

Biologische bestrijding Droge mol (*Verticillium*)

PT PROJECTNUMMER 14830

Peter Oei, ECO Consult Foundation, Culemborg
Dr. G. Albert, Pilzforum, Hackenheim, Duitsland

September 2014

Productschap  Tuinbouw

Met financiële ondersteuning van het Productschap Tuinbouw

Contactpersoon: Jan Vink

Begeleiding vanuit PAC: Niek Franzmann,



Contactpersoon voor deze rapportage:

Peter Oei
info@spore.nl
www.spore.nl
HR Holststraat 44
4103 VB Culemborg
Tel: 06 515 42 882

Samenvatting

Speciaal geselecteerde bacteriën (*Bacillus subtilis*) bleken al eerder in staat om *Trichoderma* en bacterievlekken (*Pseudomonas tolaasii*) te onderdrukken en de kwaliteit van de champignons te verbeteren. Nu blijkt het zelfde principe ook te werken tegen Droge Mol (*Verticillium*). Om bacteriën te vinden die een antagonistische werking hebben tegen *Verticillium* zijn er monster genomen op plekken waar reeds een *Verticillium* infectie aanwezig was. Deze zijn getest en 14 daarvan hadden een antagonistische werking. Van deze 14 stammen zijn de 6 meest potente getest op in een champignonteelt simulatie experiment. Hier werd een opzettelijke *Verticillium* infectie geïnduceerd en de antagonistische bacteriën eenmalig toegevoegd aan de dekaarde. De meest potente stammen vertoonde een reductie tot 37%, in het verlies van verkoopbare champignons door *Verticillium*. Gebruik van deze bacteriën in de praktijk leverde geen opbrengstdaling op; onder laboratoriumomstandigheden waren de opbrengsten in kilo's gelijk aan de de controle.

Inleiding

In de champignonteelt treden regelmatig kwaliteits- en opbrengstproblemen op door verschillende pathogene bacteriën en schimmels. Schade door Droge Mol komt regelmatig voor. In de literatuur en uit de praktijk is bekend dat bepaalde bacteriën, waaronder stammen van *Bacillus subtilis*, ongewenste schimmels en bacteriën kunnen onderdrukken. Zo is in Thailand een biologische bestrijding tegen *Trichoderma* in de handel onder de naam Plaikaow. Doel van dit onderzoek is om rassen *Bacillus subtilis* en *Pseudomonas* te vinden, die de champignonsector kan gaan inzetten om op een duurzame wijze het gewas te beschermen. Hiervoor is een groot aantal isolaten van bacteriën verzameld uit aarde, compost waar reeds een *Verticillium* infectie aanwezig was en natto (een Japanse gefermenteerde bonenspecialiteit, waarvan bekend is dat *Bacillus subtilis* een belangrijk onderdeel van de microflora uitmaakt). Van deze stammen was vooraf niet bekend of ze enige werking ten opzichte van *Verticillium* zouden hebben. Daarom is vervolgens een selectieproces uitgevoerd: een test of deze stammen sporenvormend waren en amylose konden afbreken (kenmerken van *Bacillus subtilis*) en welke antagonistische werking ze tegen *Verticillium* hadden (deel 1). Vervolgens is het effect van de kwaliteit van champignons getest met verschillende behandelingen (deel 2).

Deel 1

Selectie van *Bacillus subtilis* en *Pseudomonas* stammen tegen *Verticillium* Pilzform Hackenheim

Materiaal en methode

Monstername

Op 15 plekken in Nederland en Duitsland zijn meerdere monsters genomen uit aarde en compost waar reeds een *Verticillium* infectie aanwezig was (appendix I bevat locaties en raw data). Met een steriele lepel is steeds ca. 5 gram materiaal in een steriele zak gedaan en verzegeld. De monsters zijn bij een temperatuur van 4 °C bewaard tot de aanvang van de werkzaamheden.

Mediumreceptuur

Als selectief medium voor *Bacillus subtilis* (SEN) is een mengsel gemaakt van de volgende ingrediënten.

Pepton tryptisch, herkomst: vlees	3 g
NaCl	70 g
Agar Agar	20 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

***Bacillus subtilis* isolaten**

Per monster is 1 gram materiaal gemengd met 10 ml steriele 0,95 % NaCl oplossing en 11 minuten bij 99 °C in reageerbuisjes gekookt. Daarna zijn de buisjes met koud water direct afgekoeld.

Uit de afgekoelde monsters zijn steeds per monster met een pipet uitstrijkjes gemaakt en bij 38 °C geïncubeerd gedurende 48 dagen. Individuele kolonies zijn vervolgens op een amylose testagar overgezet. Kolonies met een duidelijke amylose activiteit (na 36 uur bij 38 °C) zijn geselecteerd voor de experimenten.

Medium voor Amylose activiteit

- Maiszetmeel 20 g
- Pepton tryptisch, herkomst: vlees 3 g
- NaCl 70 g
- Agar Agar 20 g
- A. dest. ad 1000 ml

Amyloseactiviteit van *B. subtilis* op agar met maiszetmeel. De lichter gekleurde cirkels tonen de afbraak van amylose.

Testmedium 1 *B. subtilis* (MEW)

- Moutextract 20 g
- Agar Agar 20 g
- Eiwitconcentraat EW 5g
- Vitamine B1 10 ppm (sterielfiltraat)
- Aqua dest ad 1000 ml

- pH 7,1

Testmedium 2 *B. subtilis* (MPP)

- Malzextrakt 20 g
- Agar Agar 20 g
- Pepton tryptisch uit vlees 5g
- Vitamine B1 10 ppm (sterielfiltraat)
- A. dest ad 1000 ml
- pH 6,84

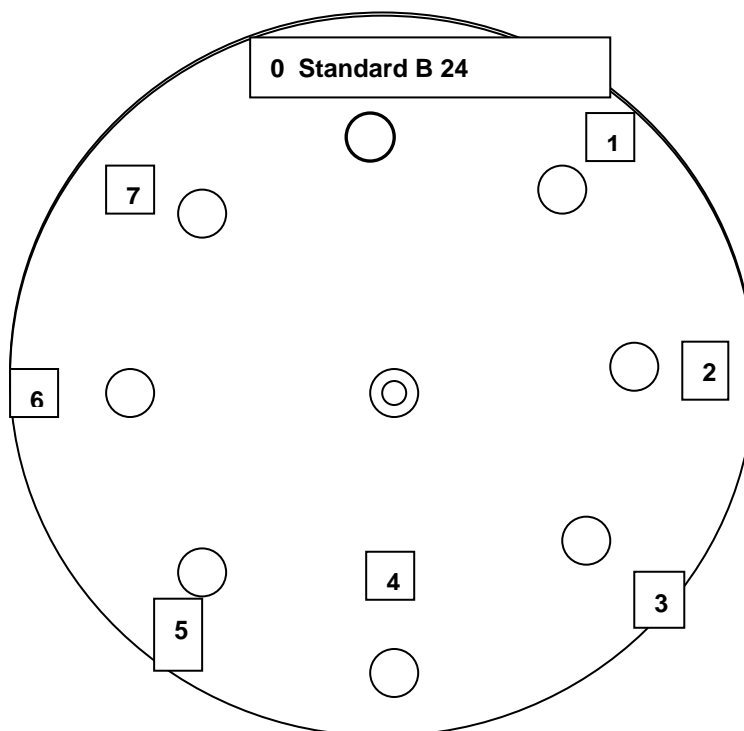
Pseudomonas isolaten test medium

Samenstelling:

- Pepton uit vlees 20 g
- MgSO₄ • 7H₂O 1,5 g
- K₂ HPO₄ 1,8 g
- Glycerol 10 ml
- Demineraliseerd water. ad 1000 ml
- pH 6.9

Zevenvoudige antagonisme test tegen *Verticillium*

Op elke petrischaal met hetzij MEW of MPP of *Pseudomonas* medium is een sjabloon met 8 cirkelvormig geordende posities voor enting geplaatst. Op elke positie kwam een 6 mm Ø filterpapiertje, dat gedrenkt was in het te testen bacterie isolaat. Op positie 0 kwam steeds de standaard stam B24, dat een goede antagonistische werking heeft (+++). Op de zeven overgebleven plaatsen kwamen de te testen isolaten. Op deze manier was het eenvoudig het verschil met B 24 waar te nemen.



Afbeelding: Schema antagonisme test tegen *Verticillium*
Op de posities 1 – 7 zijn de *Bacillus* stammen geënt.

In het midden van elke petrischaal is met een pipet steeds een sporensuspensie van 4 soorten *Verticillium* geënt. De culturen werden bij 28° C geïncubeerd; elke bacteriestam is zowel op testmedium MPP als MEW geënt. Alleen als bij beide kolonies van de bacteriestammen op zowel MEW als MPP een duidelijke grenszone zichtbaar was, kreeg de stam de notatie 'werkzaam'. Die werkzaamheid is in vier gradaties onderscheiden:

0	Geen antagonistische werking
+	Zwakke antagonistische werking
++	Duidelijke antagonistische werking maar zwakker dan de standaard B 24
+++	antagonistische werking vergelijkbaar of beter dan standaard B 24



Figuur 1 voorbeeld selectie proces. In de linker afbeelding is een petrischaal zichtbaar waar 7 *Pseudomonas* monsters zijn aangebracht (wit/gele cirkeltjes). De gehele petrischaal is besmet met sporen van *Verticillium*. De middelste *Pseudomonas* kolonie heeft een antagonistisch effect op de ontwikkeling van *Verticillium*. Op de rechter afbeelding is zichtbaar dat het groeipatroon van de middelste *Pseudomonas* kolonie overeenkomt met remming van *Verticillium*.

Resultaten:

14 stammen hadden een sterk antagonistische werking (++++) op *Verticillium*. De 6 meest potente stammen zijn geselecteerd voor deel 2 simulatie experiment van een *Verticillium* infectie bij de champignon teelt. Soort bepaling van de meest potente stammen is gedaan door middel van MALDITOF en leverde de volgende resultaten op:

Lfd. Nr. 307:	<i>Bacillus pumilus</i>
Lfd. Nr. 326	<i>Bacillus subtilis</i>
Lfd. Nr. 327	<i>Bacillus subtilis</i>
Lfd. Nr. 447	<i>Bacillus subtilis</i>
Lfd. Nr. 530	<i>Pseudomonas putida</i>
Lfd. Nr. 600	<i>Pseudomonas caricapapayae</i>

Deel 2

Definitieve selectie van antagonistische bacteriën (*Bacillus* en *Pseudomonas*) tegen *Verticillium fungicola* bij *Agaricus bisporus* vruchtlichamen *Pilzforum Hackenheim*

Inleiding

In eerdere experimenten was de optimale inoculum dichtheid van *Verticillium* bepaald voor de *in vivo* testen voor champignons samen met de referentie stam B42 (zie Appendix II verslag van oktober 2013). Uit deze onderzoeken bleek dat een concentratie van 5000 tot 10.000 sporen per ml bij een Inoculum mengsel van 200 ml per kweek box het verschil in effectiviteit kan aantonen. Hiervoor zijn drie verschillende *Pseudomonas* - en drie verschillende *Bacillus* isolaten geselecteerd uit deel 1 van dit onderzoek voor het *in vivo* testen in champignon teelt.

Materialen en methoden

Startculturen voor *Pseudomonas* en *Bacillus*-isolaten

Samenstelling S1 medium voor *pseudomonas*:

- Sucrose 10 g
- Glycerol 10 ml
- Caseïne 5 g
- 1,0 g NaHCO₃
- MgSO₄ • 7H₂O 1,0 g
- K₂ HPO₄ 2,3 g
- 1,2 g natriumlaurylsulfaat
- agar-agar 18g
- Trimethoprim 20 mg (oplossen in 300µl DMSO en na
- Autoclaveren add)
- 1000 ml A. dest.

Selectie medium voor *Bacillus subtilis* (SEN)

- Tryptic pepton uit vlees 3 g
- NaCl 70 g
- Agar agar 20 g
- A.dest. ad 1000 ml

Deze zuivere kweken werden gebruikt om vloeibare kweken inoculeren.

De volgende bacteriële species zijn gebruikt voor de test:

Interne benaming (Appedix III)	Soortnaam
FZB 42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
PF 2 I 5	<i>Bacillus subtilis</i>
Natto	<i>Bacillus subtilis</i>
PFB 530	<i>Pseudomonas putida</i>
PFB 600	<i>Pseudomonas carica-papayae</i>
PFB 593	<i>Pseudomonas koreensis</i>

Productie van vloeibare kweken voor de dekaarde inoculatie vond plaats in de volgende media

1 Pseudomonas isolaten

Samenstelling medium:

- Pepton uit vlees 20 g
- MgSO₄ • 7H₂O 1,5 g
- K₂ HPO₄ 1,8 g
- Glycerol 10 ml
- Gedemineraliseerd water. ad 1000 ml
- pH 6.9

2. Bacillus isolaten

Samenstelling medium:

- Pepton uit vlees 8 g
- Gistextract 4 g
- K₂HPO₄ 0,5 g
- MnSO₄ 10 mg
- CaCl₂ 50 mg
- MgSO₄ 50 mg
- Gedemineraliseerd water. ad 1000 ml

De bacteriële isolaten werden geïncubeerd in 1 liter Erlenmeyer kolf op een magnetische roerder bij 27 ° C

Interne	Benaming	Stammen	CFU per ml van de datum op de dekaarde enting
FZB 42		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4 X 10 ⁷
PF 2 I 5		<i>Bacillus subtilis</i>	1 X 10 ⁷
Natto		<i>Bacillus subtilis</i>	3 X 10 ⁶
PFB 530		<i>Pseudomonas putida</i>	8,5 X 10 ⁸
PFB 600		<i>Pseudomonas carica-papayae</i>	1 X 10 ⁹
PFB 593		<i>Pseudomonas koreensis</i>	1 X 10 ⁸

Isolatie van *Verticillium fungicola* van besmette champignons.

De *Verticillium* isolaten moesten virulent genoeg zijn om een zichtbare infectie te induceren en zijn daarom geëxtraheerd van reeds besmette champignons. Voor isolatie van *Verticillium fungicola* van champignons is er een selectief medium voor *Verticillium* genomen dat ontwikkeld is door Rinker et al. Gebruikt 1993 (DL Rinker, S. Bussmann, G. Doel, Een selectief medium voor *Verticillium fungicola*. Canadian Journal of Plant Pathology, Vol. 15, Issue 2, 1993, pagina's 123-124). Met behulp van een steriele naald werden kleine groepen van conidioforen overgebracht naar het selectieve medium

Samenstelling: (per 1000 ml)

- 1,0 g raffinose
- Malachietgroenoxalaat 30 mg
- Broomkresolgroen-Na 30 mg
- NH₄H₂PO₄ 2,0 g
- KCl 0,4 g
- MgSO₄ • 7H₂O 0,4 g
- Ampicilline 50 mg
- Benomyl 15 mg
- Melkzuur tot pH 4,7
- agar-agar 15g
- dest. ad 1000 ml

De verdere teelt werd uitgevoerd op aardappel agar uitgevoerd (PDA's)

Verscheidene *Verticillium* isolaten (V1, V2, V3 en DSM) (Zie appendix III voor referentie) werden gemengd met inoculatie in gelijke delen.

Productie van sporen suspensie

Zes met sporen producerende *Verticillium* culturen overdekte petrischaaltjes werden geschraapt m.b.v. een steriele glazen spatel en overgebracht in 500ml steriel leidingwater. In de blender werd de *Verticillium* mycelium mix voor 5 seconden gemengd. Daarna werd de sporenmix gescheiden met behulp van een fijne zeef en gaas. De sporen dichtheid werd

bepaald met een Neubauer telkamer onder de microscoop. De spore dichtheid was 2×10^7 per ml. Gewenst spore dichtheden werden bereid door verdunning met steriel leidingwater.

De volgende berekende spore dichtheden in vergelijking met de CFU waarden verkregen werden voor de test:

Gewenste sporen dichtheid <i>Verticillium</i>	Bepaald met CFU-test sporendichtheid <i>Verticillium</i>
2500	3700
7500	6600
15000	11000

Productie dekaarde mengsels met bacteriën:

33 kg dekaarde werd besproeid met 1,6 liter bacterie suspensie, grondig gemengd en in het donker gerijpt bij 18-21 °C gedurende 2 dagen. Toen werd de dekaarde verdeeld volgens de proefopzet van in afzonderlijke varianten. De afzonderlijke varianten en controles worden beschreven in het Excel-bestand. Appendix III.

Inoculatie met *Verticillium*

3 dagen na antagonistische bacterie inoculatie werd 200 ml van de *Verticillium* suspensie gelijkmatig verdeeld in verschillende concentraties per vak. Als negatieve controle werd er voedingsmedium zonder bacteriën gespreoid in plaats van bacteriële suspensie.

Experimentele procedure

Kratten, 32 liter, Afmetingen: 480 mm (l), 350 mm (b), 240 mm (h)

De opvouwbare boxen werden bekleed met dun HDPE-folie en gevuld met 6 kg substraat en 4 kg dekaarde. Het oppervlak van de dekaarde werd bedekt met de rest van de film, zodat er altijd een CO₂ gehalte van ongeveer 10.000 ppm in het krat aanwezig zou zijn. Terwijl de temperatuur op 23 °C werd gehouden zijn de groeifase.

Nadat ongeveer 90% van het mycelium was doorgegroeid tot het oppervlak (na 16 dagen), werd het afdekfolie verwijderd en vond er opruwen van het substraat oppervlak plaats. 24 uur later werd de temperatuur verlaagd tot 18,5 °C tot 19,5 °C en het CO₂ gehalte onder 1000 ppm. Luchtvochtigheid was rond de 90-95%. 300 ml water werd er per doos gespoten. Meer water (250 ml) werd na 3, 5, 9, 18 dagen toegevoegd. De oogst van de evaluatie periode werd verlengd van 22/7/14 tot 5/8/ 2014

Tijdslijn:

06/09/2014: Doorgroeide compost (6 kg) gevuld in dozen

19/06/2014: Dekaaarde met bacteriën geënt, geïncubeerd in de kas

20/06/2014: Evaluatie van de CFU op entdag

21/06/2014: Het toepassen van de individuele dekaarde op compost varianten in dozen

24/06/2014: Infectie van de dekgrond met *Verticillium*sporen

10/07/2014: Opruwen op het dekaarde

22/07/2014: Begin van de evaluatie (eerste schimmels verschijnen)

05/08/2014: Einde van de evaluatie (*Verticillium* symptomen) in controles

Resultaten en Discussie

De verkregen cijfers zijn weergegeven in het overeenkomstige Excel - gecombineerde bestand. (Appendix III)

Allereerst dient te worden opgemerkt dat de compost fragmentarisch was en het mycelium zeer lange tijd nodig had (12 dagen), voor dat er een uniforme kolonisatie van het substraat zichtbaar werd. Bovendien, groeide het mycelium ongewoon langzaam (19 dagen) voor dat de dekaarde voldoende bedekt werd dat het kon worden opgeruwd. Het mycelium vormde minder rhizomorfs de dekaarde dan in eerdere experimenten waargenomen.

De oogst vond plaats in de loop van 16 dagen met een bijna dagelijks oogsten en er waren geen duidelijke vluchten te detecteren. Na 16 dagen werd het experiment beëindigd omdat dan *Verticillium* symptomen zich voordeden bij de niet-geïnfecteerde varianten door secundaire infectie van de sporen van de getroffen varianten. In dit experiment heeft ook een opvallende overlast van aquatische schimmels (wateroverlast, weepers) plaats gevonden. Echter is er geen verband met de behandelingen gevonden.

De oogst resultaten toonden grote verschillen tussen individuele varianten en de herhalingen de van verschillende condities. Daarom kunnen alleen trends gedetecteerd. Het totale samengestelde gewicht van alle verkoopkwaliteit champignons uit de met *Verticillium* geïnfecteerde kratten, geeft een significant verschil ten opzichte van de controles zonder antagonistische bacteriën met *Verticillium*.

Besmette bakken met <i>Verticillium</i>	Bacterie	De totale opbrengst aan bruikbare paddenstoelen van alle zes geïnfecteerde gevallen in grammen
Controle met enkel <i>Verticillium</i>		2034
B 42	<i>Bacillus subtilis</i>	1896
PFB 2 5	<i>Bacillus subtilis</i>	3183
Natto	<i>Bacillus subtilis</i>	2556
PFB 600	<i>Pseudomonas carica papayae</i>	3460
PFB 593	<i>Pseudomonas koreensis</i>	2234
PFB 530	<i>Pseudomonas putida</i>	2865

Top 3. Sterkst remmende bacterie stammen	Reductie in verlies door Droge Mol t.o.v. geen bacteriën toevoegen
1. <i>P. carica papayae</i> 600	37% minder verlies
2. <i>B. subtilis</i> 2 5	31% minder verlies
3. <i>P. putida</i> 530	22% minder verlies

Conclusie:

- 2 *B. subtilis* stammen en 3 verschillende *Pseudomonas* stammen hebben een remmende werking op *Verticillium* infecties bij champignons binnen een marge van 10.000-50.000 *Verticillium* sporen per ml.
- Voorbij de 50.000 is *Verticillium* sporen per ml is er geen remmende werking waargenomen.
- De geselecteerde bacterie stammen hebben ten opzichte van de controles geen negatieve effecten op de ontwikkeling van de champignon of de opbrengst, wel werd er geobserveerd dat de behandelde champignons bijzonder wit waren in vergelijking met de controles

De 5 bacterie stammen remmen bestaande in de dekaarde *Verticillium* sporen en, zoals werd waargenomen, op de petrischalen. Ook meerdere toepassingen met het sproeiwater net voor de knopvorming worden nog getest met meer antagonistische bacteriën.

Een heel andere aanpak zou de volledige verneveling van de bacteriën in de teeltruimtes, zodat eventuele besmettingsbronnen op muren, vloeren en rekken kunnen worden bestreden. Als deze bacteriën zich er kunnen vestigen zou dat een effectieve bescherming opleveren tegen de herkolonisatie van ziekteverwekkers.

FIG. 1.

Droge molsymptomen en gezonde paddenstoelen naast elkaar



Fig. 2

Spot symptomen en Droge mol met hoge inoculumdichtheid in B42



Fig. 3 Sterke spot symptomen in vruchtlichamen (PFB 530, 7500 sp / ml)



Fig. 4

Gezonde paddenstoelen en droge mol op PFB 600 besmet met 7500 sporen / ml

