

Praktijk gereed maken van biologische bestrijding bacterievlekken.

Rapportage tot éérste go/no go moment

Dr. J. Baars

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: 620162

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Paddenstoelen

Adres : Peelheideweg 1, 5966 PJ Horst-America

: Postbus 6042, 5960 AA Horst

Tel. : 077 - 464 75 75

Fax : 077 - 464 15 67

E-mail : info.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1	SAMENVATTING.....	5
2	AANLEIDING TOT HET ONDERZOEK.....	6
2.1	Omvang van de schade door bacterievlekken.....	6
2.2	De veroorzaker van bacterievlekken.....	6
2.3	Voorkomen van bacterievlekken.....	6
2.3.1	Klimaatsomstandigheden in de teeltruimte.....	6
2.3.2	Gebruik van gechloreerd water.....	6
2.4	Onderzoek aan biologische bestrijding.....	7
2.4.1	Bacteriofagen.....	7
2.4.2	Bacteriën.....	7
2.5	Opzet van een praktijkproef met biologische bestrijding.....	10
2.6	Randvoorwaarden voor de uitvoering van de proeven.....	10
3	COMMUNICATIE BINNEN HET PROJECT.....	11
4	UITVOERING EN RESULTATEN VAN DE PRAKTIJKPROEVEN.....	12
4.1	Proefplan.....	12
4.2	Proef op bedrijf 1.....	12
4.3	Proef op bedrijf 2.....	14
5	CONCLUSIE EN VOORSTEL VOOR VERVOLGONDERZOEK.....	16
6	GERAADPLEEGDE LITERATUUR.....	20

1 Samenvatting

Dit rapport beschrijft de resultaten van twee praktijkproeven naar de mogelijkheden om een bacteriepreparaat te gebruiken voor de bestrijding van bacterievlekken. Het gebruikte bacteriepreparaat bevatte een bacterie die in 4 onafhankelijke teeltproeven bij PPO in staat bleek om bij preventieve toepassing een kunstmatige infectie met bacterievlekken te bestrijden. Hoewel deze biologische bestrijder niet in staat was om bacterievlekken volledig te voorkomen bleek bij toepassing t.o.v. de onbehandelde controle ruwweg de helft minder champignons aangetast te zijn door bacterievlekken. Bovendien bleek dat de champignons met bacterievlekken minder sterk werden aangetast.

Het optreden van bacterievlekken bij teeltbedrijven is niet goed te voorspellen. In de praktijkproeven werd daarom de biologische bestrijder toegepast nadat de teler had geconstateerd dat de teelt last had van bacterievlekken. Nadat de vlucht waarin bacterievlekken was geconstateerd was geoogst, werd de dekaarde behandeld met een preparaat met de biologische bestrijder. In de daaropvolgende vlucht werd gekeken of de biologische bestrijder effect had gehad. Hiertoe werd het percentage aangetaste champignons in het proefveldje vergeleken met een controle veldje. De dekaarde van het controle veldje was behandeld met een preparaat waarin de biologische bestrijder afwezig was.

In beide praktijkproeven die binnen project 620162 zijn uitgevoerd, werd vastgesteld dat indien op deze manier toegepast, de biologische bestrijder geen effect had op de aantasting door bacterievlekken. Dit houdt in dat het project in zijn huidige vorm geen doorgang kan vinden.

Gezien de gunstige resultaten van de teeltproeven bij PPO is dit een verrassend resultaat. Een mogelijke verklaring voor het gebrek aan werkzaamheid van de biologische bestrijder zou gevonden kunnen worden in het tijdstip van toepassing. De theorie is dat de biologische bestrijder en *Pseudomonas tolaasii* (de veroorzaker van bacterievlekken) met elkaar concurreren om beschikbare ruimte en voedingsstoffen. Als een biologische bestrijder de beschikbare ruimte en voedingsstoffen in de dekaarde al in bezit heeft genomen zal *P. tolaasii* zich niet kunnen ontwikkelen. Blijkbaar heeft na het plukken van een vlucht champignons, de pathogene *P. tolaasii* een dusdanig sterke positie in de dekaarde veroverd, dat een biologische bestrijder hem daar niet van kan verdrijven. Dat zou betekenen dat, zoals gedaan in de proefteelten bij PPO, een biologische bestrijder altijd preventief zal moeten worden ingezet.

Op basis van deze gegevens is het moeilijker om proeven in de praktijk uit te voeren. In de praktijk is het lastig te voorspellen wanneer bacterievlekken wel of niet optreden. Dat zou betekenen dat proeven in de praktijk een groot aantal teelten moeten omvatten, in de veronderstelling dat in een gedeelte van deze teelten zich inderdaad bacterievlekken ontwikkelen. Een tweede complicerende factor is dat de champignons die met de biologische bestrijder behandeld zijn, vernietigd moeten worden. De biologische bestrijder is (nog) niet toegelaten als bestrijdingsmiddel en mag dus niet gebruikt worden op champignons die in de handelskanalen terechtkomen.

2 Aanleiding tot het onderzoek.

2.1 Omvang van de schade door bacterievlekken.

Bacterievlekken worden veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas tolaasii*. In economisch opzicht is het waarschijnlijk de belangrijkste ziekte in de teelt van champignons. Diverse auteurs (Fermor *et al.*, 1991, Goor *et al.*, 1986; Geels *et al.*, 1991, Olivier *et al.*, 1978, Rainey *et al.*, 1992) melden dat ongeveer 5-15% van de totale champignonproductie is aangetast door bacterievlekken. Een aanzienlijk deel daarvan moet worden gedeclineerd of zelfs ongeschikt voor verkoop worden verklaard.

2.2 De veroorzaker van bacterievlekken.

Onderzoek naar het voorkomen van *P. tolaasii* in uitgangsmateriaal van de teelt en tijdens de teelt (Wong & Preece, 1980; Fahy *et al.*, 1981) heeft uitgewezen dat de bacterie altijd aanwezig is. Zelfs in gezonde teelten kan de aanwezigheid van *P. tolaasii* worden aangetoond. Ook in de uitgangsmaterialen voor dekaarde (veen en schuimaarde) komt *P. tolaasii* voor, maar dan in veel lagere aantallen. Volgens Fahy *et al.* (1981) is de vraag of bacterievlekken zullen optreden in een teelt daarmee meer een kwestie van klimaatsomstandigheden dan van hygiëne. Wong & Preece (1980) hebben aangetoond dat ook de handen en het gereedschap van het plukpersoneel een bron van infectie zijn, en benadrukken dat ook hygiëne van groot belang is.

2.3 Voorkomen van bacterievlekken.

2.3.1 Klimaatsomstandigheden in de teeltruimte.

De meest effectieve manier om de ziekte te voorkomen is om er voor te zorgen dat de groei van de ziekteverwekkende bacterie wordt geremd. Gunstige condities voor de groei van *P. tolaasii* treden in de teelt van champignon op als de paddestoelen te lang nat blijven (Gaze, 1979). Bacterievlekken kunnen optreden als het oppervlak van de champignons langer dan 2 tot 3 uur vochtig blijft (Watson & Gulliver, 1981; Van Zaayen & Smits, 1982). Voedingsstoffen diffunderen vanuit het champignonweefsel in de waterfilm en kunnen door *P. tolaasii* gebruikt worden voor groei. *P. tolaasii* heeft een zeer korte generatietijd en kan zich onder optimale omstandigheden op de champignonhoeden in minder dan een uur in aantal verdubbellen (Fahy, 1985). Daarnaast is *P. tolaasii* in het bezit van flagellen waarmee de bacterie zich over een vochtig oppervlak kan verplaatsen. Na watergeven kan men door middel van extra ventilatie en circulatie er voor zorgen dat de champignons snel opdrogen. Telers zijn zich i.h.a. bewust van het belang van een goede klimaatsbeheersing om bacterievlekken te voorkomen. Ze kunnen desondanks echter verrast worden door plotselinge veranderingen in de weersomstandigheden (vooral in zomer en herfst).

2.3.2 Gebruik van gechloreerd water.

Daarnaast wordt gebruik gemaakt van gechloreerd water om de symptomen van de ziekte te onderdrukken (Royse & Wuest, 1980; Wong & Preece, 1985). Hiertoe wordt natriumhypochloriet opgelost in het sproeiwater. De werkzame stof is het hydrolyse product HOCl. Wong & Preece (1985) hebben aangetoond dat in waterige suspensies van de bacterie een concentratie aan actief chloor van 5 mg/ml in staat is om alle bacteriën af te doden. Deze activiteit wordt echter volledig teniet gedaan als naast de bacteriën ook andere stoffen in de suspensie aanwezig zijn waarmee het actief chloor kan reageren. In een suspensie van de bacterie met daarnaast 20% dekaarde is minstens 150 mg/ml aan actief chloor nodig om enige werkzaamheid te vertonen. Onder deze omstandigheden worden de bacteriën niet afgedood, maar wordt slechts hun vermogen om zich te vermenigvuldigen aangetast. Het gebruik van hogere concentraties aan

actief chloor dan 150 mg/ml is gevaarlijk en veroorzaakt vaak bruinverkleuring van de champignons. Het gebruik van concentraties aan actief chloor lager dan 100 mg/ml heeft geen effect. Om optimaal effectief te kunnen zijn dient begonnen te worden met toediening van gechloreerd water zodat de knopjes verschijnen, dus lang vóórdat bacterievlekken zichtbaar zijn. Toediening van natriumhypochloriet is niet langer zinvol als de symptomen van bacterievlekken reeds zichtbaar zijn. Een ander belangrijk praktisch probleem bij het gebruik van gechloreerd water op teeltbedrijven is de instabiliteit van natrium hypochloriet. Als de oplossing langere tijd bewaard wordt, loopt het gehalte aan actief chloor terug. Er bestaat dan een grote kans dat men onbewust met lagere concentraties actief chloor werkt.

Samenvattend kan gezegd worden dat toediening van gechloreerd water alleen werkt als het preventief gebruikt wordt. Zelfs als het gechloreerd water op de juiste tijdstippen wordt toegepast, worden de ziekteverschijnselen op z'n best verminderd. Daarnaast blijkt het werken met gechloreerd water moeilijk omdat het chloor niet stabiel is. Een tweede punt van zorg is dat bij toediening van gechloreerd water, de kans op het ontstaan van droge mollen toeneemt. De gedachte hierachter is dat de kieming van sporen van *Verticillium fungicola* (veroorzaker van droge mollen), normaliter in dekaarde geremd wordt door de aanwezigheid van bacteriën. Bij gebruik van gechloreerd water worden deze bacteriën geremd, waardoor kieming van *Verticillium* sporen vergemakkelijkt wordt.

Alternatieven voor een chemische bestrijding van bacterievlekken zijn niet voorhanden. Geels (1995) beschrijft de effectiviteit van bestrijding van bacterievlekken met het antibioticum kasugamycine. Hiertoe infecteerde hij knopjes in de eerste vlucht met *P. tolaasii* en bestreed hij de symptomen in de tweede vlucht met een 1% oplossing van kasugamycine. In de onbehandelde controle was 57% van de champignons aangetast (18% licht, 29% matig en 10% zwaar). Van de met kasugamycine behandelde champignons was slechts 9% licht aangetast. Kasugamycine heeft echter geen toelating als bestrijdingsmiddel.

2.4 Onderzoek aan biologische bestrijding.

Een andere mogelijkheid voor het onderdrukken van bacterievlekken, is gebruik te maken van biologische bestrijders. Biologische bestrijders bieden in tegenstelling tot gechloreerd water het voordeel van een langdurige werking. Een tweede voordeel is dat biologische bestrijders zich goed kunnen ontwikkelen onder de omstandigheden die gunstig zijn voor het optreden van bacterievlekken. Een biologische bestrijder is daardoor in staat om werkzaam te zijn op het goede moment. Er is onderzoek gedaan naar de toepassingsmogelijkheden van twee typen biologische bestrijders; bacteriofagen en antagonistische bacteriën.

2.4.1 Bacteriofagen

Bacteriofagen zijn virussen die bacteriën kunnen infecteren en afdoden. De reeks aan gastheren die door een bepaalde bacteriofaag kan worden geïnfecteerd is relatief klein. Sommige bacteriofagen kunnen bijvoorbeeld slechts een beperkt aantal stammen van een bacteriesoort infecteren. Munsch & Olivier (1995) beschrijven de experimenten die ze hebben uitgevoerd aan de toepassing van bacteriofagen voor de bestrijding van bacterievlekken. De beste resultaten werden verkregen als de bacteriofagen 4 dagen na afdekken op de dekaarde werden gespreoid. In kunstmatig besmette teelten werd het aantal gevlekte champignons met 30 tot 80% gereduceerd (met een gemiddelde van 55% in tien jaar onderzoek). De *P. tolaasii* stammen die gebruikt werden in de experimenten bleken niet in staat te zijn om een resistentie tegen de bacteriofagen te ontwikkelen.

Helaas bleken sommige stammen in de natuurlijke populatie van *P. tolaasii* wel resistent tegen besmetting met de bacteriofaag. Hoe hoog het percentage resistente *P. tolaasii* stammen in de natuurlijke populaties is, is niet bekend. Een biologisch bestrijdingsmiddel op basis van bacteriofagen met de naam Phagus is momenteel in het stadium van registratie, maar nog niet op de markt.

2.4.2 Bacteriën

Nair & Fahy (1972, 1976) waren de eersten die de mogelijkheid van biologische bestrijding met behulp van antagonistische bacteriën beschreven. Zij isoleerden antagonistische bacteriën uit dekaarde. Deze

bacteriën bleken echter te weinig effectief om als biologisch bestrijdingsmiddel te kunnen gebruiken. De onderzoekers schreven het gebrek aan effectiviteit toe aan verschillen in groeisnelheid van de bacteriën op champignonhoeden (Fahy *et al.*, 1981). *P. tolaasii* bleek op champignonhoeden veel harder te kunnen groeien dan de antagonistische bacteriestam. In een tweede poging om goede biologische bestrijders tegen *P. tolaasii* te vinden, isoleerden zij bacteriën van hoeden van gezonde champignons (Fahy *et al.*, 1981). Zij vonden tussen de geïsoleerde bacteriën enkele stammen die in staat waren om in proefteelten met een kunstmatige infectie het percentage champignons met bacterievlekken te onderdrukken. Deze antagonistische bacteriën waren fluorescente *Pseudomonaden* die nauw verwant waren aan *P. tolaasii*. Deze bacteriën hebben aan de basis gestaan van een biologisch bestrijdingsmiddel dat onder de namen "Conquer" en "Victis" op de markt is geweest. Voor een succesvolle toepassing van de biologische bestrijder werd een toepassingsstrategie ontwikkeld (Fahy, 1985). De gedachte achter deze strategie was dat de biologische bestrijder en *P. tolaasii* met elkaar concurreren om beschikbare ruimte en voedingsstoffen. Om de biologische bestrijder succesvol te laten zijn moest deze worden toegediend op die tijdstippen tijdens de teelt dat er weinig *P. tolaasii* bacteriën aanwezig zijn. Fahy (1985) stelde voor om de biologische bestrijder toe te dienen op Fase II compost, vlak voor het enten. Na de pasteurisatiefase zijn de meeste *P. tolaasii* bacteriën in compost gedood en kan hun terrein worden overgenomen door de biologische bestrijder. Een tweede belangrijk toedieningsmoment in de teelt, lag bij de aanmaak van dekaarde. In veen, dat vrij zuur is en in kalk zitten vrij weinig *Pseudomonas*-soorten. Als door het mengen van veen en kalk de zuurgraad neutraal wordt, ontstaat een andere situatie en kunnen *Pseudomonaden* gaan groeien. Als op dat moment een biologische bestrijder wordt geïntroduceerd, kan deze voorkomen dat *P. tolaasii* in aantal toeneemt. Na toepassing van de biologische bestrijder mag in de verdere teelt geen gechloreerd water meer gebruikt worden omdat dat de antagonistische bacteriën kan beschadigen en daardoor hun werking schade toebrengen. Ondanks het uitgebreide advies dat voor de toepassing van Conquer en Victis werd uitgebracht, werden deze middelen niet succesvol.

Ook Fermor & Lynch (1988) en Fermor *et al.* (1991) hebben getracht om biologische bestrijders tegen bacterievlekken te ontwikkelen. Fermor & Lynch (1988) hebben een groot aantal bacterie-isolaten gescreend op bruikbaarheid als biologische bestrijder van bacterievlekken. Fermor *et al.* (1991) hebben vervolgens 25 van deze antagonisten in mini-teelten van champignon, die geïnficeerd werden met *P. tolaasii*, getest op hun effectiviteit. Geen enkele van deze antagonisten was in staat om het niveau aan bacterievlekken tot het niveau van de niet-geïnficeerde controle. De beste biologische bestrijders waren in staat om het ziekteniveau te halveren. Daarnaast hebben Fermor *et al.* (1991) gekeken naar het optimale tijdstip van toepassing. Daartoe werd de meest efficiënte biologische bestrijder op 4 verschillende momenten in de teelt aangebracht: bij het enten, bij het afdekken, vlak voor knopvorming en na de eerste vlucht. Bij toediening bij het afdekken was de biologische bestrijder het meest effectief; bij toediening vlak voor knopvorming het minst. De beste bestrijding werd echter gevonden als de biologische bestrijder meerdere malen tijdens de teelt werd toegevoegd.

Door PPO sector Paddestoelen zijn in het kader van een door LNV gefinancierd project zijn een aantal bacteriestammen geïsoleerd die kunnen dienen als biologische bestrijders van bacterievlekken. Deze bacteriestammen zijn uit een aantal verschillende bronnen geïsoleerd; van champignons, aardappelen en uit dekaarde.

De effectiviteit van deze bacteriestammen is getest in een viertal teelten in de proefkwekerij. In deze proefteelten werden steeds bacterievlekken opgewekt door de dekaarde 7 dagen na afventileren te besmetten met *P. tolaasii*. De effectiviteit van biologische bestrijders werd getest door daags voor besmetting met *P. tolaasii* de dekaarde met een suspensie van de biologische bestrijders te behandelen. Afhankelijk van de proef werd daarnaast soms ook later in de teelt een extra behandeling van de biologische bestrijders gegeven.

De werkzaamheid van de biologische bestrijders werd beoordeeld door de opbrengst aan champignons te vergelijken met een controle die noch met *P. tolaasii* noch met een biologische bestrijder behandeld was. Daarnaast werd gekeken naar de mate waarin de ziektesymptomen werden gereduceerd. Om de ernst van de aantasting met bacterievlekken vast te leggen werden de geoogste champignons ingedeeld in 4 klassen: gezond, licht aangetast, matig aangetast en zwaar aangetast. Op die manier kon beoordeeld worden of a) een behandeling effect had op het percentage gezonde paddestoelen en b) de ernst van de aantasting bij de champignons met bacterievlekken.

De meest succesvolle bestrijder van bacterievlekken was bacterie-isolaat 8901R. Dit isolaat is een zeer

Proef-nummer	Behandeling	Opbrengst (kg/m ²)	% van de opbrengst			
			Gezond	Licht	Matig	Zwaar
21850	gezonde controle	22.9	93.0%	4.0%	2.0%	1.0%
	zieke controle ⁽⁵⁾	21.8	76.0%	12.0%	8.0%	3.0%
	antagonist toegepast ⁽¹⁾	22.3	96.0%	2.0%	1.0%	0.0%
22170	gezonde controle	31.74	99.5%	0.0%	0.0%	0.0%
	zieke controle ⁽⁵⁾	32.4	78.0%	19.1%	2.7%	0.2%
	antagonist toegepast ⁽²⁾	32.13	92.8%	7.0%	0.2%	0.0%
23070	gezonde controle	35.33	83.8%	10.1%	5.3%	0.8%
	zieke controle ⁽⁵⁾	35.17	66.9%	23.6%	7.8%	1.7%
	antagonist toegepast ⁽³⁾	34.34	79.0%	19.2%	1.7%	0.0%
23650	gezonde controle	37.55	98.4%	1.5%	0.0%	0.0%
	zieke controle ⁽⁶⁾	37.16	91.0%	7.6%	1.4%	0.0%
	antagonist toegepast ⁽⁴⁾	38.75	95.9%	4.1%	0.1%	0.0%

Tabel 1. Samenvatting van de resultaten van de 4 proefteelten waarin de effectiviteit van bacterie-isolaat 8901R als biologische bestrijder van bacterievlekken werd getest.

⁽¹⁾ Toediening biologische bestrijder daags vóór en daags na infectie met pathogeen en bij begin tweede vlucht.

⁽²⁾ Toediening biologische bestrijder daags vóór en daags na infectie met pathogeen en tijdens tweede vlucht

⁽³⁾ Toediening biologische bestrijder daags vóór infectie met pathogeen.

⁽⁴⁾ Toediening biologische bestrijder daags vóór infectie met pathogeen en na eerste vlucht

⁽⁵⁾ Infectie dekaarde met pathogeen 8 dagen na aanvang afventileren.

⁽⁶⁾ Infectie dekaarde met pathogeen 6 dagen na aanvang afventileren.

naaste verwant van *P. tolaasii*. Een samenvatting van de met bacterie-isolaat 8901R behaalde resultaten wordt gegeven in Tabel 1. De opbrengst aan champignons wisselde enigszins van proef tot proef, maar het is duidelijk dat toepassing van de bacterie-isolaat 8901R geen negatieve invloed op de opbrengst had. Bij vergelijking van de mate van aantasting werden ook verschillen gevonden tussen de teeltproeven. Het succes waarmee de teelten besmet konden worden met bacterievlekken varieerde. In proef 23650 werden in de zieke controle (d.w.z. alleen *P. tolaasii* op dekaarde gebracht) bij slechts 9% van

de champignons bacterievlekken gevonden. In proef 23070 was de infectie het meest succesvol. Daar werd in de zieke controle bij 33% van de champignons bacterievlekken gevonden. In al deze proeven bleek vooral het bacterie-isolaat 8901R in staat om de aantasting met bacterievlekken significant te onderdrukken. In proefteelt 21850 daalde het percentage aangetaste champignons van 23% naar 3%, in proefteelt 22170 van 22% naar 7%, in proefteelt 23070 van 33% naar 21% en in proefteelt 23650 van 9% naar 4%. Als daarnaast gekeken werd naar de mate van aantasting, zagen we dat bij toepassing van de biologische bestrijder de champignons met bacterievlekken minder zwaar werden aangetast. Samenvattend kan men zeggen dat bij toepassing van de biologische bestrijder veel minder champignons last krijgen van bacterievlekken en dat bovendien de champignons met bacterievlekken minder sterk zijn aangetast.

Behandeling met de biologische bestrijder blijkt daarmee ongeveer even effectief als een behandeling met gechlloreerd water. De effectiviteit van behandelingen met gechlloreerd water wordt beschreven door Royse & Wuest (1980) en Wong & Preece (1985). De manier waarop deze auteurs de mate van aantasting door bacterievlekken vaststellen is niet geheel gelijk aan de manier waarop PPO dit doet. In grote lijnen wordt enerzijds gekeken naar het percentage champignons met bacterievlekken en anderzijds naar het percentage aangetast hoedoppervlak van de aangetaste champignons. In de experimenten van Royse & Wuest (1980) daalde het percentage aangetaste champignons van 97% in de niet met chloor behandelde teelten naar ong 50% in de met chloor behandelde teelten. Daarnaast nam bij

de champignons met bacterievlekken het percentage aangetast hoedoppervlak af bij behandeling met chloor. Ook Wong & Preece (1985) vonden een halvering van het percentage aangetast champignons bij behandeling met gechloreerd water.

2.5 Opzet van een praktijkproef met biologische bestrijding.

De gunstige resultaten die behaald werden met bacteriestam 8901R bij de bestrijding van bacterievlekken waren reden om te onderzoeken of ook op bedrijven in de praktijk deze bacterie gebruikt zou kunnen worden als biologische bestrijder van bacterievlekken. Het uitvoeren van proeven op praktijkbedrijven brengt echter enige beperkingen met zich mee.

Het eerste probleem is dat het niet te voorspellen is wanneer een bedrijf last gaat krijgen van bacterievlekken. Het is uiteraard niet mogelijk om op bedrijven de teelten te besmetten. Om dit probleem te ondervangen is besloten om deelnemende telers te vragen om contact op te nemen met PPO zodra er zich problemen met bacterievlekken voordoen op het bedrijf.

Het tweede probleem hangt samen met de schaal waarop de proef kan worden uitgevoerd. De biologische bestrijder is geen wettelijk toegelaten bestrijdingsmiddel. Het is dus niet mogelijk om een hele teeltruimte te behandelen, omdat daarmee alle geogoste champignons ongeschikt worden gemaakt voor consumptie. Om dit probleem te ondervangen is besloten om slechts kleine proefveldjes in de bedden van een bedrijf te maken. De oogsterving wordt daarmee zo klein mogelijk gehouden.

2.6 Randvoorwaarden voor de uitvoering van de proeven

Een voorwaarde die door het Productschap Tuinbouw is gesteld voor financiering is dat de resultaten van de proeven gebruikt kunnen worden ter ondersteuning van een toekomstige aanvraag tot toelating bij het College Toelating Bestrijdingsmiddelen (CTB). Daartoe moeten de praktijkproeven worden uitgevoerd door een officieel erkende testinrichting. Deze erkenning wordt verzorgd door de Plantenziektenkundige Dienst. De in dit rapport beschreven proeven zijn uitgevoerd onder de erkenning van PPO sector Fruit (contactpersoon Dr. M. Wenneker).

Daarnaast dient voor de toepassing van de biologische bestrijder op praktijkbedrijven een ontheffing voor proefdoeleinden beschikbaar te zijn. De verkregen ontheffing voor proefdoeleinden (No. P 20030747) is geldig tot 5 maart 2005 en geldt voor maximaal 50 m² teeltoppervlak. De ontheffing is verleend onder voorwaarden. Deze hebben betrekking op persoonlijke bescherming van diegene die het middel toepast en op de opbrengst van de behandelde oppervlakten. De opbrengst van de behandelde oppervlakten moet worden vernietigd.

3 Communicatie binnen het project

Er zijn verschillende wegen bewandeld om teeltbedrijven op de hoogte te stellen van de mogelijkheid om deel te nemen aan de proef. In het najaar van 2003 werden bij PPO Paddestoelen regelmatig bijeenkomsten van een praktijknetwerk Paddestoelen georganiseerd. Tijdens deze bijeenkomsten werd informatie gegeven over de manier waarop we van plan waren om de praktijkproeven uit te voeren. De leden van het praktijknetwerk werden telkens voorzien van hand-outs met informatie met het verzoek om deze te verspreiden tijdens studieclub bijeenkomsten.

Voorzitters van studieclubs die niet in het praktijknetwerk Paddestoelen vertegenwoordigd waren, werden telefonisch benaderd met het verzoek om de praktijkproeven met een biologische bestrijder van bacterievlekken onder de aandacht te brengen.

In het algemeen leverde deze manier van werken slechts heel gering respons op. In persoonlijke gesprekken werd het potentiële belang van een biologische bestrijder bevestigd. Dit ging dan tevens vergezeld van de opmerking dat men op dat moment geen last had van bacterievlekken. Gedurende het najaar van 2003 hebben geen bedrijven op de oproep tot deelname gereageerd.

Na inspanningen van leden van de programma advies commissie en een publicatie met oproep tot deelname in Paddestoelen (11 maart 2004 week 11 pag 3) hebben zich 3 bedrijven gemeld voor deelname.

In onze ervaring kost het veel moeite om het idee van een praktijkproef levend te houden bij de bedrijven. Een oproep tot deelname moet samenvallen met de aanwezigheid van bacterievlekken op het bedrijf. Als problemen met bacterievlekken enkele weken na de oproep optreden, is men (heel begrijpelijk) vergeten dat de mogelijkheid tot deelname aan een praktijkproef nog open staat.

Indien de proef een vervolg op bedrijven krijgt, zal veel aandacht moeten worden besteed aan communicatie met bedrijven. Idealiter zou een samenwerking met adviseurs in de champignonteelt tot stand gebracht moeten worden. Zij bezoeken op regelmatige basis de bedrijven en kunnen een bemiddelende rol spelen. Ze kunnen enerzijds de mogelijkheid tot deelname aan een praktijkproef onder de aandacht brengen van het bedrijf op het moment dat er problemen zijn met bacterievlekken. Ze kunnen anderzijds PPO attenderen op bedrijven die last hebben van bacterievlekken en bereid zijn tot deelname.

4 Uitvoering en resultaten van de praktijkproeven

4.1 Proefplan

Voor de uitvoering van de praktijkproeven zijn protocollen ontwikkeld. De proeven worden uitgevoerd op teeltbedrijven met bacterievlek-problemen. De volgorde van gebeurtenissen is schematisch weergegeven in Figuur 1. Bij het optreden van een aantasting door bacterievlekken tijdens de uitgroei van de eerste of tweede vlucht werd PPO door de teler gewaarschuwd. Een PPO-medewerker bezocht daarop de teler op dezelfde of uiterlijk de volgende dag. Doel van het bezoek was drieledig.

- Ten eerste diende vastgesteld te worden dat het daadwerkelijk om een aantasting door bacterievlekken ging. Hiervoor werden monsters van aangetaste paddestoelen (5 stuks) verzameld en werd het pathogeen geïsoleerd. Ook werd de mate van aantasting gekwantificeerd (gewicht van aantastingsklassen in monster van 2 kg per proefveldje).
- Ten tweede diende bekeken te worden of het bedrijf kon voldoen aan (of akkoord ging) met de randvoorwaarden die nodig zijn voor het succesvol uitvoeren van de proef (goede registratie van werkzaamheden, bescherming van de proefveldjes tegen verstoring van de proef).
- Ten derde dienden in de teeltruimte 6 proefveldjes met een representatieve aantasting te worden vastgelegd (3 voor blanco behandeling, 3 voor experimentele behandeling). Ook werd ruime aandacht besteed aan instructie i.v.m. uitvoering van de proef.

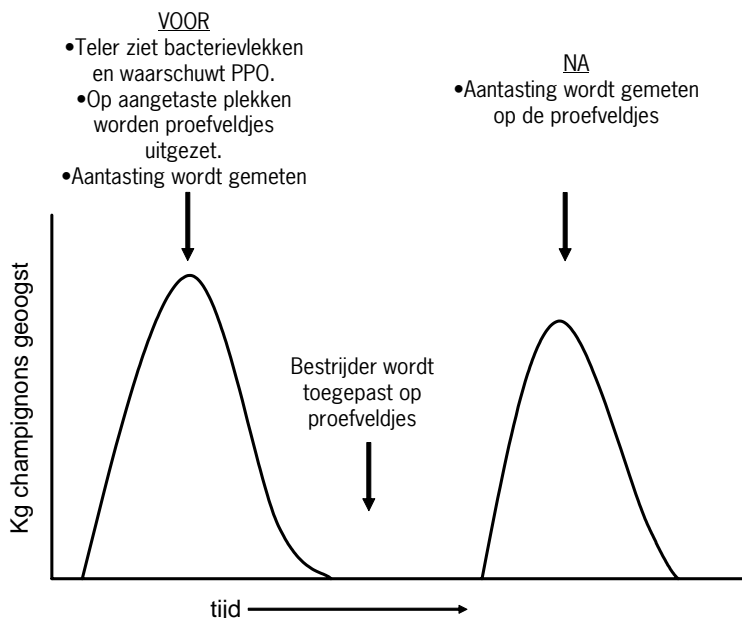
Nadat de teler de vlucht waarin bacterievlekken geconstateerde waren had geoogst, werd een suspensie van de antagonistische bacterie klaargemaakt en werd een besproeiing van de dekaarde van de

proefveldjes uitgevoerd. Vervolgens werd de teler nogmaals geïnstrueerd hoe om te gaan met de behandelde proefveldjes.

Vlak vóór de teler de daaropvolgende vlucht ging oogsten, werden door een PPO-medewerker de 6 proefveldjes volledig leeggeplukt. De champignons werden meegenomen naar PPO Paddestoelen in Horst-America. Daar werden de geoogste paddestoelen verdeeld in aantastingsklassen (gezond, licht -, matig - of zwaar aangetast) en gewogen. Vervolgens werden de paddestoelen vernietigd d.m.v. een hittebehandeling met stoom.

4.2 Proef op bedrijf 1.

Bedrijf 1 was een handoogstbedrijf met 4 cellen. De bacterievlekken veroorzaakten problemen in de tweede vlucht. Na melding door de teler is op dezelfde dag (16 maart) een medewerker van PPO op bezoek



Figuur 1. Volgorde van de gebeurtenissen zoals beschreven in het proefplan



Proefveldje "Controle"



Proefveldje "Behandeld"

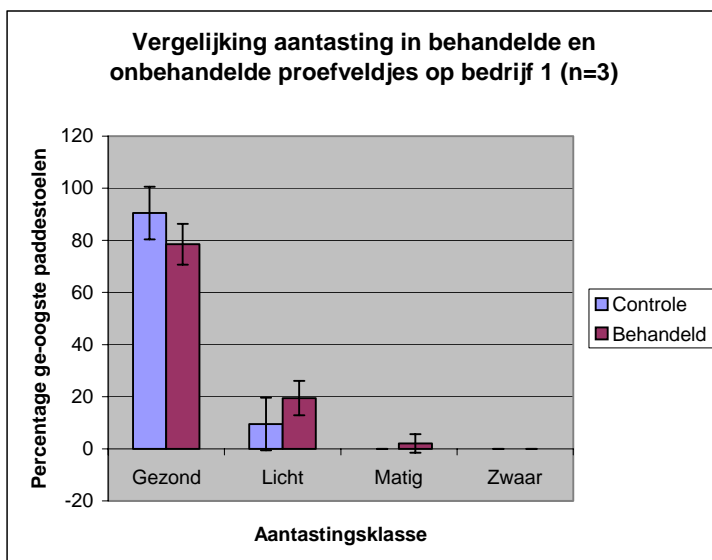
Figuur 2. Foto's van twee van de zes proefveldjes op bedrijf 1, voorafgaand aan de proef. Nadat deze champignons waren geoogst, werden de proefveldjes behandeld. Proefveldjes 1.1 t/m 1.3 werden besproeid met leidingwater terwijl de proefveldjes 1.4 t/m 1.6 werden besproeid met een suspensie van de biologische bestrijder in leidingwater.

geweest om de mate van aantasting te beoordelen (Figuur 2). De vlucht waarin de bacterievlekken werden geconstateerd was op 22 maart in zijn geheel geoogst.

Op 23 maart zijn de proefveldjes behandeld volgens plan (veldje 1 t/m 3 met leidingwater, veldje 4 t/m 6 met een suspensie van de biologische bestrijder in leidingwater). De teler heeft na de tweede vlucht niets gesproeid, ook geen gechloreerd leidingwater. Dekarde is hard en droog.

Op 30 maart zijn de paddestoelen van de proefveldjes geoogst. Vervolgens is bij PPO de mate van aantasting vastgesteld. Over de paddestoelen die buiten de proefveldjes zijn geoogst is de teler 100% tevreden. Er is een mooie derde vlucht verschenen. In de onderlaag in het midden van het bed staan minder exemplaren. Hier en daar werd een huilende champignon gevonden. Verder werden hier en daar champignons met "krokodillenhuid" gevonden wat wijst op een flinke circulatie.

In Figuur 3 wordt het effect van toediening van de biologische bestrijder weergegeven. Er zijn nauwelijks verschillen in de percentages gezonde paddestoelen. Circa 80 á 90% van de paddestoelen zijn vrij van bacterievlekken. De biologische bestrijder lijkt geen effect te hebben gehad. Als we de aantasting op de proefveldjes vóór en na toepassing van de biologische bestrijder met elkaar vergelijken (Figuur 4),



Figuur 3. Vergelijking van de aantasting door bacterievlekken in de behandelde en onbehandelde proefveldjes. Weergegeven zijn de gemiddelden van de gewichtpercentages aan geoogste paddestoelen. De foutbalken geven de standaard deviatie weer.

Behandeling met een suspensie van de biologische bestrijder heeft geen effect had.

valt op dat in de proefveldjes die niet met de biologische bestrijder behandeld zijn er in de derde vlucht sowieso een grote toename aan gezonde paddestoelen wordt gevonden. Blijkbaar is door aanpassing van het celklimaat (droog telen) het bacterievlekkenprobleem aanzienlijk verminderd. Door droger te telen wordt de ontwikkeling van bacterievlekken geremd. De veroorzaker van bacterievlekken, *P. tolaasii*, heeft vocht nodig om zich te kunnen ontwikkelen. Echter, dezelfde omstandigheden die de groei van *Pseudomonas tolaasii* remmen, remmen ook de groei van de biologische bestrijder. Dit zou de afwezigheid van een effect van toediening van de biologische bestrijder kunnen verklaren.

4.3 Proef op bedrijf 2.

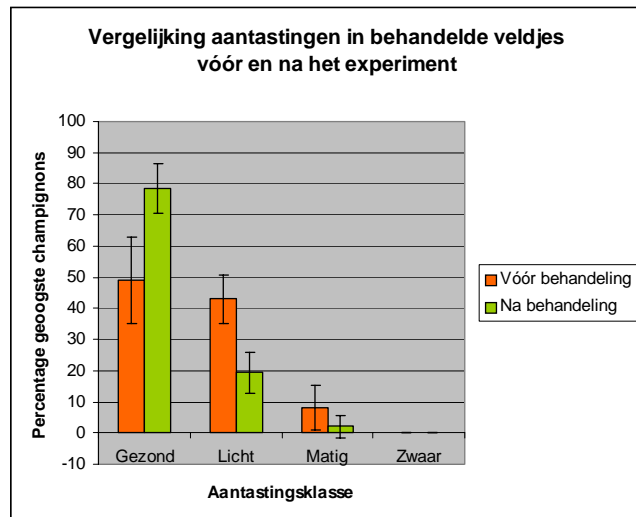
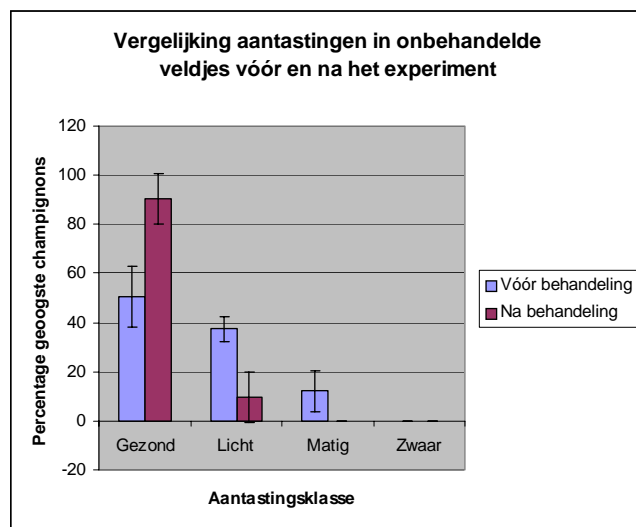
Bedrijf 2 was een handoogstbedrijf dat in kisten teelde. Op 16 maart nam het bedrijf contact op met PPO. Vooral op de 4^e en 5^e plukdag van de eerste vlucht werden symptomen waargenomen. Veel plekjes ontstonden als gevolg van plukhandelingen en er werden bruine plekken op raakvlakken met andere

paddestoelen gevonden. In de teeltruimten was sprake van een beperkte klimaatregeling en er was geen mogelijkheid tot regeling van RV.

Op 18 maart werd het bedrijf bezocht door een medewerker van PPO. Deze heeft proefveldjes uitgezet en monsters genomen. Er waren veel drukplekken te zien en een geringe aantasting door bacteriën (Figuur 5).

Op 19 maart zijn de proefveldjes behandeld volgens plan (veldje 1 t/m 3 met leidingwater, veldje 4 t/m 6 met een leidingwater). Op de vier daar op volgende dagen werd de dekaarde op vocht gesproeid.

Op 23 maart zijn de paddestoelen van de proefveldjes geoogst. Vervolgens is bij PPO de mate van aantasting vastgesteld. Het effect van toediening van de biologische bestrijder (Figuur 6) is gering. Zowel op de behandelde als de onbehandelde proefveldjes is meer dan 90% van de paddestoelen gezond. Als we de aantasting op de proefveldjes vóór en na toepassing van de biologische bestrijder met elkaar vergelijken (Figuur 7), valt op dat ook op bedrijf 2 in de proefveldjes die niet met de biologische bestrijder behandeld zijn er sowieso een grote toename aan gezonde paddestoelen wordt gevonden. De mate waarin het percentage gezonde champignons is toegenomen verschilt tussen de controle-veldjes en de behandelde veldjes. Bij aanvang van het experiment is in de controle-veldjes gemiddeld 74% van de champignons gezond. Dit percentage neemt toe tot 94% aan het einde van het experiment (20% toename van gezonde champignons op de controle veldjes). In de behandelde proefveldjes neemt het aantal gezonde



Figuur 4. Vergelijking van de mate van aantasting in de proefveldjes vóór en na behandeling. Weergegeven zijn de gemiddelden van de gewichtspercentages aan geoogste paddestoelen. De foutbalken geven de standaard deviatie weer. Zowel in de onbehandelde proefveldjes (besproeid met leidingwater) als de behandelde proefveldjes (besproeid met bacteriesuspensie in leidingwater) nam het percentage gezond champignons sterk toe. In samenhang daarmee nam het percentage paddestoelen in de klassen "licht-" en "matig aangetast" af.

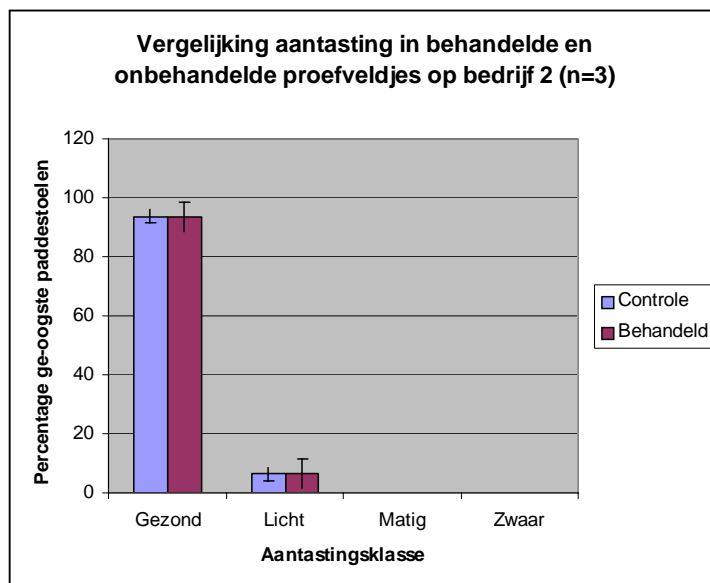


Figuur 5. Representatieve foto's van de aantasting op enkele van de gekozen proefveldjes op bedrijf 2.

paddestoelen toe met 35% (58% gezond vóór behandeling; 93% gezond na behandeling).

Het is niet duidelijk of dit effect te wijten is aan de aanwezigheid van de biologische bestrijder. Op bedrijf 1

is de trend namelijk omgekeerd (zie Figuur 4). Op de niet behandelde controle-velddjes neemt het percentage gezonde champignons toe met 40% terwijl op de behandelde proefveldjes het percentage slechts met 29% toeneemt.



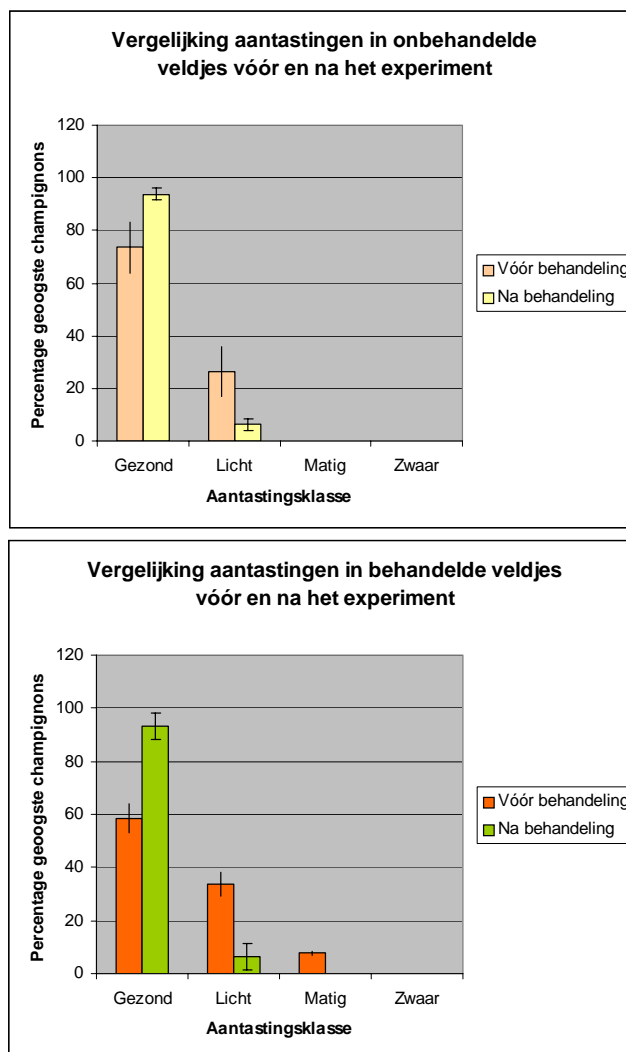
Figuur 6. Vergelijking van de aantasting door bacterievlekken in de behandelde en onbehandelde proefveldjes op bedrijf 2.

Weergegeven zijn de gemiddelden van de gewichtspercentages aan geogste paddestoelen. De foutbalken geven de standaard deviatie weer.

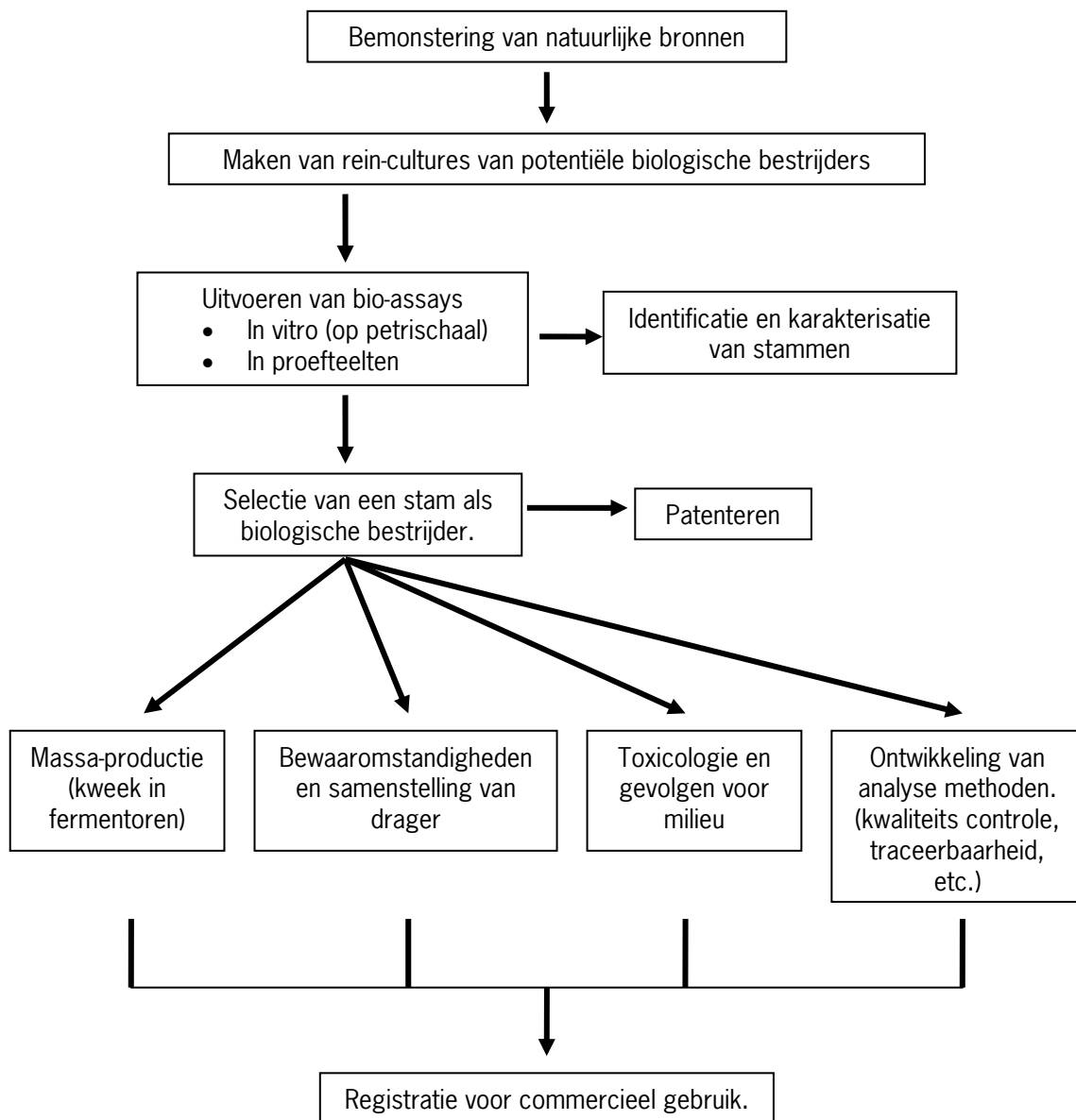
Behandeling met een suspensie van de biologische bestrijder heeft geen effect had.

5 Conclusie en voorstel voor vervolgonderzoek.

Montesinos (2003) geeft een overzicht van de stappen die een microbiologisch bestrijdingsmiddel moet ondergaan voordat het uiteindelijk op de markt verschijnt (zie Figuur 8). De ontwikkeling van een microbiologisch bestrijdingsmiddel begint met het isoleren en in rein-cultuur brengen van mogelijk geschikte bacteriestammen. Deze stammen worden vervolgens in bio-assays op verschillende manieren getest op hun werkzaamheid tegen het pathogeen. Hieruit komt vervolgens waarschijnlijk meest geschikte bacteriestam naar voor. Op dit punt zijn we nu beland met de biologische bestrijder tegen bacterievlekken. Op basis van 4 proefteelten bij PPO Paddestoelen is de bacteriestam gekozen die het meest effectief bacterievlekken onderdrukt. Vervolgens is in het voorliggende project getracht om de positieve resultaten van de proefteelten bij PPO ter herhalen in de praktijk. De resultaten van deze beide praktijkproeven toonden aan dat bij de gebruikte methode van toepassing, de biologische bestrijder van bacterievlekken geen effect had. Dit houdt een no-go in voor het verdere verloop van project 620162. Dit is een resultaat dat we, gezien de duidelijk positieve effecten die tijdens proefteelten bij PPO behaald zijn, niet verwacht hadden. Op zoek naar een verklaring, is de manier waarop de proefteelten bij PPO zijn uitgevoerd, vergeleken met de manier waarop de biologische bestrijder in de praktijkproeven is ingezet. Het grote verschil dat dan in het oog springt is het moment waarop de biologische bestrijder in de teelt wordt geïntroduceerd. In de proefteelten bij PPO werd eerst de biologische bestrijder op de dekaarde aangebracht en een dag later werd het pathogeen aangebracht. In de praktijkproeven werd het omgekeerde gedaan; nadat de aanwezigheid van het pathogeen was vastgesteld, werd de biologische bestrijder geïntroduceerd. Als we kijken naar de theoriën over het werkingsmechanismen dan is dit een cruciaal verschil. De theorie is dat de biologische bestrijder en *P. tolaasii* met elkaar concurreren om beschikbare ruimte en voedingsstoffen (Fahy, 1985). Als een biologische bestrijder de beschikbare ruimte en voedingsstoffen al in bezit heeft genomen zal *P. tolaasii* zich niet kunnen ontwikkelen. Fermor et al. (1991) toonden voor de bacterie-isolaten die zij in hun



Figuur 7. Vergelijking van de mate van aantasting in de proefveldjes vóór en na behandeling. Weergegeven zijn de gemiddelden van de gewichtpercentages aan geogste paddestoelen. De foutbalken geven de standaard deviatie weer. Zowel in de controle-veldjes (besproeid met leidingwater) als de behandelde proefveldjes (besproeid met bacteriesuspensie in leidingwater) nam het percentage gezond champignons sterk toe. In samenhang daarmee nam het percentage paddestoelen in de klassen "licht-" en "matig aangetast" af.



Figuur 8. Onderzoeks-items bij de ontwikkeling van microbiologische bestrijdingsmiddelen. (afgeleid van Montesinos, 2003)

testopzet gebruikten aan, dat bij toediening van de antagonist nadat de symptomen van bacterievlekken in de teelt zichtbaar waren, de biologische bestrijder geen effect had. Mogelijk heeft iets vergelijkbaars in onze experimenten gespeeld. Blijkbaar heeft na het plukken van een vlucht champignons, het pathogeen *P. tolaasii* een dusdanig sterke positie in de dekaarde veroverd, dat een biologische bestrijder hem daar niet van kan verdrijven. Een indicatie dat *P. tolaasii* zich, na het verschijnen van de symptomen van bacterievlekken, inderdaad in grote aantallen in de dekaarde heeft gevestigd wordt gegeven door Wong & Preece (1980). Bij analyse van 524 monsters dekaarde uit teelten zonder symptomen vonden zij slechts in 1% van de monsters *P. tolaasii* isolaten. Bij analyse van 20 monsters dekaarde van teelten met bacterievlekken vonden zij in alle monsters *P. tolaasii* isolaten. Dat zou betekenen dat, zoals gedaan in de proefteelten bij PPO een biologische bestrijder altijd preventief zal moeten worden ingezet om werkzaam te zijn.

Samenvattend kunnen we zeggen dat het negatieve resultaat van beide praktijkproeven hoogstwaarschijnlijk te wijten is aan het moment waarop de biologische bestrijder is toegepast (curatief

i.p.v. preventief). In vier afzonderlijke experimenten uitgevoerd bij PPO is een belangrijke reductie van bacterievlekken behaald bij het preventief toegepast van de antagonist. Dit geeft voldoende vertrouwen om door te gaan met de ontwikkeling van een biologische bestrijdingsmethode gebaseerd op isolaat 8901R.

De indicatie dat de biologische bestrijder preventief moet worden toegepast, heeft grote gevolgen voor de mogelijkheden om in de praktijk proeven te doen. Zoals in paragraaf 2.5 reeds is aangegeven, is niet vooraf aan te geven wanneer een teelt besmet zal worden met bacterievlekken. Dat zou betekenen dat proeven in de praktijk een groot aantal teelten moeten omvatten, in de veronderstelling dat in een gedeelte van deze teelten zich inderdaad bacterievlekken ontwikkelen. In al deze teelten moet de biologische bestrijder worden toegepast, in combinatie met een onbehandelde controle. Een tweede complicerende factor is dat de champignons die met de biologische bestrijder behandeld zijn, vernietigd moeten worden. De biologische bestrijder is (nog) niet toegelaten als bestrijdingsmiddel en mag dus niet gebruikt worden op champignons die in de handelskanalen terechtkomen.

Als we terugkeren naar Figuur 8, zien we dat voor een verdere ontwikkeling van de biologische bestrijding nog een aantal zaken moeten uitzoeken. Een van de items is "Bewaaromstandigheden en samenstelling van de drager". Tot nu zijn alle experimenten uitgevoerd met een verse bacteriesuspensie. Voor toepassing van de biologische bestrijder op bedrijven is het gebruik van verse suspensies niet handig. Er zal gekeken moeten worden naar een vorm waarin de bacterie gedurende langere tijd bewaard kan worden. Er zal een zogeheten drager moeten worden ontwikkeld. Een dergelijke drager kan een vloeistof zijn waarin de bacterie gesuspendeerd is, of het kan een vaste drager zijn. In geval van een vaste drager wordt de bacterie vermengd met een vaste stof die goed strooibaar is. Voorbeelden van vaste dragers die gebruikt zijn voor *Pseudomonas* soorten zijn: veendeeltjes, vermiculiet, kaoline, ligniet, alginaat bolletjes en talgpoeder (Amer & Utkede, 2000; Nandakumar *et al.*, 2001; Vidhyasekaran *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 2004).

Een tweede item is "Massa-productie". Indien een biologische bestrijder op grote schaal gebruikt gaat worden, moet hij ook op grote schaal gekweekt kunnen worden. In een vervolgproject moeten de mogelijkheden om de biologische bestrijder op grote schaal te kweken (in fermentoren) worden onderzocht. Om kosten-efficiënt te produceren moet gezocht worden naar een kweekmedium waarbij de opbrengst aan bacteriecellen hoog is, terwijl de kosten van het medium laag zijn.

Een derde item is de ontwikkeling van analysemethoden. Deze analyse methoden dienen om een kwaliteitscontrole op het uiteindelijke bestrijdingsmiddel uit te voeren (hoeveelheid actieve cellen in het product). Daarnaast kunnen deze methoden gebruikt worden om een residu-analyse uit te voeren op de geogste champignons. Voor de ontwikkeling van dergelijke analyse methoden wordt gebruik gemaakt van moleculaire technieken. Hierbij worden DNA fingerprints van de biologische bestrijder vergeleken met die van andere stammen van dezelfde bacteriesoort. Op die manier kan een DNA fragment gevonden worden dat kenmerkend is voor de biologische bestrijder. Dit DNA fragment kan dan als een marker gebruikt worden.

Een laatste item is "Toxicologie en gevolgen voor milieu". Vragen met betrekking tot dit item moeten beantwoord worden bij een registratie bij het College Toelating Bestrijdingsmiddelen. Hoe omvangrijk dit onderzoek is, hangt af van het organisme waar het om gaat. In geval van de biologische bestrijder van bacterievlekken gaat het om een bacterie die van nature op de hoeden van champignons voorkomt. De bacterie wordt daardoor waarschijnlijk al geconsumeerd door mensen.

Vervolgonderzoek aan de biologische bestrijding van bacterievlekken zou in een aantal stappen kunnen worden uitgevoerd. Elke stap zal afgesloten moeten worden met een go/no-go beslissing. Allereerst zou gekeken kunnen worden naar de meest optimale drager en de omstandigheden waaronder de biologische bestrijder het langst overleeft op die drager. Idealiter zou de biologische bestrijder enige weken te bewaren moeten zijn. Het vinden van een geschikte drager is een eerste voorwaarde en zou een go/no-go beslissingspunt kunnen zijn in de verder ontwikkeling.

Als is vastgesteld op welke drager de biologische bestrijder het best overleeft, kunnen teeltproeven gedaan worden bij PPO. In deze teeltproeven moet vervolgens vastgesteld worden hoe (en wanneer) in de teelt de biologische bestrijder kan worden toegepast. Indien deze celproeven worden uitgevoerd onder auspiciën van erkende testinstellingen, kunnen de resultaten worden gebruikt voor ondersteuning van registratie bij het College Toelating Bestrijdingsmiddelen. Indien deze proeven gunstige resultaten te zien geven, zou hier een tweede go/no-go beslissingspunt gelegd kunnen worden. Vervolgens zouden parallel

aan elkaar kweek op grote schaal en de ontwikkeling van analysemethoden kunnen worden uitgevoerd. Deze twee stappen dienen naast elkaar te worden uitgevoerd om voor de evaluatie van de kweek op grote schaal goede analyse methoden nodig zijn.

6 Geraadpleegde literatuur.

- Amer G.A. & Utkede R.S. (2000) Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can. J. Microbiol.* 46, pp 809-816.
- Fahy P.C. (1985) Bacterial blotch; disease entry points and biological control strategy. *Spawn Mate Newsletter* 4, pp 4-7.
- Fahy P.C., Nair N.G. & Bradley J.K. (1981) Epidemiology and biological control of bacterial blotch caused by *Pseudomonas tolaasii*. *Mushroom Science* 11, pp 343-353.
- Fermor T.R. & Lynch J.M. (1988) Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*: screening, isolation and characterisation of bacteria antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). *J. Appl. Bacteriol.* 65, pp 179-187.
- Fermor T.R., Henry M.B., Fenion J.S., Glenister M.J., Lincoln S.P. & Lynch J.M. (1991) Development and application of a biocontrol system for bacterial blotch of the cultivated mushroom. *Crop Protection* 10, pp 271-278.
- Gaze R.H. (1979) Report on ADAS farm investigation of bacterial blotch disease 1978/1979. *The mushroom Journal* 83, pp 504-508.
- Geels F.P. (1995) *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Appl. Bacteriol.* 79, pp 38-42.
- Geels F.P., van Griensven L.J.L.D. & Rutjens A.J. (1991) Chlorine dioxide and the control of bacterial blotch on mushrooms, caused by *Pseudomonas tolaasii*. *Mushroom Science* 13, pp 437-442.
- Goor M., van Tomme R., Swings J., Gillis M., Kersters K. & de Ley J. (1986) Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *J. Gen. Microbiol.* 132, pp 2249-2264.
- Munsch P. & Olivier J.M. (1995) Biocontrol of bacterial blotch of the cultivated mushroom with lytic phages; Some practical considerations. *Mushroom Science* 14, pp 595-602.
- Nair N.G., & Fahy P.C. (1976) Commercial application of biological control of mushroom bacterial blotch. *Aus. J. Agric. Res.* 27, pp 415-422.
- Nair N.G. & Fahy P.C. (1972) Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bact.* 35, pp 439-442.
- Nandakumar R., Babu S., Viswanathan R., Sheela J., Raguchander T. & Samiyappan R. (2001) A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *BioControl* 46, pp 493-510.
- Olivier J.M., Guillaumes J. & Martin D. (1978) Study of a bacterial disease of mushroom caps. In: *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact.* Pp 903-916. INRA. Angers
- Rainey P.B., Brodey C.L. & Johnstone K. (1992) Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. In: *Adv. Plant Pathol.* (Andrews J.H. & Tommerup I. eds.), pp 95-117. Academic Press.
- Royse D.J. & Wuest P.J. (1980) Mushroom Brown Blotch: Effects of chlorinated water on disease intensity and bacterial populations in casing soil and on pilei. *Phytopathology* 70, pp 902-905.
- Van Zaayen A. & Smits J.F. (1982) Measuring moisture on mushroom caps and forecasting bacterial blotch. *Proc. Of the GCRI Symposium on Bacterial Blotch*, Littlehampton, Uk, pp 20-26.
- Vidhyasekaran P., Sethuraman K., Rajappan K. & Vasumathi K. (1997) Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeon peawilt. *Biological Control* 8, pp 166-171.
- Walker R., Rossall S. & Asher M.J.C. (2004) Comparison of application methods to prolong the survival of potential biocontrol bacteria on stored sugar-beet seed. *Journal of Applied Microbiology* 97, pp 293-305.
- Watson R. & Gulliver A. (1981) The measurement of moisture on mushrooms for forecasting and control of bacterial blotch disease. *Mushroom Science* 11, pp 331-342.
- Wong W.C. & Preece T.F. (1980) *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops: A note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. *J. Appl. Bacteriol.* 49, pp 305-314.

- Wong W.C. & Preece T.F. (1985) *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: effects of sodiumhypochlorite on the bacterium and on blotch disease severity. J. Appl. Bacteriol. 58(3), pp 259-267.