

CODEN: IBBRAH (4-85) 1-26 (1985)

INSTITUUT VOOR BODEMVRUCHTBAARHEID

RAPPORT 4-85

DE ROL VAN HET ANTAGONISME BIJ DE OVERLEVING VAN RHIZOCTONIA SOLANI
SCLEROTIËN IN GROND

*With a summary: The role of antagonism in the survival of sclerotia
of Rhizoctonia solani in soil*

door

H. VELVIS

1985

Instituut voor Bodemvruchtbaarheid, Oosterweg 92, Postbus 30003,
9750 RA Haren (Gr.)

Inst. Bodemvruchtbaarheid, Rapp. 4-85 (1985) 26 pp.

INHOUD

1. Inleiding	3
2. Materiaal en methoden	5
2.1. Grondsoorten	5
2.2. Sclerotiën	6
2.3. Bepaling overleving	7
2.4. Controle op antagonisten	7
3. Resultaten	9
3.1. De overleving van sclerotiën in verschillende gronden	9
3.2. Vergelijking overleving van gekweekte en natuurlijke sclerotiën	13
3.3. Invloed temperatuur op overleving sclerotiën in grond	15
3.4. De snelheid waarmee sclerotiën door <i>V. biguttatum</i> gekoloniseerd worden	17
4. Discussie	20
5. Samenvatting	22
6. Summary	23
7. Literatuur	24

1. INLEIDING

Rhizoctonia solani is in staat zich op verschillende wijzen te handhaven in grond. Voor de actieve overleving is van belang zijn relatief groot vermogen tot competitief saprofytisme (Papavizas, 1970). Sommige auteurs benadrukken echter dat voor de overleving vooral de pathogene fase van betekenis is (Christou, 1962; Pitt, 1964; Sanford, 1952). Dit onderscheid heeft betrekking op een verschil in inoculumdichtheid. Bij afwezigheid van een waardplant ligt deze veelal onder de detectiegrens van de gebruikte methoden. Tijdens het groeiseizoen van een gevoelig gewas wordt een sterke toename van de inoculumdichtheid waargenomen, die na verwijdering van het gewas weer daalt naar een veel lager niveau (Herr, 1976; Papavizas *et al.*, 1975; Roberts and Herr, 1979; Sanford, 1952).

Inactief overleeft *R. solani* d.m.v. sclerotiën of dikwandige hyfen in planteresten (Boosalis and Scharen, 1959). Deze structuren kunnen tot ca. 5 jaar levensvatbaar blijven (Herzog und Wartenberg, 1958) en onder droge omstandigheden zeker 6 jaar (Gadd and Bertus, 1928).

Hoewel er tussen *Rhizoctonia*-stammen verschillen bestaan in overlevingscapaciteit (Baker *et al.*, 1967; Olsen *et al.*, 1967; Papavizas, 1964), wordt de populatie-ontwikkeling in een gegeven grond sterk bepaald door omgevingsfactoren. Dit kunnen chemische factoren zijn, zoals CO₂-concentratie of N-gehalte (Papavizas, 1970), en vooral NH₄-N (Papavizas *et al.*, 1975), of K₂O-gehalte (Lewis, 1979). Het kunnen ook fysische factoren zijn zoals textuur (Herr, 1976; Lewis, 1979; Papavizas, 1968; Sirry *et al.*, 1974), vochtigheid en temperatuur (Papavizas, 1970).

Ook biologische factoren zijn belangrijk, nl. de aanwezigheid van een waardplant (zie boven) of 'drager' (Daniëls, 1963; Griesbach, 1975; Griesbach, 1980; Jager *et al.*, 1982), de algemene microbiële activiteit (Lewis, 1979) en het antagonisme (Baker *et al.*, 1967; Herzog und Wartenberg, 1958; Naiki and Ui, 1972). Meestal zal een complex van factoren de ontvankelijkheid van een grond voor *R. solani* bepalen.

De in de literatuur vermelde voorbeelden van *Rhizoctonia*-onderdrukkende gronden, al dan niet geïnduceerd, worden meestal in verband gebracht met het optreden van bepaalde antagonisten (Van den Boogert and Jager, 1983; Chet and Baker, 1981; Henis *et al.*, 1978; Liu and Baker, 1980).

Jager en Velvis (1983) vonden dat sclerotiën van *R. solani* afkomstig uit zure zandgronden voor 73% geïnfecteerd waren met hyperparasitaire schimmels, tegen 25% bij de neutraal tot alkalische klei- en zavelgronden.

Een onderzoek van Velvis en Jager (1983) bracht aan het licht dat de overleving van sclerotiën van *R. solani* bij incorporatie in verschillende gronden nogal uiteen kan lopen. Deze beide gegevens duiden op een aanzienlijk onderscheid in antagonist-populaties in diverse grondsoorten.

De rol van het antagonisme bij de overleving van *Rhizoctonia*-sclerotiën wordt in dit onderzoek nader bestudeerd.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Grondsoorten

Eind oktober/begin november 1983 zijn grondmonsters gehaald van zandgronden uit Haren en Zeyerveld, van zavelgronden uit Kloosterburen en Tollebeek (Noordoostpolder) en van kleigronden uit Grijpskerk en de Flevopolder (Minderhoudhoeve), waarin die zomer aardappels verbouwd waren.

De grond is vóór het gebruik gezeefd door een 3-mm zeef. Een aantal gegevens van de gronden staat vermeld in tabel 1.

TABEL 1. Gegevens over de gebruikte grond.
TABLE 1. Relevant data on the soils used.

	pH (KCl)	Slib (%)	Humus (%)
Zandgrond Haren	4,5	5,4	4,3
Zeyerveld	4,9	6,8	6,9
Zavelgrond Kloosterburen	5,0	13,3	1,5
Tollebeek (NOP)	7,6	12,5	2,1
Kleigrond Grijpskerk	7,2	39,7	4,1
Flevopolder	7,4	45,5	3,1

Ook is een analyse verricht van in deze gronden voorkomende mycoparasieten. Van elke grond zijn 100 pellets à 0,075 g (droog) gezet op agarplaten (mout-gistextract-agar, MGA) met *R. solani* cultures van één week oud (*Rhizoctonia*-platen). Na 10 dagen bij 20 °C zijn de pellets onder een Wild M3 stereomicroscop gecontroleerd op uitgroei van mycoparasieten (zie tabel 2).

TABEL 2. Het voorkomen van mycoparasieten in de grond bij de aanvang van de proef*.

TABLE 2. Occurrence of mycoparasites in the soil at the start of the experiment.

	V.big	G.ros	G.nigr	H.fim	Volut.cil	Trich.spp	Cylindr.	overige
Haren	357	2	17	0	0	aanwezig	0	0
Zeijerveld	38	0	0	0	0	0	0	0
Kloosterburen	281	28	0	0	0	0	6	0
Tollebeek	6	0	0	0	1	0	0	0
Grijpskerk	8	14	0	0	2	0	0	1
Flevopolder	0	0	0	0	3	0	0	0

* Weergegeven als 'bezettingsindex': dit is het percentage grondpellets met uitgroei van de mycoparasiet vermenigvuldigd met de mate van uitgroei, uitgedrukt in een schaal van 1 t/m 5. Maximale bezetting is dus 500.

V.big= *Verticillium biguttatum*; G.ros= *Gliocladium roseum*; G.nigr= *Gliocladium nigrovirens*; H.fim= *Hormiactis fimicola*; Volut.cil= *Volutella ciliata*; Trich.spp= *Trichoderma* spp.; Cylindr.= *Cylindrocarpus destructans*.

2.2. Sclerotiën

In de meeste proeven werd gebruik gemaakt van gekweekte sclerotiën, omdat alleen daardoor kon worden gewaarborgd dat het uitgangsmateriaal absoluut vrij was van antagonisten en uniform van grootte. De sclerotiën werden verkregen van ca. 3 weken oude *R. solani* 41AHa cultures op MGA. Van dit materiaal werden sclerotiën geponsd met een doorsnee van 2 mm, die vervolgens aan de lucht werden gedroogd.

In één proef werd de overleving van gekweekte en natuurlijke sclerotiën vergeleken. Sclerotiën afkomstig van aardappelknollen werden gebruikt.

2.3. Bepaling overleving

Van ieder grondmonster werden hoeveelheden van ca. 100 g vlak ingevuld in petrischalen van 15 cm. Op het oppervlak werden op regelmatige afstand van elkaar per petrischaal 10 sclerotiën geplaatst, op stukjes nylongaas van ca. 1 cm². Alles werd afgedekt met een stuk nylongaas en vervolgens met nog een laag grond van 100 g. Naast de verschillende grondsoorten werd een controle met perliet ingezet.

Iedere week werden de petrischalen gewogen en door bijdruppelen van water op gewicht gebracht.

De controle op overleving gebeurde door de sclerotiën na een bepaalde incubatie-periode uit de grond te halen, op 2% wateragar te zetten, en na 1 dag bij 20°C de uitgroei te bepalen. Daarbij werden de sclerotiën in klassen ingedeeld naar het aantal uitgegroeide hyfen per sclerotium: 0, 1-5, 6-10, 11-25 en >25 hyfen. Op grond van deze cijfers werd de vitaliteits-index (V) berekend volgens een formule,

$$V = \frac{\%(0) \times 0 + \%(1-5) \times 1 + \%(6-10) \times 2 + \%(11-25) \times 3 + \%(>25) \times 4}{4}$$

2.4. Controle op antagonisten

Bij het verwijderen van de sclerotiën uit de grond werd genoteerd op hoeveel sclerotiën met het blote oog mycoparasieten te zien waren. De sclerotiën werden, na controle van de uitgroei op wateragar, op vochtig perliet gezet en na 14 dagen incubatie bij 25°C onder de stereomicroscop beoordeeld op het voorkomen van mycoparasieten. Bij de eerste proef werd hiermee volstaan. In de daarop volgende proeven werden dezelfde sclerotiën ook nog op *Rhizoctonia*-platen gezet en na 10 dagen bij 25°C nogmaals beoordeeld op uitgroei van mycoparasieten. Een bepaling van bacterie- en streptomyceet-antagonisten werd alleen in de eerste proef uitgevoerd, door een gedeelte van de sclerotiën fijn te

malen met behulp van een Silverson-mixer in 200 ml suspenseervloeistof (0,2% NaCl, 0,05% Na₂CO₃ en 0,1% (NaPO₃)₆ in demi-water). Hiervan werd een verdunningsreeks gemaakt. Van een aantal verdunningen werden vervolgens bacterie-telplaten gegoten in grondextractagar (per liter demi-water: 8 g agar; 0,5 g glucose; 0,2 g vleesextract; 0,2 g gistextract; 0,4 g pepton; 100 ml grondextract; voedingszouten en spoorelementen). Van telplaten met een redelijk te tellen aantal kolonies (tussen 20 en 200) werden de bacteriën en streptomyceten overgeënt op MGA en apart getest op hun antibiotisch vermogen t.o.v. *R. solani*.

3. RESULTATEN

3.1. De overleving van sclerotiën in verschillende gronden

In iedere grondsoort werden zowel bij 10 als bij 20 °C 100 sclerotiën ingezet: 50 voor de bepaling van de overleving en de kolonisatie door mycoparasieten, en eveneens 50 voor de bepaling van het aantal antibionten.

De gronden werden ingesteld op pF 2.0.

Aanvankelijk was het de bedoeling om na ca. 1 maand de sclerotiën uit de grond te halen. Met die uit perliet en uit de zavelgrond van Tollebeek (NOP) is dit ook gebeurd, maar toen bleek dat deze sclerotiën allemaal nog springlevend waren, is besloten de rest nog langere tijd in de grond te laten. Wel is ter controle ook van de zandgrond uit Haren (20 °C) nog 1 petrischaal opgeofferd. Van de 10 sclerotiën hieruit groeiden 4 niet uit op wateragar. Op 1 sclerotium was met het blote oog duidelijk de witte sporulatie van *Verticillium biguttatum* te zien, op 5 andere sclerotiën werden onder de stereomicroscoop sporoforen van *V. biguttatum* geconstateerd.

Na 75 dagen zijn de overige sclerotiën uit de grond gehaald. De gegevens over de levensvatbaarheid, het voorkomen van mycoparasieten en de aanwezigheid van antibionten zijn respectievelijk samengevat in de tabellen 3, 4 en 5.

Bij 10 °C trad er in de grond geen afname in vitaliteit op. Bij 20 °C was er een beduidend verschil tussen de gronden. Een sterke doding van sclerotiën had - m.u.v. de Flevopolder-grond - plaats in gronden met een relatief hoge dichtheid aan *Verticillium biguttatum*. Dit zijn gronden met een lage pH. *V. biguttatum* kan, zoals aangetoond (Velvis and Jager, 1983), sclerotiën doden.

TABEL 3. Levensvatbaarheid van de sclerotiën na een verblijf van 75 dagen in de grond.

TABLE 3. *Vitality of the sclerotia after 75 days in the soil.*

	Temp. °C	% scler. waaruit uitgroei volgende aant. hyfen					Vitaliteits- index
		0	1-5	6-10	11-25	>25	
Haren	10	0	0	0	0	100	100
	20	63	3	0	3	31	34
Zeijerveld	10	0	0	0	0	100	100
	20	30	10	0	2	58	62
Kloosterburen	10	0	0	0	0	100	100
	20	56	0	0	0	44	44
Tollebeek*	10	0	0	0	0	100	100
	20	0	0	0	0	100	100
Grijpskerk	10	0	0	0	0	100	100
	20	4	4	0	0	92	93
Flevopolder	10	0	2	2	2	94	97
	20	86	10	4	0	0	5
Perliet*	10	0	0	0	2	98	100
	20	0	0	0	0	100	100

*De sclerotiën uit perliet en uit de zavelgrond van de NOP zijn na 35 dagen bekeken.

Op een paar uitzonderingen na geldt dat de sclerotiën óf dood waren, óf nog zeer vitaal. Na de kolonisatie door de antagonist vindt de doding kennelijk vrij snel en radicaal plaats. Het lijkt erop dat een belangrijk deel van het proces zich in de grond uit Haren al in de eerste maand heeft afgespeeld.

TABEL 4. Het vóórkomen van mycoparasieten op de sclerotiën na een verblijf van 75 dagen in de grond.

TABLE 4. Occurrence of mycoparasites on the sclerotia after 75 days in soil.

	T, °C	% scler. met mycoparasieten						
		met blote oog	na 14 dg. op perliet, ingedeeld in soorten					
			V.big	H.fimic	Glio.spp	Trich.spp	Volut.cil	overige
Haren	10	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	18 ^x	0	0	0	0	0
Zeijerveld	10	0	2 ^x	0	0	0	0	0
	20	0	2 ^x	0	0	0	0	0
Kl'buren	10	0	0	0	0	0	0	0
	20	2	22 ^x	0	0	0	0	0
Tollebeek*	10	0	0	0	0	0	6	0
	20	0	0	0	0	0	0	0
Grijpskerk	10	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	2 ^x	0	0	0	0	0
Flevop.	10	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0

*De sclerotiën uit Tollebeek zijn na 35 dagen bekeken en op perliet gezet.

^xAlleen op levende sclerotiën.

V.big= *V. biguttatum*; H.fimic= *Hormiactis fimicola*; Glio.spp= *Gliocladium* spp; Trich.spp= *Trichoderma* spp; Volut.cil= *Volutella ciliata*

Een andere aanwijzing dat *V. biguttatum* verantwoordelijk was voor de doding, is het feit dat het de enige mycoparasiet was die op de bij 20°C geïncubeerde sclerotiën voorkwam, vooral in gronden waar veel doding optrad. Bovendien zijn maar incidenteel antagonistische bacteriën en streptomyceten waargenomen (tabel 5). Toch zou in de monsters met een groot aantal gedode sclerotiën een hoger percentage sclerotiën met *V. biguttatum* verwacht mogen worden. Bij Zeijerveld-grond was dit zelfs

maar 2%. Opvallend was dat dode sclerotiën nergens begroeiing met *V. biguttatum* te zien gaven, maar uitsluitend de levende.

TABEL 5. Het aantal bacteriën en streptomyceten en het percentage hiervan dat antibiotisch is t.o.v. *R. solani* van 50 sclerotiën na een verblijf van 75 dagen in de grond.

TABLE 5. Number of bacteria and streptomycetes and their proportion (%) that is antibiotic with respect to *R. solani* on 50 sclerotia after 75 days in soil.

	Temp. °C	Aant. bact. x 2.10 ⁶	% antibioten
Haren	10	39 S = 4	2
	20	110 S = 16	0
Zeijerveld	10	41 S = 7	0
	20	44 S = 14	0
Kloosterburen	10	54 S = 9	0
	20	79 S = 13	0
Tollebeek*	10	56 S = 7	2
	20	57 S = 8	0
Grijpskerk	10	29 S = 9	0
	20	23 ^x S = 7	10 ^x
Flevopolder	10	286 S = 19	0
	20	163 S = 17	0

*De sclerotiën uit de zavelgrond van Tollebeek (NOP) zijn na 35 dagen bekeken.

^xBacterie-telplaten overwoekerd door spreidende bacillen; telling niet betrouwbaar.

Er is reden te veronderstellen dat er een bepaalde ontwikkeling is in de kolonisatie van de sclerotiën door *V. biguttatum* in de grond. Na 1 maand bevatten 6 van de 10 sclerotiën uit Harener grond *V. biguttatum*. Na 75

dagen was dit bij dezelfde grond nog maar 18% (op perliet). De groei van *V. biguttatum* stopt waarschijnlijk kort nadat de sclerotiën gedood zijn (het substraat is op); na verloop van tijd is hij op de sclerotiën niet meer te zien. Groei en sporulatie treedt alleen op bij pas gekoloniseerde sclerotiën die nog in leven zijn. Vandaar het relatief kleine aantal sclerotiën met *V. biguttatum* op perliet. Het is aannemelijk dat de conidiën van *V. biguttatum* nog wel op de gedode sclerotiën aanwezig waren. Om dit aan te tonen zijn de sclerotiën in de volgende proeven ook nog op Rhizoctonia-platen gezet.

De Flevopolder-grond vormde een uitzondering. In deze grond werd bij het begin van de proef geen *V. biguttatum* aangetroffen, en ook nauwelijks andere mycoparasieten. Na 75 dagen zijn op de sclerotiën uit de grond evenmin mycoparasieten aangetroffen. Niettemin is 86% van de bij 20°C geïncubeerde sclerotiën dood. Bij controle onder de microscoop bleken de dode sclerotiën evenwel grote aantallen nematoden met stilet te bevatten, meer dan 500 per sclerotium. Dit is bij de dode sclerotiën uit de andere gronden niet waargenomen. De doding van de sclerotiën in Flevopolder-grond moet dus worden toegeschreven aan parasitaire nematoden, die bij 10°C nauwelijks actief zijn.

3.2. Vergelijking overleving van gekweekte en natuurlijke sclerotiën

De overleving van gekweekte en natuurlijke sclerotiën werd vergeleken in zandgrond uit Haren en kleigrond uit de Flevopolder. Per object werden 50 sclerotiën ingezet bij 20°C. Het vochtgehalte van de grond werd ingesteld op 50% van het waterhoudend vermogen (WHV).

Op 12% van de natuurlijke sclerotiën werd *V. biguttatum* aangetroffen na een incubatie van 11 dagen op vochtig perliet, en op 8% *Penicillium* spp. Vijf procent van deze sclerotiën was dood.

Na 75 dagen werden de sclerotiën uit de grond gehaald. In de kleigrond van de Flevopolder liep de vitaliteit van de natuurlijke sclerotiën sterker terug dan van de gekweekte (tabel 6). Hoewel een deel van deze sclerotiën bij het begin al besmet was met *V. biguttatum*, is op de 15 dode sclerotiën maar één keer *V. biguttatum* waargenomen (tabel 7),

en wel bij incubatie op *Rhizoctonia*-platen. Van de gekweekte sclerotiën bleken in dezelfde grond 2 van de 3 dode, na incubatie op *Rhizoctonia*-platen, geïnfecteerd te zijn met *V. biguttatum*.

TABEL 6. Levensvatbaarheid van gekweekte en natuurlijke sclerotiën na een verblijf van 75 dagen in grond.

TABLE 6. *Vitality of cultured and natural sclerotia after 75 days in soil.*

Herkomst grond	Type scler.	% scler. ingedeeld naar uitgroei aant. hyfen					Vitaliteits- index
		0	1-5	6-10	11-25	>25	
Flevopolder	gekweekt	6	0	2	16	76	89
	natuurlijk	30	2	0	8	60	67
Haren	gekweekt	70	6	0	0	24	26
	natuurlijk	72	0	0	2	26	28
Uitgangs- situatie	gekweekt	0	0	0	0	100	100
	natuurlijk	5	0	0	5	90	94

In de Harener zandgrond was er in de teruggang in vitaliteit van gekweekte en natuurlijk sclerotiën vrijwel geen verschil. Hier kon in beide gevallen op ca. 80% van de gedode sclerotiën *V. biguttatum* worden aangetoond, ook nu alleen na incubatie op *Rhizoctonia*-platen. Dat was meer dan op de levende (zie ook tabel 9).

Een aanzienlijk deel van de doding is dus toe te schrijven aan *V. biguttatum*. De schimmel blijft, waarschijnlijk in spore-vorm, aanwezig op gedode sclerotiën. De gekweekte sclerotiën bleken verder veel vaker geïnfecteerd te zijn met *Gliocladium nigrovirens*. De vaak wat losser samengestelde gekweekte sclerotiën zouden vatbaarder kunnen zijn voor deze myco-parasiet dan de op de aardappelknol gevormde. In eerder onderzoek (Velvis and Jager, 1983) is geen dodingseffect van *G. nigrovirens* op (natuurlijke) sclerotiën aangetoond.

TABEL 7. Het voorkomen van mycoparasieten op gekweekte en natuurlijke sclerotiën na een verblijf van 75 dagen in grond.*
 TABLE 7. Occurrence of mycoparasites on cultured and natural sclerotia after 75 days in soil.

Herkomst grond	Type scler.	Aant.	Op perliet							Op <i>Rhizoctonia</i> -platen						
			V.b.	G.r.	G.n.	H.f.	V.c.	T.sp.	P.sp.	V.b.	G.r.	G.n.	H.f.	V.c.	T.sp.	P.sp.
Flevopolder	gekweekt dood	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	levend	47	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1
	natuurlijk dood	15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	levend	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Haren	gekweekt dood	35	0	0	0	0	2	0	2	30	0	24	0	2	0	0
	levend	15	5	0	0	0	0	0	1	10	1	8	0	0	0	0
	natuurlijk dood	36	0	0	0	0	0	0	0	28	0	5	0	0	0	1
	levend	14	2	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0

*Gegeven is het aantal sclerotiën dat de betreffende mycoparasiet bevat.

V.b.=*Verticillium biguttatum*; G.r.=*Gliocladium roseum*; G.n.=*Gliocladium nigrovirens*; H.f.=*Hormiactis fimicola*; V.c.=*Volutella ciliata*; T.sp.=*Trichoderma* spp.; P.sp.=*Penicillium* spp.

In vergelijking met de voorgaande proef valt op, dat de doding in de Flevopolder-kleigrond nu veel geringer was dan in Harener zandgrond. Parasitaire nematoden werden nu niet waargenomen. Het lager vochtgehalte kan hieraan debet zijn.

Wat betreft de afname in vitaliteit in zand- en kleigrond zijn gekweekte en natuurlijke sclerotiën goed vergelijkbaar. Ten gunste van de gekweekte sclerotiën kan worden gezegd dat ze uniform van grootte zijn en geen antagonisten bevatten, zodat de doding van sclerotiën ondubbelzinnig kan worden toegeschreven aan ongunstige factoren in de grond zelf. Een nadeel is dat het effect van *G. nigrovirens* wellicht wordt overgewaardeerd.

3.3. Invloed temperatuur op overleving sclerotiën in grond

Zoals in de eerste proef is aangetoond (tabel 3), overleven sclerotiën van *R. solani* bij 10°C goed in alle gronden. Dit stemt overeen met literatuurgegevens over sclerotiën van *R. solani* en andere schimmels (Velvis and Jager, 1983; Willets, 1971).

Aannemelijk kon worden gemaakt dat bij 20°C *V. biguttatum* de belangrijkste veroorzaker is van de doding. Deze schimmel heeft een groeiminimum tussen de 10 en 15°C. In deze proef is nagegaan hoe het staat met de overleving bij drie temperaturen boven de 10°C, te weten 13, 16 en 20°C. De bepaling werd uitgevoerd in de zandgrond uit Haren, die het meest effectief bleek. Bij elke temperatuur werden 50 gekweekte sclerotiën ingezet in grond met een vochtgehalte van 50% WHV. Na 74 dagen zijn ze uit de grond gehaald.

Het aantal gedode sclerotiën vertoonde een opklimmende reeks naarmate de temperatuur hoger was (tabel 8), en weerspiegelde tevens de kolonisatieactiviteit van *V. biguttatum* (tabel 9).

TABEL 8. Levensvatbaarheid van sclerotiën na een verblijf van 74 dagen in Harener zandgrond bij 13, 16 en 20°C.

TABLE 8. *Vitality of sclerotia after 74 days in Haren sand at 13, 16 and 20°C.*

Temp.	% scler. ingedeeld naar uitgroei aantal hyfen					Vitaliteits-index
	0	1-5	6-10	11-25	>25	
Uitgangssituatie	0	0	0	0	100	100
13°C	16	2	0	0	82	83
16°C	54	6	0	0	40	42
20°C	84	2	0	0	14	15

Bij 13°C waren al enkele sclerotiën gedood, hetgeen betekent dat de minimumtemperatuur tussen 10 en 13°C moet liggen. Vrijwel alle gedode sclerotiën bleken *V. biguttatum* te bevatten. Omdat dit weer alleen geconstateerd werd na incubatie op *Rhizoctonia*-platen, zijn de gegevens over de begroeiing met mycoparasieten op perliet nu niet vermeld.

TABEL 9. Het voorkomen van mycoparasieten op sclerotiën na een verblijf van 74 dagen in zandgrond uit Haren bij 13, 16 en 20°C *.
 TABLE 9. Occurrence of mycoparasites on sclerotia after 74 days in Haren sand at 13, 16 and 20°C.

Temp.	Aant.	Na incubatie op <i>Rhizoctonia</i> -platen						
		V.b.	G.r.	G.n.	H.f.	V.c.	T.sp.	P.sp.
13°C dood	8	8	0	2	0	0	0	1
levend	42	16	0	1	0	0	0	0
16°C dood	27	27	1	19	0	5	0	0
levend	23	11	0	0	0	0	0	0
20°C dood	42	40	1	25	0	0	0	1
levend	8	6	0	0	0	0	0	1

*Gegeven is het aantal scler. dat de betreffende mycoparasiet bevat.
 Voor de betekenis v.d. afkortingen: zie onder tabel 7.

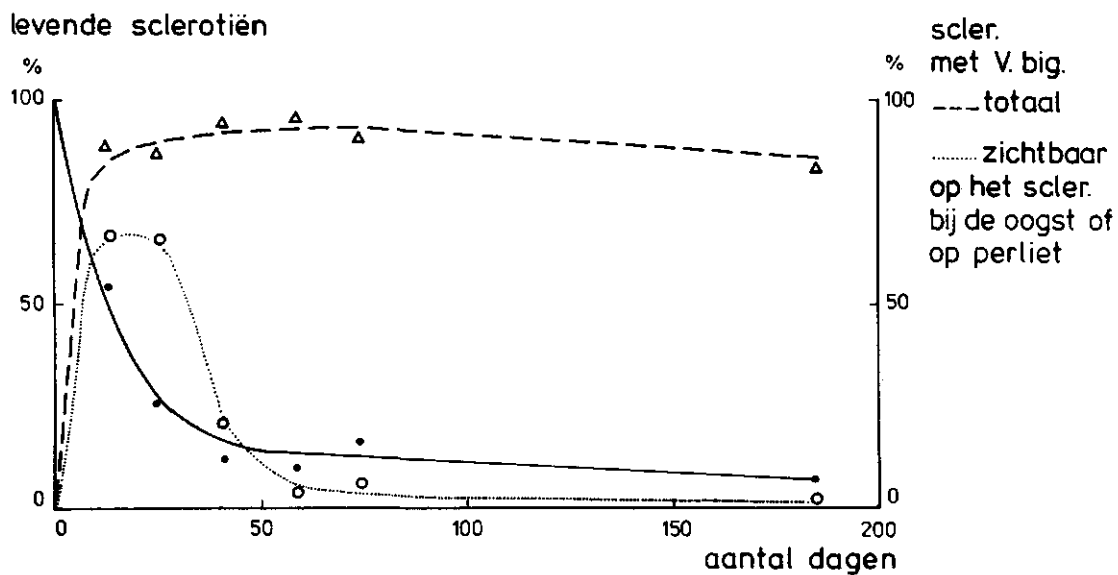
Van de overige mycoparasieten kwam alleen *G. nigrovirens* frequent voor, echter bijna alleen op gedode sclerotiën. Hoewel in de vorige proef ook levende (gekweekte) sclerotiën veelvuldig *G. nigrovirens* bevatten (tabel 7), zou het kunnen zijn dat deze schimmel beter in staat is de sclerotiën te koloniseren als ze reeds verzwakt zijn. Ook toen kwam *G. nigrovirens* op de gedode sclerotiën relatief wat meer voor. Dit sluit aan bij de constatering dat de 'hardere' knolsclerotiën minder vaak geïnfecteerd bleken met *G. nigrovirens* dan de 'lossere' gekweekte (tabel 7). Nader onderzoek moet dit nog uitwijzen.

3.4. De snelheid waarmee sclerotiën door *V. biguttatum* gekoloniseerd worden

Bij de eerste proef werd vermoed dat het proces van doding van sclerotiën in de Harener zandgrond al voor een groot deel in de eerste maand was

voltooid. (Deze grond was rijk aan *V. biguttatum*.) En verder dat de kolonisatie van sclerotiën door *V. biguttatum* volgens een bepaald patroon verloopt. Om dit nauwkeuriger te toetsen, zijn sclerotiën gedurende perioden van verschillende lengte geïncorporeerd in grond. Ook deze proef werd uitgevoerd met zandgrond uit Haren. Voor ieder tijdstip werden 50 gekweekte sclerotiën ingezet bij een vochtgehalte van 50% WHV. De incubatietemperatuur was 20°C. Sclerotiën werden geoogst na 13, 25, 41, 59, 74 en 185 dagen. Bepaald werden de vitaliteit van de sclerotiën en de aanwezigheid van *V. biguttatum* hierop.

In figuur 1 zijn de uitkomsten weergegeven.



Figuur 1. De overleving van sclerotiën en de kolonisatie hiervan door *V. biguttatum* in de loop van de tijd in Harener zandgrond bij 20°C.

Figure 1. Course of survival of sclerotia and their colonization by *V. biguttatum* in Haren sand at 20°C.

De aanwezigheid van *V. biguttatum* is op twee manieren in beeld gebracht:
 a. het aantal sclerotiën dat bij het uit de grond halen of na incubatie op perlit zichtbaar begroeid was (stippellijn);

b. het totaal aantal waarop *V. biguttatum* voorkwam, dus na incubatie op *Rhizoctonia*-platen (streepjeslijn).

Reeds na 13 dagen was bijna de helft van de sclerotiën gedood en ca. 90% van de sclerotiën gekoloniseerd door *V. biguttatum*. Daarna nam het aantal door *V. biguttatum* geparasiteerde sclerotiën vrijwel niet meer toe, wel het aantal gedode sclerotiën. Na 41 dagen leek het aantal overlevende sclerotiën zich min of meer te hebben gestabiliseerd rond tien procent. Ook na een half jaar is maar weinig vermindering opgetreden. Een dergelijk verloop is ook door De Weerd (1984) aangetoond in dalgrond bij 18°C. Kennelijk vindt de vitaliteitsreductie tussen de 13e en 41e dag voornamelijk plaats op sclerotiën die al in de eerste twee weken door *Verticillium* waren geïnfecteerd.

De kolonisatie van sclerotiën door *V. biguttatum* in grond vindt dus relatief snel plaats. Sclerotiën die daarna nog niet geparasiteerd zijn, hebben een grote kans blijvend aan parasitering te ontsnappen. Het is uitgesloten dat het hier zou gaan om meer resistente sclerotiën of om sclerotiën die ten gevolge van begroeiing door andere micro-organismen een voor *Verticillium* ongunstig microklimaat om zich heen hebben opgebouwd. Beënting van overgebleven levende sclerotiën met *V. biguttatum* resulteerde al vrij snel in parasitering en doding ervan.

De stippellijn toont dat het aantal sclerotiën dat zichtbaar geparasiteerd was bij het uit de grond halen of na incubatie op perliet, eerst ook hoog was, maar na 25 dagen heel snel daalde. Dit weerspiegelt de terugval van het aantal levende nog parasiteerbare sclerotiën, terwijl van de dode sclerotiën de aanvankelijke, rijke begroeiing met *Verticillium*-conidioforen verdwijnt. Toch bleek ook na een half jaar van de resterende levende sclerotiën nog een enkele gekoloniseerd te zijn door *V. biguttatum*. Dit proces gaat nog heel geleidelijk door.

4. DISCUSSIE

Voor de doding van sclerotiën van *Rhizoctonia solani* lijkt (in de onderzochte gronden) *Verticillium biguttatum* verantwoordelijk te zijn. Van bacteriën en streptomyceten is geen effect aangetoond. Andere mycoparasieten lijken een ondergeschikte rol te spelen. In één geval moest de doding aan parasitaire nematoden worden toegeschreven. Het waren de zuurdere gronden, twee zandgronden en één zavel, waarin *V. biguttatum* veel voorkwam en waarin de sterkste vitaliteitsreductie optrad. Deze gegevens stemmen overeen met onderzoek aan sclerotiën afkomstig van een groot aantal proefvelden (Jager and Velvis, 1983). Ook hierin bleek dat *V. biguttatum* verreweg de meest vóórkomende mycoparasiet was. Sclerotiën uit (zure) zandgronden waren gemiddeld driemaal zo vaak geïnfecteerd met *V. biguttatum* als sclerotiën uit de meer neutrale klei- en zavelgronden. Of er sprake is van een direct of indirect effect van de pH op *V. biguttatum*, is nog in onderzoek.

Het is niet waarschijnlijk dat de beteugeling van *R. solani* in Nederlandse aardappelgronden door één schimmel bepaald wordt. Gegevens uit eerder onderzoek (Jager and Velvis, 1980) leren dat het besmettingsniveau van *R. solani* in de klei- en zavelgronden gemiddeld zeker niet hoger is dan in zand- en dalgronden. Eerder het tegendeel is waar. Op langere termijn en onder veldomstandigheden zullen daarom nog andere biotische en wellicht abiotische factoren de *Rhizoctonia*-dichtheid in sterke mate beïnvloeden. Papavizas *et al.* (1975) noemen als mogelijke oorzaken van de door hen geconstateerde sterke afname van de *Rhizoctonia*-populatie gedurende winter en voorjaar de geleidelijke uitputting van de "food bases" in de grond en het nadelig effect van de lage temperatuur op *R. solani*. Zij concluderen dat *R. solani* in hoge mate afhankelijk is van planteweefsel en vrijwel verdwijnt wanneer dit is uitgeput. Roberts and Herr (1979) veronderstellen in dit verband dat de stilstand van actief parasitisme (bij biet) ten gevolge van de lage temperatuur, en de daardoor ontstane drastisch beperkte nutriëntenbenutting, leidt tot stress en afsterving van de minder vitale *Rhizoctonia*-propagels.

In hoever dergelijke mechanismen ook bij aardappel-pathogene *R. solani* de populatie-ontwikkeling beïnvloeden zal nader onderzoek moeten uitwijzen. Veel hangt af van de vorm waarin *R. solani* achterblijft in de grond. Uit ons onderzoek is gebleken dat in de grond resterende ruststructuren, in casu sclerotiën, in de ene grond aanzienlijk betere overlevingskansen hebben dan in de andere grond, wanneer de omstandigheden gunstig zijn (dichtheid *V. biguttatum*; temperatuur, etc.).

De vraag is of in de grond aanwezig hyfen-materiaal van *R. solani* in dezelfde mate wordt gekoloniseerd door mycoparasieten als sclerotiën. Wat in feite de rol is van het antagonisme in de populatiedynamiek van *R. solani* is dan ook nog niet opgehelderd.

Het proces van de kolonisatie van sclerotiën door *V. biguttatum* kan zeer snel verlopen, zoals uit de laatste proef in de Harener zandgrond blijkt (figuur 1). Het kleine aantal dat aan parasitering ontsnapt, blijft er kennelijk ook op langere termijn min of meer van gevrijwaard en vormt mogelijk een bron voor volgende infecties. Van den Boogert (persoonlijke mededeling) heeft aangetoond dat er een vrij direct contact tussen een conidium van *V. biguttatum* en *R. solani* nodig is om het conidium te doen ontkiemen en daarna te doen penetreren in de *Rhizoctonia*-cellen. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat het merendeel van de sclerotiën in de nabijheid van één of meer actieve *Verticillium*-sporen is gekomen, met als gevolg dat de kolonisatie snel plaatsvond. Een gering aantal sclerotiën zal dat nauwe contact niet hebben gehad en daardoor aan kolonisatie zijn ontsnapt. Een probleem hierbij is, dat de sclerotiën bij het in de grond plaatsen meteen ontkiemen. De uitgelopen hyfen verplaatsen zich over ruime afstand door de grond. De kans dat daarbij géén contact gemaakt wordt met een *Verticillium*-spore is, gelet op de dichtheid van *V. biguttatum* in de Harener zandgrond, erg klein. Of *V. biguttatum* zich in de grond echter via de hyfen over grotere afstanden naar het sclerotium verplaatst is niet zeker. Ook dit is een aanknopingspunt voor nader onderzoek. Bovenstaande veronderstelling impliceert dat het aantal sclerotiën dat wordt gekoloniseerd samenhangt met de dichtheid van *V. biguttatum*. De snelheid waarmee dit aantal wordt gekoloniseerd hangt onder meer af van de temperatuur en van de vitaliteit van de betrokken *V. biguttatum* sporen. Dit zal onderzocht worden.

5. SAMENVATTING

Sclerotiën van *Rhizoctonia solani* werden bij 10 en 20°C geplaatst in een zestal gronden, namelijk 2 zand-, 2 zavel- en 2 kleigronden. Bij 10°C waren na 75 dagen de sclerotiën vrijwel allemaal nog in leven. Teruggang in vitaliteit is gevonden bij 20°C in de zandgronden en in één zavelgrond (alle met een pH-KCl van 5 of lager), met een relatief hoge dichtheid van de mycoparasiet *Verticillium biguttatum*, en ook in een kleigrond uit de Flevopolder. In dit laatste geval waren waarschijnlijk parasitaire nematoden verantwoordelijk voor de sterke sclerotiumdoding. *V. biguttatum* blijkt de belangrijkste veroorzaker van de vitaliteitsreductie. Ophopingen van antagonistische bacteriën en streptomyceten werden nergens op de sclerotiën aangetoond. In de zandgrond van Haren speelde, naast *V. biguttatum*, waarschijnlijk *Gliocladium nigrovirens* een rol.

De bodemtemperatuur is van grote invloed op de vitaliteitsreductie: het minimum ligt tussen 10 en 13°C; daarboven neemt de activiteit snel toe.

In de Harener zandgrond vond (bij 20°C) kolonisatie en doding van sclerotiën zeer snel plaats: binnen twee weken was ca. 90% van de sclerotiën geparasiteerd door *V. biguttatum* en ca. 50% gedood. Slechts een klein deel van de sclerotiën ontsnapte aan de kolonisatie en bleef tenminste een half jaar levensvatbaar. Geconcludeerd werd dat vooral de initiële kolonisatie door *V. biguttatum* de overlevingskansen van de sclerotiën bepaalt. Deze kolonisatie hangt af van de dichtheid van *V. biguttatum*.

6. SUMMARY

Sclerotia of *R. solani* were placed about 1 cm deep into two sands, two sandy loams and two clay loams in petridishes, and kept at 10 or 20°C. At 10°C all sclerotia were still alive after 75 days. A considerable decrease in vitality, however, was observed at 20°C in the sands and in one sandy loam (from Kloosterburen), containing high densities of the mycoparasite *Verticillium biguttatum*. These soils had a pH-KCl of 5 or lower. Many sclerotia were also killed in one clay loam, apparently as a result of attack by parasitic nematodes. *V. biguttatum* appeared to be the most important cause of reduction in vitality. Accumulation of antagonistic bacteria and streptomycetes was not observed in any of the soils. In sand from Haren, *Gliocladium nigrovirens* presumably played a role, besides *V. biguttatum*.

Soil temperature greatly affects vitality; the minimum lies between 10 and 13°C; at higher temperatures activity increases rapidly. The rate of colonization and killing of sclerotia was high in the Haren sand at 20°C: within 2 weeks almost 90% of the sclerotia was parasitized by *V. biguttatum*, while 50% was killed. A small number of sclerotia, however, escaped colonization and survived for at least half a year. It was concluded that first-stage colonization by *V. biguttatum* governs survival of sclerotia.

7. LITERATUUR

- Baker, K.F., N.T. Flentje, C.M. Olsen and H.M. Stretton, 1967. Effect of antagonists on growth and survival of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 57: 591-597.
- Boogert, P.H.J.F. van den, and G. Jager, 1983. Accumulation of hyperparasites of *Rhizoctonia solani* by addition of live mycelium of *R. solani* to soil. *Neth. J. Pl. Path.* 89: 223-228.
- Boosalis, M.G. and A.L. Scharen, 1959. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces eutiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. *Phytopathology* 49: 192-198.
- Chet, I. and R. Baker, 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290.
- Christou, T., 1962. Penetration and host-parasite relationships of *Rhizoctonia solani* in the bean plant. *Phytopathology* 52: 381-389.
- Daniels, J., 1963. Saprophytic and parasitic activities of some isolates of *Corticium solani*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 485-502.
- Gadd, C.H. and L.S. Bertus, 1928. *Corticium vagum* B & C. The cause of a disease of *Vigna oligosperma* and other plants in Ceylon. *Ceylon J. Sci.* 11: 27-49.
- Griesbach, E., 1975. Die Bedeutung von Unkräutern für die Übertragung von *Rhizoctonia solani* Kühn. I. Das Vorkommen von *Rhizoctonia solani* Kühn auf Unkräutern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd., Abt. 2,* 130: 45-63.
- Griesbach, E., 1980. Die Bedeutung von Unkräutern für die Übertragung von *Rhizoctonia solani* Kühn. IV. Die Rolle der Unkräuter bei der Überwinterung des Erregers. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd., Abt. 2,* 135: 195-200.
- Henis, Y., A. Ghaffar and R. Baker, 1978. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: Effect of successive plantings, PCNB,

- and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. *Phytopathology* 68: 900-907.
- Herr, L.J., 1976. In field survival of *Rhizoctonia solani* in soil and in diseased sugarbeets. *Can. J. Microbiol.* 22: 983-988.
- Herzog, W. und H. Wartenberg, 1958. Untersuchungen über die Lebensdauer der Sklerotien von *Rhizoctonia solani* (Kühn) im Boden. *Phytopath. Zeitschr.* 33: 291-315.
- Jager, G. en H. Velvis. 1980. Onderzoek naar het voorkomen van *Rhizoctonia*-werende aardappelpercelen in Noord-Nederland. *Inst. Bodemvruchtbaarheid, Rapp.* 1-80, 62 pp.
- Jager, G., W. Hekman and A. Deenen, 1982. The occurrence of *Rhizoctonia solani* on subterranean parts of wild plants in potato fields. *Neth. J. Pl. Path.* 88: 155-161.
- Jager, G. and H. Velvis, 1983. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potato fields. 1. Occurrence. *Neth. J. Pl. Path.* 89: 21-29.
- Lewis, J.A., 1979. Influence of soil texture on survival and saprophytic activity of *Rhizoctonia solani* in soils. *Can. J. Microbiol.* 25: 1310-1314.
- Liu, S. and R. Baker, 1980. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 404-412.
- Naiki, T. and T. Ui, 1972. The microorganisms associated with the sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kühn in soil and their effects on the viability of the pathogens. *Mem. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 8: 252-265.
- Olsen, C.M., N.T. Flentje and K.F. Baker, 1967. Comparative survival of monobasidial cultures of *Thanatephorus cucumeris* in soil. *Phytopathology* 57: 598-601.
- Papavizas, G.C., 1964. Survival of single-basidiospore isolates of *Rhizoctonia praticola* and *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 10: 739-746.
- Papavizas, G.C., 1968. Survival of root-infecting fungi in soil. VIII. Distribution of *Rhizoctonia solani* in various physical fractions of naturally and artificially infested soils. *Phytopathology* 58: 746-751.
- Papavizas, G.C., 1970. Colonisation and growth of *Rhizoctonia solani* in soil. In: J.R. Parmeter (ed.), *Rhizoctonia solani, biology and pathology*. Univ. Calif. Press, Berkeley, Los Angeles and London. (Overzichtsartikel) pp. 108-122.

- Papavizas, G.C., P.B. Adams, R.D. Lumsden, J.A. Lewis, R.L. Dow, W.A. Ayers and J.G. Kantzes, 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology* 65: 871-877.
- Roberts, D.L. and L.J. Herr, 1979. Soil populations of *Rhizoctonia solani* from areas of healthy and diseased beets within four sugarbeet fields differing in soil texture. *Can. J. Microbiol.* 25: 902-910.
- Pitt, D., 1964. Studies on sharp eyespot disease of cereals. II. Viability of sclerotia: persistence of the causal fungus, *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Appl. Biol.* 54: 231-240.
- Sanford, G.B., 1952. Persistence of *Rhizoctonia solani* Kühn in soil. *Can. J. Bot.* 30: 652-664.
- Sirry, A.R., H.F. Higazy and A.A. Farahat, 1974. Studies on root rot disease of *Phaseolus vulgaris* L. caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agric. Res. Rev. (Cairo)* 52: 23-30.
- Velvis, H. and G. Jager, 1983. Biological control of *Rhizoctonia solani* on potatoes by antagonists. I. Preliminary experiments with *Verticillium biguttatum*, a sclerotium-inhabiting fungus. *Neth. J. Pl. Path.* 89: 113-123.
- Weerd, J. de, 1984. Invloed van natuurlijke factoren op de overleving van *Rhizoctonia solani*. Stageverslag voor de Rijks Hogere Landbouwschool te Groningen.
- Willems, H.J., 1971. The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biol. Rev.* 46: 387-407.