

Nieuws van de KNPV werkgroep Botrytis

De KNPV werkgroep *Botrytis* heeft een bijeenkomst gehouden op 18 mei 2004 in Lisse. Op de bijeenkomst werden vijf presentaties gehouden, waarvan de samenvattingen hieronder zijn weergegeven. Tevens heeft er een bestuurswisseling plaatsgevonden. Jurgen Köhl (Plant Research International) trad af als voorzitter en wordt opgevolgd door Jan van Kan (Wageningen Universiteit), wiens functie als secretaris wordt overgenomen door Joop van Doorn (PPO Bloembollen, Lisse).

Tot op heden was het lidmaatschap voorbehouden aan medewerkers van universiteiten, onderzoeksinstituten en proefstations. Op de bijeenkomst is besloten om het lidmaatschap van de werkgroep open te stellen voor vertegenwoordigers van bedrijven en sectororganisaties, mits deze een voldoende actieve inbreng in de werkgroep zullen hebben. De toelating van deze categorie leden vereist een aanpassing van de reglementen van de werkgroep. Een concepttekst van de nieuwe reglementen is ter commentaar aan de huidige leden toegestuurd. Personen die belangstelling hebben voor het lidmaatschap van de KNPV werkgroep Botrytis kunnen contact opnemen met de secretaris (joop.vandoorn@wur.nl) voor nadere informatie en aanmelding. De volgende bijeenkomst van de werkgroep is gepland op dinsdag 12 april 2005 in Wageningen.

Belangrijke ontwikkeling in het *Botrytis*-onderzoek is het feit dat de volledige genomische DNA sequentie van *Botrytis cinerea* in de loop van 2004 zal worden bepaald door een consortium van Franse onderzoekers. De informatie zal in 2005 publiek beschikbaar komen.

Eind oktober 2004 zal het vierjaarlijkse International Botrytis Symposium plaatsvinden in Antalya, Turkije.

Samenvattingen van presentaties op de KNPV werkgroep Botrytis, 18 mei 2004

Geïnduceerde resistentie in bolgewassen

Theo Prins

Plant Research International, Wageningen

De laatste jaren is veel onderzoek gedaan naar de induceerbaarheid van resistentie door het aanschakelen van verschillende resistentieroutes zoals de salicylzuur-route, jasmonzuur-route en de stikstof oxide-route. Indien *Botrytis* resistentie in dit verband wordt onderzocht, gaat het meestal om *B. cinerea* als pathogeen op dicotyle gewassen.

Omdat er in de bollensector veel problemen zijn met vuur (*Botrytis*), is er door het Productschap Tuinbouw opdracht gegeven om onderzoek te verrichten naar de mogelijkheid om resistentie te induceren in tulp (tegen *B. tulipae*) en lelie (tegen *B. elliptica*). Deze presentatie zal zich richten op het onderzoek in tulp.

In dit onderzoek zijn in verschillende seizoenen de tulpencultivars 'Ile de France' (resistent), 'Leen van der Mark' (intermediair) en 'Christmas Marvel' (vatbaar) behandeld met stoffen waarvan wel-

ke in de literatuur werden beschreven als resistentie-inducerende component. Het gaat hier onder andere om salicylzuur (SA), jasmonzuur (JA), de ethyleenprecursor ACC, BABA, BTH, BION®, L-Arginine, Sildenafil Citraat en Arachidonzuur. Ook werd de toediening gecombineerd met de uitvloeier Silwet L-77 (Van Meeuwen Chemicals B.V., Weesp).

Na toediening van de component werd een tot zeven dagen later geïnoculeerd met *B. tulipae*. Omdat een geslaagde infectie slecht optreedt in beschadigd blad, is gekozen voor wrijven van blad in combinatie met sproeien van conidia, of prikken in combinatie met druppelen.

Na verschillende herhalingen binnen en tussen seizoenen kon geen statistisch verschil in behandeling worden aangetoond. Wel bleken cv. Ile de France en cv. Christmas Marvel nog steeds als resistent respectievelijk vatbaar te worden gescoord. Ook werden effecten van de uitvloeier Silwet waargenomen op de verschillende cv's in relatie tot *B. tulipae* resistentie. Afsluitend kan gesteld worden dat het mogelijk inducerend karakter van de geteste stoffen niet tot resistentie tegen *B. tulipae* heeft geleid.

Integratie van het gebruik van de antagonist *Ulocladium atrum* in de teelt van aardbei voor de bestrijding van vruchtrot (*Botrytis cinerea*)

Jürgen Köhl¹, Bert Evenhuis², Pedro Boff^{1,3}

¹Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen, e-mail: jurgen.kohl@wur.nl;

²Praktijk-onderzoek Plant & Omgeving (PPO), Postbus 430, 8200 AK Lelystad, e-mail:

bert.evenhuis@wur.nl;

³EPAGRI, P.O. Box 181, CEP 88502-970, Lages, SC, Brazilië, e-mail: pboff@epagri.rct-sc.br

Botrytis cinerea veroorzaakt vruchtrot van aardbei. Bloemen en vruchten worden geïnfecteerd door conidia van *B. cinerea*. Sporen kunnen gevormd worden op necrotisch weefsel, zoals afgestorven bladeren in het aardbeigewas, maar ook op dood weefsel van andere planten binnen en buiten het gewas.

De antagonist *Ulocladium atrum* is geselecteerd op zijn vermogen in necrotisch weefsel onder veldomstandigheden te kunnen concurreren met *Botrytis* spp. Het antagonisme resulteert in de onderdrukking van sporulatie van het pathogeen, zoals bij toepassingen in ui tegen *Botrytis squamosa*, of het onderdrukken van de groei van *B. cinerea* vanuit necrotisch weefsel in aangrenzend gezond weefsel, zoals bij toepassingen in cyculaam.

De eerste experimenten in aardbei lieten zien dat *U. atrum* de sporulatie van *B. cinerea* op aardbeibladeren kan onderdrukken en ook bloemen kan beschermen tegen infectie door *B. cinerea*. De antagonist had geen nadelige effect op de bevruchting en vruchtvorming. Vervolgens werd een serie van veldexperimenten uitgevoerd in de jaren 1996 tot 2003 met als doel

het gebruik van *U. atrum* te optimaliseren en te integreren in de eenjarige verlate teelt van aardbei met gekoelde wachtbedplanten. De eerste experimenten werden uitgevoerd om de relevante doelen (plaats van werking) voor de antagonist te identificeren. De resultaten lieten zien dat necrotische aardbeibladeren in de teelt van wachtbedplanten geen belangrijke inoculumbronnen zijn voor *B. cinerea*. De toepassing van *U. atrum* voor de bloei op wachtbedplanten had dan ook geen effect op het optreden van vruchtrot. In hetzelfde experiment reduceerde het gebruik van *U. atrum* of fungicides gedurende de bloei het optreden van vruchtrot significant met 33% respectievelijk 57%. De resultaten van vervolproeven lieten zien dat het interval tussen bespuitingen met de antagonist gedurende de bloei kort moet zijn om een bestrijdingseffect te kunnen garanderen omdat alle bloemen geraakt moeten worden nadat ze open gegaan zijn. Hiervoor zijn tenminste twee 'kalender'-bespuitingen per week nodig.

In 2002 en 2003 werd in de veldexperimenten een Beslissing Ondersteunend Systeem getoetst met als doel de timing van de antagonist-toepassingen te optimaliseren en op grond van voor het pathogeen ongunstige omstandigheden onnodige toepassingen te voorkomen. In 2003 resulteerden zeven regelmatige 'kalender'-bespuitingen van *U. atrum* in een reductie van vruchtrot met 24%. Echter, zes bespuitingen, uitgevoerd op grond van het Beslissing Ondersteunend Systeem had een reductie van vruchtrot met 39% tot gevolg. De toepassing van fungicides volgens dezelfde beslissingsregels leidde tot een reductie van vruchtrot met 67%.

Vervolgonderzoek is gericht op de integratie van het gebruik van fungicides en de antagonist. Ziektebestrijding kan mogelijk verder verbeterd worden indien de

antagonist bij matige infectiekansen, en fungicides bij hoge infectiekansen worden toegepast. Verder moet rekening worden gehouden met de bestrijding van echte meeldauw. Fungicides toegepast tegen vruchtrot hebben vaak een voldoende bijwerking tegen echte meeldauw, maar de antagonist heeft geen werking tegen witziekte.

Het onderzoek werd gefinancierd door het Ministerie voor Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, de Europese Commissie (FAIR3 CT96-1898) en de Braziliaanse Regiering (CAPES 2959/95-0).

Op weg naar een toets voor *Botrytis*-aantasting in roos

Jurriaan J. Mes,
Renata M. Ariens,
H. Martijntje Vollebregt,
Eric P. Boer,
Monique F. van Wordragen

Agrotechnology & Food Innovations,
Bornsesteeg 59, 6708PD Wageningen

De distributie en handel in verse agroproducten heeft grote behoefte aan een test die de initiële kwaliteit van een product kan vaststellen. Deze informatie is noodzakelijk voor het economisch en ecologisch optimaliseren van distributieketens van groente, fruit en siergewassen. Binnen het door EET en PT gefinancierde onderzoek wordt getracht bio-indicatoren te vinden om *Botrytis* aantasting van rozen, in een vroeg stadium van de keten, te kunnen voorspellen.

Dit jaar is gewerkt aan de eerste fase van het onderzoek, het maken van de microarray met daarop de genen die mogelijk betrokken zijn bij de kwaliteitseigenschap die onderzocht wordt. Eerst zijn twee banken gemaakt, een random bank van licht geïnfecteerde buitenpetalen van de gevoelige 'Bian-

ca' roos en een subtractie (SSH) bank van dit zelfde materiaal gesubtraheerd met niet geïnfecteerde binnenpetalen. Van de twee banken zijn gezamenlijk ruim 1800 clonen gesequenced. Na contig analyse konden de sequenties in 1300 unieke contigs gerangschikt worden wat betekent dat de redundantie in de banken niet hoog was. BlastX analyse resulteerde in ongeveer 70% betrouwbare homologie hits met sequenties aanwezig in de databank. Op basis van deze mogelijke functies zijn 1205 unieke ESTen geselecteerd om op een microarray te spotten waarbij sequenties die te maken hebben met DNA/RNA metabolisme en translatie niet geselecteerd zijn. Testhybridisaties hebben inmiddels uitgewezen dat de microarray van goede kwaliteit is.

De volgende stap is het hybridiseren van batches rozen die gesampled zijn op dag 1 (de dag dat ze bij de veiling afgeleverd zouden zijn) en die verschillen in ontwikkeling van *Botrytis* aantasting, waargenomen in uitbloeioproeven. Het afgelopen jaar zijn 25 batches 'Bianca' rozen geanalyseerd op het vóórkomen van *Botrytis*. Hiertoe worden de rozen afgesneden op veertig centimeter, in voedingsoplossing gezet en onder standaardcondities uitgebloeid. Tijdens de uitbloei werd het bloeistadium en de *Botrytis* aantasting gescoord. Er zijn geen kunstmatige besmettingen uitgevoerd, aantasting die gescoord wordt ontstaan dus van nature in het product. De resultaten gaven aan dat er mogelijk kleine telers- en seizoensinvloeden zijn die effect hebben op het vóórkomen van *Botrytis*.

Op basis van de *Botrytis* aantastinggegevens van dag 7 zijn alle geanalyseerde partijen rozen ingedeeld in verschillende kwaliteitsklassen. Meerdere monsters per kwaliteitsklasse zullen nu geanalyseerd worden met behulp van de microarray om indicatorgenen te identificeren die de kwaliteit kun-

nen voorspellen. Immers, de microarray analyses zullen uitgevoerd worden met materiaal van dag 1 waarin de verschillen in aantasting nog niet zichtbaar waren. De indicatorgenen die wij zoeken zijn dus geen genen van *Botrytis* zelf maar genen van de roos die gevoeligheid voor *Botrytis* verraden of genen die geïnduceerd worden in de roos door de eerste sporen van *Botrytis* die op het product geland zijn.

Self-protection of Botrytis against biocontrol agents

*Alexander Schouten,
Grardy van den Berg,
Yaite Cuesta Arenas,
Olesya Maksimova and
Jos M. Raaijmakers*

*Laboratory of Phytopathology,
Wageningen University, P.O. Box 8025,
6700 EE Wageningen, The Netherlands,
E-mail: sander.schouten@wur.nl*

Antibiotics encompass a chemically heterogeneous group of organic, low-molecular weight compounds produced by microorganisms. At low concentrations, antibiotics are deleterious to the growth or metabolic activities of other microorganisms. In the past decades, numerous antibiotics have been isolated from various bacterial strains that are antagonistic to plant pathogenic fungi. Antibiotics are produced in plant-associated environments and play an important role in *in situ* interactions between antagonistic bacteria and plant pathogenic fungi. In the phyllosphere, antibiosis also plays a role in controlling fungal diseases, including "grey mould" caused by *Botrytis cinerea*. Its enormous host range and saprophytic and parasitic life style indicate that *B. cinerea* has the potential to cope with a variety of toxic compounds that are released by the host plants during colonization and infection. Recent

studies in our laboratory have shown that *B. cinerea* can also defend itself against antibiotics produced by antagonistic bacteria. Several *B. cinerea* isolates, obtained from different locations and host plants, were resistant to 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) and phenazines, two structurally different antibiotics produced by strains of *Pseudomonas* bacteria. Biochemical analysis gene expression studie and targeted disruption of specific genes in *B. cinerea* showed that membrane-bound efflux pumps contribute to resistance to phenazines and 2,4-DAPG. In addition to this non-degradative resistance mechanism, studies with specific gene replacement mutants, induction assays and purified secreted proteins demonstrated that a laccase is involved in metabolizing the antibiotic and consequently also contributes to 2,4-DAPG resistance. It can therefore be concluded that the plant pathogenic fungus *B. cinerea* harbours multiple mechanisms to cope with antibiotic metabolites produced by antagonistic *Pseudomonas*.

Botrytis in bloembolgewassen: antagonististen in een geïntegreerde bestrijdingsstrategie

*Rik de Werd, Marjan de Boer,
Ineke Pennock en
Jan van der Bent*

*Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
Bloembollen. Postbus 85,
2160 AB Lisse,
e-mail: rik.dewerd@wur.nl*

Vuur, veroorzaakt door *Botrytis tulipae*, *B. elliptica* and *B. gladiolorum* kan opbrengstverliezen geven tot 80% in respectievelijk tulp, lelie en gladiool door vroegtijdige bovengrondse afsterving. Vuur kan bestreden worden met een combinatie van diverse maatregelen. Mogelijke bouwstenen van een

dergelijke beheersstrategie zijn voor wat betreft Vuur een ruime vruchtwisseling, gewasrestmanagement, gebruik van partieel resistente cultivars, lagere plantdichtheid, ondersteuning door een vuurwaarschuwingssysteem en effectieve bestrijdingsmiddelen.

Vanwege economische overwegingen worden plantdichtheid en cultivarkeuze nauwelijks ingezet in de beheersing van vuur. Gewasrestmanagement, vruchtwisseling en waarschuwingssystemen spelen vaak wel een rol, maar de basis blijft het frequent toepassen van fungiciden, al dan niet gerelateerd aan infectieperioden en cultivargevoeligheid. Het ontbreken van effectieve curatieve middelen is voor veel telers een extra reden voor voorzichtigheid. PPO Bloembollen stimuleert door middel van onderzoek, lezingen en publicaties de toepassing van maatregelen die het gebruik van chemische

middelen kunnen verminderen. Daarnaast wordt in samenwerking met diverse partners binnen WageningenUR onderzocht of antagonisten en gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong (GNO's) gangbare fungiciden (gedeeltelijk) kunnen vervangen.

Twee van de antagonisten die tegen vuur getest zijn hebben drie opéénvolgende jaren in klimaatkastproeven met lelie en tulp bijna uitsluitend goede bestrijdingseffecten laten zien. In dezelfde periode zijn deze antagonisten als onderdeel van een beheersingsstrategie in veldproeven toegepast. De resultaten hiervan zijn tot nog toe minder consistent. In tulp gaf één van de antagonisten een positief effect. In 2003 was de natuurlijke infectiedruk te laag om een effect te kunnen meten en in 2004 wordt op basis van de bovengrondse symptoomvorming geen

effect verwacht. In lelies gaven beide antagonisten in 2002 een licht positief effect (niet significant) op de opbrengst en in 2003 een bestrijdend effect dat vergelijkbaar was met een goedwerkend fungicide. Onderzoek naar de weersomstandigheden en populatieontwikkeling van de antagonisten in het veld na een bespuiting heeft de discrepantie tussen veld- en klimaatkastproeven nog niet kunnen verklaren.

Het onderzoek naar de toepassing van GNO's heeft na een in vitro screening en screening d.m.v. een biotoets met leliebladeren uitgevoerd door Plant Research International, een aantal veelbelovende stoffen opgeleverd. In klimaatkastproeven worden ook goede effecten van diverse GNO's gevonden. Momenteel richt het onderzoek zich met name op werkingsduur, formulering en toedieningstechniek van deze stoffen.