

Bestrijding van *Phytophthora* spp. met behulp van (bio) surfactants en surfactant-producerende *Pseudomonas* spp.

Kris de Jonghe

Op 29 november 2006 promoveerde Kris de Jonghe aan Universiteit Gent op het proefschrift getiteld "Control of *Phytophthora* spp. by means of (bio)surfactants and surfactant-producing *Pseudomonas* spp.". Promotor was Prof. Dr. Ir. Monica Höfte, verbonden aan de vakgroep Gewasbescherming, Universiteit Gent. Het onderzoek werd gefinancierd door de Universiteit Gent.

Inleiding

Een toenemende vraag naar een milieuvriendelijke landbouw met lage pesticiden-input heeft geresulteerd in een sterke interesse in micro-organismen met een antagonistische werking tegen bodempathogenen, die resistentie kunnen induceren tegen pathogenen of plantengroei-bevorderende effecten bezitten (Lugtenberg & Bloemberg, 2004; Whipps, 2001). Tot nu toe werden slechts enkele antagonistische organismen, bacteriën in het bijzonder, ge-commercialiseerd als biologisch bestrijdingmiddel. De belangrijkste redenen hiervoor zijn een inconsistente werking in de bodem, een relatief lage ziektebeheersingscapaciteit en een vaak hoge specificiteit van het biopesticide (Larkin *et al.*, 1998). Er worden permanent studies gedaan naar nieuwe strategieën en alternatieve methoden voor ziektebeheersing en één daarvan is het inzetten van *surfactants* ter bestrijding van belangrijke zoösporenvormende plantpathogenen. Dit steunt op de

bevindingen van Tomlinson en Faithfull (1979) dat *surfactants* een interessante biologische activiteit bezitten tegen zoösporenvormende pathogenen. Deze eigenschap werd door Stanghellini en Rasmussen (1994) voor het eerst gesuggereerd als een mogelijke oplossing voor economisch belangrijke pathogenen in hydroponische teelten. Verder laat de huidige evolutie naar het op grote schaal overschakelen op grondloze teeltmethoden een betere kennis toe van de ecologische interacties die plaatsvinden in de plantenrhizosfeer. Deze kennis wordt als de sleutel tot het voorspellen van de beste condities voor een succesvolle biologische bestrijding beschouwd (Whipps, 1997).

Doelstelling

Dit werk bestudeert de mogelijkheid tot het gebruik van chemische en microbiële *surfactants* als doeltreffende biociden van *Phytophthora* in grondloze teelten. Verder onderzoekt deze studie ook de efficiëntie en het

belang van *surfactant*-metabolieten geproduceerd door plantgeassocieerde *Pseudomonas* spp. in de ziektebeheersing van *Phytophthora nicotianae*, verwekker van wortel- en stengelbasisrot in de substraatteelt van tomaat.

De bestrijding van *Phytophthora cryptogea*, verwekker van bruin penrot in de hydroponische witlooftrek, met behulp van een alcoholalkoxylaat surfactant

De *surfactant* Atplus MBA1301, een enkelvoudig-vertakt C13-alcohol-alkoxylaat, werd geëvalueerd en effectief bevonden in de bestrijding van *Phytophthora cryptogea*, verwekker van bruin penrot van witloof. Deze pathogeen vormt meestal een probleem wanneer hij binnengebracht wordt in de hydroponische treksystemen, de laatste fase in de witloofteelt. MBA1301 bezit een uitstekend potentieel als biocide van *P. cryptogea*, wat werd aangetoond aan de hand van zowel proeven op laboratoriumschaal als in een semi-commerciële proefopzet. Door het snel afbreken van het *surfactant* in de recirculerende voedingsoplossing was het echter noodzakelijk om de toepassing ervan éénmalig te herhalen gedurende de witlooftrek.

PROMOTIES



Figuur 1. Symptomen van bruin penrot op de penwortel van witloof.

Vergelijking van de werking van drie alcohol-alkoxylaten met verschillende moleculaire structuur in de bestrijding van *Phytophthora nicotianae* wortelrot op tomaat in substraatteelt

De biologische werking van MBA1301, ditmaal tegen *P. nicotianae* in de substraatteelt van tomaat, werd vergeleken met die van twee andere alcohol-alkoxylaten, MBA1303 en MBA1306. De drie *surfactants* verschillen in het hydrofiele deel van hun structuur. MBA1303 heeft een hydrofiel deel van vergelijkbare grootte, maar met een gerandomiseerde polymerisatie van de

ethyleenoxide- en propyleenoxide-moleculen in tegenstelling tot de blok-copolymeerstructuur van MBA1301, en gaf, net als MBA1301, een goede ziektebeheersing. MBA1306, daarentegen, met een blok-copolymeer-gedeelte van ongeveer acht keer de grootte van die van MBA1301, bleek veel minder effectief te zijn. Een herhaalde toepassing van MBA1301 en MBA1303 was niet nodig, daar de initiële dosis van $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ voldoende bleek om de planten te beschermen tegen verdere aantasting door de pathogeen. Deze éénmalige dosis was echter hoger dan de herhaalde toepassing van $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ die effectief bleek tegen *P. cryptogea* in de hydrocultuur van witloof.

Effectiviteit van een rhamnolipiden-formulering in de bestrijding van *Phytophthora* in grondloze teelten

De strategie om *surfactants* in te zetten in de bestrijding van *Phytophthora*-ziekten in grondloze teelten werd verder verbreed

naar microbiële *surfactants* door het testen van de rhamnolipiden-formulering PRO1, zowel tegen *P. cryptogea* in de witloof-trek als tegen *P. nicotianae* in de substraatteelt van tomaat. In beide systemen kon met behulp van PRO1 een efficiënte vermindering van het aantal aangetaste planten verkregen worden. Zoals voor de synthetische *surfactants* was een éénmalige dosis PRO1 voldoende tegen *P. nicotianae*, terwijl een herhaling van de toepassing van PRO1 noodzakelijk bleek om *P. cryptogea* in de hydrocultuur te beheersen.

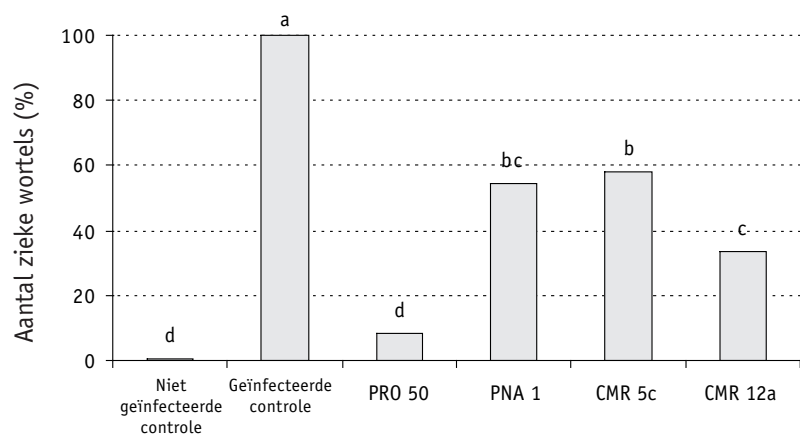
Doeltreffendheid van de directe toepassing van surfactant-producerende bacteriën in de bestrijding van *Phytophthora* in grondloze teelten

Het laatste deel van dit werk gebruikt een andere aanpak en evalueert de directe toepassing van *surfactant*-producerende bacteriën in de rhizosfeer. Verschillende *Pseudomonas* spp. waren effectief in de bestrijding van *P. nicotianae* wanneer ze



Figuur 2. Links: normale zoosporenvrijstelling uit een *Phytophthora*-sporangium. Rechts: zoosporenvrijstelling in de aanwezigheid van een surfactant; de volledige desintegratie van de zoosporen is duidelijk waarneembaar. Algemeen werden ook groeibevorderende effecten waargenomen op de planten in de behandelingen met de (bio)surfactants en surfactant-producerende bacteriën. Dit fenomeen kon niet verder bestudeerd worden maar draagt zeker bij tot de biologische activiteit en is het waard om onderwerp uit te maken van verdere studie.

PROMOTIES



Figuur 3. Vergelijking van de biologische activiteit van de rhamnolipiden-formulering PRO1, toegediend in een concentratie van 50 µg/ml (PRO50) en die van aangegoten bacteriesuspensies (10^8 bacteriën/ml) van een drietal surfactant-producerende bacteriën tegen *Phytophthora nicotianae* in substraatteelt van tomaat.

werden toegevoegd aan de voedingsoplossing in de steenwolmatten van de tomatenteelt. De bekende rhamnolipiden-producerende *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 bewees succesvol de tomatenplanten te beschermen tegen een latere infectie met 10^2 zoösporen van *P. nicotianae*. Daar *P. aeruginosa* een opportunistisch menselijk pathogeen is, werden enkele alternatieve nuttige surfactant-producerende *Pseudomonas* spp. getest. Zowel *P. chlororaphis* 1391, *Pseudomonas* CMR12a en *Pseudomonas* CMR5c (twee nieuwe soorten, geïsoleerd van cocoyamwortels in Kameroen), die alle drie een nog niet verder gekarakteriseerd cyclisch lipopeptide biosurfactant-metaboliet produceren, vertoonden een goed controlepotentieel tegen *P. nicotianae* wanneer ze

geïntroduceerd werden in de rhizosfeer van tomaat. Uit de experimenten bleek duidelijk dat de voornaamste activiteit toegeschreven kon worden aan de surfactant-metaboliet en meer bepaald aan het zoösporen-lyserend effect dat deze bezit.

Besluiten

Tot besluit kan gezegd worden dat chemische en microbiële surfactants kunnen gebruikt worden als actief ingrediënt in een anti-*Phytophthora*-formulering, onafhankelijk van de mogelijke fysisch-chemische en andere functionele eigenschappen die zij bezitten. Door hun lagere toxiciteit en hogere biologische afbreekbaarheid, kan de inzet van deze formuleringen ter (gedeeltelijke) vervanging van

klassieke pesticiden in een aantal gewassen met economisch belangrijke *Phytophthora*-problemen, een positief effect hebben op de impact van het pesticidengebruik op het milieu. Tenslotte heeft ook de directe toepassing van surfactant-producerende bacteriën potentieel als beheersmaatregel in de bestrijding van bodem-*Phytophthora*'s in grondloze teelten.

De auteur wil de volgende bedrijven bedanken: Uniqema (Gouda, NL) voor het ter beschikking stellen van de synthetische surfactants, en PlantSupport (Grootebroek, NL) voor het ter beschikking stellen van de rhamnolipiden-formulering PRO1.

Referenties

- Larkin, R.P., Roberts, D.P. & Gracia-Garza, J.A., 1998. Biological control of fungal diseases. In: Fungicidal activity-chemical and biological approaches to plant protection. Hutson, D. & Miyamoto, J. (eds.), Wiley, New York, USA, pp 141-191.
- Lugtenberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V., 2004. Life in the rhizosphere. In: *Pseudomonas*, vol. 1. Ramos, J.L. (ed.). Kluwer Academic Publishers/Pleum Publishers, New York, USA, pp. 403-430.
- Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.L., 1994. Hydroponics - a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease* 78, 1129-1138.
- Tomlinson, J.A. & Faithfull, E.M., 1979. Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Oplidium brassicae*. *Annals of Applied Biology* 93, 13-19.
- Whipps, J.M., 1997. Developments in the biological control of soil-borne pathogens. *Advances in Botanical Research* 26, 1-134.
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52 (March - Special Issue. Roots: From Gene to Ecosystem), 487-511.

PROMOTIES