, Aquahort (Elektrolytische reactie met water en keukenzout, koper, zilver, etc.)

Op gladde en schone oppervlakken en in water werken in potentie alle ontsmettingsmiddelen goed tegen bacteriën. Bacteriën zijn eenvoudig qua structuur en de celwand is daarom gemakkelijk te beschadigen waardoor de bacteriën zullen worden gedood. Echter dit is altijd afhankelijk van de mate van vervuiling, de matrix waarin de bacterie zich bevindt en de toegepaste dosering van het ontsmettingsmiddel.

Ook als ontsmettingsmiddelen worden gebruikt om verspreiding tijdens watergift te voorkomen vallen een aantal middelen al af op basis van hun invloed op het gewas. Dit zijn vooral de middelen met een langere duurwerking zoals benzoëzuur. In dit onderzoek is het effect van waterstofperoxide, natriumhypochloriet en chloordioxide op de verspreiding van *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* onderzocht.



## **3 Verzamelen en inventariseren van *Pseudomonas cattleyae* op bedrijven, ontwikkelen DNA-toets (Groen Agro Control)**

Groen Agro Control heeft als onderdeel van dit project (fase 1) een DNA toets voor *Pseudomonas cattleyae* ontwikkeld. Bij deze toets zijn ook drie extractiemethoden voor drie verschillende matrices (materiaal waarop de bacterie zich bevindt) ontwikkeld. Daarnaast zijn op een drietal teeltbedrijven monsters van jonge planten, drain-, bassin- en regenwater en bark genomen om mogelijke besmettingsbronnen in kaart te brengen. Twee van deze bedrijven werken met een chloordioxide-ontsmetter en de derde werkt zonder ontsmettingsapparaat. De monsters zijn met de DNA-toets getest op aanwezigheid van *Pseudomonas*. De ontwikkelde DNA-analyse is in het vervolg van dit project ook gebruikt om besmettingen te bevestigen.

### **3.1 Materiaal en Methoden**

#### **3.1.1 Monsters**

Op enkele bedrijven zijn door *Pseudomonas* aangetaste planten verzameld. De planten zijn gebruikt in het ontwikkelen van de DNA-toets. Daarnaast zijn op een drietal bedrijven monsters genomen van bark (ongebruikt), jonge planten, water uit de regenleiding, uit het regenbassin en van het drainwater om mogelijke besmettingsbronnen te achterhalen. De op de teeltbedrijven bemonsterde jonge planten waren afkomstig van twee vermeerderaars en hadden allen een aantasting. Omdat deze aantasting klein (en jong) was is het niet mogelijk om visueel *Pseudomonas* vast te stellen. De aantastingen waren veelal gelig van kleur, “terug gekleurd”, of zij hadden een bruin ingezakt centrum of lichte verkurking.

#### **3.1.2 DNA-toets**

Als DNA-techniek is real-time PCR gebruikt om de toets voor *Pseudomonas cattleyae* op te zetten. Sequenties (nucleotidenvolgorde DNA) van verschillende stammen *Pseudomonas cattleyae* en andere bacteriën zijn vergeleken. PCR-primers zijn ontwikkeld op basis van overkomsten tussen de verschillende stammen van *Pseudomonas cattleyae* en verschillen met andere bacteriën. Verschillende sets aan primers zijn getest op specificiteit en gevoeligheid.

#### **3.1.3 Extractiemethoden**

Waarschijnlijke materialen waarop of waarin de bacterie zich kan bevinden zijn: plantmateriaal, water en bark. Hiervoor zijn drie afzonderlijke extractiemethoden ontwikkeld. Voor plantmateriaal met symptomen worden stukjes symptomatisch materiaal verzameld, waarop direct een DNA-extractie wordt uitgevoerd. Het opgezuiverde DNA kan gebruikt worden in de real-time PCR om *Pseudomonas cattleyae* te detecteren. Van planten zonder symptomen worden bladeren verzameld en gewassen met een buffer. De wasbuffer wordt gefiltreerd om de bacteriën te verzamelen. Watermonsters worden ook gefiltreerd. Na filtratie bevinden de bacteriën zich op het filter waarop een DNA-extractie uitgevoerd kan worden. Barkmonsters worden ook eerst gewassen met een buffer. De bacteriën worden hier verzameld door centrifugatie waarna een DNA-extractie uitgevoerd kan worden op de verzamelde bacteriën.

## 3.2 Resultaten

### 3.2.1 Specificiteit DNA-toets

De DNA toets die ontwikkeld is reageert positief op *Pseudomonas cattleyae*, en negatief op verwante organismen. Tabel 1. geeft weer op welke organismen de DNA-toets negatief reageert. De toets laat geen kruisreactie zien met *Phalaenopsis*. De DNA toets is vervolgens getest op monsters van visueel aangetaste planten op vier verschillende praktijkbedrijven (zie Tabel 2.). De toets geeft een positieve uitslag (toont de besmetting aan) voor alle vier monsters. Hiermee is tevens bevestigd dat de toets *Pseudomonas* daadwerkelijk detecteert die bij verschillende praktijkbedrijven heerst.

Tabel 1: Lijst van organismen waarop getoetst is.

Organisme	resultaat
<i>Pseudomonas cattleyae</i> LMG 2364	positief
<i>Acidovorax citrulli</i>	negatief
<i>Acidovorax defluvii</i>	negatief
<i>Acidovorax anthurii</i>	negatief
<i>Acidovorax avenae</i>	negatief
<i>Pseudomonas syringae</i>	negatief
<i>Pseudomonas cichorii</i>	negatief
<i>Pseudomonas corrugata</i>	negatief
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	negatief
<i>Pseudomonas</i> sp.	negatief
<i>Xanthomonas fragariae</i>	negatief
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	negatief
<i>Erwinia cypripedii</i>	negatief
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	negatief
<i>Phytophthora cryptogea</i>	negatief
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	negatief
<i>Phalaenopsis</i>	negatief
<i>Gerbera</i>	negatief
<i>Arabidopsis</i>	negatief
<i>Pythium ultimum</i>	negatief
<i>Myrothecium roridum</i>	negatief
<i>Rhizoctonia fragariae</i>	negatief
Positief: de DNA-toets toont <i>Pseudomonas</i> aan	
negatief: de DNA-toets toont <i>Pseudomonas</i> niet aan	

Tabel 2. Monsters van de praktijkbedrijven die getoetst zijn op *Pseudomonas*.

herkomst	Stam	Resultaat
bedrijf 1	MDI091026327	Positief
bedrijf 2	MDI100108165	Positief
bedrijf 4	MEX091028388	Positief
bedrijf 7	MDI100216299	Positief
De bedrijven zijn anoniem weergegeven, namen zijn bekend bij de onderzoekers.		

## 3.2.2 Gevoeligheid DNA-toets

Met deze test kan *Pseudomonas* ook aangetoond worden op planten die (nog) niet aangetast zijn, maar al wel besmet zijn. Dit is aangetoond met symptoomloze planten afkomstig van een praktijkbedrijf, deze planten hadden naast een zichtbaar aangetaste plant gestaan.

Drie verschillende extractiemethoden voor blad-, water- en barkmonsters zijn geoptimaliseerd. Verschillende wasbuffers en concentratiemethoden zijn uitgetest. De beste condities zijn gebruikt om besmettingsbronnen te achterhalen. De detectiegrens van de toets ligt rond de 300 bacteriën in het te testen monster.

## 3.2.3 Besmettingsbronnen

Op een drietal teeltbedrijven zijn monsters van het drain-, bassin- en regenwater, bark en jonge planten genomen om mogelijke besmettingsbronnen in kaart te brengen. De watermonsters testten, op een drainwatermonster van bedrijf 2 na, allemaal negatief voor *Pseudomonas*. De ontsmetting op bedrijf 2, waar het drainmonster positief is bevonden, werkte afdoende omdat in het recirculatie water geen *Pseudomonas* gedetecteerd is. In geen enkel monster van ongebruikte bark van de teeltbedrijven is *Pseudomonas* gevonden. Wel is er *Pseudomonas* aangetoond op bark uit een pot van een zwaar aangetaste plant. Op de monsters van jong plantmateriaal is geen *Pseudomonas* aangetoond.

## 3.3 Conclusie en Discussie

De DNA-toets is ontwikkeld met behulp van *Pseudomonas*-aantastingen op de teeltbedrijven en is voldoende specifiek om te gebruiken in praktijksituaties. De toets is voor alle partijen in de tuinbouw beschikbaar. De DNA-toets is niet alleen voor *Phalaenopsis*-telers bruikbaar, maar ook voor telers van andere orchideeën.

De DNA-toets is voldoende gevoelig om *Pseudomonas* aan te tonen op symptoomloze planten. Dit maakt de toets bruikbaar om niet aangetaste planten te testen op de aanwezigheid van *Phalaenopsis*. De algemeen geldende opvatting dat *Pseudomonas* met het jong plantmateriaal meegeleverd wordt kon in dit onderzoek niet hard gemaakt worden, ondanks dat de bemonstering gericht was op aangetaste plantjes.

De meest waarschijnlijke infectiebronnen zijn de zieke planten die op de tuin staan. Het spatwater verspreidt tijdens het watergeven de bacterie. Rondom een besmette plant ontstaat een groeiende cirkel van aangetaste planten. De bacterie is op bark van besmette planten teruggevonden, dat maakt de bark onder de rolcontainers, waar zieke planten gestaan hebben, verdacht. Om besmettingsbronnen op een bedrijf te achterhalen is het mogelijk om planten, water en bark te toetsen.



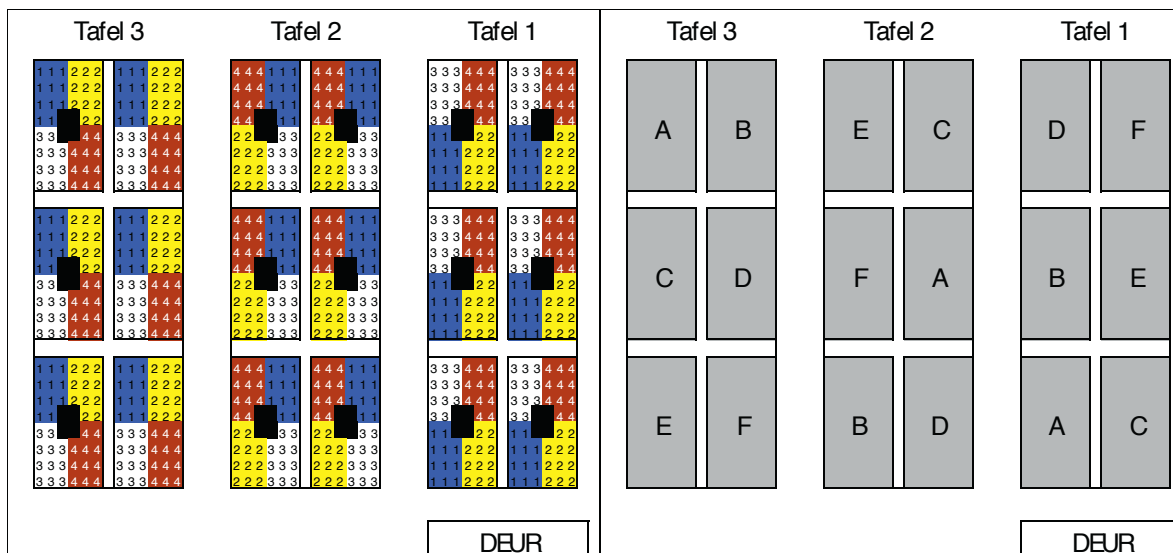


# 4 Kasexperiment

## 4.1 Opzet en uitvoering kasexperiment

Het experiment is uitgevoerd in 5 zogenaamde airco-kascompartimenten in het complex van Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk. Per compartiment zijn 3 roltafels geplaatst met op elke tafel 6 groepen van 6 bij 8 planten. De middelste 4 posities zijn vrijgehouden. In het vrije centrum zijn bij de start van het experiment 2 zwaar met *Pseudomonas* geïnfecteerde planten geplaatst. Deze twee zwaar geïnfecteerde planten dienden als besmettingsbron voor de onbesmette planten. Bij de start van het experiment is van elk van de gezonde planten 1 blad op de nerf gevouwen om de kans op infectie te vergroten.

Elke groep van 44 gezonde planten was opgebouwd uit 4 verschillende cultivars (4 maal 11 planten). Het ging om de Phalaenopsis cultivars "Sun Passat", "Inspiration", "Golden Jaguar" en "Exception". De diverse cultivars zijn door telers ter beschikking gesteld voor het experiment.



Figuur 1. Schematische weergave van de verdeling van de planten over de tafels per compartiment. Blauw (1) "Exception", Geel (2) "Golden Jaguar", Wit (3) is "Sun Passat" en Bruin (4) Inspiration.

### 4.1.1 Gietwaterbehandelingen

De 6 groepen kregen gedurende de looptijd van het experiment ontsmet gietwater met een standaard bemesting met daaraan toegevoegd een behandeling. De behandelingen zijn samen met de leden van de beoordelingscommissie onderzoek (BCO) bepaald en komen overeen met de gemiddeld gebruikte doseringen in de praktijk. De behandelingen bestonden uit:

- A. Waterstofperoxide (20 ppm)
- B. Chloordioxide (0,3 ppm)
- C. Natriumhypochloriet (2 ppm)
- D. Aangepaste pH 4,5
- E. Aangepaste stikstofgift (8 mmol/liter)
- F. Onbehandelde controle

Per compartiment wordt elke behandeling 3 maal herhaald. De behandelingen liggen geward over de tafels. Ook de cultivars zijn geward. De behandelingen zijn toegevoegd aan de standaard voedingsoplossing in voorraadbakken die waren geplaatst in de corridor voor de kascompartimenten. Voor elke gietbeurt zijn de voorraadvaten gevuld en zijn de gewenste doseringen van het middel toegevoegd, is het stikstofniveau op 8 mmol gebracht en de pH op 4,5. De groepen A-F zijn wekelijks handmatig gegoten. Er is daarbij gestreefd naar kleine gietbeurten, waarbij opzettelijk spatwater van de geïnfecteerde planten op de onbesmette planten terecht is gekomen.

Om verspreiding van het spatwater tussen de behandelingen te voorkomen is er een fysieke scheiding tussen de verschillende groepen op de tafel aangebracht in de vorm van schermen van 50 cm hoog (zie ook afbeelding 5).



Afbeelding 5. Inrichting van de kascompartimenten (foto: Wageningen UR Glastuinbouw).

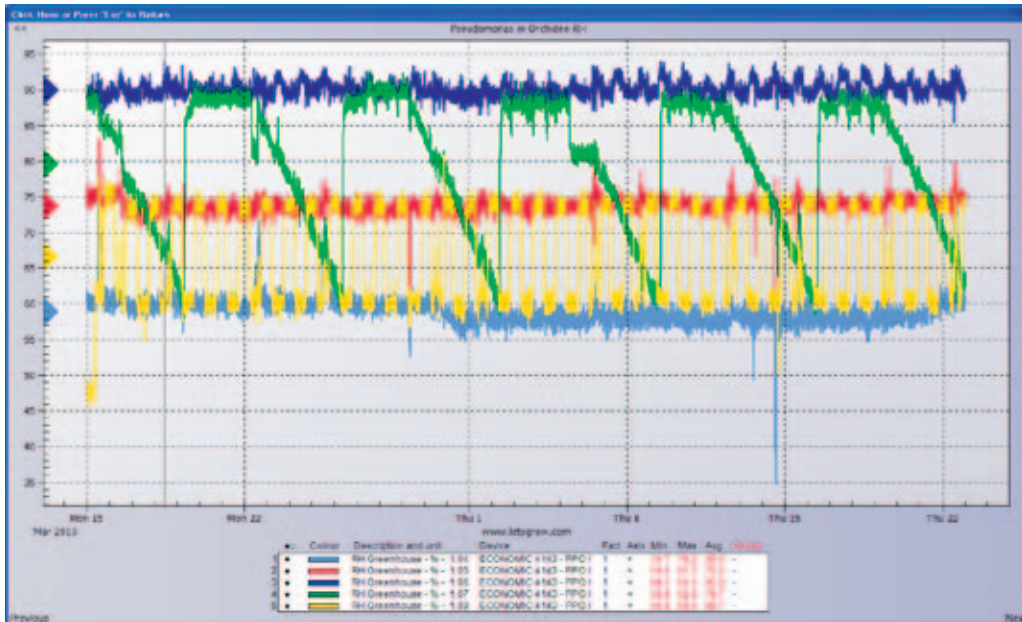
## 4.1.2 Waarnemingen

Het experiment heeft 10 weken geduurd. Gedurende het experiment zijn de planten wekelijks beoordeeld. Het aantal aangetaste planten is per positie, behandeling en cultivar geregistreerd. Daarnaast is aan het einde van het experiment ook de mate van aantasting gescoord. De mate aantasting is geclassificeerd van 0 tot en met 9, waarbij klasse 0 geen aantasting en klasse 9 geheel uitgevallen planten vertegenwoordigde.

## 4.1.3 Relatieve luchtvochtigheid behandelingen

Elk van de 5 kascompartimenten heeft een eigen vaste relatieve luchtvochtigheid of een variabele luchtvochtigheid behandeling.

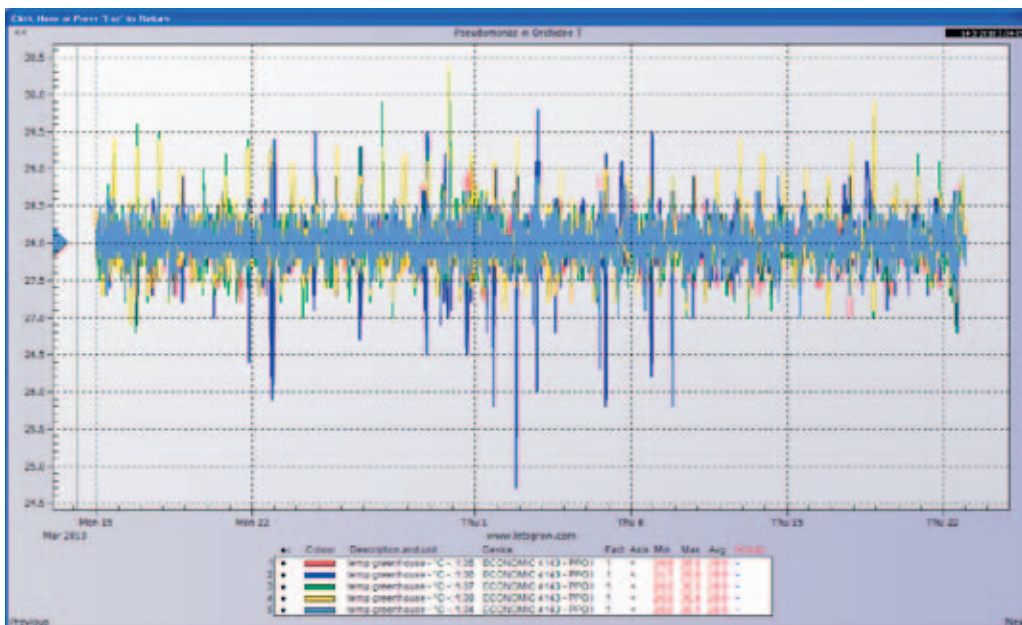
- Kascompartiment 1.04 is gezet op een vaste relatieve luchtvochtigheid van 60%
- Kascompartiment 1.05 is gezet op een vaste relatieve luchtvochtigheid van 75%
- Kascompartiment 1.06 is gezet op een vaste relatieve luchtvochtigheid van 90%
- Kascompartiment 1.07 is ingesteld op 3 dagen relatieve luchtvochtigheid van 90% en daarna geleidelijke afbouw naar een relatieve luchtvochtigheid van 60% gedurende de rest van de week.
- Kascompartiment 1.08 is ingesteld op een relatieve luchtvochtigheid van 60% tijdens de dag en 75% gedurende de nacht.



Figuur 2. Realisatie van ingestelde relatieve luchtvochtigheden gedurende het experiment

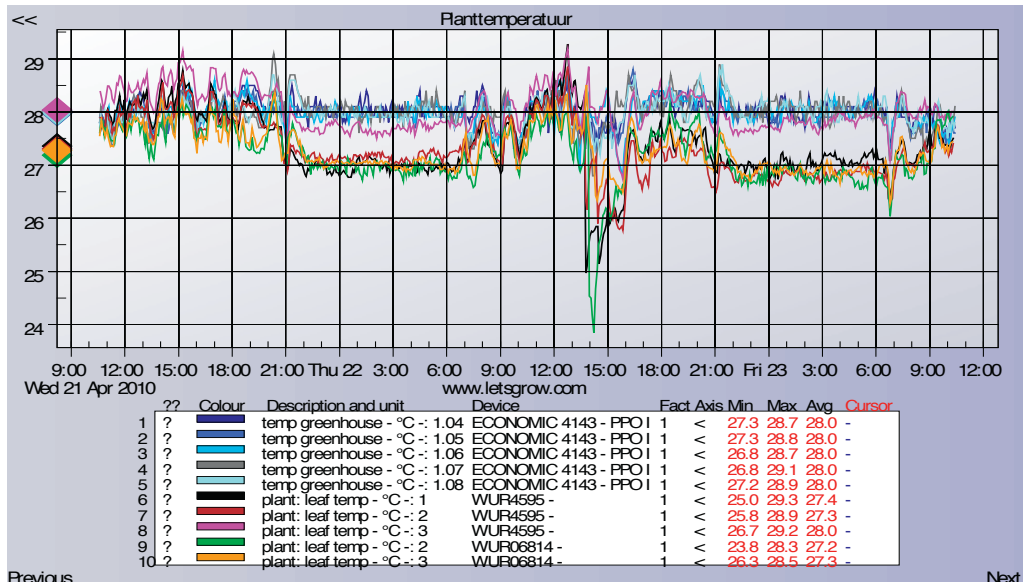
#### 4.1.4 Temperatuur

De temperatuur is gemiddeld op 28 °C ingesteld voor alle 5 kascompartimenten. Aan de hand van de onderstaande Figuur 3. is te zien dat de gemiddelde kastemperatuur voor alle compartimenten op 28 °C is uitgekomen.



Figuur 3. Gemiddelde temperatuur in de 5 kascompartimenten.

In elk compartiment is ook de planttemperatuur gemonitord. Er zijn geen grote verschillen tussen de gemiddelde planttemperatuur en de gemiddelde kasttemperatuur vast te stellen (Figuur 3. en 4). De afwijking is maximaal 0.6 °C in compartiment 1.07 (3 dagen RV 90% en daarna geleidelijk naar een RV van 60%). Alleen bij de behandeling met continu 90% RV is de planttemperatuur gemiddeld gelijk aan de temperatuur in het compartiment. Bij alle andere RV behandelingen ligt de planttemperatuur een fractie lager dan de omgevingstemperatuur.



Figuur 4. Gemiddelde planttemperaturen in de 5 kascompartimenten.

## 4.2 Het effect van relatieve luchtvochtigheid op de ontwikkeling en verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

### 4.2.1 Doel van het experiment

Het doel van het experiment is het verkrijgen van kennis over de omstandigheden die de groei en verspreiding van de bacterie *Pseudomonas* stimuleren. In het experiment is gekeken naar de effecten van relatieve luchtvochtigheid op de ontwikkeling en verspreiding van de bacterie. In de praktijk wordt ook extra gestookt om de relatieve luchtvochtigheid snel terug te brengen naar een relatieve luchtvochtigheid van 60%. Door te bepalen bij welke relatieve luchtvochtigheid extra uitbreiding van de symptomen plaats vindt, kan een ondergrens worden bepaald die mogelijk hoger ligt dan de gebruikelijke 60%. Een hogere relatieve luchtvochtigheid zorgt voor meer groei en minder verbruik van energie.

### 4.2.2 Resultaten

#### 4.2.2.1 Effect van relatieve luchtvochtigheid op het aantal aangetaste planten

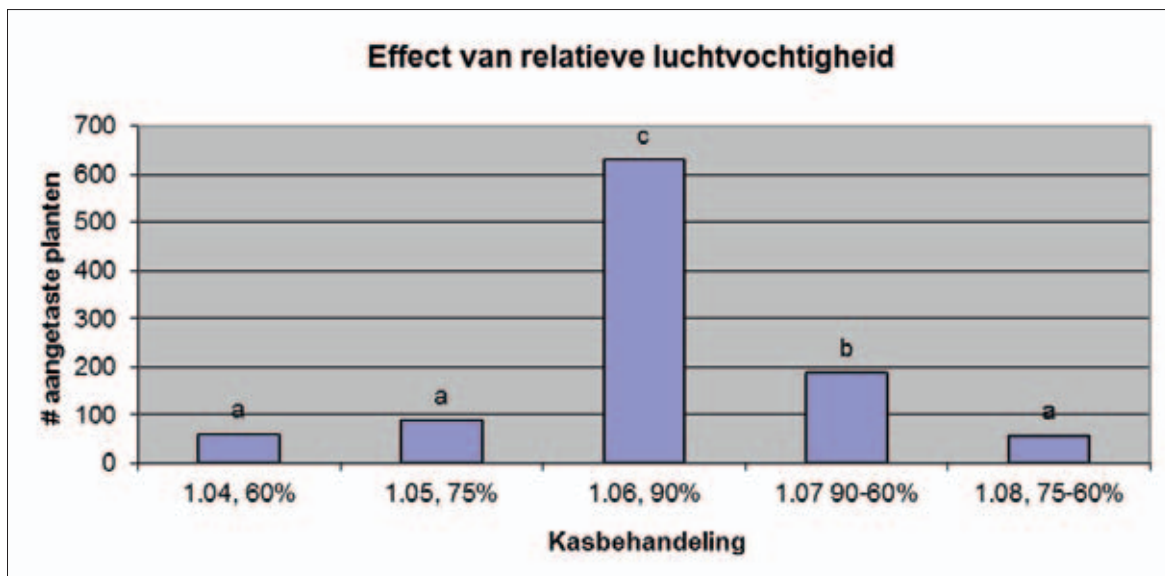
Uit de resultaten is een duidelijk effect waarneembaar van de hoogte van de relatieve luchtvochtigheid op de verspreiding van de bacterie *Pseudomonas cattleyae*. De verspreiding van bacteriën is bij planten die een continue of een behandeling van 3 dagen met een relatieve luchtvochtigheid van 90% hebben ondergaan hoger dan bij de overige 3 behandelingen waarbij de relatieve luchtvochtigheid niet hoger is dan 75%.



Afbeelding 7. Zwaar aangetaste planten (RV 90%) (foto: Wageningen UR Glastuinbouw).

Vooraf bij de behandeling waarbij de planten voortdurend bij 90% relatieve luchtvochtigheid stonden, ging de verspreiding zeer snel en werden de meeste aangetaste planten waargenomen. Dit gold ook voor alle toegepaste behandelingen (zie hoofdstuk 4.3). Al bij de eerste waarneming op 13 april 2010 worden de meeste aantastingen (81) in kascompartiment 1.06 (RV 90%) waargenomen.

Het effect van relatieve luchtvochtigheid is duidelijk waarneembaar in Figuur 5, waarbij de verschillen tussen kascompartiment 1.06, waar een continue relatieve luchtvochtigheid van 90% werd gehandhaafd en de andere behandelingen worden getoond. Ook de behandeling, waarbij gedurende 3 dagen een relatieve luchtvochtigheid van 90% werd aan gehouden, verschilt significant van de behandelingen waarbij maximaal 75% werd aangehouden. Tussen de behandelingen van een continue relatieve luchtvochtigheid van 60%, 75% en schommelingen tussen een RV van 60% en 75% zijn geen significante verschillen.

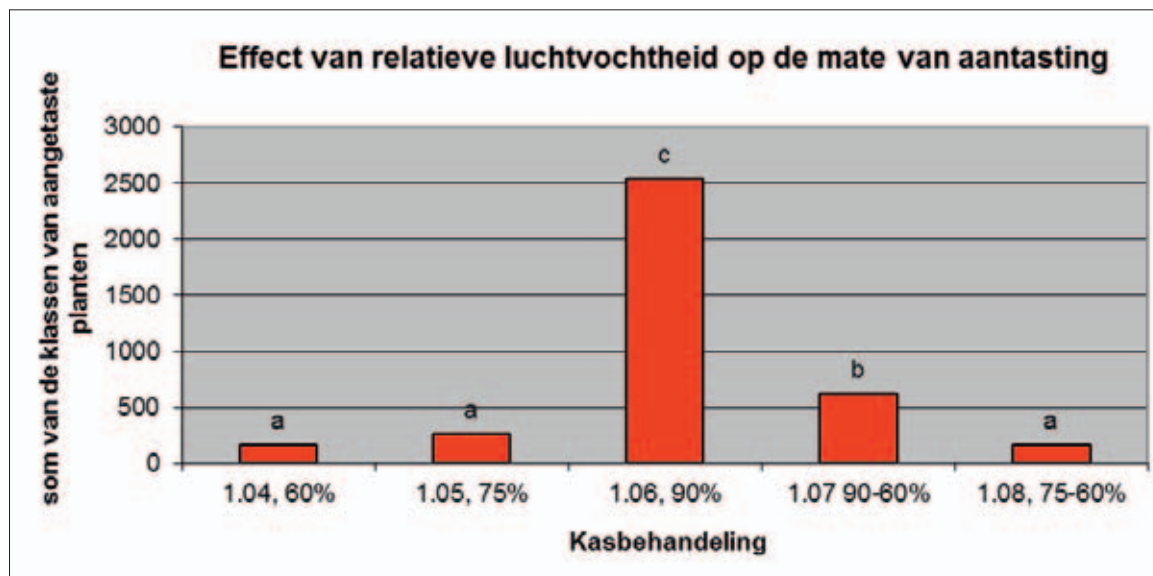


Figuur 5. Het effect van relatieve luchtvochtigheid op het aantal aangetaste planten. Gelijke letters in de grafiek geven aan dat er geen significant verschil bestaat tussen deze behandelingen. Fischer's protected least significant difference ( $p < 0.05$ ).



#### 4.2.2.2 Effect van relatieve luchtvochtigheid op de mate van aantasting bij aangetaste planten

Niet alleen het aantal aangetaste planten is groter bij behandelingen waarbij gedurende een periode de relatieve luchtvochtigheid op 90% wordt gehouden, maar ook de mate van de symptomen neemt toe.



Figuur 6. Het effect van relatieve luchtvochtigheid op de mate van aantasting. Gelijke letters in de grafiek geven aan dat er geen significant verschil bestaat tussen de behandelingen. Fischer's protected least significant difference ( $p < 0.05$ ).

Het is duidelijk waarneembaar in Figuur 6. dat de ernst van de symptomen veel groter is bij hoge relatieve luchtvochtigheid van 90%. Ook hier is de behandeling waarbij gedurende 3 dagen een relatieve luchtvochtigheid van 90% wordt aan gehouden significant verschillend van de behandelingen waarbij maximaal 75% werd aangehouden. Tussen de behandelingen met een continue relatieve luchtvochtigheid van 60%, 75% en schommelingen tussen een RV van 60% en 75% zijn geen significante verschillen waar te nemen.

Als opmerking dient geplaatst te worden dat het grote verschil tussen continue relatieve luchtvochtigheid van 90% en de andere behandelingen wordt verklaard door de ernstigere symptomen, maar ook doordat er meer aangetaste planten met ernstige symptomen zijn gescoord.

### 4.3 Het effect van gietwaterbehandelingen op de ontwikkeling en verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

#### 4.3.1 Doel van het experiment

Het doel van dit experiment is om het effect vast te stellen op de verspreiding en ontwikkeling van de bacterie *Pseudomonas* door het toevoegen van middelen aan het water of door het aanpassen van pH of stikstofgift. In de praktijk worden middelen aan het gietwater toegevoegd om biofilm uit de leidingen te verwijderen, maar ook om eventueel in het systeem aanwezige bacteriën te doden. Ook wordt mogelijk de verspreiding van de bacteriën via het opspattende water belemmerd. De gedachte daarbij is dat door de dosering zo te kiezen dat het water bij het gieten nog meetbaar reactief is, dat het water dat in contact is geweest met het blad en de daarop aanwezige bacteriën bij het opspatten de in het spatwater aanwezige bacteriën ook nog doodt. Deze gedode bacteriën kunnen andere planten niet meer via het gietwater infecteren.



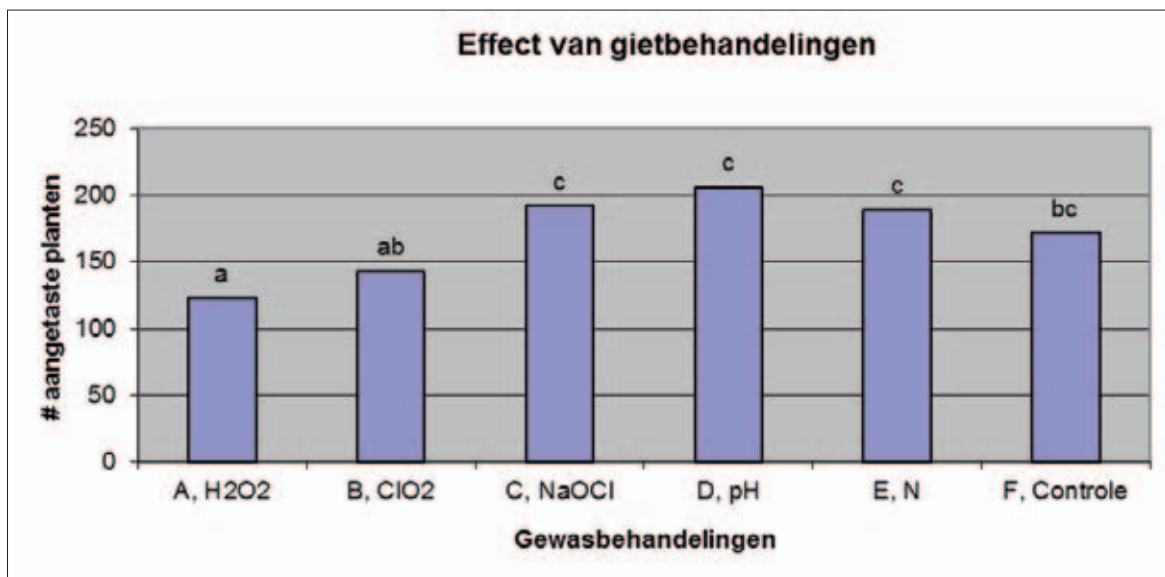
## 4.3.2 Resultaten

### 4.3.2.1 Effect van de waterbehandelingen op het aantal aangetaste planten

Gedurende de looptijd van het experiment kregen de planten ontsmet gietwater toegediend met een standaard bemesting met daaraan toegevoegd een behandeling. De behandelingen bestonden uit:

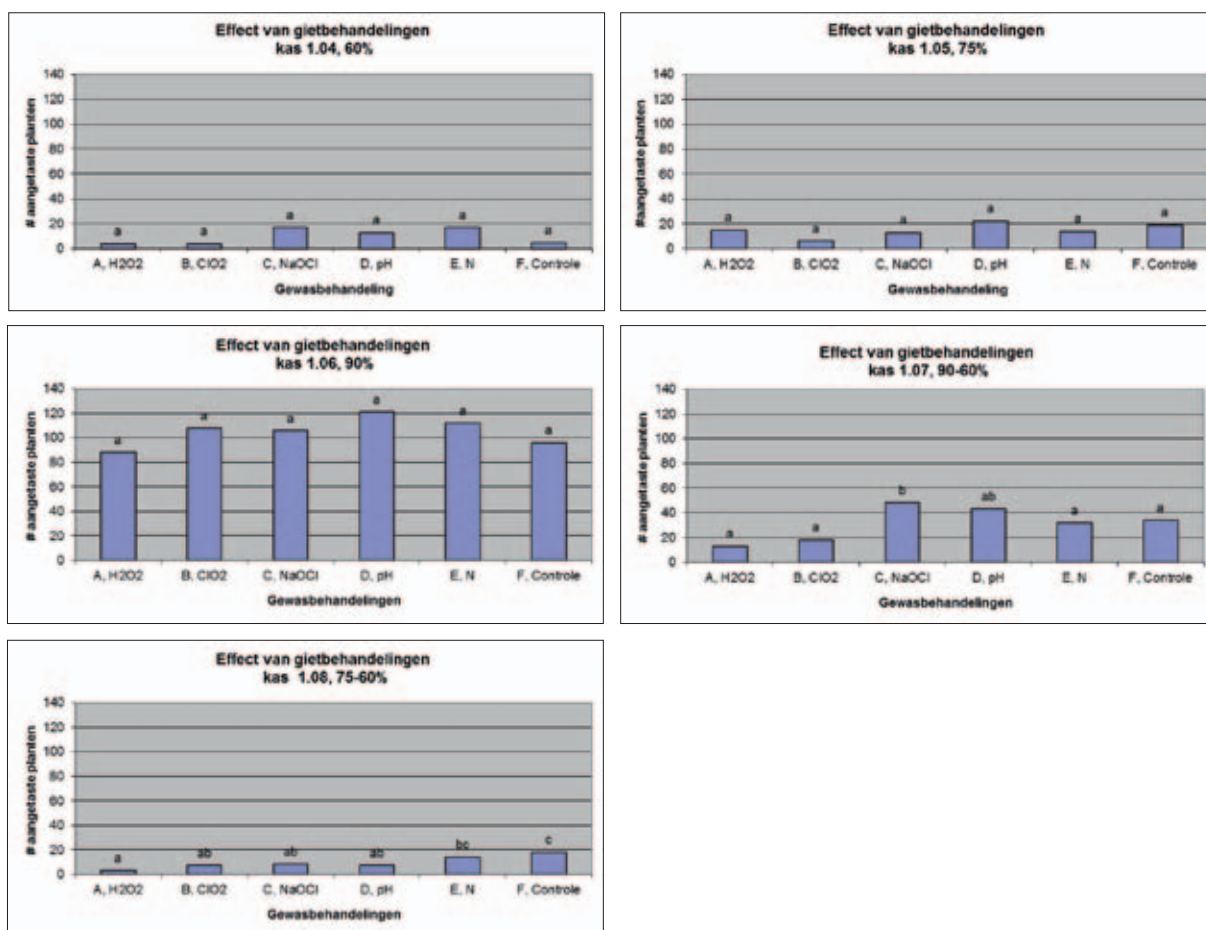
- A. Waterstofperoxide (20 ppm)
- B. Chloordioxide (0,3 ppm)
- C. Natriumhypochloriet (2 ppm)
- D. Aangepaste pH 4,5
- E. Aangepaste stikstofgift (8 mmol/liter)
- F. Onbehandelde controle

De effecten van deze behandelingen zijn grafisch weer gegeven in Figuur 7. Uitsluitend de behandelingen van het water met 20 ppm  $H_2O_2$  heeft een effect dat significant afwijkt van de onbehandelde controle. De behandeling met 2 ppm chloordioxide wijkt niet significant af van de controle behandeling maar wel van de behandelingen met natriumhypochloriet, pH en de stikstof behandeling. Opmerkelijk zijn de behandelingen met natriumhypochloriet, pH en stikstof. Deze behandelingen van het water tonen geen significant verschil met de onbehandelde controle, maar laten wel een hoger aantal aangetaste planten zien als gevolg van de onbehandeld controle. Op basis van deze resultaten is verschil in het aantal aangetaste planten tussen de behandelingen met waterstofperoxide en chloordioxide niet significant.



Figuur 7. Het effect van gietbehandelingen op het aantal aangetaste planten. Gelijke letters in de grafiek geven aan dat er geen significant verschil bestaat tussen de behandelingen. Fischer's protected least significant difference ( $p < 0.05$ ).

Deze eerdere resultaten zijn tot stand gekomen als de som van het aantal aangetaste planten over de 5 compartimenten heen. Het gaat dus om de som van de aangetaste planten behandeld met bijvoorbeeld waterstofperoxide bij verschillende klimaatsbehandelingen. Als alle compartimenten apart worden bekeken worden de volgende figuren 8-12 verkregen:

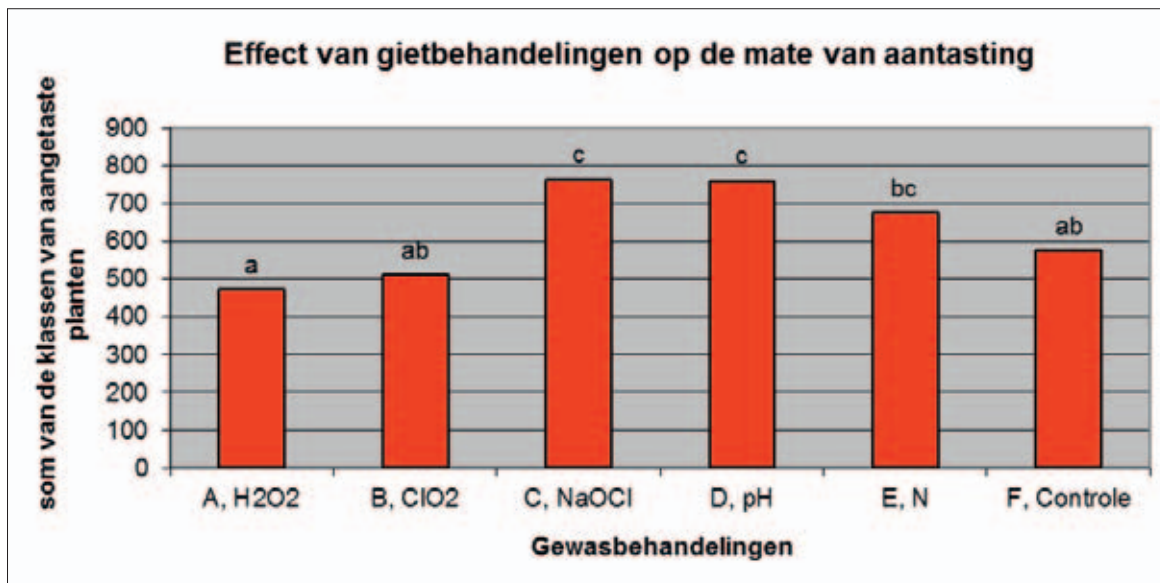


Figuur 8-12. Het effect van gietbehandelingen op het aantal aangetaste planten per kascompartiment (relatieve luchtvochtigheid). Gelijke letters in de grafiek geven aan dat er geen significant verschil bestaat tussen de behandelingen. Fischer's protected least significant difference ( $p < 0.05$ ).

Op kascompartimentniveau zijn er in 3 van de 5 kascompartimenten geen verschillen in aantallen aangetaste planten waar te nemen ten opzichte van de onbehandelde controle. Alleen in kascompartiment 1.07 met een relatieve vochtigheidsregime van 90-60% en in kascompartiment 1.08 met een relatieve vochtigheidsregime van 75-60% zijn significante verschillen waar te nemen tussen de behandelingen. Alleen in in kascompartiment 1.08 met een relatieve vochtigheidsregime van 75-60% verschillen de behandelingen met waterstofperoxide, chloordioxide, natriumhypochloriet en een pH van 4,5 significant van de positieve controle. De aanpassing van het stikstofgehalte naar 8 mmol heeft in geen van de compartimenten een effect op het aantal aangetaste planten.

#### 4.3.2.2 Effect van de waterbehandelingen op de mate van aantasting

Kijkende naar Figuur 13 waarin de mate van aantasting als gevolg van gietbehandelingen is uitgedrukt is duidelijk zichtbaar dat het patroon van het effect van de gietbehandelingen op het aantal aangetaste planten wordt gevolgd. Echter statistisch verschilt het effect van de behandeling met waterstofperoxide of met van chloordioxide niet van de onbehandelde controle. Op basis van deze resultaten lijken de behandelingen met natriumhypochloriet en de aanpassing van de pH zelfs een negatief effect te hebben. De aantasting lijkt erger bij een behandeling met natriumhypochloriet en bij een aanpassing van de pH naar 4,5.



Figuur 13. Het effect van toegepaste gietbehandelingen op de mate van aantasting. Gelijke letters in de grafiek geven aan dat er geen significant verschil bestaat tussen de behandelingen. Fischer's protected least significant difference ( $p < 0.05$ ).

## 4.4 Het effect van de cultivar op de ontwikkeling en verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

### 4.4.1 Doel van het onderzoek

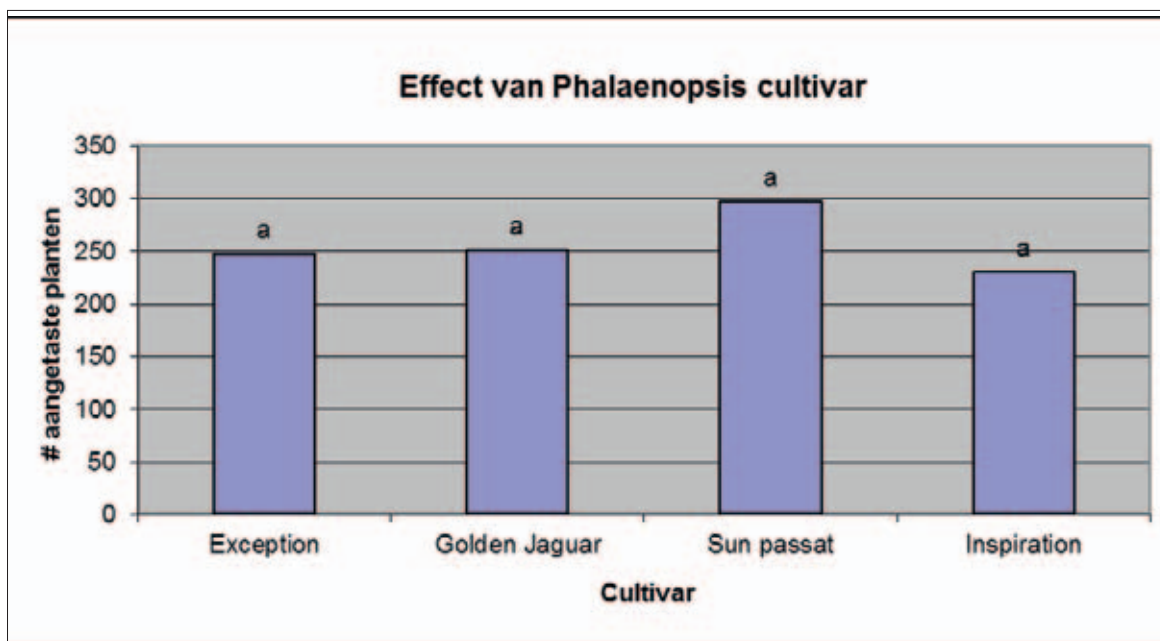
Van 4 verschillende Phalaenopsis cultivars "Sun Passat", "Inspiration", "Golden Jaguar" en "Exception" is onderzocht met als doel om vast te stellen wat de invloed is van cultivar-eigenschappen op de ontwikkeling van de bacterieziekte.

### 4.4.2 Resultaten

#### 4.4.2.1 Effect van Phalaenopsis cultivars op het aantal aangetaste planten

De diverse cultivars zijn door telers ter beschikking gesteld voor het experiment. De opmerking moet worden geplaatst dat bij de start van het experiment al verschillen tussen de diverse herkomsten konden worden gemaakt. De kwaliteit was niet gelijk bij de start van het experiment. Eén van de cultivar was geïnfecteerd met virus en een andere cultivar had harde en vale bladeren.

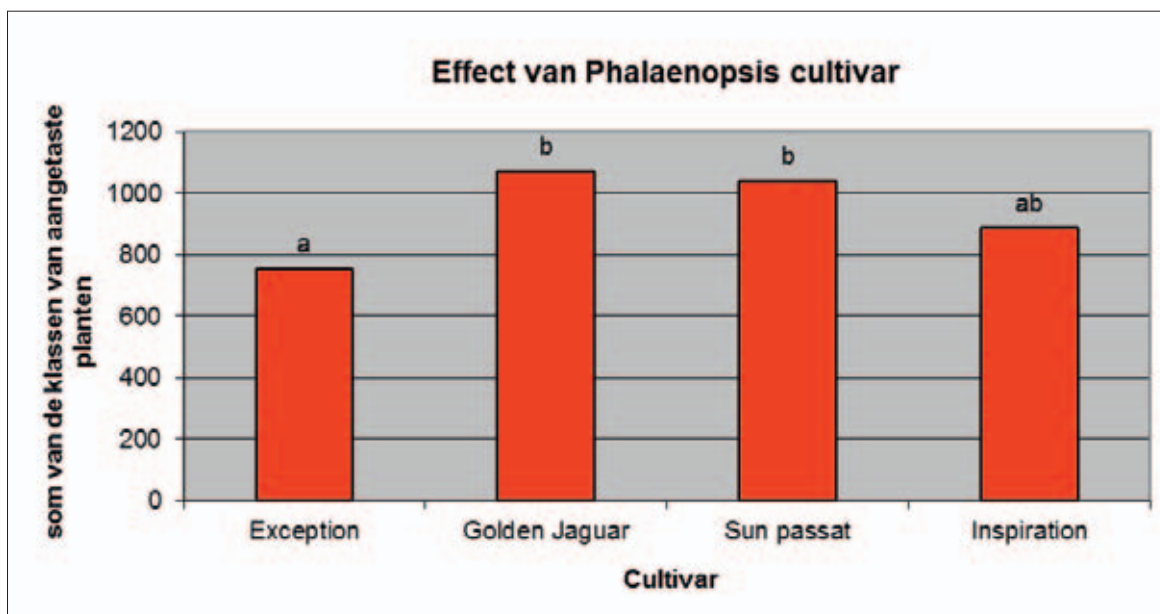
Afgezien van de wisselende conditie van de planten bij aanvang van de proef zijn er tijdens het experiment ook geen verschillen tussen de cultivars in aantallen aangetaste planten waargenomen.



Figuur 14. Het effect van de Phalaenopsis cultivar op het aantal aangetaste planten. Gelijke letters in de grafiek geven aan dat er geen significant verschil bestaat tussen de behandelingen. Fischer's protected least significant difference ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4.2.2 Effect van Phalaenopsis cultivars op de mate van aantasting

Ondanks dat er geen verschillen tussen de cultivars kunnen worden aangetoond in aantallen aangetaste planten, lijkt de ernst van de symptomen wel te verschillen tussen de cultivars. Op het gebied van de ernst van de symptomen verschilt de cultivar "Exception" significant van de cultivars "Golden Jaguar" en "Sun passat". De verschillen tussen cultivar "Inspiration" en de andere drie cultivars zijn niet significant te noemen.



Figuur 15. Het effect van de Phalaenopsis cultivar op de mate van aantasting. Gelijke letters in de grafiek geven aan dat er geen significant verschil bestaat tussen de behandelingen. Fischer's protected least significant difference ( $p < 0.05$ ).

## 5 Conclusies en discussie

### 5.1 Conclusies

#### 5.1.1 Het effect van relatieve luchtvochtigheid op de ontwikkeling en verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

Op basis van de resultaten kan geconcludeerd worden dat de relatieve luchtvochtigheid van groot belang is bij de verspreiding en ontwikkeling van *Pseudomonas cattleyae*. Er kan geconcludeerd worden dat in het kascompartiment met een relatieve luchtvochtigheid van 90% de meeste aangetaste planten telt, maar ook met de ernstigste symptomen. Ook het kascompartiment waar voor een kortere periode van 3 dagen een relatieve luchtvochtigheid van 90% wordt aangehouden zijn de aantallen aangetaste planten hoger dan de kascompartimenten waar een lagere RV wordt aangehouden. Voor alle kascompartimenten met bijbehorende relatieve luchtvochtigheden geldt dat er een duidelijk verband is tussen het aantal aangetaste planten en de mate van aantasting bij de verschillende luchtvochtigheden.

Een relatieve luchtvochtigheid van 75% geeft onder extreme ziektedruk geen extra verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* ten opzichte van de aantallen in kascompartiment waar een relatieve luchtvochtigheid van 60% is aangehouden. Dit wordt bevestigd door de resultaten uit kascompartiment 1.08 waar een schommelende relatieve luchtvochtigheid tussen 60% en 75% is aangehouden. Ook in dit kascompartiment is geen extra verspreiding waargenomen ten opzichte het kascompartiment met de laagste relatieve luchtvochtigheid (60%). Dit in tegenstelling tot eerder proeven uitgevoerd in opdracht van het Productschap Tuinbouw door GROWinIT in 2006. In een experiment met *Phalaenopsis* in een klimaatcel met een schommelende relatieve luchtvochtigheid is wel waargenomen dat de kans op een infectie met *Pseudomonas* groter wordt. Destijds is het experiment niet herhaald en ging het om een proef met kleine aantallen planten. Er was destijds geen mogelijkheid om de resultaten statistisch te analyseren. Daarmee is de betrouwbaarheid van deze resultaten uit 2006 beperkt.

#### 5.1.2 Het effect van gietwaterbehandelingen op de ontwikkeling en verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

Er zijn geen middelen uit deze proef naar voren gekomen die de verspreiding tegen gaan. Gezien de enorme ziekte druk en de verwonding van het gewas om de infectie te stimuleren is dat op voorhand ook al een illusie. Op basis van de resultaten kunnen we echter wel concluderen dat het middel waterstofperoxide met een dosering van 20 ppm aan het gietwater een duidelijk effect heeft op het aantal aangetaste planten en dus op de verspreiding van de bacterie in het gewas ten opzichte van de onbehandelde controle. Ook de behandeling met chloordioxide met een dosering van 0,3 ppm lijkt een effect te sorteren, maar het aantal aangetaste planten bij deze behandeling wijkt onvoldoende af van de onbehandelde controle (ontsmet water).

Als er gekeken wordt naar de effecten op kascompartiment niveau zijn er bij de kascompartimenten waar een hoge of een lage relatieve luchtvochtigheid wordt aangehouden, zijn geen verschillen waarneembaar tussen de verschillende gietwaterbehandelingen. Er treden verschillen op tussen de gietwaterbehandelingen als er schommelingen in de relatieve luchtvochtigheid in kascompartimenten wordt ingesteld. Alleen voor kascompartiment 1.08 waar een schommelende relatieve luchtvochtigheid tussen de 75% en 60% is ingesteld kan worden geconcludeerd dat het middel waterstofperoxide een effect heeft op de verspreiding van *Pseudomonas cattleyae*. Ook de gietwaterbehandelingen met chloordioxide, natriumhypochloriet en een pH aanpassing naar 4,5 laten in dit kascompartiment een effect zien op de verspreiding ten opzichte van de onbehandelde controle.

### 5.1.3 Het effect van de cultivar op de ontwikkeling en verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* (*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

Op basis van de resultaten kan worden geconcludeerd worden dat de cultivar geen invloed heeft op het aantal aangetaste planten. Op basis van de resultaten waarbij is gekeken naar de mate van aantasting kan wel onderscheid worden gemaakt tussen de 4 cultivars. Op basis van deze resultaten kan worden geconcludeerd worden dat de mate van aantasting bij cultivar 'Exception' minder was dan bij de andere cultivars. De verschillen tussen de cultivar "Exception" en de cultivars "Golden Jaguar" en "Sun Passat" zijn significant. De verschillen tussen cultivar "Inspiration" en de andere drie cultivars zijn niet significant te noemen.

De kanttekening die gemaakt moet worden is dat de planten bij de start van het experiment in wisselende conditie waren. Eén van de cultivars was geïnfecteerd met een virus en een andere cultivar had symptomen van nutriënten gebrek.

## 5.2 Discussie

Als we de conclusies interpreteren en bekijken in het licht van de teelt van *Phalaenopsis* zijn ook nog interessante conclusies te trekken. De conclusies geven aan dat een relatieve luchtvochtigheid van continu 75% geen extra verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* laat zien ten opzichte van een relatieve luchtvochtigheid van continu 60%. Als we deze gegevens koppelen aan het onderzoek 'Energiezuinig teeltconcept *Phalaenopsis*' van Dueck *et al.* (2010) geeft deze conclusie kennis over de verspreiding van de bacterie, maar ook mogelijkheden om energie te besparen. Om de relatieve luchtvochtigheid te verlagen zal moeten worden gestookt en/of worden gelucht. Als de relatieve luchtvochtigheid niet hoeft worden teruggebracht naar 60% en op 75% gehouden kan worden vanwege verminderd risico op extra verspreiding van *Pseudomonas cattleyae*, kan in de opkweekfase van de teelt 2 m<sup>3</sup> gas/m<sup>2</sup>/jaar worden bespaard. Voor de koeling- en afkweekfase, waar de planten voor bloeminductie koeler worden geteeld, ligt dat aanzienlijk lager maar zal dat toch nog kunnen leiden tot een energie besparing van 0,2 m<sup>3</sup> gas/m<sup>2</sup>/jaar." Uit recent onderzoek van Dueck en Van Noort (2010) bleek daarnaast dat in de warme fase van de teelt bij een lage relatieve luchtvochtigheid van 60%, de groei en ontwikkeling van het gewas minder is dan bij een hoge RV van 80%. De hoge relatieve luchtvochtigheid had een positief effect op de groei van *Phalaenopsis*. Als daarbij ook een hoger lichtniveau wordt aangehouden in combinatie met een hogere relatieve luchtvochtigheid zijn de effecten op groei nog groter (Dueck *et al.*, 2010).

De resultaten van dit onderzoek en de uitkomsten van het onderzoek van Dueck *et al.* geven aanleiding om het in dit rapport beschreven experiment te herhalen om te kijken of een relatieve luchtvochtigheid van hoger dan 75% invloed heeft op de verspreiding van *Pseudomonas*. Zo kan mogelijk nog meer energie worden bespaard en kunnen de omstandigheden voor groei van het gewas verder worden geoptimaliseerd.

Ten aanzien van de gietwaterbehandelingen geven de resultaten aanleiding om na te denken over het toevoegen van middelen aan het gietwater. Zeker de aanpassingen op het gebied van pH en stikstofgehalte lijken geen effect te hebben en lijken in enkele gevallen zelfs een averechts effect te genereren. Ook het toepassen van natriumhypochloriet met een dosering van 2 ppm lijkt geen effect te hebben op de verspreiding van *Pseudomonas cattleyae* ten opzichte van de onbehandelde controle. Dit is tegenstelling wat veelal wordt gedacht in de praktijk. Ook chloordioxide met een dosering van 0,3 ppm toont in dit experiment geen effect ten opzichte van de onbehandelde controle. Waterstofperoxide (20 ppm) laat wel een effect zien. De kanttekening die bij deze resultaten kan worden geplaatst, is dat de praktijkdoseringen in sommige gevallen vele malen hoger liggen dan die gedurende het experiment zijn toegepast. De doseringen in het experiment zijn gekozen op aanbeveling van de begeleidingscommissie onderzoek (BCO) en zijn de algemeen geldende doseringen. Een ander punt van discussie is de hoge infectie druk tijdens het experiment. De enorme ziektedruk in de kascompartimenten als gevolg van de zwaar geïnfecteerde planten en de snelle eerste verspreiding als gevolg van het keuzen van een blad hebben mogelijk de effecten van de middelen gereduceerd. De hoogte van de infectiedruk is in ieder geval niet conform de praktijk, maar is gekozen om een proef met zekerheid te laten slagen. De inoculatie heeft plaats gevonden op een wijze die de situatie nabootst in een vroeg stadium van de teelt.



Watergift met daarop volgend hoge relatieve luchtvochtigheden en het beschadigen van de jonge plant zijn in de praktijk redenen die worden genoemd als oorzaak voor een haard of uitbraak met *Pseudomonas cattleyae*. Deze situaties uit de praktijk zijn nagebootst door het aanleggen van de relatieve luchtvochtigheid regimes in kascompartimenten en het kneuzen van één blad per plant.

In de praktijk worden ook veel andere gietwaterbehandelingen gedaan om de verspreiding van *Pseudomonas* tegen te gaan. Er wordt gewerkt met Aquanox en andere technieken op basis van ECA water of met technieken op basis van koperelektrolyse (Aquahort). Het kan mogelijk interessant zijn om in een vervolgonderzoek te kijken naar de effecten van deze nieuwe waterbehandelmethodes op de verspreiding van de bacterie en hun effecten op het gewas. Daarnaast is het interessant om ook de in dit onderzoek gebruikte gietwaterbehandelingen opnieuw te toetsen en daarbij andere doseringen te hanteren.

Over cultivar-gevoeligheden zijn in dit onderzoek geen harde uitspraken te doen. Ondanks dat op basis van de resultaten en de statistische analyse een conclusie kan worden getrokken. Staat deze conclusie sterk ter discussie vanwege het feit dat de uitgangssituatie van de 4 cultivars geenszins gelijk was. De planten zijn geschonken door telers en waren niet allemaal van de zelfde kwaliteit. Als gevolg hiervan zijn de waargenomen verschillen geen reële verschillen en kan de conditie van het gewas bij de start van het experiment een grotere rol hebben gespeeld dan de specifieke eigenschappen van de verschillende cultivars.

De problematiek met *Pseudomonas cattleyae* in de teelt van Phalaenopsis is met dit onderzoek niet opgelost, toch kan worden gezegd dat er stappen zijn gemaakt in de beheersing van het probleem tijdens de teelt van Phalaenopsis. Echter nieuwe technieken, nieuwe overheidseisen (emissie-vrije glastuinbouw) en nieuwe teelt methodes (recirculatie bij de teelt van Phalaenopsis) roepen veel nieuwe vragen op over dit hardnekkige probleem bij de teelt van orchidee.

De bacterieziekte *Pseudomonas cattleyae* staat nog steeds hoog op de agenda van de telers en is een van de grootste dreigingen in de teelt, vervolgonderzoek is nodig om hier gehoor aan te geven en antwoorden te geven op nieuwe vraagstukken zoals: "Wat is de dreiging van *Pseudomonas* bij 100% recirculatie van drainwater bij de teelt van Phalaenopsis?" of "Wat is het effect van ECA water op de verspreiding van *Pseudomonas*?".





## 6 Literatuur

- Anthura/IMAC, 2007.  
Teelthandleiding Phalaenopsis potplanten.
- Gobielje, M., 2007.  
*Acidovorax (Pseudomonas)* in Phalaenopsis. Nieuwsbrief Bureau IMAC.
- Baas R., 2008.  
Voldoende vocht cruciaal voor bloeieresultaat Phalaenopsis. Vakbl. Bloem. 15: 58-59.
- Baas R., 2010.  
Verdampingsmodel Phalaenopsis. Rapport Kas als Energiebron.
- Dueck T., de Boer P. en Van Noort F., 2010.  
Teeltversnelling door klimaatoptimalisatie. PT Rapport GTB-1016.
- Dueck T., Baas, R., Campen, J., Van Noort, F. & Kromwijk, A., 2010.  
Energiezuinig teeltconcept Phalaenopsis. PT Rapport 13880. GROWinIT, Onderzoek naar het effect van schommelingen in luchtvochtigheid op het optreden van *Pseudomonas cattleyae* in Phalaenopsis, PT project 12569. GROWinIT, Literatuurstudie naar bacterierot door *Pseudomonas cattleyae* in Phalaenopsis, PT project 12569
- Floricultura, 2009.  
Nieuwsbrief jaargang 27 nr. 1.
- Kromwijk A., 2008.  
Effect dag-/nachttemperatuur tijdens opkweek en effect CO<sub>2</sub> tijdens afkweek van Phalaenopsis. PT Rapport 540.
- Willems A., Goor M., Thielemans S., Gillis M., Kersters M. & De Ley J., 1992.  
Transfer of Several Phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* and *Acidovorax konjaci*. Int. J. of Systematical Bacteriology 41-1: p. 107-119.









