

Effect UV-C belichting op myceliumgroei en sporenkieming van *Fusarium oxysporum* en *Fusarium solani*

In vitro experimenten

Marcel Wenneker en Nina Joosten

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector fruit
November 2008

PPO nr. 3261086200

© 2008 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.

Dit is een vertrouwelijk document, uitsluitend bedoeld voor intern gebruik binnen PPO dan wel met toestemming door derden. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermenigvuldigd of verspreid voor extern gebruik.

Projectnummer: 3261086200

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector fruit

Adres : Lingewal 1, Randwijk
: Postbus 200, 6670 AE Zetten
Tel. : 0488 - 47 37 02
Fax : 0488 - 47 37 17
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1	INLEIDING	4
2	MATERIAAL EN METHODE	5
2.1	Belichting met UV-C en dosering	5
2.2	Effect van UV-C op sporenkieming.....	5
2.3	Effect van UV-C op myceliumgroei.....	5
2.4	Effect van UV-C op sporenproductie	6
2.5	Statistische analyse	6
3	RESULTATEN	7
3.1	Sporenkieming	7
3.2	Myceliumgroei.....	8
3.2.1	Fusarium oxysporum.....	8
3.2.2	Fusarium solani.....	10
4	FOTO'S EFFECT UV-C OP MYCELIUMGROEI EN SPORENVORMING.....	11
5	CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	12
	BIJLAGE I STATISTISCHE ANALYSE F. OXYSPORUM	13
	BIJLAGE II STATISTISCHE ANALYSE F. SOLANI.....	17

1 Inleiding

In dit rapport worden de resultaten beschreven van het onderzoek naar het effect van UV-C belichting op de myceliumgroei en sporenkieming van *Fusarium oxysporum* en *F. solani*. Het onderzoek is uitgevoerd op verzoek van paprikateiler mts J. van der Bosch uit Bleiswijk en het Kennisplatform UV-gewasbescherming Glastuinbouw (bestaande uit Cleanlight, Berg Product en Eric Gerritsma Tuinbouw techniek). De opzet van het onderzoek is besproken met de opdrachtgevers.

2 Materiaal en methode

In dit onderzoek is het effect gemeten van UV-C op de sporenkieming en de myceliumgroei van *Fusarium oxysporum* en *F. solani*. Dit gebeurde in het laboratorium van PPO-fruit op voedingsbodems [*in vitro experimenter*]. De schimmels waren afkomstig uit de schimmelcollecties van de Plantenziektenkundige Dienst (*F. oxysporum*) en CBS (*F. solani*).

Tabel 1. In het onderzoek geteste schimmelsoorten.

Schimmelsoort	Code	Sporen	Mycelium
<i>Fusarium oxysporum</i>	FO	Macroconidiën	x
<i>Fusarium solani</i>	FS	Microconidiën	x

2.1 Belichting met UV-C en dosering

De experimenten werden uitgevoerd in Randwijk bij Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. De belichting werd uitgevoerd met een lage druk UV-lamp. De gewenste UV-C dosering (mJ/cm^2) werd verkregen door de hoogte van de lamp en de belichtingsduur te variëren. De exacte dosering werd tijdens de proeven vastgesteld met behulp van een UV-C lichtmeter.

2.2 Effect van UV-C op sporenkieming

De schimmelsoorten werden opgekweekt op Potato Dextrose Agar (PDA – aardappel dextrose agar). Van sporulerende schimmelcultures werden sporensuspensies (macro- of microconidiën) verkregen (circa 1×10^5 sporen/ml). Bij *F. oxysporum* werden macro-conidiën gebruikt, bij *F. solani* de micro-conidiën. Van de sporensuspensies werd 200 microliter op een Petri schaal met wateragar gebracht en uitgespreid met een steriele glazen spatel. De Petrischalen met wateragar (zonder deksel) en sporen werden belicht met een bepaalde UV-C dosis (in drie herhalingen). Na het belichten werden de Petrischalen geïncubeerd in een klimaatkast in het donker bij 22°C. Na 24, 48 en 96 uur werden de sporen onder de microscoop op kieming beoordeeld. Kieming werd bepaald door tenminste 150 sporen per Petrischaal op kieming te beoordelen. Een spore werd als gekiemd geteld als de kiembuis langer was dan de halve diameter van de spore.

Tabel 2. Toegepaste UV-C doseringsreeksen (mJ/cm^2) bij experiment UV-C op sporenkieming.

Experiment	Schimmelsoort	Dosering mJ/cm^2
Sporenkieming	FO, FS	0, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 150, 200

2.3 Effect van UV-C op myceliumgroei

De experimenten werden uitgevoerd door een myceliumponsje in het midden van een voedingsbodem te zetten. Na 24 uur incubatie in een klimaatkast werden de ponsjes verwijderd, en werd het nieuw gevormde myceliumdraden belicht met een bepaalde dosering UV-C. De behandelingen werden in drie herhalingen uitgevoerd. In de experimenten werd gekeken naar een dosis-effect en het effect van herhaald belichten. Hiervoor werden de ponsjes belicht met een doseringsreeks zoals weergegeven in de onderstaande tabellen. Het effect van de UV-C belichting werd bepaald door de diameter van de schimmelkolonie (mycelium) op bepaalde dagen te meten. Resultaten uit eerder onderzoek gaven aanwijzingen dat het effect van UV-C waarschijnlijk kortstondig is, en de frequentie van belichten belangrijker is dan de dosis. Daarom werden

schalen met schimmelponsjes vijfmaal, driemaal of tweemaal met alle doseringen UV-C belicht.

Tabel 3. Toegepaste UV-C doseringsreeksen (mJ/cm^2) bij experiment voor effect UV-C op myceliumgroei.

Experiment	Schimmelsoort	Dosering mJ/cm^2
Myceliumgroei	FS, FO	0, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 150, 200

Tabel 4. Toegepaste frequentie van belichten bij experiment voor effect UV-C op myceliumgroei.

Experiment	Schimmelsoort	Frequentie	Dagen
Myceliumgroei	FS, FO	5x belicht	ma, di, wo, do, vr
Myceliumgroei	FS, FO	3x belicht	ma, wo, vr
Myceliumgroei	FS, FO	2x belicht	ma, vr

De myceliumgroei werd gemeten op 1, 2, 3, 4 en 5 dagen na uitvoering van de (eerste) UV-C belichting. In het verslag zijn de resultaten weergegeven van de meting op dag 5; de dag na de laatste uitgevoerde belichting.

2.4 Effect van UV-C op sporenproductie

Tijdens de experimenten werd geconstateerd dat de myceliumgroei slechts beperkt werd geremd. Dat werd veroorzaakt doordat het mycelium in de voedingsbodem groeide. Opvallend was dat het mycelium dat op de voedingsbodem groeide zichtbaar geremd werd en minder sporuleerde. Om dit aan te tonen werd een bepaalde hoeveelheid steriel water op de voedingsbodem gegoten en de sporen met een steriele spatel los gekrabbd. Van de ontstane suspensie werd de sporenconcentratie bepaald.

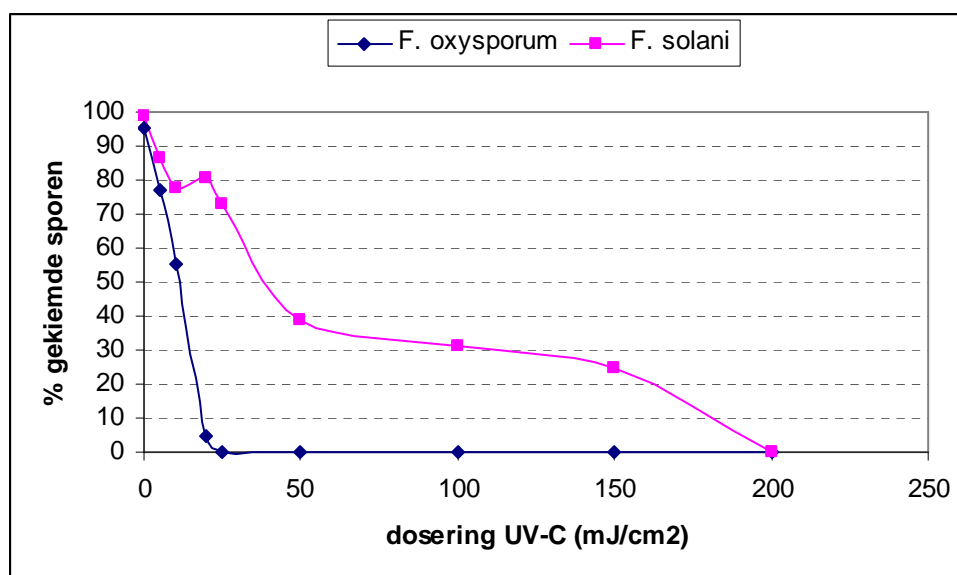
2.5 Statistische analyse

De statistische analyses van de resultaten zijn uitgevoerd met Genstat 11th edition release 1 (Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Research, UK), aangevuld met de Biometris Genstat Procedure Library 9nd Edition. Als significante effecten werden aangetoond met de F-test ($P < 0.05$) dan werden paarsgewijze vergelijkingen gemaakt op grond van de Least Significant Differences (LSD)-test waarbij de $LSD_{0.001}$ gebruikt zijn.

3 Resultaten

3.1 Sporenkieming

Uit de figuur 1 blijkt dat de sporenkieming geremd werd naarmate de UV-C dosis verhoogd werd. De kieming van de macroconidiën van *F. oxysporum* werd sterker geremd dan de microconidiën van *F. solani*.



Figuur 1: percentage gekiemde sporen van *F. oxysporum* en *F. solani* - 24 uur na UV-C belichting.

De sporenkieming werd na 24, 48 en 96 uur bepaald. Bij *F. oxysporum* werd bij een dosering van 50 mJ/cm² na 96 uur slechts 3 procent kieming waargenomen. Bij doseringen van 100 mJ/cm² en hoger werd geen kieming meer waargenomen na 96 uur incubatie.

Tabel 5: percentage gekiemde macroconidiën van *F. oxysporum* - 24, 48 en 96 uur na UV-C belichting.

mJ/cm ²	24 uur	48 uur	96 uur
0	96	nd	nd
5	77	nd	nd
10	55	nd	nd
20	4	62	nd
25	0	28	nd
50	0	0	3
100	0	0	0
150	0	0	0
200	0	0	0

nd: niet bepaald omdat de individuele sporen niet beoordeeld konden worden door de aanwezigheid van kiembuizen.

Een volledige doding van de micro-conidiën van *F. solani* werd met de toegepaste UV-C doseringen niet bereikt. Bij een dosering van 200 mJ/cm² werd na 96 uur nog 50% kieming waargenomen.

Tabel 6: percentage gekiemde microconidiën van *F. solani* - 24, 48 en 96 uur na UV-C belichting.

mJ/cm ²	24 uur	48 uur	96 uur
0	99	nd	nd
5	87	90	nd
10	78	85	88
20	81	80	80
25	73	72	76
50	39	57	66
100	31	39	nd
150	25	34	66
200	0	7	50

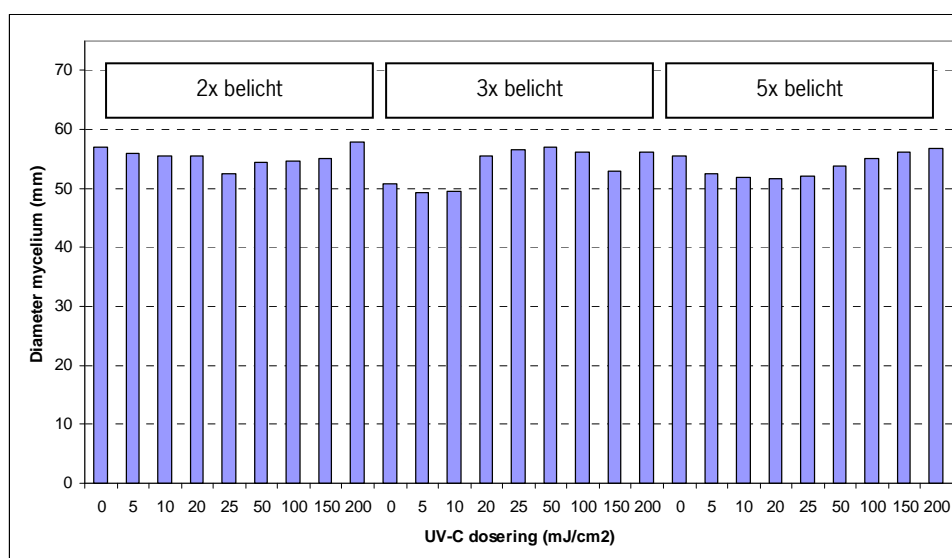
nd: niet bepaald omdat de individuele sporen niet beoordeeld konden worden door de aanwezigheid van kiembuizen.

3.2 Myceliumgroei

3.2.1 *Fusarium oxysporum*

In een experiment werd het effect van de UV-C dosis en belichtingsfrequentie op de myceliumuitgroei van de schimmels bekeken. De schimmels verschilden duidelijk in groeisnelheid. *F. oxysporum* was een snel groeiende schimmel, *F. solani* was een trager groeiende schimmel. Uit figuur 2 blijkt dat de belichtingsfrequentie, gemiddeld over de UV-C doseringen, geen effect had op de myceliumuitgroei van *F. oxysporum*.

Uit figuur 2 blijkt verder dat bij de gebruikte UV-C doseringen geen of nauwelijks effect op de myceliumgroei viel waar te nemen bij *F. oxysporum*. Er werden geen statistisch betrouwbare effecten van UV-C dosering of belichtingsfrequentie aangetoond. Ook werden er geen trends waargenomen die er op wijzen dat de myceliumgroei geremd werd. Dit werd veroorzaakt doordat de schimmel ook in het medium groeide en daardoor niet meer door het UV-C licht bereikt werd. Hierdoor kon de schimmel ongeremd doorgroeien.



Figuur 2: Effect van UV-C dosering en belichtingsfrequentie op de myceliumgroei van *F. oxysporum* op kunstmatig voedingsmedium, gemeten op dag 5.

Uit onderstaande tabel blijkt dat bij frequent belichten met UV-C de hoeveelheid mycelium op de voedingsbodem sterk gereduceerd werd.

Tabel 7: Myceliumgroei *F. oxysporum* in en op de agar

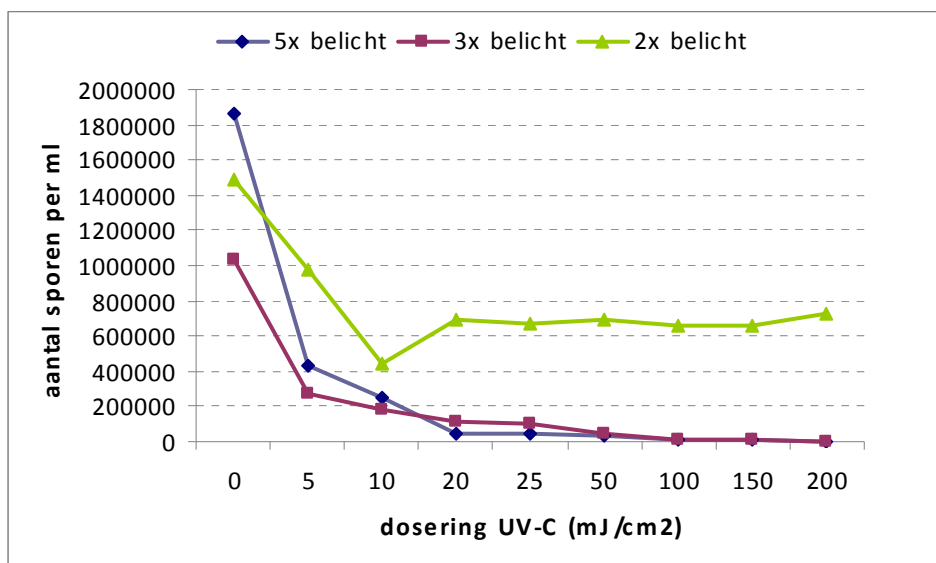
mJ/cm ²	5x belicht	3x belicht	2x belicht
0	2	2	2
5	2	2	2
10	2	1	2
20	1	1	2
25	1	1	2
50	1	1	2
100	1	1	1
150	0	0	1
200	0	0	1

0 = helemaal in de agar

1 = gedeeltelijk in en op de agar

2 = sterke groei op de agar

Het effect van UV-C dosering en belichtingsfrequentie kan gerelateerd worden aan de sporenproductie, zoals blijkt uit onderstaande figuur 3. Het regelmatig belichten resulteerde bij lage UV-C doseringen in een sterke afname van de sporenproductie (microconidiën).

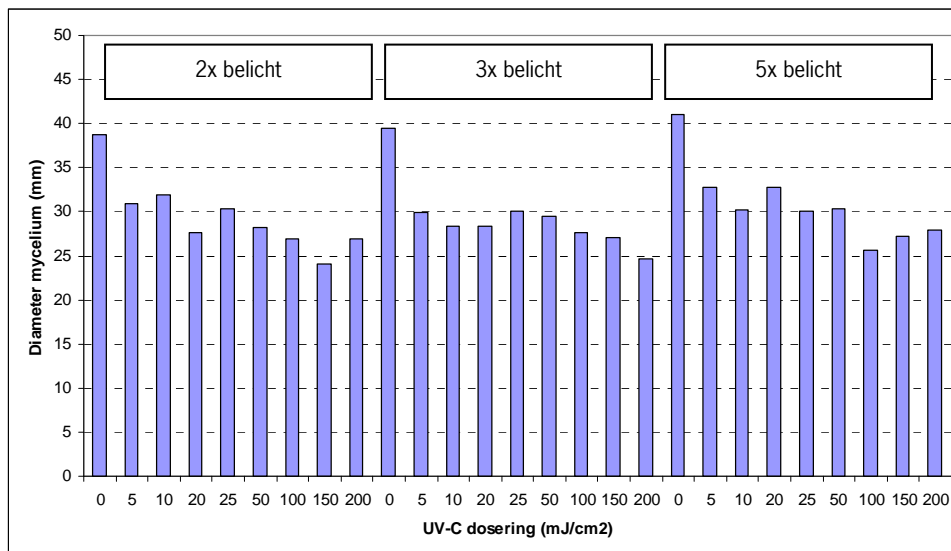


Figuur 3: sporenproductie van *F. oxysporum* bij verschillende UV-C doseringen en belichtingsfrequenties.

3.2.2 Fusarium solani

Bij *F. solani* werd de mycelium uitgroei al geremd bij een lage UV-C dosering. Een duidelijk effect van belichtingsfrequentie lijkt niet aantoonbaar op de myceliumgroei. Maar ook bij deze schimmelsoort groeide het mycelium gedeeltelijk in de voedingsbodem. Bij deze schimmel was het echter niet mogelijk om een duidelijk onderscheid te maken tussen mycelium volledig *op* of *in* de voedingsbodem.

Uit figuur 4 blijkt dat UV-C een effect heeft op de groei van mycelium van *F. solani* op een voedingsbodem. Vanaf de laagst toegepaste dosering (5 mJ/cm²) werd een significante groeireductie aangetoond. Deze myceliumgroei werd beperkt verder geremd bij toenemende UV-C dosering. Deze schimmel groeide, evenals *F. oxysporum*, zowel op als in de voedingsbodem, op de foto's in H4 valt waar te nemen dat vooral de schimmelgroei *op* de voedingsbodem sterk geremd werd bij toenemende belichtingsfrequentie als bij toenemende dosering. Bij *F. solani* werden aan het einde van het experiment nog geen sporen op het mycelium gevormd. Het effect van belichtingsfrequentie en dosering op de sporenproductie kon daarom niet worden gemeten.

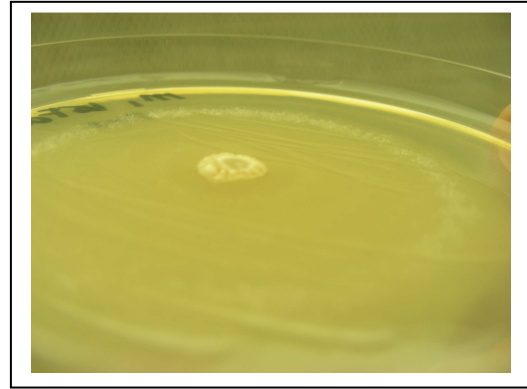


Figuur 4: Effect van UV-C dosering en belichtingsfrequentie op de myceliumgroei van *F. solani* op kunstmatig voedingsmedium, gemeten op dag 5.

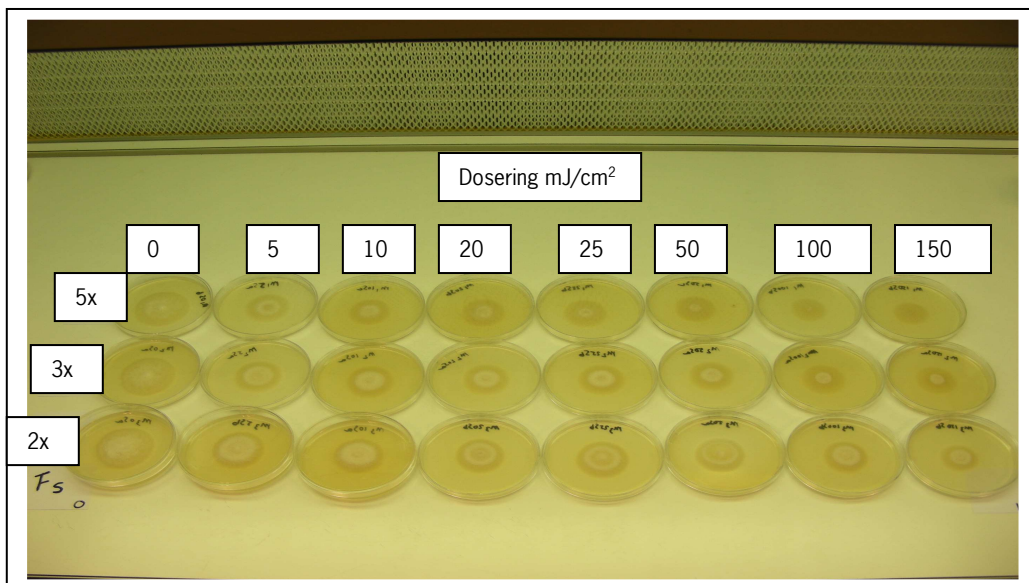
4 Foto's effect UV-C op myceliumgroei en sporenvorming



Mycelium op agar



Mycelium in agar



Effect van 2x, 3x en 5x belichten met UV-C op de myceliumgroei van *F. solani*.

5 Conclusies en aanbevelingen

In dit onderzoek is het effect van UV-C belichting op de myceliumgroei en sporenkieming van *F. oxysporum* en *F. solani* getoetst. Dit gebeurde in het laboratorium op een voedingsmedium (*in vitro*). Geconcludeerd kan worden dat:

- De macrosporen van *F. oxysporum* bij relatief lage UV-C doseringen gedood worden.
- De microsporen van *F. solani* bij relatief hoge UV-C doseringen gedood worden.
- Het effect van UV-C belichting op de myceliumgroei beperkt is bij *F. oxysporum*, omdat de schimmel sterk in de voedingsbodem groeit. Hierdoor is het mycelium niet bereikbaar voor UV-C licht.
- Bij *F. solani* de myceliumgroei op een voedingsbodem wel geremd wordt door UV-C licht, deze schimmel groeit minder sterk in de voedingsbodem.
- Bij zowel *F. oxysporum* als *F. solani* de myceliumgroei op de voedingsbodem geremd wordt door UV-C licht.
- Bij *F. oxysporum* de hoeveelheid gevormde sporen sterk geremd wordt bij toenemende belichtingsfrequentie en UV-C dosering. Bij *F. solani* kon dat niet worden aangetoond omdat er nog geen sporen werden gevormd.

Aanbeveling:

- De resultaten geven aan dat oppervlakkig groeiend mycelium van *F. oxysporum* en *F. solani* met een frequente UV-C belichting bestreden kan worden. Ook de (micro-)sporenproductie van *F. oxysporum* blijkt verminderd te worden. De verwachting is dat dit ook voor *F. solani* geldt. Het verdient de aanbeveling om het bestrijdend effect van UV-C belichting tegen *F. oxysporum* en *F. solani* te onderzoeken op planten/gewassen.

Bijlage I Statistische analyse F. oxysporum

GenStat Release 11.1 (PC/Windows) November 2008
Copyright 2008, VSN International Ltd.

Analysis of variance

Variate: diam_oxysporum

Source of variation	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
Herh stratum	2	0.078	0.039	0.03	
Herh.Freq stratum					
Freq	2	62.054	31.027	21.26	0.007
Residual	4	5.839	1.460	0.32	
Herh.Freq.Dosering stratum					
Dosering	8	95.767	11.971	2.66	0.017
Freq.Dosering	16	282.620	17.664	3.93	<.001
Residual	48	215.788	4.496		
Total	80	662.145			

Pairwise testing: homogeneous groups in probabilities, P=0.001

Dosering	Diameter	
10	52.27	a
5	52.53	a
25	53.65	a
20	54.27	a
0	54.41	a
150	54.69	a
50	55.02	a
100	55.26	a
200	55.52	a

Fusarium oxysporum - Pairwise comparisons of means; p= 0.001

=====

-----> Freq : 2x belicht (=F2)

levels, means and groups for factor: Dosering mJ/cm²

25 52.45 a
 50 54.41 a
 100 54.61 a
 150 54.99 a
 10 55.45 a
 20 55.59 a
 5 55.85 a
 0 56.97 a
 200 57.89 a

-----> Freq : 3x belicht (=F3)

levels, means and groups for factor: Dosering

5 49.18 a . .
 10 49.40 a . .
 0 50.82 a b .
 200 51.99 a b c
 150 52.88 a b c
 20 55.48 . b c
 100 56.16 . b c
 25 56.48 . b c
 50 56.93 . . c

-----> Freq : 5x belicht (=F5)

levels, means and groups for factor: Dosering

20 51.74 a
 10 51.96 a
 25 52.03 a
 5 52.57 a
 50 53.73 a
 100 55.00 a
 0 55.43 a
 150 56.19 a
 200 56.69 a

=====

Pairwise testing: homogeneous groups in probabilities, P=0.001

F2 = 2x belicht; F3= 3x belicht en F5 = 5x belicht.

F3	53.26	a
F5	53.93	a
F2	55.36	a

=====

-----> Dosering : 0 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq
F3 50.82 a .
F5 55.43 a b
F2 56.97 . b

-----> Dosering : 5 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq
F3 49.18 a .
F5 52.57 a b
F2 55.85 . b

-----> Dosering : 10 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq
F3 49.40 a .
F5 51.96 a b
F2 55.45 . b

-----> Dosering : 20 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq
F5 51.74 a
F3 55.48 a
F2 55.59 a

-----> Dosering : 25 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq
F5 52.03 a
F2 52.45 a
F3 56.48 a

-----> Dosering : 50 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq
F5 53.73 a
F2 54.41 a
F3 56.93 a

-----> Dosering : 100 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F2 54.61 a

F5 55.00 a

F3 56.16 a

-----> Dosering : 150 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F3 52.88 a

F2 54.99 a

F5 56.19 a

-----> Dosering : 200 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F3 51.99 a .

F5 56.69 a b

F2 57.89 . b

=====

Bijlage II Statistische analyse F. solani

Analysis of variance

Variate: diam_solani

Source of variation	d.f.	(m.v.)	s.s.	m.s.	v.r.	F pr.
Herh stratum	2		2.201	1.101	0.26	
Herh.Freq stratum						
Freq	2		34.234	17.117	4.04	0.110
Residual	4		16.954	4.238	1.56	
Herh.Freq.Dosering stratum						
Dosering	8		1216.118	152.015	55.90	<.001
Freq.Dosering	16		96.155	6.010	2.21	0.018
Residual	46	(2)	125.083	2.719		
Total	78	(2)	1459.504			

Pairwise testing: homogeneous groups in probabilities, P=0.001

Dosering	Diameter	Group
150	26.12	a . . .
200	26.47	a . . .
100	26.76	a b . .
50	29.33	. b c .
20	29.60	. . c .
10	30.12	. . c .
25	30.18	. . c .
5	31.20	. . c .
0	39.75	. . . d

Pairwise comparisons of means; p= 0.001

=====

-----> Freq : 2x belicht (=F2)

levels, means and groups for factor: Dosering

150 24.08 a . . .
 200 26.86 a b . .
 100 26.98 a b . .
 20 27.69 a b c .
 50 28.23 a b c .
 25 30.41 . b c .
 5 30.95 . b c .
 10 31.84 . . c .
 0 38.74 . . . d

-----> Freq : 3x belicht (=F3)

levels, means and groups for factor: Dosering

200 24.70 a . .
 150 27.07 a b .
 100 27.63 a b .
 10 28.37 a b .
 20 28.40 a b .
 50 29.44 . b .
 5 29.90 . b .
 25 30.09 . b .
 0 39.43 . . c

-----> Freq : 5x belicht (=F5)

levels, means and groups for factor: Dosering

100 25.69 a . .
 150 27.22 a . .
 200 27.85 a . .
 25 30.04 a b .
 10 30.14 a b .
 50 30.32 a b .
 20 32.70 . b .
 5 32.76 . b .
 0 41.08 . . c

=====

Pairwise testing: homogeneous groups in probabilities, P=0.001

F2 = 2x belicht; F3= 3x belicht en F5 = 5x belicht.

F3	29.45	a
F2	29.53	a
F5	30.87	a

Pairwise comparisons of means; p= 0.001

=====

-----> Dosering : 0 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F2 38.74 a

F3 39.43 a

F5 41.08 a

-----> Dosering : 5 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F3 29.90 a

F2 30.95 a

F5 32.76 a

-----> Dosering : 10 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F3 28.37 a

F5 30.14 a

F2 31.84 a

-----> Dosering : 20 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F2 27.69 a .

F3 28.40 a b

F5 32.70 . b

-----> Dosering : 25 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F5 30.04 a

F3 30.09 a

F2 30.41 a

-----> Dosering : 50 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F2 28.23 a

F3 29.44 a

F5 30.32 a

-----> Dosering : 100 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F5 25.69 a

F2 26.98 a

F3 27.63 a

-----> Dosering : 150 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F2 24.08 a

F3 27.07 a

F5 27.22 a

-----> Dosering : 200 mJ/cm²

levels, means and groups for factor Freq

F3 24.70 a

F2 26.86 a

F5 27.85 a

=====