

KNPV-werkgroep 'Bodempathogenen en bodemmicrobiologie'

*Samenvattingen van de voordrachten gehouden op
donderdag 1 november 2001 op het PRI te Wageningen*

Diversiteit en Gewasspecificiteit van antagonistische *Pseudomonas* spp.

*M. Bergsma-Vlami, M. Staats,
M.H.M. Holterman, M.E. Prins en
J.M. Raaijmakers*

*Leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit en
Researchcentrum, Postbus 8025, 6700 EE Wageningen*

2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) is een fenolische metaboliet die geproduceerd wordt door *Pseudomonas* spp. Uit diverse studies is gebleken dat DAPG een belangrijke rol speelt in de biologische bestrijding van verscheidene bodempathogenen door *Pseudomonas* spp. Een evaluatie van de effectiviteit van DAPG-producenten toont echter aan dat, onder veldomstandigheden, de bescherming van planten door deze antagonisten nog te variabel is. Deze variabiliteit wordt voor een belangrijk deel toegeschreven aan een inefficiënte kolonisatie van de fylosfeer.

Om de kolonisatie van de plant te verbeteren is compatibiliteit tussen antagonist en 'waardplant' noodzakelijk. Deze compatibiliteit is onderzocht door de populatiedynamica en de genotypische diversiteit te bepalen van DAPG-producerende *Pseudomonas* spp. die van nature voorkomen in de rhizosfeer van vier verschillende plantensoorten (tarwe, suikerbiet, aardappelen en lelie). De resultaten tonen aan dat DAPG-producenten in relatief hoge dichtheden voorkomen in de rhizosfeer van deze waardplanten (10^5 - 10^6 CFU / g). Met behulp van recent ontwikkelde primers voor DGGE-analyse blijkt dat bepaalde genotypische groepen relatief veel meer voorkomen in de rhizosfeer van een specifieke waardplant, terwijl er ook groepen zijn die in de rhizosfeer van alle vier waardplanten veelvuldig voorkomen. Zowel gewasspecifieke als meer generalistische DAPG-producerende *Pseudomonas* spp. worden op dit moment getest op hun effectiviteit van ziekteonderdrukking. Daarnaast richt het onderzoek zich op factoren die bepalend zijn voor gewasspecificiteit van deze groep van antagonistische *Pseudomonas* spp.

Effecten van phenazine en phloroglucinol producerende *Pseudomonas putida* WCS358r op de rhizosfeermicroflora van tarwe onder veldcondities

M. Viebahn¹, D.C.M. Glandorf¹,
T.W.M. Ouwens¹, E. Smit², P. Leeflang²,
K. Wernars², L.S. Thomashow³, L.C. van Loon¹
en P.A.H.M. Bakker¹*

¹ *Universiteit Utrecht, Fytopathologie, P.O. Box 80084,
3508 TB Utrecht, Nederland*

² *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven,
Nederland*

³ *USDA, Washington State University, Pullman, WA, USA*

* *Huidige adres: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu,
Bilthoven, Nederland*

De saprofytische bodembacterie *Pseudomonas putida* WCS358r werd genetisch gemodificeerd met genen voor de productie van phenazine-1-carbonzuur (PCA) of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), secundaire metabolieten met een anti-microbiële werking. De genetisch gemodificeerde micro-organismen (GGMs) remmen in vitro groei van verschillende plantpathogenen zoals *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* en *Pythium*. In veldexperimenten in 1997 en 1998 konden effecten van de PCA-producerende GGMs op de natuurlijke schimmelmicroflora aangetoond worden.

Beginnend in 1999 worden nu gedurende vier jaar effecten van herhaalde introductie van PCA- en DAPG-producerende GGMs onderzocht. De GGMs zijn door middel van zaad-coating in de bodem geïntroduceerd (10^7 CFU / zaad). Effecten van de GGMs op de natuurlijke microflora van tarwerhizosfeer werden vergeleken met effecten van de ouderstam WCS358r en ten opzichte van een onbehandelde controle. De aantallen van zowel WCS358r als de GGMs in de tarwerhizosfeer namen gedurende het teeltseizoen af van ca. 10^7 per gram rhizosfeer tot 10^2 - 10^4 / g 4 weken na de oogst van de tarwe. Introductie van de GGMs had geen effect op

aantallen van diverse kweekbare schimmel- en bacteriële groepen.

Behalve door middel van kweektechnieken werden effecten op de rhizosfeermicroflora door middel van 'amplified ribosomal DNA restriction analysis' (ARDRA) van 16S rDNA (bacterieel) en 18S rDNA (schimmel) geanalyseerd. In 1999 werden effecten waargenomen van de DAPG-producerende GGMs op zowel bacteriële als de schimmelmicroflora. Ondanks de verschuivingen van deze microbiële populaties werden geen effecten op decompositie van cellulose, substraat geïnduceerde respiratie en nitrificerende potentiaal waargenomen. Effecten op de totale microflora zijn in het seizoen van 2000 niet waargenomen, mogelijk is dit het gevolg van onderdrukking van een microflora die schadelijk is voor de plantontwikkeling. Het is mogelijk dat de variabiliteit van de microflora in 2000 zo groot was, dat effecten niet meer meetbaar zijn. In 2000 werd een positief effect op plantengroei en gewasopbrengst ten gevolge van alle bacteriële behandelingen waargenomen. Momenteel wordt onderzocht welke groepen van microorganismen door de GGMs worden beïnvloed.

Biologische grondontsmetting ter bestrijding van *Verticillium dahliae* in aardbeien

J.G. Lamers¹, A. Evenhuis¹, P. Wanten¹ en W.J. Blok²

¹Praktijkonderzoek Plant en Omgeving PPO-AGV, P.O.Box 430, 8200 AK Lelystad

²Biologische bedrijfssystemen, Wageningen Universiteit, Marijkeweg 22, 6709 PG Wageningen

De *Verticillium*-verwelkingsziekte veroorzaakt wereldwijd belangrijke verliezen in de aarbeiencultuur. De ziekte kan effectief bestreden worden door fumigatie met methylbromide, maar dit grondontsmettingsmiddel wordt binnen enkele jaren wereldwijd verboden en in Nederland is het al sinds de tachtiger jaren verboden. Er moeten daarom alternatieve methoden ontwikkeld worden. Hier wordt verslag gedaan van zgn. biologische grondontsmetting. Hierbij wordt een groenbemester in de grond gebracht (40 ton / ha), de grond licht aangeregen en geïrrigeerd. Vervolgens wordt de grond afgedekt met een laag dikke, zuurstofdichte plastic. Het plastic blijft gedurende de zomer zes tot tien weken liggen. Gedurende deze periode ontwikkelen zich anaërobe omstandigheden waarin, naar we aannemen, voor een aantal pathogenen toxische fermentatieproducten gevormd worden. In verscheidene veldexperimenten bleek dat biologische grondontsmetting diverse persistente pathogene bodemschimmels en -nematoden sterk reduceerde. Biologische grondontsmetting werd in een experiment in 1999 gevolgd door de teelt van aardbeien in zowel 2000 als 2001.

De bodembesmetting met *Verticillium dahliae* bleek te zijn gereduceerd met 75 %. In 2000 werd geen verschil gevonden in gewasgroei van wachtbedplanten die stonden op grond die biologisch ontsmet was in vergelijking met een niet-ontsmette controle. In 2001 was de verwelking in een normaalteelt aardbeien (tweede jaar) minder en de opbrengst hoger in de biologisch ontsmette percelen. Twee boeren pasten biologische grondontsmetting toe op hun velden en vergeleken deze met een controleveld. Bij één boer was de opbrengst van het controleveld slechts 30% ten opzichte van het veld dat biologisch ontsmet was (interactie *V. dahliae* en *Pratylenchus penetrans*) en de andere boer had een vermindering van 85% van de inoculumdichtheid van *V. dahliae* in de ontsmette grond. Het blijkt dat de *Verticillium*-verwelkingsziekte in aardbei goed bestreden kan worden door middel van biologische grondontsmetting.

Invloed van microbiële samenstelling op fungistase

W. de Boer

NI00-Centrum voor Terrestrische Oecologie, Boterhoeksestraat 48, Postbus 40, 6666 ZG Heteren

Fungistase is de geheel of gedeeltelijke onderdrukking van kieming van schimmelsporen en groei van schimmelhyfen in bodems. Het is een fenomeen dat zich in vrijwel alle bodems voordoet, maar de mate van fungistase en de gevoeligheid van schimmels kan per bodem verschillen. In het algemeen zijn plantenziekte-verwekkende bodemschimmels veel gevoeliger voor fungistase dan saprofyten (schimmels die bodem-organische stof afbreken). De relatie tussen fungistase en ziekteverendheid van bodems is niet eenduidig. Dit komt omdat fungistase zowel een positief als negatief effect kan hebben op de infectie door plantenpathogene schimmels. Een bepaalde mate van fungistase is voor plantenpathogenen gunstig omdat het kieming van sporen onder ongunstige omstandigheden (geen waardplant) voorkomt. Bij sterke fungistase kiemen de sporen van pathogenen echter ook niet onder gunstige omstandigheden (aanwezigheid waardplant). Daarnaast leidt langdurige fungistase tot irreversibele remming van de kiemkracht. In zijn algemeenheid kan men zeggen dat maatregelen die fungistase stimuleren gunstig zijn voor de ziekteverendheid.

De meest gegeven verklaring voor fungistase is een algemeen tekort aan voedingsstoffen of zelfs een ontrekking van voedingsstoffen aan sporen of hyfen die wordt veroorzaakt door de (potentiële) activiteit van de microbiële biomassa in de bodem. Daarnaast zijn er ook publicaties die de aanwezigheid van remmende stoffen als oorzaak van fungistase noemen. Duidelijk is in elk geval dat er vrijwel altijd een biologische oorzaak is omdat fungistase wordt opgeheven door geheel of gedeeltelijke sterilisatie van bodems.

In ons onderzoek hebben we het verloop van fungistase en microbiële activiteit (respiratie) gemeten aan een tweetal duinbodems na introductie van fungistase-verlagende maatregelen (gedeeltelijke sterilisatie of nutriëntentoevoegingen).

In het eerste experiment vonden we voor de saprofytische bodemschimmel *Chaetomium globosum* een langdurige (meer dan 12 weken) opheffing van fungistase (gemeten als koloniserend vermogen door hyfen) na een initiële gedeeltelijke sterilisatie (magnetron) of na initiële toevoeging van een rijk substraat (Tryptic Soy Broth). In beide gevallen was de bodemrespiratie (CO₂-productie) vanaf 4 weken gelijk aan dat van de onbehandelde grond, terwijl de bacterie-aantallen een factor 10 hoger waren geworden dan in de onbehandelde grond. Dit geeft aan dat het nutriëntentekort even hoog of zelfs hoger moet zijn geweest dan in de onbehandelde grond, maar dat dit niet voldoende was voor een terugkeer van fungistase. Het lijkt daarom zeer aannemelijk dat de gedeeltelijke sterilisatie en TSB-toevoeging geresulteerd heeft in blijvende afwezigheid van een toxische factor doordat de samenstelling van bodemmicroorganismen is veranderd. Deze veronderstelde verandering van de bacteriële samenstelling werd bevestigd middels analyse (DGGE) van de totale bacteriële DNA-pool. In een tweede experiment, met een andere duinbodem, waren de resultaten in dit opzicht minder duidelijk omdat voor de vier geteste schimmels (twee plantenpathogenen en twee saprofyten) een significant positieve correlatie werd gevonden tussen bodemrespiratie en remming van hyfengroei. Dit zou dus wel kunnen duiden op een relatie tussen nutriëntenbeschikbaarheid en fungistase. Toch gaven ook een aantal resultaten in dit experiment aan dat de samenstelling van de microorganismen een cruciale rol speelt bij het ontstaan van fungistase. Duidelijk is echter geworden dat competitie en aanwezigheid van toxische stoffen niet altijd eenvoudig te scheiden zijn omdat de nutriëntenbeschikbaarheid van invloed kan zijn op de productie van secundaire metabolieten. Verder kan ook de gevoeligheid van een schimmel voor toxische stoffen veranderen door de nutriëntenbeschikbaarheid. Op basis van onze onderzoeksresultaten verwachten wij dat de microbiële samenstelling via vorming van toxische stoffen essentieel is voor het ontstaan van fungistase maar dat, binnen dat kader, nutriëntenbeschikbaarheid mede bepalend is voor de mate van fungistase.

Over biotoetsen met een nieuwe bacteriële antagonist tegen *Pythium aphanidermatum**

L.B. Folman¹, J. Postma² en J.A. van Veen¹

¹ Universiteit Leiden, EEW, sectie Plantenecologie

² Plant Research International, Wageningen

Dit onderzoek is mede mogelijk gemaakt door de Stichting Technische Wetenschappen

* Deze voordracht werd gehouden op de vergadering van 19 april 2001

Pythium aphanidermatum veroorzaakt wortelrot in komkommer in kassen met recirculerende voedingsoplossing, waarbij zoösporen zorgen voor verspreiding van infecties over het hele gewas. Een *Xanthomonas* sp., geïsoleerd uit de rhizosfeer van komkommer, bleek in herhaalde experimenten wortelrot bij jonge komkommerplanten te onderdrukken tot het niveau van ongeïnoculeerde controleplanten. Er zijn verschillende biotoetsen uitgevoerd op komkommerplanten om meer inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme en de toepassingsmogelijkheden van de antagonist. Een korte biotoets werd uitgevoerd met twee weken oude plantjes, gekweekt in liggende flesjes met voedingsoplossing. De bacterie werd toegevoegd door zaadbacterisatie, toediening van een bacteriesuspensie aan de voedingsoplossing, of beide. De test is verder op verschillende wijzen uitgevoerd: met ongewassen bacteriecellen van verschillende kweekmedia, gewassen cellen, of met steriel cultuurfiltraat. In alle experimenten werden de planten na bacterisatie van de voedingsoplossing geïnoculeerd met zoösporen. Uit de experimenten bleek dat met alleen zaadbacterisatie geen ziekteonderdrukking optrad. Toediening van een suspensie van ongewassen bacteriecellen of cultuurfiltraat aan de voedingsoplossing in flesjes veroorzaakte goede onderdrukking van infecties. Gewassen cellen waren ineffectief. Verder bleek het opkweekmedium van belang voor de effectiviteit van de bacterie of het cultuurfiltraat.

Een wat langere biotoets werd met vier tot zes weken oude planten uitgevoerd in hydrocultures in bakken van achttien liter met beluchting. Hierbij werd ook bij herhaalde toediening van de bacterie (in suspensies van ongewassen cellen) geen duidelijk effect gevonden. Dit is mogelijk te wijten aan een groter verdunningseffect van de bacterie of mogelijke actieve componenten uit de suspensie, in vergelijking met de toets in flesjes. Momenteel wordt verder onderzoek gedaan naar de effectiviteit en de persistentie van de bacterie in de rhizosfeer en voedingsoplossing in systemen met oudere planten.