

Ulocladium atrum 385: Een veelbelovende kandidaat voor de biologische bestrijding van *Botrytis cinerea*

J. Köhl en W. Molhoek

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen

De plantpathogene schimmel *Botrytis cinerea* veroorzaakt grote economische schade in een groot aantal gewassen. De schimmel *Ulocladium atrum* is geselecteerd als een antagonist van *B. cinerea*. De ecologische eigenschappen van de antagonist maken hem tot een aantrekkelijke kandidaat voor toepassingen op bovengrondse plantendelen.

Dit artikel geeft een overzicht over de mogelijkheden van het gebruik van *U. atrum* in belangrijke gewassen.

Introductie

Botrytis cinerea is wereldwijd één van de meest belangrijke plantpathogenen welke schade geeft tijdens teelt en na-oogst, vooral in de teelt van groenten, druiven, fruit en siergewassen. De gebruikelijke manier om de ziekte te bestrijden is het herhaaldelijk toepassen van fungiciden. Het pathogeen is in staat om snel resistenties voor fungiciden te ontwikkelen. Daarom is het verantwoord gebruik van verschillende werkzame stoffen, in combinaties of afwisselend, van groot belang.

In de biologische bestrijding worden nuttige micro-organismen gebruikt welke als antagonist werken tegen plantpathogenen door voedselcompetitie, antibiose of hyperparasitisme. Deze methode kan een milieuvriendelijk alternatief zijn voor chemische bestrijding. Biologische bestrijding kan ook een instrument zijn in geïntegreerde bestrijdingssystemen om de opbouw van fungicide-resistente populaties te voorkomen. Dit is een constante bedreiging voor de chemische bestrijding van *B. cinerea*.

Door het Instituut voor Planten-

ziektenkundig Onderzoek (nu Plant Research International) is in het kader van het Meerjarenplan Gewasbescherming (MJPG) in de jaren 1991-1994 uit een grote reeks van kandidaat-antagonisten het schimmelisolaat *Ulocladium atrum* 385 geselecteerd voor de bestrijding van *B. cinerea*.

Onderzoek, van 1994 tot heden, uitgevoerd in Nederland en andere Europese landen, met deze antagonist was gericht op het gebruik van de antagonist onder praktijkomstandigheden in wereldwijd belangrijke gewassen zoals druif, tomaat, aardbei en siergewassen. Verder zijn de ecologische eigenschappen van zowel de antagonist als het pathogeen in kaart gebracht.

Biologische bestrijdingsstrategieën

Het necrotrofe pathogeen *B. cinerea* doodt eerst plantenweefsel voordat dit het weefsel binnen dringt. Voor verdere groei en vermeerdering is het pathogeen afhankelijk van dood weefsel. Drie strategieën

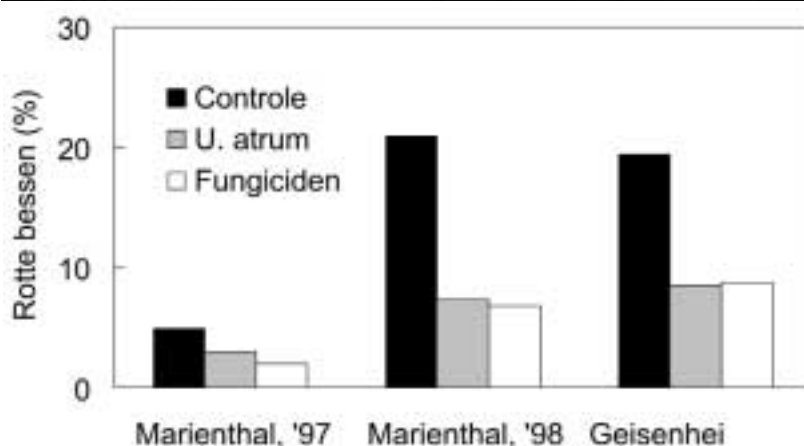
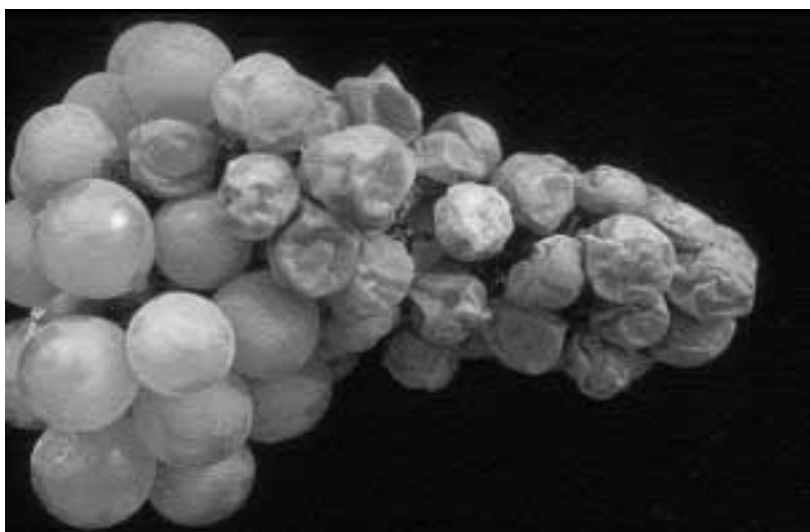
voor de biologische bestrijding van *B. cinerea* kunnen worden onderscheiden:

- 1) microbiële onderdrukking van de infectie;
- 2) microbiële onderdrukking van de kolonisatie door mycelium, de overleving en de sporulatie van het pathogeen in necrotisch plant weefsel;
- 3) microbiële afbraak van sclerotien als primair inoculum voor volgende gewassen (Köhl en Fokkema, 1998; Köhl *et al.*, 1995b).

De keuze voor een biologische bestrijdingsstrategie is afhankelijk van de gevoeligheid van het pathogeen en de effectiviteit van het antagonistisch mechanisme gedurende de verschillende stadia van de levenscyclus van het pathogeen. De keuze voor een antagonist is afhankelijk van de antagonistische potentie, z'n vermogen in de niche waar de interacties plaats vinden te overleven en metabolisch actief te zijn en de gemiddelde interactietijd.

Korte interactietijden tussen pathogeen en antagonist vragen om een snelwerkend mechanisme van antagonisme zoals de productie van antibiotica of andere voor het pathogeen toxische stoffen. Bij langere interactietijden kan een langzamer werkend mechanisme, zoals voedselcompetitie, effectief zijn. De niche waarin de interacties plaatsvinden wordt gekenmerkt door beschikbare voedingsstoffen, abiotische factoren en biotische factoren en het microklimaat. Voor de ontwikkeling van een biolo-

ARTIKEL



Figuur 1. Effect van *Ulocladium atrum* op de grauwe schimmel in druif

gisch bestrijdingsmiddel tegen *B. cinerea* is een strategie gekozen die gebaseerd is op microbiële onderdrukking van kolonisatie van necrotisch weefsel door mycelium van het pathogeen gedurende zijn saprofytische fase. De reden voor deze keuze is de lange potentiële interactietijd tussen antagonist en pathogeen. Andere voorbeelden van biologische bestrijding via kolonisatieonderdrukking op necrotisch plantenweefsel zijn het gebruik van antagonistische schimmels op afgefallen appelblad in boomgaarden om de ascosporenproductie van appelschurft (*Venturia inaequalis*) te verminderen (Carisse et al, 2000; Heye en Andrews, 1983) en het gebruik van de schimmel *Limmonomyces roseipellis* op tarwestro om de ontwikkeling van het tarwepathogeen *Pyrenophora tritici-repentis* te remmen (Pfender et al, 1993).

Selectie van antagonisten

Schimmelkandidaten werden getest op hun vermogen om met *B. cinerea* te concurreren. Hiervoor werd necrotisch plantmateriaal geïnoculeerd met sporen van het pathogeen en de kandidaatantagonist. Na incubatie onder geconditioneerde omstandigheden werd de kolonisatie van het necrotische weefsel door het pathogeen (zichtbaar door de sporulatie) gekwantificeerd. Deze screeningexperimenten werden uitgevoerd onder gunstige omstandigheden voor zowel het pathogeen als de antagonist bij 18 °C en continue vocht. In de volgende stap werden andere klimaatomstandigheden gekozen welke meer overeenkomen met de situatie van gewassen in het veld, waar periodes met lage temperaturen kunnen voorkomen en vochtperiodes vaak onderbroken worden door droge periodes (Köhl

et al., 1995a; Köhl et al., 1995c). Onder zulke omstandigheden kan de biologische bestrijding falen als antagonisten gevoelig zijn voor zulke belemmeringen voor schimmelgroei of overleving.

De screeningexperimenten resulteerden in de selectie van *U. atrum* 385 welke de ontwikkeling van *Botrytis* spp. op necrotisch plantmateriaal kan onderdrukken onder optimale omstandigheden maar, belangrijker nog, ook onder minder optimale omstandigheden zoals bij lage temperaturen (Köhl et al., 1999) en na onderbrekingen van bladnat-perioden (Köhl et al., 1995c).

Ecologie van *Ulocladium atrum*

Ondanks dat het optimum van *U. atrum* voor de myceliumgroei hoger ligt dan van *Botrytis* kan de antagonist net als *Botrytis* groeien bij lage temperaturen tot 1 °C. Ook is in een breed temperatuuraantrajec een snelle kieming van *U. atrum* sporen gevonden. Tussen 12 °C en 30 °C heeft de antagonist minder dan 6 uur nodig om te kiemen. Deze eigenschap is van belang voor de vestiging van de schimmel in het substraat tijdens de meestal korte bladnatperioden van enkele uren tijdens dauwnachten. Een andere antagonist die in dit onderzoek met *U. atrum* is vergeleken had meer dan 24 uur nodig onder deze omstandigheden, hetwelk niet zal leiden tot kolonisatie van het substraat onder veldomstandigheden. In biotoetsen met necrotische bladeren onderdrukte *U. atrum* de sporulatie van *B. cinerea* bij de geteste temperaturen tussen 1 tot 24 °C.

Snelle veranderingen van de beschikbaarheid van water is kenmerkend voor bovengrondse plantengedelen. Dergelijke omstandigheden zijn een belangrijke remmende factor voor veel antagonisten die in een gewas worden gebracht. *U. atrum* echter is in staat om onderbrekingen van bladnatperioden

te overleven en om weer snel te groeien als de vochtomstandigheden weer gunstig zijn voor schimmelgroei. Sporen van *U. atrum* kunnen een periode van minstens tien weken in een gewas overleven zoals aangetoond is in cyclamengewassen (Köhl *et al.*, 2000, Köhl *et al.*, 1998).

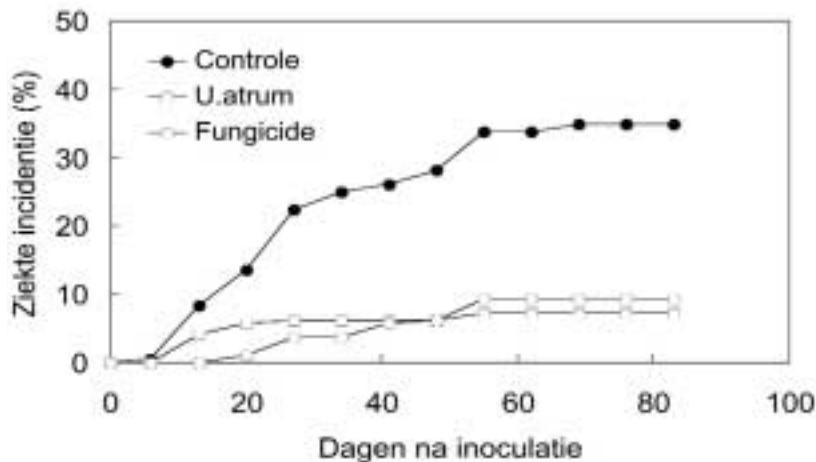
Biologische bestrijding onder praktijkomstandigheden

Druif

B. cinerea kan in druif aantasting geven op de bessen (grauwe schimmel) met als gevolg opbrengstderiving en kwaliteitsverlies. In een *Botrytis* epidemie in druif speelt necrotisch weefsel zoals de bast en dode bladeren een belangrijke rol als inoculumbron en necrotische bloemdelen als een brug voor de infectie van jonge bessen. *U. atrum* is getest in veldproeven met druif in twee verschillende wijngebieden in Duitsland gedurende twee jaar met de variëteiten Riesling en Müller Thurgau. Deze experimenten zijn uitgevoerd door de Universiteit van Bonn (Schoene en Köhl, 1999). Gedurende het groeiseizoen werd het gewas vier keer gespoten met een sporensuspensie van *U. atrum*. Bij de oogst was het percentage rotte vruchten ongeveer 50 % (significant) minder in de met *U. atrum* behandelde velden dan in de onbehandelde controle velden (Figuur 1). Dezelfde reductie is gevonden in de met conventionele fungiciden tegen *Botrytis* behandelde velden. Schoene *et al.* hebben ook aangetoond dat *U. atrum* niet gevoelig is voor fungiciden die in druif gebruikt worden ter bestrijding van valse meeldauw en van *Botrytis* (Schoene *et al.*, 1998). Hieruit kan geconcludeerd worden dat het mogelijk is om *U. atrum* in moderne gewasbeschermingsprogramma's op te nemen.

Aardbei

In de aardbeienteelt is de grauwe schimmel op vruchten een veel



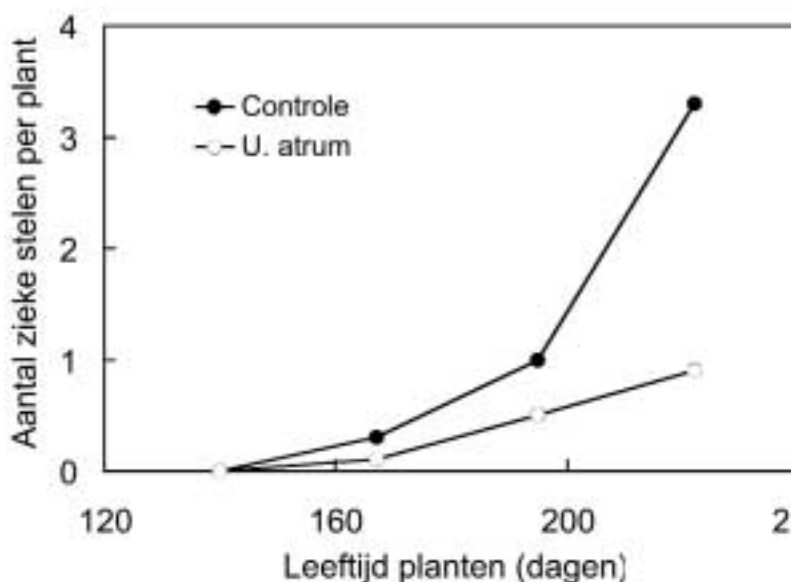
Figuur 2. Schade van *Botrytis cinerea* in tomaat en de bestrijding hiervan door *U. atrum*

voorkomend verschijnsel en het gewas wordt dan ook frequent gespoten met fungiciden tijdens de bloei en het afrijpen van de vruchten. De belangrijkste infectieroute is kolonisatie van necrotische bloemdelen door *B. cinerea* van waaruit het pathogeen later de ontwikkelende vrucht aantast. In veldproeven die gedurende zes jaar in Nederland zijn uitgevoerd is gebleken dat *U. atrum* in staat is de bloemen tegen kolonisatie van *Botrytis* te beschermen. In veel gevallen leiden frequente toepassingen van *U. atrum* gedurende de bloei met intervallen van drie tot zeven dagen tot een significante vermindering van grauwe schimmel op de vruchten bij de oogst. Echter in de meeste proeven is het effect van fungiciden niet gehaald. Verder onderzoek is nodig om de werking van *U. atrum* in dit gewas te verbeteren. Een probleem

in aardbei is dat gedurende enkele weken continu nieuwe bloemen gevormd worden. De antagonist moet de bloemen bereiken voordat het pathogeen zich gevestigd heeft. Dit kan betekenen dat de intervallen tussen de antagonist toepassingen kort moeten zijn wat mogelijk voor praktijktoepassing niet acceptabel is.

Tomaat

De kasteelt van tomaat wordt bedreigd door stengelrot veroorzaakt door *B. cinerea*. Bij het verwijderen van bladeren en scheuten ontstaan wonden die een invalspoort vormen voor het pathogeen. Na de infectie groeit het pathogeen vaak door in de onbeschadigde stengel hetwelk resulteert in het afsterven van de plant. In experimenten, uitgevoerd in Zuid Frankrijk door INRA (Fruit en Nicot, 1999), is gevon-



Figuur 3. Schade van *Botrytis cinerea* in cyclaam en de bestrijding hiervan door *U. atrum*

den dat stengelwonden die behandeld zijn met *U. atrum* goed beschermd zijn tegen infectie door *B. cinerea*. In alle experimenten bereikte de antagonist dezelfde effecten als fungicidebehandelingen die ter vergelijking zijn uitgevoerd (Figuur 2). Deze veelbelovende resultaten werden verkregen in experimenten met tomaat zowel in kassen als in plastic tunnels gedurende verschillende groeiseizoenen.

Cyclaam

B. cinerea veroorzaakt een hevige aantasting van zowel bladeren als bloemen van cyclaam. Natuurlijk afstervende bladeren vormen een brug voor het pathogeen om de plant aan te tasten. In verschillende jaren zijn experimenten in diverse

praktijkkassen in Nederland uitgevoerd met het gebruik van *U. atrum*. Uit de resultaten hiervan kan geconcludeerd worden dat *U. atrum* geïntegreerd kan worden in de cyclamenteelt en dat het mogelijk is om bij de bestrijding van *Botrytis* het gebruik van fungiciden volledig te vervangen door de antagonist (Köhl *et al.*, 2000; Köhl *et al.*, 1998) (Figuur 3). Het gebruik van de antagonist met intervallen van vier weken tijdens het verschillende maanden durende groeiseizoen lijkt economisch haalbaar.

Roos

De productietijd van potrozen is ca. drie maanden. In deze periode worden de planten twee maal gesnoeid.

Hierdoor ontstaan wonden die geïnfecteerd kunnen worden door *B. cinerea*. Afstervende bladeren die aanwezig zijn in de potplanten zijn een belangrijke voedingsbron voor het pathogeen. Toepassing van *U. atrum* in experimenten uitgevoerd in een praktijkkas in Nederland resulteerde in een significante reductie van de sporenproductie van *B. cinerea* en daardoor werd het risico van plantuitval verminderd (Köhl en Gerlagh, 1999). Vergelijkbare resultaten met *U. atrum* in potrozen zijn gevonden in Denemarken (Yohalem, 2000). Omdat dode bladeren ook in de teelt van snijrozen een belangrijke voedingsbodem voor de productie van *Botrytis* sporen zijn (Da Tagatiba *et al.*, 1998) zou het gebruik van *U. atrum* ook voor deze teelt van belang kunnen zijn.

Verdere plannen

Omdat in economisch zeer belangrijke gewassen is gebleken dat *U. atrum* een effectieve antagonist is tegen *B. cinerea* biedt deze antagonist een goed perspectief voor de ontwikkeling van een biologisch bestrijdingsproduct voor commercieel gebruik in Nederland en elders. Verder onderzoek naar de massaproductie van de sporen van de antagonist en naar de formulering van het sporenmateriaal tot een suspenderbaar poeder is van groot belang. Vervolgens kan de productontwikkeling en registratie van *U. atrum* door een commercieel bedrijf worden uitgevoerd.

Dit onderzoek is ondersteund door de Europese Unie (FAIR3-CT96-1898 BIOSPORSUPPRESS) en het Nederlandse Productschap voor de Tuinbouw.

Literatuur

- Carisse, O., Phillon, V., Rolland, D. & Bernier, J., 2000. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **90**: 31-37
- Da Tagatiba, J.S., Maffia-LA, L.A., Barreto, R.W., Alfenas, A.C. and Sutton, J.C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea*

- in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* **26**: 8-19
- Fruit, L. & Nicot, P., 1999. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Ulocladium atrum*. *IOBC Bulletin* **22**: 81-84.
- Heye, C. C. & Andrews, J. H., 1983. Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **73**: 650-654.
- Köhl, J. & Fokkema, N.J., 1998. Biological control of necrotrophic foliar fungal pathogens. In: Boland, G.J. & L.V. Kuykendall (eds.) *Plant-Microbe Interactions and Biological control*, Marcel Dekker, New York, pp. 49-88
- Köhl, J. & Gerlagh, M., 1999. Biological control of *Botrytis cinerea* in roses by the antagonist *Ulocladium atrum*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent* **64**: 441-445.
- Köhl, J., Gerlagh, M., & Grit, G. 2000. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production systems of cyclamen. *Plant Disease* **84**: 569-573.
- Köhl, J., Gerlagh, M., De Haas, B.H. & Krijger, M.C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology* **88**: 568-575.
- Köhl, J., Lombaers-van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., Kessel, G.J. & Goossen-van de Geijn, H.M., 1999. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. *BioControl* **44**: 329-346.
- Köhl, J., Molhoek, W.M.L., van der Plas, C.H. & Fokkema, N.J., 1995a. Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* **85**: 393-401.
- Köhl, J., van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., & Fokkema, N.J., 1995b. Suppression of sporulation of *Botrytis* spp. as valid biocontrol strategy. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 251-259.
- Köhl, J., van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L. & Fokkema, N.J., 1995c. Selection of antagonists suppressing sporulation of *Botrytis allii* and *B. cinerea* after interrupted wetness periods. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 627-637.
- Pfender, W. F., Zhang, W. & Nus, A., 1993. Biological control to reduce inoculum of the tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in surface-borne residues of wheat fields. *Phytopathology* **83**: 371-375.
- Schoene, P. & Köhl, J., 1999. Biologische Bekämpfung von *Botrytis cinerea* mit *Ulocladium atrum* in Reben und Cyclamen. *Gesunde Pflanzen* **51**: 81-85.
- Schoene, P., Lennart, B. & Oerke, E.C., 1999: Fungicide sensitivity of fungi used in biocontrol of perthotrophic pathogens. p 477-482 in: Lyr H, Russell PE, Dehne HW & Sisler HD (eds.): *Modern fungicides and antifungal compounds*. 12th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichsroda, May 1998.
- Yohalem, D.S., 2000. Microbial management of early establishment of grey mould in pot roses. 17. Danske Plantevarnskonference, DJF-rapport **12**: 97-102.