

Vroegtijdig vuur detecteren kan bollentelers uit de brand helpen

Identificatie en detectie van *Botrytis*-soorten in bloembolgewassen

Joop van Doorn¹, Khanh Pham¹ en Jan van Kan²

¹ Praktijkonderzoek Plant en omgeving, onderdeel van Wageningen UR

² Wageningen University, Laboratorium voor Fytopathologie

In bloembolgewassen kan de schimmel *Botrytis* veel schade veroorzaken. *Botrytis* kan snel toeslaan. Snelle en gevoelige toetsen kunnen dan bijdragen tot het op tijd nemen van maatregelen om ‘vuur’ te beheersen. Er komen verschillende *Botrytis*-soorten voor, die moleculair-genetisch gedetecteerd en geïdentificeerd kunnen worden. Serologische toetsen bleken niet te werken. PCR-methodieken, gebaseerd op enkele kleine verschillen in DNA-sequenties wel. Mogelijk kunnen via monitoring van luchtmonsters waarschuwingssystemen voor vuur verder worden verbeterd.

Botrytis in bloembolgewassen

Een van de belangrijkste schimmelziekten die bolgewassen bedreigen wordt veroorzaakt door *Botrytis*-soorten. Onder gunstige (vochtige en niet te koude) omstandigheden kan *Botrytis* zich in lelies of tulpen verspreiden als ‘vuur’! De symptomen variëren van spetters tot grotere aangetaste bladoppervlakken en bloemen (Figuur 1 en 2).

Er komen tenminste tien *Botrytis*-soorten voor in bolgewassen (Tabel 1). Vooral *B. tulipae* in tulp, *B. elliptica* in lelie en *B. gladiolorum* in gladiool veroorzaken veel schade. De meeste *Botrytis*-soorten zijn waardplantspecifiek. De soort *B. cinerea* is echter polyfaag en tast veel verschillende gewassen aan. Deze soort (ook wel grauwe schimmel genoemd) wordt in bolgewassen aangetroffen op afgestorven plantendelen in het veld en tijdens bewaring, vooral in tulp. Op de afgestorven delen groeit *B. cinerea* verder en kan sporen vormen waarmee de schimmel zich verder verspreidt ‘als een lopend vuurtje’. Aan het eind van het

groei seizoen kan de schimmel sclerotien maken: zwarte ingedroogde structuren waarmee hij de winter kan overleven. Vuur, veroorzaakt door *Botrytis tulipae*, *B. elliptica* en *B. gladiolorum* kan opbrengstverliezen geven tot wel 80%

Tabel 1. Overzicht van *Botrytis*-soorten en de bolgewassen die ze aantasten. Voor een aantal zijn DNA-toetsen ontwikkeld.

<i>Botrytis</i> -soort	Bolgewas	ELISA?	DNA-verschillen?	DNA-toets?
<i>B. tulipae</i>	Tulp (vuur) en ook lelie (alleen spetters)	ja	ja	ja
<i>B. elliptica</i>	Lelie (vuur)	ja	ja	ja
<i>B. cinerea</i>	Alle bolgewassen (?)	-	ja	ja
<i>B. narcissicola</i>	Narcis	-	ja	ja
<i>B. polyblastis</i>	Narcis	-	ja	-
<i>B. gladiolorum</i>	Gladiool	-	ja	ja
<i>B. galanthina</i>	Sneeuwkllokje	-	ja	-
<i>B. allii</i>	Sierui	-	ja	-
<i>B. croci</i>	Krokus	-	ja *	-
<i>B. hyacinthi</i>	Hyacint	-	ja *	-

*Tussen *B. hyacinthi* en *B. croci* werden geen verschillen in DNA gevonden, maar wel tussen deze twee en de overige soorten (Kan et al., 2006, Staats et al., 2005 en Figuur 1 in de bijdrage van Staats in dit nummer).
- = geen bekend.

ARTIKEL



Figuur 1. Symptomen ('spetters') in lelie, veroorzaakt door *Botrytis elliptica*. Als de schimmel verder groeit, worden de symptomen ernstiger, en gaat de schimmel sporen produceren. Ook *B. tulipae* kan op lelie spetters veroorzaken. Deze groeien echter niet uit.

ARTIKEL

door vroegtijdige bovengrondse afsterving van het gewas. Uitgaande van een areaal van tulp in Nederland van 10.000 hectare met een waarde van 10 tot 30 k€ per ha, kan de totale economische schade oplopen tot miljoenen euro's.

Beheersing

Hoe kan men deze ziekte beheersen? Een preventieve aanpak is de teelt van vuurongevoelige gewassen en toepassing van een brede gewasrotatie. Het is van belang om gewasresten goed te verwijderen gezien het vermogen van *Botrytis* om vooral op afgestorven delen te groeien. Onderploegen of gebruik van gewasbeschermingsmiddelen na de oogst om ontwikkeling van sclerotia te voorkomen is een optie. Naast chemische middelen zijn er antagonisten voorhanden, meestal bacteriën die schimmels kunnen doden of remmen. Een geïntegreerd systeem waarbij zowel chemische middelen als biologische agentia gebruikt worden is wenselijk. Hiervoor is het waarschuwingssysteem BoWas ontwikkeld (zie hiervoor het artikel van Evenhuis *et al.* in deze uitgave). Een belangrijk aspect voor het onderzoek naar geïntegreerde bestrijding van *Botrytis* is het

verkrijgen van inzicht in de epidemiologie. Dit is niet alleen belangrijk voor de bollenteelt, maar ook toepasbaar voor de glastuinbouw of vollegrondsgroententeelt.

Toetsontwikkeling

Snelle, *Botrytis*-soortspecifieke en gevoelige detectietechnieken zullen toepasbaar zijn in wetenschappelijke studies (epidemiologie van *Botrytis*), in de praktijk en om effecten van gewasbeschermingsmiddelen (biologisch en chemisch) tegen *Botrytis* in detail te kunnen meten. Uiteraard ligt er ook een toepassing bij diagnostische vragen en als objectieve laboratoriumtoets t.b.v. de handel voor bevestiging van onduidelijke of door andere aantastingen gemaskeerde symptomen in bolgewassen. Verder kan vroegtijdige detectie van vuur aangewend worden om het bestaande waarschuwingssysteem (BoWas) voor bollentelers te verfijnen. In samenwerking met PRI en WU Fytopathologie is in de afgelopen jaren aan toetsontwikkeling gewerkt.

1. Serologische detectie van *Botrytis*-soorten

Er zijn polyklonale antisera beschreven, die zijn gericht tegen *Botrytis cinerea* (Meyer *et al.*,

2000). Dit commercieel verkrijgbare antiserum is gebruikt om *B. cinerea* met ELISA aan te tonen. De gevoeligheid bleek niet erg hoog en er trad kruisreactie op met *B. elliptica* en *B. tulipae*. De methode was derhalve niet geschikt voor monitoring van vuur in het veld.

Recombinant-antisera gericht tegen *Botrytis tulipae* (Doorn *et al.*, 2004) reageerden eveneens zwak en weinig-specifiek in ELISA. Hoewel deze techniek goede antilichamen voor andere pathogenen heeft opgeleverd, werkte de methode niet goed voor *Botrytis* in tulp. Daarom is besloten niet met serologische technieken door te gaan.

2. Moleculair-genetische toetsing

Door het laboratorium voor Fytopathologie is een tiental 'huishoudgenen' van *Botrytis*-soorten gesequenced, waaronder de soorten *B. tulipae* (tulp), *B. elliptica* (lelie) en *B. cinerea*. De DNA-sequenties van drie genen van meerdere isolaten per *Botrytis*-soort zijn verder geanalyseerd: Heat Shock Protein 60 (*HSP60*), RNA polymerase (*RPB2*) en Glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase (*G3PDH*) (Staats *et al.*, 2005, Kan *et al.*, 2006). Het bleek dat deze genen genoeg verschillen vertoonden om de ontwikkeling van soortspecifieke PCR-primers mogelijk te maken. Er zijn specifieke primers (Figuur 3) ontwikkeld en onder laboratoriumomstandigheden gevalideerd met DNA van referentie-isolaten van *B. tulipae*, *B. elliptica* en *B. cinerea*. De primers zijn verder getest op veldisolaten van deze drie soorten en op geïnfecteerd of verdacht bladmateriaal. De PCRs bleken robuust, specifiek en gevoelig; voordat er symptomen (lesies of spetters) zichtbaar waren werden *Botrytis*-sporen al aangetoond op planten in het veld.

Testen van de moleculaire toets in de praktijk

Diverse tulp- en leliecultivars zijn bemonsterd in het veld. Planten met en zonder symptomen zijn getest met de PCR-toets. De ruim tachtig monsters lieten zien, dat op tulp *B. tulipae* voorkomt, en op oude symptomen ook *B. cinerea*. Op lelie, die in de praktijk meestal na tulp wordt geteeld en in de proefveldopstelling naast tulpenvelden was gelegen, werden alle drie soorten aangetoond: *B. tulipae* geeft in lelie kleine, niet-doorgroeiende symptomen ('spetters'), terwijl in gevoelige cultivars *B. elliptica* wel uitgroeit en ernstige schade veroorzaakt ('vuur'). Ook hier werd *B. cinerea* aangetoond in oudere symptomen. De gevoeligheid van de PCR op veldmonsters was hoog. Symptoomloze bladdelen in de omgeving van 'spetters' waren in de PCR-toets positief voor *Botrytis*, in tegenstelling tot gezond-

de controleplanten. Ter verdere verbetering van de toets is, in samenwerking met PRI, een real-time PCR-methode ontwikkeld die *B. elliptica* kan detecteren en onderscheiden van andere *Botrytis*-soorten op basis van de DNA-sequentie van het *G3PDH*-gen.

Ook is gekeken in hoeverre het mogelijk was moleculaire detectie van *Botrytis* in andere gewassen dan lelie en tulp te ontwikkelen. Dit betrof o.a. *B. gladiolorum* in gladiool en *B. narcissicola* in narcis. In de gevallen dat praktijkmateriaal met deze aantastingen beschikbaar was, bleken de PCRs goed te werken (Kan *et al.*, 2006).

Toepassing: kwantificering van schimmelsporen in de lucht?

Botrytis verspreidt zich onder gunstige omstandigheden (vochtig, gematigde temperaturen) via de lucht. Via luchtbemonstering zouden sporenvluchten eerder meetbaar kunnen zijn, waardoor waarschuwingssystemen verfijnd kunnen worden. Wanneer er geen sporen zijn (bijvoorbeeld in het begin van het teeltseizoen) maar er wel een waarschuwing wordt afgegeven op grond van temperatuur en luchtvochtigheid zouden er geen gewasbeschermingsmiddelen toegepast hoeven te worden. Via real-time PCR is het mogelijk om een schatting te maken van aantallen sporen. Bij de detectie in bladmateriaal van lelie bedroeg de detectielimiet 10 tot 15 conidia. Bij een pilot-onderzoek is een Burkard sporenvanger neergezet aan de kop van een tulpen- en later een lelieproefveld. Gedurende het veldseizoen van zowel tulp als lelie is bemonstering uitgevoerd: lucht wordt aangezogen door het apparaat, de *Botrytis*-sporen die in de lucht voorko-



Figuur 2. Een massaal door 'vuur' aangetast perceel met een gevoelige leliecultivar (*Stargazer*).

ARTIKEL

men worden opgevangen op een kleverige laag op een plastic filter. Na een week wordt het filter verwijderd en beoordeeld op het vóórkomen van sporen m.b.v. microscopie. DNA werd van de filters geïsoleerd en geanalyseerd op de aanwezigheid van *Botrytis*-sporen en hun hoeveelheid. Waarnemingen van de aantallen sporen op de filters werden vervolgens vergeleken met de infectiekansen die werden voorspeld door het waarschuwingssysteem en de weersomstandigheden. In deze pilot zijn alleen kwalitatieve gegevens verzameld.

In 2007 bleken *Botrytis*-sporen weinig voor te komen in de eerste teeltperiode van lelie (30 mei tot 5 juni), maar toe te nemen in de periode van 15 augustus tot 20 augustus. Er waren ook dagen dat geen sporen van *Botrytis* werden gedetecteerd (13-15 juli). In de eerste periode werd een waarschuwing gegeven (advies tot spuiten) terwijl er geen sporen werden gemeten en ook visueel in het gewas geen spetters zichtbaar werden. Voor het maken van een goede ijkreeks (DNA-concentratie versus aantal sporen) en inschatting van de waarde van deze metingen voor het waarschuwingssysteem is vervolgonderzoek nodig. Daarbij is het van belang om meerdere opstellingen te gebruiken en vooral te bemonsteren in het vroege voorjaar (*B. tulipae*) en begin van de zomer (*B. elliptica*).

Wat kan de praktijk ermee?

Met de ontwikkeling van gevoelige toetsen kan *Botrytis* worden aangetoond voordat er symptomen optreden. In sommige gevallen is bestrijding niet nodig. Op lelie kan *B. tulipae* spetters geven, maar deze zetten niet

door. Ook is meetbaar of er veel of weinig *B. cinerea* aanwezig is. Deze kan in de bewaring van tulpenbollen toeslaan. Verder is gebleken, dat sommige symptomen lijken op die van *Botrytis*, maar een andere oorzaak hebben. Bij gladiool lijkt een bladziekte, veroorzaakt door de schimmel *Stemphyllium*, veel op een *Botrytis*-aantasting. Voor onderzoek is het nu mogelijk om de overleving van *Botrytis* en verspreiding in het gewas te kunnen meten (Carisse *et al.*, 2008). Dit is van belang om betere, meer gerichte bestrijdingsmethoden te ontwikkelen. De effecten van biologische of geïntegreerde bestrijding zijn meetbaar door vast te stellen of er meer of minder sporen of schimmeldraden aanwezig zijn op plantmateriaal. Dit kan een belangrijke aanvulling leveren op waarschuwingssystemen voor vuur aan het begin van het ‘vuur-seizoen’, waarbij onnodig spuiten wordt voorkomen. Toepassing van luchtmonitoring kan verder uitgebreid worden naar andere sporen-vormende schimmels, naar bacteriën zoals *Erwinia* en mogelijk ook naar meting van fijnstof!

Literatuur

Carisse O, Savary S & Willocquet L (2008) Spatiotemporal relationships between disease development and airborne inoculum in unmanaged and managed *Botrytis* leaf blight epidemics. *Phytopathology* 98: 38-44

Doorn J van, Pham K, Paffen A, Boogert P van den & Kan J van (2004) Verspreiding van vuur: aantonen voor je het ziet! *Bloembollenvisie* 29: 20-21

Kan J van, Staats M, Baarlen P van & Doorn J van (2006) Genetische variatie van *Botrytis* schimmels in bolgewassen. *Bloembollenvisie* 57: 20-21

Meyer UM & Dewey FM (2000) Efficacy of different immunogens for raising monoclonal antibodies to *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 104: 979-987

Staats M, Baarlen P van & Kan J van (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22: 333-346

<i>B. elliptica</i>	TTTGC	GAA - CTCCTCGGTTACCTAGTTGTAAAATTCTAATCGTTGGTGAATAGA
<i>B. galanthina</i>	TTTGTGAAACCCCGGCTGCCTACTTGCGAAATTCTAATTGTTGGTGAATAGA	
<i>B. convoluta</i>	TTTGTGAAACCCCGGCTACCTAGTTGTAAAATTCTAATTGTTGGTGAATAGA	
<i>B. paeoniae</i>	TTTGTGAAATCCCCTGGCTAACTAGTTGTAAAATTCTAATTGTTGGTGAATAGA	
<i>B. hyacinthi</i>	TTTGTAGA ACTCTCCGGCTACCTAGTTGTAAAATTCTAATTGTTGGCGAATAGA	
<i>B. croci</i>	TTTGTAGA ACTCTCCGGCTACCTAGTTGTAAAATTCTAATTGTTGGCGAATAGA	
<i>B. gladiolorum</i>	TTTGTGAAA <u>CCCCCGGCTGCCTAGTTCCAGA</u> ATTCTAATGGCTGGTGAATAGA	
<i>B. narcissicola</i>	TTTGTGAAACCCCGGCTGCCTAATTGCAAAATTCTAATTGTTGGTGAATAGA	
<i>B. tulipae</i>	TTTGT <u>GAAATCCCCGGCC</u> ACCTAGTTGCAAAATTCTAATTGTTGGTGAATAGA	
<i>B. polyblastis</i>	TTTGTGAAACCCCGGCTGCCTAGTTGCAAAATTCTAATTGTTGGTGAATAGA	
<i>B. cinerea</i>	<u>TTTGCAAAACTCCC - GGCT</u> ACCTAGTTTCAAGATTCTAATTATTGGTGAATAGA	
	* * * * *	

Figuur 3. Vergelijking van DNA-sequenties van het gen voor ‘Heat shock eiwit’ (HSP60) van verschillende *Botrytis*-soorten. * geeft een positie aan die in alle soorten hetzelfde is. De posities van de ‘forward’-primers van *Botrytis cinerea*, *B. tulipae* en *B. gladiolorum* zijn onderstreept.