

SB  
Bibliotheek  
Proefstation  
Naaldwijk

A

3

W

11

PROEFSTATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS,  
TE NAALDWIJK.

Vruchtval bij tomaat veroorzaakt door *Botrytis cinerea*.

door:  
M.A.de Waard.

Naaldwijk, 1966.

2239475

Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder glas te Naaldwijk.

Vruchtval bij tomaat veroorzaakt door Botrytis cinerea.

Inleiding en doelstelling.

Vruchtval bij tomaat veroorzaakt door B. cinerea, is een gevolg van het binnendringen van de schimmel via natuurlijke wonden. Deze ontstaan door het afsterven van de punten der kelkblaadjes. Door de vorming van een abscissielag in de vruchtsteel wordt de vrucht afgestoten.

In enkele proeven is de invloed van kunstmatige infectie van de kelkblaadjes nagegaan op de vruchtval.

Opzet en uitvoering.

Trossen met nog groene tomaten werden van planten geplukt. Van de kelkblaadjes werden de puntjes afgeknipt en geïnoculeerd met wat sporulerend mycelium van B. cinerea.

Het mycelium was afkomstig van een 6 tot 12 dagen oude cultuur van de schimmel, groeiend op gewijzigde Richard's agar, gekweekt bij 21°C. De trossen werden bewaard in glazen. Op de bodem van elke glazen bevond zich ± 50 gr. zand waaraan in proef 1 10 ml en in proef 2 4 ml water was toegevoegd, teneinde een hoge luchtvochtigheid te verkrijgen. Het zand was afgedekt met filterpapier.

De proef is 2x uitgevoerd. Per proef werden 6 trossen wel en 6 trossen niet geïnoculeerd.

De glazen werden bewaard bij kamertemperatuur.

Resultaat.

Na 7 dagen werd het aantal vruchten geteld dat tengevolge van de aantasting was afgestoten.

De resultaten zijn in onderstaande tabel weergegeven.

De getallen in kolom 1 geven het percentage vruchten, dat van de centrale vruchtsteel gevallen is, door afstoting van de vrucht op de abscissielag in de vruchtsteel.

Id. in kolom 2 het percentage waar de afstoting tussen kelk en vrucht heeft plaatsgevonden.

Kolom 3 geeft het percentage vruchten dat niet afgestoten is.

Tabel 1. Verband tussen inoculatie der kelkblaadjes met B. cinerea en de vruchtval in procenten.

Proef		Kolom 1	Kolom 2	Kolom 3
1	Geïnoculeerd	81	7	12
	Controle	12	0	88
2	Geïnoculeerd	90	6	4
	Controle	4	0	96

Uiterlijk waren de kelkblaadjes verrot en met luchtmycelium overdekt. In proef 2 kwam minder luchtmycelium voor, omdat het zand hier minder vochtig was.

Rond de aanhechting van de vruchtsteel kwamen op de vrucht vaak verkrakte plakken voor. Op de aanhechtingsplaats zelfs was zowel vrucht als vruchtsteeltje verbruint of verkrakt. De bovenste cellagen van het harde vruchtsteeltje werden zacht. In het vruchtsteeltje werd een abscissielag gevormd, nog voor de schimmel deze laag bereikt had.

#### Bespreking der resultaten.

B. cinerea groeit dus na infectie via de kelkblaadjes en de vrucht in het vruchtsteeltje.

In het vruchtweefsel wordt een abscissielag gevormd, de vorming ervan wordt waarschijnlijk veroorzaakt door toxinen. Over de aard van deze toxinen is verder niets bekend.

De vruchtval bij geïnoculeerde kelkblaadjes is betrouwbaar groter dan bij niet geïnoculeerde.

Pathologische anatomie van tomatenplanten, aangetast door

Botrytis cinerea.

Kiesbuizen van B. cinerea kunnen niet alleen via wonden of beschadigd weefsel, maar ook via onbeschadigd bladweefsel de plant binnendringen.

Dit komt vooral voor bij fysiologisch oude bladeren of bij bladeren met een relatief dunne cuticula.

Volgens Blackman & Welsford (1916) geschiedt het binnendringen op mechanische wijze. Ze namen onder de gewollen top van een kiesbuis, een lichte indeuking waar.

Volgens Linkens & Haage (1963) gaat aan het binnendringen van de kieshyfe een cutinase-activiteit vooraf. Hierdoor zou de cutine laag op enzymatische weg worden opgelost.

Na het binnendringen van de infectiehyfe groeit de schimmel verder het planteweefsel in, met behulp van enzymen welke de middenlamel aantasten. De protoplasten desintegreeren hierdoor en B. cinerea groeit het aldus getransformeerde weefsel in.

In enkele zelfgemaakte preparaten is het verloop van schimmelhyfen nagegaan in een stengel op de grens van ziek naar gezond weefsel. De coupes werden gekleurd in 0.02% katoenblauw in laktofenol-alkohol en ontkleurd in lakto-fenol-alkohol (10 gr. watervrije fenol, 10 cc geconc. melksuur, 20 cc glycerine en 20 cc alcohol 96%) Het verloop van de schimmel in het weefsel was in de meeste preparaten moeilijk te volgen, omdat het weefsel reeds te veel was gadesintegreerd. In 2 tekeningen is het verloop van hyfen in een xyleemvat en in het mergparenchym aangegeven.

## Het isoleren van enkele schimmels.

Tijdens de praktijkperiode werden de volgende schimmels uit aangetaste plantemateriaal geïsoleerd.

1. Botrytis cinerea Pers. ex Fr. op tomaat. Stukjes stengel werden uitgelegd op vochtig filtreerpapier. Na enkele dagen werd wat van het sporulerende mycelium overgeënt op kersenagar. Daarna werd overgeënt op Richard's agar + 5% saccharose (R + S) en op ada. Op ada groeit de schimmel vrij snel naar de rand van de schaal en begint na  $\pm$  7 dagen over de hele schaal tegelijk te sporuleren. Op Richard's agar groeit de schimmel iets langzamer naar de rand van de schaal. De sporulatie begint in het midden.  
Tekening: vertakte conidiendrager met conidien.
2. Botrytis cinerea op paprika. Veroorzaakt donker- tot lichtbruine plekken op de stengel, waarop de schimmel sporuleert. Isolatie als bij 1. Gekweekt op R + S.
3. Didymella lycopersici op tomaat. Bruin zwarte plekken op de stengel waarin zwarte bolletjes te zien zijn. Dit is de imperfecte vorm van de schimmel en wordt Ascochyta hortorum genoemd. Vaak zijn de stengels op de plaats van aantasting verhard. Ook voetrot kan door Didymella veroorzaakt worden.  
De schimmel werd geïsoleerd door stukjes aangetast stengel-weefsel uitwendig te ontsmetten en uit te leggen op kersenagar. Na enkele dagen werd de schimmel overgeënt op kersenagar, waarop de schimmel ook wordt gekweekt.  
De zwarte pycnidien waarin zich ovale, tweecellige sporen bevinden zijn wel microscopisch bekeken, maar niet getekend.
4. Phytophthora sp. op tomaat. Veroorzaakt bruine plekken op de stengel. Gaat vaak gepaard met holtrekken van de stengel. De schimmel kan via de hoofdwortel de stengel binnendringen. Een verbruinen en afsterven van de hoofdwortel is hiervan het gevolg. De schimmel groeit inwendig door de wortelhals naar boven. Boven de wortelhals kan het een typische insnoeiing van de stengel veroorzaken, waardoor de plant omvalt.  
De schimmel werd geïsoleerd door stukjes stengel uitwendig te ontsmetten en uit te leggen op kersenagar. De schimmel werd na uitgroeien uit de stengelstukjes geënt op becnagar.  
De soortnaam van de schimmel is Ph. araeae of Ph. richardiae.

Beide komen op tomaat voor, maar zijn zeer moeilijk te onderscheiden.  
Ook *Fh. infestans* komt op de tomaat voor, maar alleen op bladeren en vruchten.  
Er werden geen geslachtelijke fructificaties waargenomen.  
Tekening: sporangien en chlamydo-sporen.

5. *Fusarium javanicum* op komkommer.

*Fusarium oxysporum* op komkommer.

Beide schimmels werden geïsoleerd uit planten, waarvan gegeven was, dat ze door deze schimmels aangetast waren.

*F. javanicum* tast *Cucurbita ficifolia* (onderstam van geente komkommer) aan. Komkommer wordt door deze schimmel net boven de grond aangetast en geeft hier een wit schimmelpluis te zien.

*F. oxysporum* kan de gehele plant aantasten. De schimmels zijn moeilijk te onderscheiden. De banaanvormige sporen van *F. javanicum* zijn meestal 2-7 cellig. De eincellen hebben gebogen punten. De sporen van *F. oxysporum* zijn 2-6 cellig. *F. javanicum* vormt veel meer sporen dan *F. oxysp.*

Tekening: sporen en chlamydo-sporen van beide schimmels.

6. *Fusarium oxysporum* op augurk.

Geïsoleerd uit de wortel, door wortelstukjes uitwendig te ontzetten en uit te leggen op kersenagar. Daarna werd de schimmel overgeënt op ada. Weinig sporen.

Tekening: sporen en chlamydo-sporen.

7. *Fusarium* sp. op augurk. Isolatie als 6. Heeft echter een rood mycelium op ada i.l.l. *F. oxysporum* en *F. javanicum* welke op ada een wit mycelium vormen.

Vormt 3-5 cellige ovale sporen.

Tekening: sporen en chlamydo-sporen.

8. Baklijzwam op komkommer. Groeit als een korst over de grond of als een manchet op het stengelgedeelte net boven de grond. Bij afsterven van de schimmel wordt de manchet hard en verhardt.

Pogingen om de schimmel te isoleren zijn niet geslaagd.

9. *Mucor* op komkommer. Van oude vergeelde vruchten waarop de schimmel groeide, kon de schimmel makkelijk overgeënt op ada

Tekening: sporangium

10. *Rhizopus*. Als verontreiniging op een plaat aanwezig

Tekening: myceliumtrade met rhizoiden

Een oriënterende proef naar de aanwezigheid van een stof, die de vorming van een abscisselaag in bladstelen induceert.

Inleiding.

De vorming van een abscisselaag in bladsteel en vruchtsteel bij tomaat kan veroorzaakt worden door de aanwezigheid van Botrytis cinerea in blad en bladsteel resp. vrucht en vruchtsteel. De schimmel induceert reeds op een afstand de vorming van een cambiumlaag, waarop het aangetaste plantedeel tenslotte van de plant afbreekt.

De manier waarop deze inductie plaats vindt, is niet bekend. De stof, die het weefsel van een natuurlijk breukvlak tot deling aanzet, kan zijn:

- a) een toxine, geproduceerd door de schimmel
- b) een afweerstof, door de plant gevormd in reactie op aanwezigheid van de schimmel.

c) een afbraakproduct van het door de schimmel aangetaste weefsel. Deze laatste veronderstelling is niet onwaarschijnlijk, omdat bij afsterving van het bladweefsel, waarbij ook afbraakproducten vrijkomen, een abscisselaag gevormd wordt.

Doelstelling.

Doel is, aan te tonen dat er werkelijk een stof is, die direct of indirect de vorming van de abscisselaag beïnvloedt.

Opzet en uitvoering.

Getracht werd de stof in een cultuurfiltraat van B. cinerea aan te tonen. Hiertoe werden stilstaande cultures van de schimmel gemaakt in erlenmeyers van 500 ml. In elke erlenmeyer bevond zich 100 ml (gewijzigd) Richard's medium, welke per 1000 ml gedestilleerd water 10 gr  $\text{KNO}_3$ , 0.25 gr  $\text{MgSO}_4$ , 5 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 gr saccharose en een spoortje  $\text{FeCl}_3$  bevat.

De erlenmeyers werden geïncubeerd bij 21°C.

Van 15 tot 30 dagen oude cultures werd de cultuurvloeistof van 2 erlenmeyers achtereenvolgens gefiltreerd door kaasdoek en een Whatmann bacterie filterkaars. Zo werd een cultuurfiltraat verkregen, vrij van eventuele resten van hyfen en sporen van B. cinerea.

Teneinde de stof in het cultuurfiltraat aan te tonen, werd het filtraat in een contact gebracht met het snijvlak van een bladsteel, die op 1 à 2 cm van de stengel was afgesneden.

- a) door pomestukjes 2% wateragar, die 12 uur in de cultuurvloeistof hadden gedreven, op het snijvlak te leggen.

Om te snelle uitdroging van de agarblekjes te voorkomen, werden de planten gedurende 1 nacht na de behandeling in de neveltent geplaatst.

b) door watjes gedrenkt in de cultuurvloeistof op de bladsteelrest te brengen, dit te omwikkelen met plastic en dicht te binden met een metalen strip.

In proef 1 is methode a) toegepast in proef 2 en 3 methode b)

In proef 4 werd het cultuurfiltraat tot 1/10 van het oorspronkelijke volume op een waterbad bij 50°C ingedampd.

Een Richard's voedingsoplossing kreeg als controle dezelfde behandeling. Methode a) werd toegepast.

Alle 4 proeven bevatten 15 planten per behandeling. Als controle werd telkens een zelfde aantal bladsteelresten met een Richard's voedingsoplossing in contact gebracht en een zelfde aantal werd niet behandeld. De leeftijd van de planten was 4 tot 6 weken. De proeven werden uitgevoerd in de variakas.

Resultaat na 1 week.

Proef	Percentage bladsteelresten afgestoten bij behandeling met		
	cultuurfiltraat	voedingsopl.	onbehandeld
1	-	-	0
2	90	60	0
3	85	50	0
4	± 75	± 50	0

Bij proef 1 werden de eerste bladsteelresten pas na 14 dagen afgestoten. Na 2 tot 3 waren na 3 dagen, na verwijdering van watten en plastic, verbruinde plakken te zien. Soms was de bladsteelrest aan het uiteinde ingedroogd.

Bij proef 4 waren alle met cultuurfiltraat behandelde bladsteelresten na 1 dag aan de uiteinden duidelijk verrot en ingedroogd. (zie foto).

Aan alle met Richard's medium behandelde en onbehandelde bladsteelresten waren toen nog geen veranderingen te bespeuren.

Na 4 dagen waren de met cultuurfiltraat behandelde bladstelen nog verder ingedroogd en lichtgroen van kleur. Vanaf de 4e dag traden echter veel secundaire schimmelinfecties op, zowel bij de met cultuurfiltraat als met voedingsoplossing behandelde bladsteelresten.

Aan de onbehandelde bladsteelresten waren geen veranderingen waar te nemen.



### Bespreking der resultaten.

Vooral in proef 4 is een duidelijke invloed van het cultuurfiltraat op de bladsteelrest te bespeuren. De vochtige agarblekjes met Richard's medium vormen echter een gunstige invalspoort voor secundaire schimmelinfecties, zodat het uiteindelijke resultaat onbetrouwbaar is. Deze schimmels kunnen n.l. ook het afstoten van de bladsteelresten veroorzaakt hebben. Desondanks kunnen we toch wel concluderen, dat er in het cultuurfiltraat een agens aanwezig was, dat een afsterven van de bladsteelrest veroorzaakte en direct of indirect de vorming van een abscisselaag induceerde.

Dit kwam duidelijker tot uiting in proef 4 dan in de proeven 2 en 3.