

BRUINE VLEKKEN OP CHAMPIGNONS TEN GEVOLGE VAN AANTASTING DOOR PSEUDOMONAS TOLAASI PAINE

*With a summary: A brown blotch disease of cultivated mushrooms caused by
Pseudomonas Tolaasi PAINE*

DOOR

H. C. BELS-KONING en K. DE JONG-OLTHOF

(Uit het Laboratorium voor Champignonsteelt-onderzoek te Houthem L.)

INLEIDING

Bruine vlekken op champignons zijn een bekend en algemeen verschijnsel in allerlei kwekerijen; maar vooral daar, waar een hoge luchtvochtigheid heerst en weinig ventilatie is. Van oudsher worden de vlekken aan „vocht” toegeschreven.

Er kunnen allerlei oorzaken zijn voor bruine vlekken op champignons. Iedere beschadiging van de cellen doet reeds oxidasen naar buiten treden, die aan de lucht een roodbruine verkleuring van het celvocht te weeg brengen.

BESCHRIJVING VAN HET ZIEKTEBEELD

De hier bedoelde bacterievlekken hebben een diep chocolade- of kastanje-bruine kleur en onregelmatige vorm. Kleine vlekjes kunnen samenvloeien tot grotere; soms is de gehele hoed bruin, alsof er verf over gemorst en langs de rand afgedropen is. Vaak bevinden de vlekken zich op de plaats, waar twee naburige champignons elkaar raken. De steel is zelden aangetast. De vlekken maken de indruk veroorzaakt te zijn door vochtspatten of overdrupend water (fig. 1). Goed ventileren en iets meer verwarmen na het sproeien der bedden, waardoor de champignons weer snel aandrogen kan het aantal gevlekte exemplaren in een kwekerij belangrijk doen verminderen, maar is niet altijd afdoende. Op doorsnede blijkt de aantasting zeer oppervlakkig en hoogstens 1 mm diep (fig. 2).

Gevlekte champignons zijn goed eetbaar. Wanneer zij geschild worden, kunnen zij zelfs als volkomen blank gerecht op tafel komen. Voor de markt zien zij er onogelijk uit en voor de conservenfabrieken vereist het schillen te veel arbeid.

De bacterie-vlekken kunnen verward worden met bepaalde stadia van een *Verticillium*-aantasting en misschien ook wel met vlekjes veroorzaakt door een schimmel van het *Sporotrichum*-type.¹⁾ De schimmelvlekken zijn iets meer grijs-achtig-bruin. Zij vertonen vaak een fijn waas van schimmelpluis met conidiën. Indien dit pluis niet direct aanwezig is, verschijnt het binnen 24 uur wanneer de champignon in een vochtige kamer (gesloten cultuurdoos met nat watje) gelegd wordt. Bacterie-vlekken blijven in een vochtige kamer onveranderd of zij gaan glimmen. Microscopisch onderzoek brengt de bacterie-massa meestal zonder moeite aan het licht. Men moet bedacht zijn op een gecombineerde schimmel- en bacterie-aantasting.

BESCHRIJVING IN DE LITERATUUR

Eenzelfde ziektebeeld wordt door TOLAAS in 1915 voor de V.S., en door PAINE in 1918 voor Engeland, beschreven. Beiden noemen echter nog een gele ver-

¹⁾ Deze ziekte doet zich voor in de vorm van een aantal speldeknoop grote vlekjes op de hoed, die niet samen vloeien. Zij is nog vrijwel niet onderzocht. BULLOCK noemt de pathogene zwam voorlopig: *Acremonium* spec. Wij isoleerden een schimmel uit dergelijke vlekjes, die door het Centraal Bureau voor Schimmelcultures te Baarn gedetermineerd werd als *Sporotrichum roseolum* OUD. et BEIJERINCK. Misschien hebben wij te doen met hetzelfde organisme.

kleuring, die hetzij als aanvangs-stadium van de ziekte optreedt, of in het vruchtvlies onder een sterk aangetaste „opperhuid” voorkomt. Ook zagen zij de vlekken dieper (tot 3 à 4 mm) in het vlees doordringen. Wij zagen nimmer een gele verkleuring en nooit vlekken, die dieper dan 1 mm gingen.

TOLAAS isoleerde een bacterie, die na inoculatie het oorspronkelijke ziektebeeld gaf. PAINE vond een bacterie, die met de beknopte beschrijving van TOLAAS overeenkwam. Hij gaf een uitvoeriger beschrijving en de naam: *Pseudomonas Tolaasi*.

ONDERZOEK

Bij ons werk voor de champignon-teelt komen wij herhaaldelijk bacterie-vlekken tegen. Het materiaal voor dit onderzoek werd verzameld in een kwekerij in de onderaardse gangen van de St Pietersberg bij Maastricht. De geïsoleerde bacteriën komen overeen met de beschrijving van PAINE.

Wij isoleerden en kweekten op champignon-agar, als volgt bereid; Champignonextract; 300 gr verse champignons koken en 3 uur trekken in 1 L water; in het extract 2 gr agar oplossen, weer aanvullen tot 1 L; steriliseren; $\frac{1}{2}$ uur met $\frac{1}{2}$ atm. overdruk. Pepton en vleesbouillon voldeden evengoed als champignon-agar. Op moutagar had in het geheel geen groei plaats.

Inoculaties werden verricht met bacterie-suspensies gemaakt van champignonagar-culturen, die 24 uur oud waren. Soms werd de hoed van te voren met een steriele naald gekrast, soms streken wij de suspensie alleen met een penseel voorzichtig over de onbeschadigde hoed. Beide methodes gaven hetzelfde resultaat. De champignons groeiden in daartoe ingerichte laboratorium-kamers, die verwarmd werden met langs de wanden gespannen elektrische kabels. Geprepareerde natte jute boven de kabels hield de atmosfeer vochtig. Door het openen van raam en/of deur kwam op primitieve wijze de ventilatie tot stand. Voor het verkrijgen van goede infectie bleek het niet nodig een stolp over de geïnoculeerde champignons te plaatsen.

Wij werkten met de volgende broedmerken en nummers: Witte champignons: SARAZIN (Parijs, Brussel), no 12, 31, 32, (no 32 geeft soms een enkele vlucht van crème exemplaren); BIE en BERNTSEN (Kopenhagen); GILLON (Brussel), no 31.

Bruine champignons: PINKERTON (Glasgow); BIE en BERNTSEN.

RESULTATEN

De inoculaties slaagden altijd *mits* de bacterie-suspensie gemaakt werd in champignon-extract, vleesbouillon of peptonwater. Reeds na 10 uren was de eerste verkleuring zichtbaar; na 24 uur was de vlek kastanjebruin (fig. 3). Bacteriën, die langer dan 5–6 maanden in reïncultuur waren, hadden hun virulentie echter verloren.

Verskil in gevoeligheid bij de „rassen” hebben wij niet geconstateerd, maar besteedden hier ook geen bijzondere aandacht aan. Uit de praktijk is bekend, dat bruine champignons minder bacterievlekken vertonen dan witte. Dit houdt misschien verband met het feit, dat bruine champignons na het gieten spoediger „droog” zijn dan witte. Wanneer de bacteriën in leidingwater of gedestilleerd water gesuspenseerd werden, volgde geen infectie.

Ook PAINE verrichtte zijn inoculaties met bacterie-suspensies in champignonbouillon, terwijl TOLAAS een gehele bacterie-kolonie met een oogje van een agar bodem lichtte en over een champignon streek. Deze methodes van inoculatie verschaften niet voldoende inzicht in de wijze van spontane infectie in de kwekerij.

Het infectieus materiaal zal hier niet zo geconcentreerd aanwezig zijn als in TOLAAS' proeven; champignonbouillon komt er niet voor. Om hieromtrent een beter inzicht te verkrijgen beproefden wij een aantal suspensie-middelen.

Wij maakten warme en koude extracten van vier der door ons gebruikte soorten dekaarde. 1e dekaarde werd met water gekookt en bleef 24 uur bij kamertemperatuur staan, vervolgens werd het afgietsel nog eens opgekookt. 2e dekaarde werd met koud water 24 uur bij kamertemperatuur bewaard.

Suspensies van de bacterie in dergelijke extracten van verse dekaarde gaven geen vlekken op de champignons. Alleen extracten van oude dekaarde, die sterk doorgroeid was met champignonmycelium gaven een gering positief resultaat.

Eveneens een zwak positief resultaat, bestaande uit lichtbruine vlekken, die slechts heel langzaam groter werden, bereikten wij met warme en koude extracten van gefermenteerde mest, waarin nog geen champignonmycelium gegroeid had.

De duidelijke diepbruine vlekken, die met suspensies in champignon-bouillon, etc. ontstaan, konden wij tenslotte ook verkrijgen met een suspensie in een extract, dat wij ter onderscheiding „champignon-water” zullen noemen. Het werd verkregen door blokjes champignon-„weefsel” aseptisch uit hoed of steel te snijden en een nacht in steriel water bij kamertemperatuur te laten staan, (1 cc weefsel in 10 cc water). In plaats van blokjes „weefsel” namen wij ook champignon-mycelium van reïnculturen op moutagar.

Uit de experimenteel verkregen vlekken kon *Pseudomonas Tolaasi* terug geïsoleerd worden. Met alle suspensie-middelen zonder bacteriën bleven de champignons volkomen wit. Deze resultaten leiden tot de conclusie, dat *Pseudomonas Tolaasi* extractief stoffen uit vlees of champignon nodig heeft om infectie teweeg te brengen. Blijkbaar zijn deze stoffen thermostabiël.

DISCUSSIE

Hierbij sluiten cytologische waarnemingen van SARAZIN (1951) aan: Onder de „opperhuid” van normale gezonde vruchtlichamen bevindt zich een zône van cellen met talrijke kleine vacuolen. SARAZIN meent, dat deze toestand correleert met een voortdurende krachtige transpiratie. In kwekerijen, waar de champignons neiging tot vlekkerigheid vertonen zijn de vruchtlichamen vaak geruime tijd vochtig. In de cellen van de bedoelde zône vindt men dan één grote vacuole. Er heerst blijkbaar een belangrijke osmotische druk, want de cellen zijn opgezwollen en barsten soms. Deze beschadiging alleen, zou al voldoende zijn om vlekken te veroorzaken, daar het celvocht nu met de lucht in aanraking komt. Deze vlekken zijn aanvankelijk roodachtig en worden pas later bruin, waarbij de kleurstof zich aan de wanden der dode cellen van de opperhuid zou hechten.

In onze kweekruimte was steeds wel enige gelegenheid tot transpiratie, zodat wij SARAZIN's waarnemingen niet konden bevestigen. Zelfs onder de stolpen kregen de champignons van onze „blanco” proeven echter nooit vlekken. De gekraste contrôle-exemplaren verkleurden uitsluitend in de kras. Eerst licht roodachtig dan heel lichtbruin. Diep chocolade bruine vlekken, die zich uitbreiden, hebben wij zonder *Pseudomonas Tolaasi* nooit gekregen.

De predisponerende invloed van waterverzadiging, zoals JOHNSON (1947) die voor hogere planten vaststelde zal hier zeker een rol spelen. Het is nl. de vraag of de hoeveelheid „champignon-water”, die de gebarsten cellen geven voldoende is, voor *Pseudomonas Tolaasi*, om infectie te weeg te brengen. De, door krassen beschadigde, cellen leveren blijkbaar niet voldoende op.

RESISTENTIE TEGEN BESTRIJDINGSMIDDELEN

Uit enkele proeven met bestrijdingsmiddelen kregen wij de indruk, dat *Pseudomonas Tolaasi* moeilijk te doden is. Wij probeerden: bleekwater, koper-acetaat, Bordeauxse pap en zink-thiocarbamaten (AAzira, AAphytora).

Een bacterie-suspensie in champignon-water werd met deze middelen gemengd en zo op de champignons gestreken. In alle gevallen traden vlekken op. De suspensies werden 2 dagen bewaard. Zelfs in de vrij hoge concentraties, waarbij de blanco's beschadiging van de champignons gaven, bleek *Pseud. Tolaasi* na 2 dagen nog te leven. Alleen bacterie-suspensies, waar 0,1 % Cu acetaat in voorkwam, vertoonden na 2 dagen, bij uitstrijken op champignon-agar, geen groei meer.

CONCLUSIES VOOR DE PRAKTIJK

Uit de resultaten met „champignon-water” blijkt hoe belangrijk het verwijderen van ouden stompen en mycelium uit de dekaarde is („trashing”). De oude resten leveren bij het sproeien der bedden „champignon-water”, dat op de hoeden kan spatten, waardoor de bacterie gunstige omstandigheden voor infectie vindt. Een direct bestrijdingsmiddel hebben wij nog niet kunnen vinden. De kwekers sproeien vaak met succes bleekwater (1–2 %).

Naast de proeven met *Pseudomonas Tolaasi* maakten wij enkele inoculaties met bacteriën, geïsoleerd uit druppeltjes bacterie-slijm, afkomstig van champignons, die „la goutte” vertoonden (beschreven door COSTANTIN 1892, MATRUCHOT 1909).

Het ziektebeeld van „la goutte” was reproduceerbaar bij afgesneden champignons in een vochtige kamer. De bacterie is echter stellig niet identiek met *Pseudomonas Tolaasi*.

SUMMARY

A brown blotch disease of cultivated mushrooms, caused by *Pseudomonas Tolaasi* PAINE, has been studied. To get infection under artificial conditions the bacteria had to be grown on media containing extracts from meat or mushrooms. The mushroom extracts were obtained from pilei and pure culture mycelium, with hot as well as with cold water. Under natural conditions old mycelium in the casing soil and stumps of mushrooms left on the beds after picking may provide for the active substances, which probably are extracted and splashed by the water used in spraying the beds. Trashing the beds will cut down the rate of blotched mushrooms. *Pseudomonas Tolaasi* proved to be resistant to the bactericides tested.

LITERATUUR

- BULLOCH, Mc G. – 1950. A new Mushroom Disease. Preliminary Notes etc. M.G.A. Bulletin 18: 24.
COSTANTIN, J. – 1892. La Goutte, Maladie du Champignon de Couche. C.R. Soc. Biol. Paris, Séance 5 Mars.
JOHNSON, J. – 1947. Water-Congestion in Plants in Relation to Disease. Res. Bull. 160, Wisc. Agr. Exp. Sta.
MATRUCHOT, L. 1909. Les Maladies du Champignon de Couche. La Goutte. La Culture des Champignons comestibles, Paris 24.
PAINE, S. G. – 1918. Studies in Bacteriosis II. A brown Blotch Disease of cultivated Mushrooms. Ann. Appl. Biol. V.: 206–219.
SARAZIN, A. – 1951. Le Champignon de Couche. Cytologie. Bull. Féd. Nat. Cultiv. Champignons, Paris 11.
TOLAAS, A. G. – 1915. A bacterial Disease of cultivated Mushrooms. Phytop. 5: 51–54.

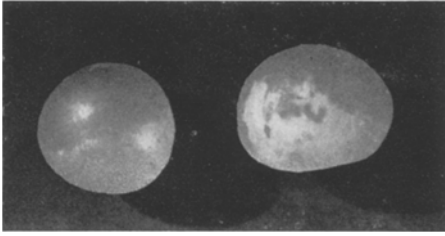


Fig. 1. Spontane infectie van *Ps. Tolaasi* PAINE op wit ras

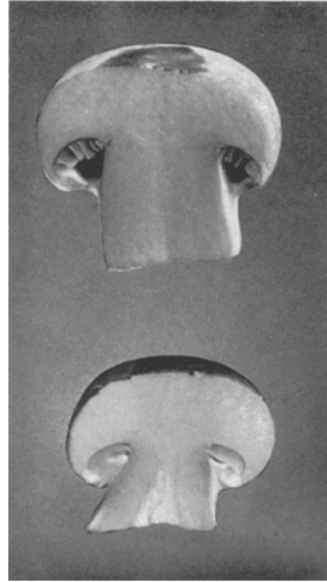


Fig. 2. Vlekken van *Ps. Tolaasi* dringen niet diep in het hoedvlees door

Inoc. 13/3 '50: Foto 15/3 '50
 Boven: doorsnee wit ras
 Onder: doorsnee bruin ras

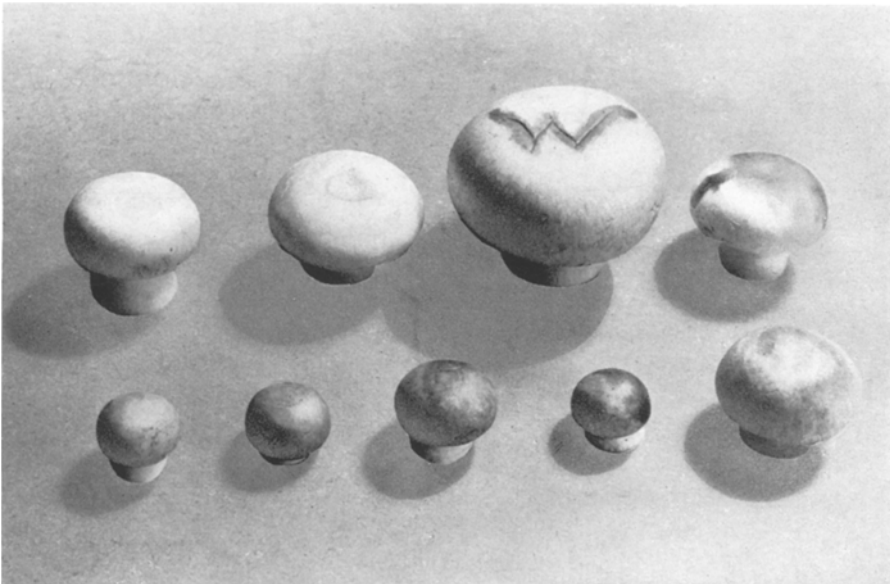


Fig. 3. Inoculatie met *Ps. Tolaasi* PAINE gesuspendeerd in champignonextract 14/3 '50, 16 u.; Foto 15/3, 10 u.

Van l. naar r.: onbehandeld
 gekrast met steriele naald
 gekrast, vervolgens bestreken met *Ps. Tolaasi*
 alleen bestreken met *Ps. Tolaasi*
 Boven: wit ras. Onder: bruin ras



FIG. 1

Bramentak met samenvloeiende vlekken van *Septocyta ramealis*. Bij → talrijke pycniden.

*Stem of blackberry with coalescent spots of *Septocyta ramealis*. At → numerous pycnidia.*

FIG. 2

Jonge spruit, nog bevestigd aan het uiteinde van de oude tak, die vlekken van *Septocyta* vertoont.

*Young shoot, still connected with the terminal part of the old stem, which shows spots of *Septocyta*.*

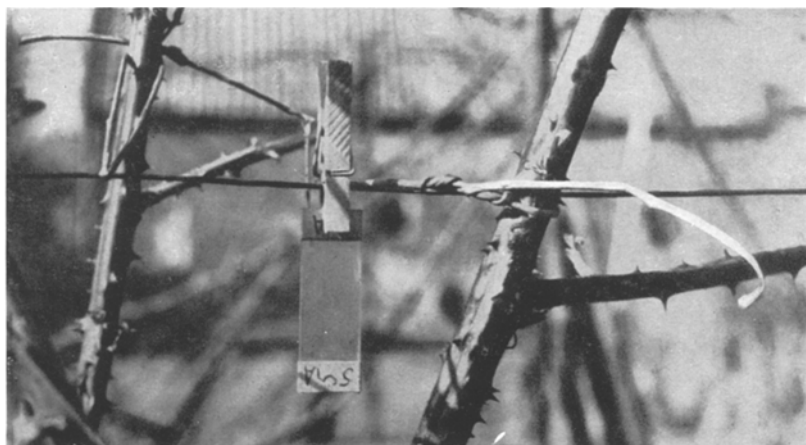


Fig. 3. Vangglasje, laag opgehangen tussen de nog kale planten (10 April '52).

Slide hanging between the plants (10-4-'52).