

# KNPV-Werkgroep Botrytis

Zestien onderzoekers van de KNPV-werkgroep Botrytis hielden op 18 september 2002 hun jaarlijkse bijeenkomst op het PPO Bomen in Boskoop. Hun zeven presentaties staan hieronder samengevat.

## Botrytis problems in hardy ornamentals

Fons van Kuik en  
Sabine Böhne

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving  
Bomen, Boskoop, Expertisegroep  
Gewasbescherming

*Botrytis cinerea* causes blight of flowers, leaves, and shoots and decay of fruit of hundreds of woody and herbaceous plant species worldwide. *B. cinerea* is most prevalent in humid areas, colonising dead vegetable matter and attacking living tissues predisposed by poor nutrition, low light intensity, low temperature, prolonged succulence, senescence, or toxic chemicals. The fungus often colonises dead plant parts first and then spread into living ones. Strains of *B. cinerea* that attack woody plants show no host specificity. They cause diseases including twig, flower and seedling blight and stem canker. Coniferous seedlings in dense seedbeds are subject to leaf and shoot blight. Dark lesions on succulent shoots commonly develop at the bases of killed needles and may then girdle the shoots. *B. cinerea* also causes storage mold and rot of many kinds of woody horticultural plants and forest tree seedlings. On dormant nursery stock in storage, the pathogen kills bark and cambium, causing them to become brown and mushy. Latent infections are common in many plants.

*Botrytis cinerea* flourishes where air is moist and stagnant. The cli-

mate events likely to promote blight are a warm period in early spring, causing growth to begin, then cool humid weather, which prolongs succulence in developing leaves and shoots. Frost damage, whether it kills or only weakens plant tissues, also set the stage for attack, especially if followed by wet weather. A few days of warm dry weather will prevent or check the disease.

Although plants vary in susceptibility to *B. cinerea*, no resistance is known in either woody or herbaceous plants.

Botrytis blight can be prevented, or losses can be minimised, by any measure that prevents plant stress or promotes air circulation and helps keep plant surfaces dry.

In general, growers rely heavily on fungicides to control *Botrytis* diseases. Chemicals registered for use against *Botrytis* in nursery stock are: thiram, tolylfluanide and the dicarboximides iprodion, vinchlozolin and procymidon. For developing anti-resistance strategies new fungicides are desirable. At Applied Plant Research Nursery Stock a range of fungicides, natural disease control products and microbials is tested to control grey mould in cuttings.

Most of the natural products tested were not effective against *Botrytis* neither were the biologicals. Unfortunately, the antagonist *Ulocladium atrum* could not be tested, thus far.

In the new crop protection programme, 2002- 2004, there seems to be an opportunity to test the microbials *Ulocladium*, *Aureobasidium*, and *Pseudomonas* or their combinations in cuttings of hardy ornamentals.

## Epidemiologie van Botrytis paeoniae in pioenroos

Jos Wubben, Dik Krijger,  
Ineke Bosker

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,  
Sector Glastuinbouw, Aalsmeer

In de teelt van pioenroos wordt veel schade veroorzaakt door de plantpathogene schimmels *Botrytis paeoniae* en *Botrytis cinerea*. In een vroeg stadium kunnen "omvallers" ontstaan doordat de jonge bloemstelen aan de basis aangetast worden. In een later stadium worden bladeren en bloemknoppen aangetast. Tijdens langdurig natte omstandigheden kan de schade op een perceel oplopen tot wel 80 %. Een zware aantasting van bovengrondse plantendelen levert tevens groeiremming op van het ondergrondse plantgedeelte (*bulb*) waardoor ook opvolgende jaren een verminderde productie geven.

Epidemiologisch onderzoek moet inzicht geven in maatregelen die genomen kunnen worden om aantasting te verminderen. Hiervoor is op een praktijklocatie het verloop van een natuurlijke aantasting gevolgd waarbij extra aandacht uitging naar mogelijke besmettingsbronnen. Omvallers zijn vroeg in het seizoen zichtbaar (eind maart) zodra de stengel boven de grond uitgroeit. De oorspronkelijke besmetting van omvallers zit vaak vlak boven de uitgroei uit de *bulb*. Dit duidt op een besmetting vanuit de grond. Met het verloop van de aantasting worden op de zieke stengelbasis conidiën gevormd welke door luchtverplaatsing verspreid worden. Lage aantallen Botrytissporen worden al vanaf eind maart in de lucht aangetroffen.

KNPV-WERKGROEP

Met name wanneer de temperatuur hoger wordt in combinatie met een hogere luchtvochtigheid, worden zeer veel *Botrytis*sporen in de lucht gevonden. Deze kunnen onder vochtige omstandigheden bovengrondse delen van de plant aantasten. Bij het afsterven van het aangetaste materiaal aan het einde van het teeltseizoen kunnen veel sclerotiën gevormd worden die in de grond kunnen overblijven. Deze zouden in het volgende jaar aantasting van jonge knoppen teweeg brengen. Nader onderzoek moet uitwijzen of dit daadwerkelijk het geval is. Dit najaar (2002) en komend voorjaar wordt de effectiviteit van teeltmaatregelen op een aantal praktijkpercelen onderzocht. Het gaat hier met name om maatregelen om het aangetaste plantmateriaal te verwijderen of te vernietigen. Daarnaast worden de mogelijkheden van een waarschuwingssysteem voor bestrijding van *Botrytis* in pioenen onderzocht.

## **Bestrijding van *Botrytis* in aardbeien met de hulp van een BOS, gericht op BoWaS**

Johan Wander<sup>1</sup>, Pascal Wanten<sup>2</sup> en Roeland Kalkdijk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PPO-agv, Lelystad en <sup>2</sup> PPO-agv Meterik.

In 2000 is PPO-agv begonnen met het valideren van een aantal beslissingsondersteunende systemen (BOS) voor de bestrijding van *Botrytis* in aardbeien. Tot en met 1999 werd door het FPO in samenwerking met Opticrop het model voor de bestrijding van *Botrytis* in bloembollen aangepast aan aardbeien. In het huidige onderzoek ligt het zwaartepunt bij dit model (BoWaS). In 2000 en 2001 werden ook een BOS van Dacom en DLV

(inmiddels overgenomen door WeerOnline) getest.

Voor de acceptatie van een BOS door telers zal een systeem aan een aantal vereisten moeten voldoen. Vooral bij aardbeien gaat het bij telers (nog) niet om vermindering van de fungiciden-input en moet het bestrijdingsniveau hoog zijn. In de afgelopen jaren is gebleken dat vermindering van het aantal bespuitingen op basis van een BOS leidt tot meer aardbeien met een aantasting door *Botrytis*. Voor de aardbeientelers is dit onaanvaardbaar. Bij gebruikmaking van een BOS moet de aantasting maximaal op hetzelfde niveau blijven. Per BOS moet daartoe bekeken worden wat een aanvaardbaar niveau is voor de infectiekans waarbij een advies gegeven wordt om te spuiten.

Gebleken is ook dat de kennis over de werking van fungiciden in aardbeien onvoldoende is. De aardbeienbloem is het meest gevoelig voor infectie tijdens de bloei. Standaard wordt er vanuit gegaan dat de werkingsduur van een fungicide zeven dagen is. Echter, is een bloem in bloei ook beschermd als deze bloem enkele dagen eerder nog in het knopstadium bespoten is?

Voorts is er ook over de curatieve werking van enkele fungiciden onvoldoende bekend. Alleen Scala heeft een curatieve werking, maar de effectiviteit van dit middel valt in de praktijk tegen.

In de huidige Nederlandse BOS-en wordt geen rekening gehouden met het bloeiverloop van aardbeien en de gevoeligheid voor infectie in verschillende ontwikkelingsstadia van de bloei. Simulatie met een Italiaans model, waarin dit wel is ingebouwd, leverde een aantal interessante spuitmomenten op. Er kan van uitgegaan worden dat het bloeiverloop van aardbeien in Italië anders is dan in Nederland. Voor de uitbreiding van Neder-

landse BOS-en met een bloeimiddel zullen dus gegevens verzameld moeten worden.

## ***Ulocladium* is *Botrytis* een slag voor, maar nog niet praktijkrijp**

A. Evenhuis<sup>1</sup>, E.T.M. Meekes<sup>2</sup>, J.A.M. Wilms<sup>1</sup>, M.P.J. Linssen<sup>1</sup>, C.H. Lombaers<sup>2</sup> en J. Köhl<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Praktijkonderzoek Plant en Omgeving, <sup>2</sup> Plant Research International

*Botrytis cinerea* is de belangrijkste veroorzaker van vruchtrot in aardbei. De afgelopen jaren is bij het Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (Horst) in samenwerking met Plant Research International het gebruik van *Ulocladium atrum* onder praktijkomstandigheden getoetst.

Kolonisatie van kroonbladeren door *B. cinerea* nam af gedurende de bloei. Bij de *U. atrum* behandeling was deze afname significant groter dan bij de onbehandelde controle en fungicidebehandeling. Het uiteindelijke percentage vruchtrot was bij de fungicidebehandelingen het laagst. Ook behandelingen met *U. atrum* verminderde het percentage aangetaste vruchten significant; in sommige gevallen was de bestrijding even goed als bestrijding met behulp van fungiciden (tolylfluamide/ iprodion).

De productie van klasse 1 aardbeien bij *U. atrum*-behandeling bleef echter achter in vergelijking met het gebruik van fungiciden. Dit verschil is mogelijk te verklaren door een zware meeldauwaantasting in de controle en *U. atrum* behandeling in tegenstelling tot de fungicidebehandeling, Tolyfluamide heeft namelijk een nevenwerking op meeldauw. Chemische be-

strijding en in mindere mate *U. atrum* verbeterden de houdbaarheid van aardbeien licht.

In biologische teelten zou *U. atrum* goed ingezet kunnen worden. In de geïntegreerde teelt is eveneens een plaats weggelegd voor *Ulocladium*, b.v. in combinatie met bestrijdingsmiddelen. Ook als de omstandigheden voor chemische bestrijding ongunstig zijn, bijvoorbeeld een nat gewas of bij lichte regen, kan *Ulocladium* toegepast worden. Uitgezocht moet worden of de effectiviteit van *Ulocladium* verbeterd kan worden door *Ulocladium* bespuitingen beter te timen met behulp van *Botrytis*-waarschuwingssystemen. Verder zou optimalisering van spuittechnieken en toepassing in combinatie met ander biologische bestrijders de effectiviteit van *Ulocladium* kunnen verbeteren.

## **Endopolygalacturonases van *Botrytis cinerea*: karakteristieken in vitro**

*Geja Krooshof, Harry Kester, Kim Burgers en Jacques Benen*

*Microbiology/Fungal genomics, Wageningen Universiteit*

*Botrytis cinerea* is een fytopathogene schimmel die grote problemen veroorzaakt in de teelt van economisch belangrijke gewassen zoals aardbei, rozen, bloembollen, druiven, kiwi, etc. Een essentiële stap in het infectieproces is de afbraak van de celwand van de plant. Om de plantencel te kunnen binnendringen, scheidt *Botrytis cinerea* een flink aantal celwandafbrekende enzymen uit, waarvan zes endopolygalacturonases (BcPG's) de meest belangrijke lijken te zijn. Deze BcPG's zijn on-

langs geïsoleerd en gekarakteriseerd om hun rol in het infectieproces nader te bepalen. Omdat de zuivering van de enzymen uit *B. cinerea* zelf erg lastig is, zijn gistcellen (*Pichia pastoris*) gebruikt om de BcPG's afzonderlijk van elkaar te produceren. De *P. pastoris* cellen maken de *Botrytis* enzymen aan na toediening van methanol. De enzymen zijn vervolgens gezuiverd en hun biochemische karakteristieken bepaald, zoals het pH optimum en substraatspecificiteit. Ook is gekeken hoe de enzymen hun substraat (pectine) afbreken en welke producten uiteindelijk ontstaan. De resultaten laten zien dat de BcPG's verschillende eigenschappen hebben ondanks hun overeenkomstige eiwitsequenties. Ze vervullen elk een eigen rol tijdens infectie. Afhankelijk van de te infecteren plantensoort maakt *Botrytis* de gewenste PG's aan die de klus kunnen klaren.

Het volgende doel is om eiwitten te vinden die de activiteit van de polygalacturonases kunnen remmen, want die zouden een *Botrytis* infectie kunnen vertragen of zelfs volledig tegengaan. Het is reeds bekend dat planten zulke PG-remmende eiwitten kunnen bezitten. Mogelijk kunnen PG-remmers ooit worden ingezet in de bestrijding van *Botrytis cinerea* infecties, maar voordat het zover is, is nog veel onderzoek nodig.

## **De rol van endopolygalacturonases in het infectieproces van *Botrytis cinerea***

*Ilona Kars, Lia Sibbel en Jan A.L. van Kan*

*Wageningen Universiteit, Laboratorium voor Fytopathologie*

Tijdens het infectieproces van *Botrytis cinerea* wordt een groot aantal celwand-afbrekende enzymen uitgescheiden, waaronder zes endopolygalacturonases (BcPGs) en een pectine methylesterase (BcPME). Ten Have *et al.* (1998) liet zien dat de eliminatie van *Bcpg1* een reductie in virulentie veroorzaakte op drie verschillende waardplanten. De aanwezigheid van meerdere genen die elk voor celwandafbrekende enzymen coderen doet vragen rijzen over de exacte functie van zo'n set enzymen. Het is onze doelstelling om te weten te komen of elk van deze endoPG's en pectine methylesterase een specifieke functie hebben tijdens het infectieproces. Om dit te onderzoeken zijn mutanten gemaakt waarin elk van de individuele *Bcpg* en *Bcpcme* genen is uitgeschakeld. De keuze voor de genen is gebaseerd op een genexpressie studie die hieraan vooraf ging. De virulentie van de verschillende *Botrytis cinerea* mutanten wordt momenteel getest op verscheidene plantensoorten. De eerste resultaten geven aan dat tenminste twee mutanten minder virulent zijn dan de wildtype stam B05.10. De reductie in virulentie is zelfs sterker dan die van de *Bcpg1* mutant.

[KNPV-WERKGROEP

## **Beheersing van *Botrytis* spp., veroorzaker van 'vuur' in bolgewassen, met behulp van antagonistische micro-organismen**

Marjan de Boer, Ineke Pennock-Vos

PPO sector Bloembollen, Lisse.

*Botrytis elliptica* en *Botrytis tulipae* zijn de veroorzakers van vuur in respectievelijk lelie en tulp. Deze *Botrytis* soorten zijn verantwoordelijk voor een productie verlies tot 80 % (afhankelijk van de cultivar). Om vuur te bestrijden worden relatief veel fungiciden

toegepast (25-40 kg/hectare). In het kader van vermindering van afhankelijkheid van chemische bestrijdingsmiddelen wordt er bij PPO-Bloembollen in Lisse onderzoek gedaan naar effecten van antagonistische micro-organismen die vuur in tulp en lelie kunnen beheersen. In klimaatkastexperimenten met tulp en lelie zijn een aantal antagonisten onderzocht op hun bestrijdende werking tegen *Botrytis*. Met name een antibioticum producerende *Pseudomonas* stam (beschikbaar gesteld door Jos Raaijmakers, Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit) en een gist (beschikbaar gesteld door Aleid Dik, PPO-Glas) bleken effectieve beheersers van vuur in zowel tulp als lelie. Deze antagonisten zijn vervolgens ook in een veldexperiment onderzocht. Hierin bleken de antagonisten niet of nauwelijks vuur te beheersen.

Gezien de goede potentiële werking van een paar antagonisten zal in vervolgonderzoek de optimalisering van de werking onder veldomstandigheden van deze antagonisten een belangrijke rol spelen. Hiertoe zal het tijdstip van toediening, hechting aan het blad, (verlenging van) werkingsduur worden onderzocht. Daarnaast wordt onderzocht of de toepassing van antagonisten in combinatie met andere maatregelen zoals b.v. fungiciden en andere pesticiden, het *Botrytis*-waarschuwingssysteem, plantdichtheid, N-bemesting, gewasrest-management leidt tot een goede vuurbestrijding met minder fungicide-input. Het combineren van verschillende soorten maatregelen moet leiden tot de ontwikkeling van een biologische of geïntegreerde beheersstrategie van vuur.