

# KNPV werkgroep Bodempathogenen en Bodemmicrobiologie

**60e bijeenkomst op 3 april 2003 in Wageningen**

Op deze jaarlijkse bijeenkomst waren ongeveer 30 onderzoekers aanwezig. Hieronder staan de samenvattingen van 5 presentaties.

## **Invloed van verschillende gewassen op de diversiteit van *Burkholderia*-stammen en de selectie van antagonistische isolaten**

J.F. Salles<sup>1</sup>, P. Garbeva<sup>1</sup>; J. A. van Veen<sup>2</sup>;  
J. D. van Elsas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Plant Research International, Postbus 16,  
6700 AA Wageningen

<sup>2</sup> NIOO-CTO, Postbus 40, 6666 ZG Heteren

Het geslacht *Burkholderia* heeft een groot potentieel als biologisch bestrijdingsmiddel in de landbouw vanwege de productie van antibiotica. Dit geslacht heeft ook de mogelijkheid de wortels van een groot aantal gewassen te koloniseren. Het doel van dit onderzoek is de diversiteit van *Burkholderia*-soorten in de wortelzone van verschillende gewassen te bestuderen en de aanleg van deze gewassen om *Burkholderia*-soorten, met een antagonistische werking tegen het bodempathogeen *Rhizoctonia solani* te selecteren. Voor dit onderzoek zijn voor een aantal gewassen potproeven uitgevoerd met grond van velden met een verschil in gebruik over de afgelopen jaren.

*Burkholderia* isolaten zijn verkregen door uitplaten op een selectief medium en vervolgens controle op antagonistische werking in een dubbel-kweek test. Met behulp van PCR-DGGE en specifieke primers is de diversiteit bepaald, waarna een evaluatie van de aanwezige *Burkholderia* populaties kon worden gemaakt.

De resultaten laten zien dat, naast de invloed van gewasgeschiedenis op *Burkholderia*, ook het gewas een belangrijke rol speelt bij de selectie van *Burkholderia* soorten. Dit blijkt uit de overeenkomsten tussen de *Burkholderia* soorten die gevonden zijn in mais en gras in vergelijking met haver en gerst. Analyse van DGGE patronen die verkregen zijn uit de totale en kweekbare populaties, tonen een correlatie tussen de

aanwezigheid van specifieke DGGE banden in de genoemde gewassen. Tussen de behandelingen is geen verschil in selectie op antagonistische isolaten gevonden. Wel kon een effect van wortel-exudaten op de aanwezige organismen worden aangetoond.

## **Lange-termijneffect van biologische grondontsmetting op *Verticillium*-verwelking bij esdoorn en trompetboom**

Goud, J.C.<sup>1</sup>, Blok, W.J.<sup>1</sup>, van Bruggen<sup>1</sup>,  
A.H.C., Lamers<sup>2</sup>, J.G., Termorshuizen, A.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biologische bedrijfssystemen, Wageningen Universiteit,  
Marijkeweg 22, 6709 PG Wageningen,  
e-mail jankees.goud@wur.nl

<sup>2</sup> PPO-Akkerbouw, Groene ruimte en Vollegrondsgroente,  
Postbus 430, 8200 AK Lelystad

Bij biologische grondontsmetting worden tal van bodempathogenen gedood of significant teruggedrongen door verse organische stof de grond in te brengen, gevolgd door het vochtig maken van de grond en het gedurende enkele weken afdekken met kuilfolie. Tijdens de fermentatieprocessen die dan optreden in de bodem heeft afdoding van bodempathogenen plaats. In de literatuur zijn wel gegevens bekend (bij inundatie en toepassing van methylbromide) dat na het initiële afdodende effect een versterkt optreden van pathogenen optrad doordat ook de ziekteverendigheid van de grond is aangetast. Eerste aanwijzingen dat dit niet het geval is werden verkregen met *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* in asperge. In het hier gerapporteerde onderzoek werd op twee locaties de mogelijkheid van heftiger terugkeer van *Verticillium dahliae* onderzocht. Dit pathogeen wordt niet volledig afgedood tijdens biologische grondontsmetting, en daardoor is een versterkt optreden niet uit te

sluiten. Op de twee locaties, Wageningen en Meterik, werd in resp. 1997 en 1998 biologische grondontsmetting uitgevoerd. Het jaar na de biologische grondontsmetting werden kiemplanten van Noorse esdoorn (*Acer platanoides*) en trompetboom (*Catalpa bignonioides*) geplant. Volgens verwachting werd de besmetting van de grond door *V. dahliae* maar met ca. 80% teruggedrongen. Deze reductie bleef echter gehandhaafd gedurende de daaropvolgende jaren. Ook de infectie en ziekte-ontwikkeling in Noorse esdoorn bleef zeer ver achter bij die van de controles. Bij trompetboom was er een groot verschil gedurende de eerste twee jaar na grondontsmetting. In het derde en vierde jaar waren de verschillen echter gering, hetgeen wij verklaren door de beperkte sterfte bij trompetboom, waardoor de planten veel meer dan bij Noorse esdoorn, gestrest waren door hun dichte stand. In de locatie bij Wageningen bleek de dichtheid van *Pratylenchus fallax* significant bij te dragen aan het optreden van verwelking. Deze nematode werd nog niet eerder in verband gebracht met *Verticillium*-verwelking in bomen. Door biologische grondontsmetting werd *P. fallax* praktisch geëlimineerd. Het verband tussen inoculumdichtheid en optreden van ziekte geeft aan dat een eventuele vrees voor heftiger optreden van *V. dahliae* na biologische grondontsmetting niet gerechtvaardigd is.

## **Schimmeldiversiteit in bodems van uiteenlopende rijpheid: vergelijking van isolatieresultaten en moleculaire karakterisering**

*F.X. Prenafeta-Boldú, R.C. Summerbell, en W. Gams*

Centraalbureau voor Schimmelcultures, Postbus 85167, 3508 AD Utrecht

Schimmels vormen meestal het merendeel van de biomassa in de grond en spelen een sleutelrol in de nutriëntenkringloop in terrestrische oecosystemen. Bovendien voorkomt een hoge dichtheid van schimmelmycelia bodemerrosie, stabiliseert fluctuaties in het vochtgehalte en reduceert het verlies van nutriënten. In het verleden werden schimmelpopulaties bestudeerd m.b.v. isolatietechnieken, zoals verdunningsschalen en bodemwastechneken. Een nadeel van deze technieken is dat hiermee een fractie van de aanwezige soorten niet gedetecteerd/verkregen wordt, omdat veel schimmels niet te kweken zijn. Met de moleculaire technieken die zijn gebaseerd op PCR met verschillende schimmelspecifieke primers gericht op het ribosomaal DNA, kunnen deze schimmels in theorie wel worden aangetoond. De aldus

verkregen *amplicons* kunnen meestal m.b.v. DGGE analyse op gel worden gescheiden.

In onze studie werden de twee benaderingen, isolatie en DGGE profielen, met elkaar gekombineerd, om de schimmelpopulaties in 10 verschillende natuurlijke bodems in Nederland te karakteriseren. De locaties waren verspreid langs een rijpheidsgradiënt, van net ontgonnen grasland langs de zee in de Kwade Hoek, tot oud dennen- en eikenbossen op de Veluwe. Deze laatste bevatten daarnaast gradiënten van belangrijke fysisch-chemische parameters die de microbiële groei beïnvloeden, zoals pH, nutriënten- en organisch-stof-gehalte. D.m.v. een cluster-analyse werden voor de abundantie van schimmelsoorten en de DGGE patronen vergelijkbare dendrogrammen verkregen. De samenstelling van de schimmelpopulatie was sterk gecorreleerd met de pH-waarden en het organisch stofgehalte. De DGGE profielen, verkregen m.b.v. algemene schimmelprimers gericht op het 18S en het meer variabele ITS, gaven echter een veel geringere diversiteit dan de isolatiemethoden. Desondanks werden basidiomyceten nauwelijks geïsoleerd maar een aantal werd d.m.v. DGGE m.b.v. basidiomyceten-specifieke primers aangetoond.

Onze resultaten tonen dat de DGGE techniek heel geschikt is voor de identificatie van niet-kweekbare schimmels, maar zij heeft niet voldoende oplossend vermogen voor de analyse van complexe populaties. Dit gemis zou kunnen worden gecompenseerd door de gecombineerde analyse van meerdere patronen, verkregen m.b.v. primers die meer specifieke schimmelmogelijkheden aanspreken.

## **Fungal Bacterial Interactions (FBI), een inventarisatie van microbiële gemeenschappen in bodems met verschillende schimmeldichtheid**

*L.B. Folman*

NIOO-CTE, Postbus 40, 6666 ZG Heteren

Bacteriën en schimmels domineren de bodem-biomassa, en zijn de belangrijkste motoren achter nutriëntencycli in terrestrische ecosystemen. Deze twee groepen micro-organismen hebben vaak complementaire ecologische functies. Maar hoe beïnvloeden bacteriën en schimmels elkaar, en wat is de aard van hun interacties? De FBI-onderzoeksgroep, een gemeenschappelijk project van microbiologische afdelingen van het NIOO en het CBS, zoekt antwoorden op deze vragen.

Er is een inventarisatie van microbiële gemeenschappen in bodems uitgevoerd langs een terrestrisch-

naar-mariene gradient, bestaande uit de volgende locaties: oud eiken- en dennenbos, jong eiken- en dennenbos, permanent grasland, struweel, duin begroeid met helmgras, schor en estuarien sediment. Hiervoor zijn traditionele isolatiemethoden voor schimmels en bacteriën gebruikt, evenals molecu-laair-biologische technieken. Schimmels waren dominant in de bosgronden: omgevingen met lage pH, weinig mechanische verstoring, lage toevoer van anorganische nutriënten, rijk aan complexe organische materialen. De omstandigheden in de schor en het sediment daarentegen bevorderden bacteriële dominantie. Middels *in vitro* tests is onderzocht of er tussen de verschillende locaties variatie was in de percentages bacteriën die in staat waren tot productie van mogelijk schimmelremmende enzymen glucanase- en chitinase (die lysis van hyfen veroorzaken door afbraak van respectievelijk polyglucanen en chitine uit schimmelcelwand) of van antibiotica werkzaam tegen *Trichoderma*, *Fusarium* en *Mortierella* (aange-toond als antagonistische activiteit op agar). Principale componentenanalyse duidde op een correlatie tussen schimmeldichtheid en het voorkomen van bacteriën met glucanase-activiteit en bacteriën met antagonistische activiteit tegen *Trichoderma*, en (in mindere mate) tegen *Fusarium*. Deze correlatie zou erop kunnen duiden dat bacteriën glucanases en antibiotische componenten maken als reactie op de aanwezigheid van schimmels, bijvoorbeeld omdat beide groepen concurreren om voedsel. *Mortierella* bleek over het algemeen resistent tegen remming door bacteriële antibiotica of andere uitscheidingsproducten. Bacteriën die al na enkele dagen sterke chitinase-activiteit vertoonden waren vooral vertegenwoordigd in locaties met lage schimmeldichtheid, de schor en het estuariene sediment (30-40% van de cultiveerbare populaties), vergeleken met de overige locaties. Chitinase heeft waarschijnlijk een primaire functie voor de bacteriën in mariene gebieden: op deze locaties is chitine afkomstig van kreeftachtigen mogelijk een belangrijke voedingsbron. Na amplificatie van bacteriële ribosomaal RNA-genen en scheiding van de verkregen fragmenten middels DGGE zijn verschillen in diversiteit van de bacteriegemeenschappen tussen de locaties onderzocht. Cluster-analyse van de DGGE-patronen toonde aan dat de bacteriële gemeenschap beïnvloed werd door het (a)biotische milieu. De bosgronden clusterden bijeen als aparte groep, waarbij bleek dat microbiële gemeenschappen in bosgronden meer op elkaar leken op basis van de leeftijd van het bos dan op basis van de boomsoort. Grasland leek qua soortenversiteit enigszins op de bosgronden. Aparte clusters vormden verder bodems begroeid met struweel en helmgras enerzijds, en schor en sediment anderzijds. Voor de uitkomsten van studies aan de diversiteit van schimmels wordt verwezen naar de lezing van Francesc Prenafeta tijdens deze werkgroepbijeenkomst.

## Effecten van genetisch gemodificeerde *Pseudomonas putida* WCS358r op bacteriën en ascomyceten in de rhizosfeer van tarwe

M. Viebahn<sup>1</sup>, Christiaan Veenman<sup>1</sup>,  
Diana Tellekamp<sup>2</sup>, E. Smit<sup>2</sup>, K. Wernars<sup>2</sup>,  
L.C. van Loon<sup>1</sup> en P.A.H.M. Bakker<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universiteit Utrecht, Fytopathologie, Postbus 80084,  
3508 TB Utrecht

<sup>2</sup> Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven

In een veldexperiment uitgevoerd in de periode 1999 tot en met 2002 werd bepaald of herhaalde introductie van genetisch gemodificeerde micro-organismen (GGM's) meetbare effecten had op de natuurlijke rhizosfeer-microflora van tarwe. In het chromosoom van de saprofytische bodembacterie *Pseudomonas putida* WCS358r werden de biosynthesegenen ingebracht voor de productie van phenazine-1-carbonzuur (PCA) of 2,4-diacetyl-phloroglucinol (DAPG) van respectievelijk *P. fluorescens* stam 2-79 en stam Q2-87. Zowel PCA als DAPG hebben antimicrobiële activiteit. De GGM's werden door middel van zaad-coating in de rhizosfeer van tarwe geïntroduceerd, waarbij in iedere jaar dezelfde behandeling in hetzelfde veldje werd toegepast. Effecten van de GGM's op de natuurlijke microflora van de plantenwortels werden vergeleken met effecten van de ouderstam WCS358r en ten opzichte van een onbehandelde controle. Om effecten van de GGM's te vergelijken met effecten van een gangbare landbouwkundige praktijk zoals wisselteelt, werd een wisselteelt van tarwe en aardappel uitgevoerd, waarbij in dezelfde veldjes in 1999 en 2001 onbehandelde tarwe en in 2000 en 2002 onbehandelde aardappel werd verbouwd.

Met behulp van bacterie- en ascomyceet-specifieke primers werden PCR reacties op totaal DNA, geïsoleerd uit de rhizosfeer, uitgevoerd. De PCR producten werden volgens gescheiden m.b.v. "denaturing gradient gel electrophoresis" (DGGE) en de zo verkregen bandenpatronen werden geanalyseerd.

Zowel met de bacterie- als de ascomyceet-specifieke primers werd een duidelijk verschil tussen tarwe en aardappel aangetoond. Tevens bleek de microflora van de tarwewortels na een jaar aardappels te verschillen van die in continue tarweteelt. Differentiële effecten van WCS358r en de GGM's zijn waargenomen gedurende dit vier-jarige veldexperiment op zowel de bacterie- als de ascomyceetpopulaties. Door middel van sequentieanalyse worden organismen die gevoelig zijn voor verstoringen momenteel geïdentificeerd.