

## ONDERZOEKVUUR

# Snelle diagnose van vuur maakt aanpak effectiever

• TEKST : JOOP VAN DOORN, KHANH PHAM, PPO BLOEMBOLLEN EN JAN VAN KAN, (WAGENINGEN UNIVERSITEIT, FYTOPATHOLOGIE)  
• FOTO : PPO BLOEMBOLLEN

In bolgewassen kan de schimmel *Botrytis* veel schade veroorzaken. Vuur kan snel toeslaan. Vaak zijn de symptomen snel zichtbaar bij vochtige en warme weersomstandigheden. In andere gevallen kunnen sporen aanwezig zijn zonder dat de schimmel toeslaat of zichtbaar is. Snelle, gevoelige toetsen kunnen bijdragen om tijdig de juiste maatregelen te nemen om het vuur te beheersen. Inmiddels heeft PPO Bloembollen samen met PRI toetsen ontwikkeld om een snel ingrijpen tegen deze schimmel mogelijk te maken.



Symptomen ("spetters") in tulp, veroorzaakt door *Botrytis tulipae*. Als de schimmel verder groeit, worden de symptomen erger en gaan de schimmeldraden sporen produceren

*Botrytis* valt bolgewassen aan zowel via de lucht door sporen als via de grond in gewasresten. Jaarlijks ondervindt de bloembollensector grote schade, vooral in tulp en lelie. Aanpak van *Botrytis* is daarom hard nodig. Er zijn gewasbeschermingsmiddelen; om het gebruik hiervan te beperken richt men zich op preventie door minder gevoelige cultivars te gebruiken en gewasresten op te ruimen, anderzijds door biologische middelen te combineren met minder gewasbeschermingsmiddelen. Sporen zijn slechts 1/100ste mm groot en dus onzichtbaar; als er spetters zichtbaar zijn, de eerste symptomen op bladeren en bloemen, is het soms te laat. Doel van dit project van de afdeling Fyto-

pathologie van Wageningen Universiteit, Plant Research International (PRI) en PPO was om met gezamenlijke kennis en ervaring een stap te maken in de richting van een verbeterde, vroege detectie van *Botrytis* voordat symptomen zichtbaar zijn. Dit gereedschap is inzetbaar voor vroegtijdige diagnose van *Botrytis* in het veld, en om vast te stellen om welke soort het gaat.

## BOTRYTIS IN BOLGEWASSEN

Er komen tenminste tien soorten *Botrytis* voor in bolgewassen. Vooral *B. tulipae* op tulp, *B. elliptica* op lelie en *B. gladiolorum* op gladiool veroorzaken veel schade. De meeste zijn waardplant-specifiek; alleen van *B. cinerea* wordt

aangenomen dat hij alle gewassen kan aantasten. *B. cinerea* groeit op verdroede plekken en kan ook in de bewaring toeslaan, vooral in tulp. De symptomen variëren van spetters tot grotere aange-taste bladoppervlakken en bloemen. Door het aanmaken van enzymen die plantencelwanden afbreken zorgt deze schimmel voor schade. Op de afgestorven delen groeit de schimmel verder, vormt sporen en verspreidt zich verder "als een lopend vuurtje". Aan het eind van het groeiseizoen kan de schimmel sclerotien maken: zwarte, ingedroogde structuren, waarmee hij de winter kan overleven.

## GEZAMENLIJKE TOETS-ONTWIKKELING

PPO heeft zich geconcentreerd op lelie en tulp. Zoals in een eerder vakbladartikel (BloembollenVisie 87) is gemeld, werkte een serologische toets met commercieel verkrijgbaar antiserum niet goed. In samenwerking met PRI zijn met behulp van bacteriën antistoffen gemaakt. Hoewel deze techniek goede antilichamen voor andere pathogenen heeft opgeleverd, werkte de methode niet goed voor *Botrytis* in tulp. Daarom werd vooral ingezet op een DNA-methode. Via een project dat is gefinancierd door de Technologiestichting STW, die universitair wetenschappelijk onderzoek met mogelijke toepassingen financiert, heeft de afdeling Fytopathologie van Wageningen UR de genetische variatie in *Botrytis* soorten in het veld bestudeerd. Hiervoor zijn genen in het DNA van de schimmel gekarakteriseerd. Deze informatie konden PRI en PPO gebruiken voor een goede identifi-

catie van *Botrytis*soorten, die voorheen alleen op sporengrootte en microscopische kenmerken kon plaatsvinden. Er zijn stukjes DNA geanalyseerd, die verschillend zijn voor de meeste van de *Botrytis*soorten in bolgewassen. Hiermee kon een soortspecifieke toets worden ontwikkeld.

## ZICHT OP AANTASTING

Met de ontwikkeling van gevoelige toetsen is het mogelijk om vast te stellen dat *Botrytis* aanwezig is voordat er symptomen optreden. Symptoomloos materiaal kan nu gevoelig getoetst worden op vuur. In sommige gevallen zijn er symptomen maar is bestrijding niet nodig. Op lelie kan *B. tulipae* spetters geven, maar deze zetten niet door. Als een DNA-toets aantoonde dat spetters op lelie gevormd worden door *B. tulipae* maar niet door *B. elliptica* is bestrijding dus overbodig. 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 veroorzaker hebben. Bij gladiool lijkt een bladziekte veroorzaakt door de schimmel *Stemphyllium* veel op *Botrytis*aantasting. Voor onderzoek is het nu mogelijk om de verspreiding van *Botrytis* in het gewas te meten. De effecten van biologische of geïntegreerde bestrijding zijn nu meetbaar door vast te stellen of er meer of minder sporen of schimmel aanwezig zijn op plantmateriaal. Dit kan een belangrijke aanvulling leveren op waarschuwingssystemen voor vuur.

## SNELLERE WAARSCHUWING?

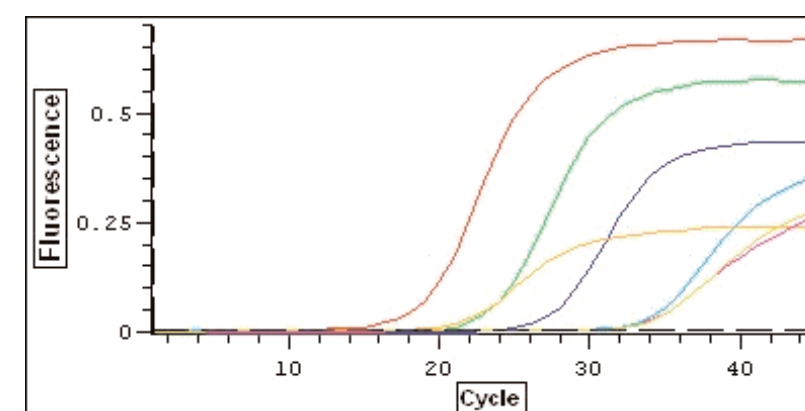
PPO wil vervolgonderzoek uitvoeren aan luchtmonsters. Wanneer sporen van *Botrytis* in de lucht aanwezig zijn, kan uitgezocht worden in welke aantallen deze voorkomen, en wanneer dit aanleiding geeft tot infectie van het gewas. Door de nieuw ontwikkelde toetsmethoden kan in de toekomst een snellere waarschuwing worden afgegeven, en is het mogelijk om nog gericht gewasbeschermingsmiddelen in te zetten.

*Het onderzoek is gefinancierd door het Ministerie van LNV.*

## DNA-TOETSEN BRENGEN VUUR SNEL IN BEELD

De verschillen tussen de *Botrytis*-soorten kunnen omgezet worden in een zogenaamde PCR-toets, waarbij specifieke stukjes DNA (in dit geval van onder meer *B. tulipae* en *B. elliptica*) vele malen vermeerderd en daardoor zichtbaar kunnen worden. Het is nu al mogelijk om ongeveer 20 *Botrytis*-sporen op een blad aan te tonen. Met behulp van Real Time PCR kan dit nog sneller en gevoeliger! Met deze snelle toets wordt met behulp van een lichtgevend stofje de detectie van DNA versterkt. Hoe meer DNA (en dus hoe meer *Botrytis*) in het monster zit, hoe eerder dit zichtbaar wordt.

Hierbij een voorbeeld van de hoeveelheden DNA-merker van *Botrytis* in lelie. De rode grafiek is van een monster, waar meer sporen van deze schimmel in zitten dan in monsters, behorende bij de groene en blauwe grafieken; de gele lijnen zijn van monsters met erg weinig sporen, waardoor de reactie pas laat zichtbaar wordt.



Botrytis-soort	Gewas	ELISA?	DNA-verschillen?	DNA-toets?
<i>B. tulipae</i>	Tulp	Nee	Ja	ja
<i>B. elliptica</i>	Lelie	ja	Ja	ja
<i>B. cinerea</i>	Alle bolgew.(?)	Nee	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 *	-

Tabel 1.

Overzicht van *Botrytis*-soorten en de bolgewassen die ze aantasten. Voor een aantal zijn ook DNA-toetsen ontwikkeld. Tussen *B. hyacinthi* en *B. croci* werden geen verschillen in DNA gevonden.