

KNPV werkgroep Bodempathogenen en bodemmicrobiologie

Bijeenkomst van 8 november 2007 te Wageningen

Geeft karvon naast spruitremming van aardappelen ook minder *Rhizoctonia*?

Jan Lamers, Roeland Kalkdijk en Wim van den Berg

PPO-AGV

D-karvon wordt uit karwijzaadolie verkregen. Het middel heeft een toelating voor toepassing als kiemremmer in de bewaring van pootgoed, consumptie- en zetmeelaardappelen. Van 2004-2006 zijn bewaar- en veldproeven uitgevoerd om na te gaan of er naast een remming van de spruitgroei ook een vermindering van de *Rhizoctonia*-verliezen optreedt. Het onderzoek werd gefinancierd door Luxan en door HPA.

De bewaring en toepassing van karvon werd met buitenluchtkoeling uitgevoerd. Als controle dienden objecten met mechanische koeling en mechanische koeling met Moncereenbehandeling. Uit het onderzoek kwam naar voren dat enige weken na de bewaring een volledige kiemremming was opgetreden in tegenstelling tot de objecten in de mechanische koeling. Verder bleek dat de effecten van karvon op de vitaliteit van de sclerotiën van *Rhizoctonia* zo laat mogelijk na toepassing dienden te worden vastgesteld om een betrouwbaar beeld te krijgen. De adviesdosering bestond uit het wekelijks toepassen van 25 milliliter karvon, waarmee in december werd aangevangen. Daarna werd de dosering maandelijks verlaagd naar tien milliliter per week in maart. Deze toepassing leidde in beide jaren tot een betrouwbare lagere vitaliteit van de sclerotiën van *Rhizoctonia*. Ook in het veld was de aantasting van de stengels betrouwbaar verlaagd. In het tweede jaar was tevens het percentage misvormde knollen in het veld groter. Een toepassing met constant vijftien milliliter per week vanaf begin november gaf

vergelijkbare resultaten te zien. De dagelijkse toepassingen van karvon gaven minder sterke effecten op de vitaliteit van *Rhizoctonia* te zien. De effecten van de adviesdosering op *Rhizoctonia* waren ongeveer de helft van de effecten die met Moncereen konden worden verkregen. Door de eerste of de eerste twee toepassing(en) van karvon te verhogen naar vijftig milliliter per week werd het effect op *Rhizoctonia* verbeterd, waardoor het resultaat weer dichterbij de behandeling met Moncereen kwam te liggen. De meerkosten voor de karvonbehandelingen werden met het zetmeelras Seresta (licht aangetast) goedge maakt door een hogere zetmeelopbrengst. Met het consumptieras Vivaldi (matig aangetast) was het rendement door de genoemde karvonbehandelingen betrouwbaar verbeterd. De Moncereenbehandeling gaf met Seresta hetzelfde rendement te zien als karvon, maar bij Vivaldi was het rendement beter dan met karvon.

Uit dit onderzoek blijkt dat D-karvon naast een remming van de kiemgroei ook tot een verlaging van de vitaliteit van *Rhizoctonia*-sclerotiën leidt, wat minder aantasting in het veld en minder sorteerverliezen in de consumptieteelt geeft. Het effect op *Rhizoctonia* kon worden verbeterd door de begindosering te verhogen.

Effecten en risico's van chemische en microbiële gewasbeschermings- middelen voor microbiële gezelschappen in de bodem

Hans Mensink

RIVM, Stoffen Expertise Centrum

Het RIVM voert een literatuuronderzoek uit naar de effecten en risico's van gewasbescher-

WERKGROEP

mingsmiddelen op microbiële gezelschappen in de bodem van agro-ecosystemen. Dit onderzoek vindt plaats in het kader van strategisch RIVM-onderzoek op het gebied van de risicobeoordeling van stoffen. Microbiële bodemgezelschappen zijn een niet-doelwitgroep waarvoor de effecten en risico's worden ingeschat bij de registratie c.q. toelating van een gewasbeschermingsmiddel. De eisen voor een microbiëel middel zijn hierbij minder stringent dan voor een chemisch middel. Dit houdt verband met het algemene beeld dat biologische middelen, waartoe de microbiële behoren, milieuvriendelijker zijn dan chemische middelen. De vraag van het literatuuronderzoek was om na te gaan in hoeverre dit beeld klopt: beïnvloeden microbiële middelen microbiële gezelschappen significant minder dan chemische? Dan zou moeten worden aangetoond dat microbiële middelen significant minder invloed hebben op de taxonomische, genetische en functionele diversiteit van bodemgezelschappen. Vervolgens zijn geschikte studies geselecteerd op grond van wetenschappelijke betrouwbaarheid en bruikbaarheid. Hierbij werd een combinatie vereist van (semi-) kwantitatieve analysetechnieken op basis van zowel niet-moleculaire (bijv. uitplanten, fysiologische activiteit) als moleculaire technieken (bijv. PCR-DGGE, PCR-RFLP). Er is gekeken naar middelen die momenteel in (sommige) EU-landen gebruikt kunnen worden of voor registratie in behandeling zijn. Het zijn dus niet per se middelen die in Nederland zijn toegelaten.

Er bleek slechts een zeer beperkt aantal studies aanwezig waarin microbiële en chemische middelen direct met elkaar worden vergeleken onder vergelijkbare testcondities. Ook was er slechts een beperkt aantal studies beschikbaar die aan alle eisen voldeden. Daarom zijn ook minder betrouwbare studies meegenomen, zoals een aantal veldstudies die echter moeilijk interpreteerbaar waren gezien de complexe samenhang van biotische en abiotische factoren wat betreft de populatiedynamiek van microbiële gezelschappen. De effecten en risico's van middelen met de volgende werkzame stoffen zijn aldus geïnventariseerd: methyl bromide, MITC, 1,3-dichloorpropeen, chloorpicrine, chloorthalonil, iprodion, fenpropimorf, imazalil, glyfosaat, diuron, *Glomus intraradices*, *Pseudomonas fluorescens* (laboratorium- of klimaatkamerstudies); 1,3-dichloorpropeen, chloorpicrine, metam natrium, DMDS, dazomet, methyl bromide, triadimefon, koper,

fenpropimorf, chloorpyrifos, propamocarb, thiram, *Streptomyces melanosporofaciens*, *Bacillus circulans*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* (kas- of veldstudies).

Uit een eerste literatuurscreening — het onderzoek loopt tot en met 2011 — blijken de volgende voorlopige resultaten: (a) er worden hooguit tijdelijke effecten veroorzaakt door zowel de microbiële als de chemische middelen, met uitzondering wellicht van middelen met het inmiddels in Nederland niet meer voor de landbouw toegelaten methylbromide, (b) effecten van zowel microbiële als chemische middelen lijken ondergeschikt aan seizoensinvloeden en landbouwkundige ingrepen als gewasrotatie en intensieve grondbewerking.

Op grond van de beschikbare gegevens kan niet geconcludeerd worden dat microbiële middelen minder effecten of risico's hebben dan chemische. Het kan echter niet worden uitgesloten dat chemische middelen effecten op met name functionele aspecten van landbouwgronden hebben, zoals bijvoorbeeld stikstofvastlegging, ziekteverendheid en mineralisatie. Deze laatste zijn voorbeelden van functies van agro-ecosystemen die tot nu toe weinig met geschikte PCR-primers zijn onderzocht.

Kwantitatieve en kwalitatieve bepaling van totale populaties bacteriële en *Pseudomonas* spp. in de rhizosfeer van *Arabidopsis thaliana* en tabak

Rogier Doornbos, Kees van Loon en Peter Bakker

Plant-Microbe Interactions, Institute of Environmental Biology, Utrecht University, Postbus 80.084, 3508 TB Utrecht

Kolonisatie van plantenwortels door specifieke stammen van fluorescerende *Pseudomonas* spp. kan leiden tot geïnduceerde systemische resistentie (ISR), een staat waarin planten sneller en effectiever op een binnendringend pathogeen reageren. De groei van het pathogeen is in geïnduceerde planten geremd in vergelijking met die in controleplanten. Om

WERKGROEP

uiteindelijk de vraag te kunnen beantwoorden of ISR ook niet-pathogene micro-organismen in de rhizosfeer beïnvloedt, is in deze studie een basislijn van de microbiële gemeenschap van de rhizosfeer van *Arabidopsis thaliana* en tabak, beiden veel gebruikt in ISR-onderzoek, gegenereerd. *Arabidopsis* en tabaksplanten werden opgekweekt op een potgrond-zandmengsel en een kleigrond. Om de diversiteit van de bacteriële microflora te vereenvoudigen werden beide grondsoorten ook geautoclaveerd voor gebruik. In deze vier experimentele situaties werd de bacteriële rhizosfeer-microflora vergeleken met de microflora van de bulkgrond. De cultiveerbare bacteriële microflora is bestudeerd door kolonievormende eenheden te kwantificeren op selectieve media. Door uit grond DNA te extraheren waarop vervolgens bacteriegroep-specifieke PCR-DGGE is toegepast, werd onderzocht of er kwalitatieve veranderingen waren in de totale bacteriële microflora, inclusief niet-cultiveerbare bacteriepopulaties.

Zowel voor *Arabidopsis* als tabak werd een duidelijk rhizosfeer-effect waargenomen op grond van tellingen op selectieve media. Populaties van bacteriën en *Pseudomonas* spp. waren veel hoger in de rhizosfeer dan in de bulkgrond. Het rhizosfeer-effect was het grootst voor de *Pseudomonas* spp.

De PCR-DGGE-resultaten laten differentiële effecten van *Arabidopsis* en tabak zien. In alle situaties is in de rhizosfeer van tabak een verschuiving in de totale populaties van bacteriën en *Pseudomonas* spp. ten opzichte van die in de bulkgrond waargenomen. Voor *Arabidopsis* is dit kwalitatieve rhizosfeer-effect veel minder duidelijk.

Het onderzoek richt zich nu op de rhizosfeer-microflora van *A. thaliana*-mutanten die verstoord zijn in signaaltransductie betrokken bij resistentie tegen pathogenen en op *Arabidopsis*-planten die ISR tot expressie brengen.

Streptomycceten-diversiteit in grond met behulp van DGGE

Mirjam Schilder en Joeke Postma

Plant Research International BV, Postbus 16, 6700 AA Wageningen, e-mail: mirjam.schilder@wur.nl

Streptomycceten vormen een belangrijke groep bacteriën in de bodem. Ze spelen een grote rol bij de afbraak van organische stof. Bovendien is aangetoond dat ze correleren met ziekteverring van verschillende bodempathogenen.

In een onderzoek naar agrobiodiversiteit en bodemweerbaarheid zijn grondmonsters genomen van verschillende biologische bedrijven verspreid over Nederland. De populatiedichtheid van cultiveerbare bacteriën en streptomycceten is bepaald door het uitplanten van grondsuspensies op respectievelijk R2A en chitine oatmeal agar met daarop een bacteriefilter. Ook werden bacteriën, inclusief streptomycceten, geselecteerd die de groei van *Rhizoctonia solani* remden. Deze antagonistische bacteriën werden geïdentificeerd door een deel van het 16S ribosomaal RNA te sequensen. Hieruit bleek dat van de 525 geïsoleerde antagonistische bacteriën, 50% tot het geslacht *Streptomyces* behoorde.

Om de populatiesamenstelling van de streptomycceten in verschillende grondmonsters te vergelijken, zijn genetische 'fingerprints' gemaakt met behulp van DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Deze methode is eerder gebruikt en beschreven door Inbar *et al.* (2005).

Voor een streptomycceten-specifieke marker werden veertien *Streptomyces*-soorten uit verschillende subgroepen getest. Uiteindelijk werd een marker uit acht soorten samengesteld. DNA werd met behulp van een 'ultra clean soil DNA isolation kit' (Mo Bio) uit grondmonsters geëxtraheerd. Nested PCR werd uitgevoerd met de primers, zoals in het artikel staat vermeld. DGGE werd gerund met een geoptimaliseerd protocol: gelgradiënt 30-80%, runtijd van zeventien uur bij honderd Volt en 60 °C.

De streptomyccetenpatronen hadden hele mooie scherpe banden, echter met relatief weinig afstand tussen de banden. De bemonsterde bodems hadden elk circa acht tot twaalf banden. Verder onderzoek moet aantonen of er correlaties tussen streptomycceten/patronen en ziekteverring aangetoond kunnen worden.

Referentie

Inbar, E., Green, S.J., Hadar, Y. & Minz, D., 2005. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomyccetes. *Microbial Ecology* 50: 73-81.