

# Verspreiding van *Verticillium dahliae* door water

Een verkenning i.o.v. het project "Teelt de grond uit"

Jelle Hiemstra, Bart van der Sluis en Khanh Pham

© 2012 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Projectnummer: 3236104213

## Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

Adres : Postbus 200, 6670 AE Zetten  
Lingewal 1, 6668 LA Randwijk  
Tel. : +31 (0)488 473702  
Fax : +31 (0)488 473717  
E-mail : [info.ppo@wur.nl](mailto:info.ppo@wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
1 INLEIDING .....	5
2 LITERATUURGEGEVENS .....	7
2.1 Substraatteelt.....	7
2.2 Vollegrondsteelten .....	7
2.3 Geïrrigeerde teelt van olijf.....	8
2.4 Conclusies .....	8
3 VELDPROEVEN .....	9
3.1 Werkwijze en resultaten in 2012 .....	9
3.2 Werkwijze en resultaten in 2013 .....	10
4 CONCLUSIES EN DISCUSSIE .....	13
5 LITERATUUR.....	15
BIJLAGE 1 .....	17
BIJLAGE 2 GEGEVENS EN RESULTATEN ANALYSE WATERMONSTERS 2012.....	19
BIJLAGE 3 GEGEVENS EN RESULTATEN ANALYSE WATERMONSTERS 2013.....	23
BIJLAGE 4 VERSPREIDING VAN <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> IN GEÏNOCULEERDE PLANTEN (VERKENNING DOOR M. KEYKHA SABER).....	25

# 1 Inleiding

Sinds een aantal jaren wordt er gewerkt aan systemen om laanbomen niet in de volle grond maar los daarvan in “goten” te telen. Naast arbeid technische voordelen biedt dit systeem in principe ook de mogelijkheid om problemen met bodempathogenen te voorkomen omdat er met een “schoon” groeimedium gewerkt kan worden. Er blijft echter een kleine kans dat pathogenen zoals *Verticillium dahliae* met het plantgoed mee komen. Dat dit inderdaad een reële mogelijkheid is, bleek in 2012. Een aantal van de toen in de goten geplante *Acer rubrum* vertoonde symptomen die aan een *Verticillium* infectie deden denken. Bij onderzoek door het diagnostiek laboratorium van PPO in Lisse werd in 2 van de 3 onderzochte planten *V. dahliae* aangetoond (zie Bijlage 1).

Onduidelijk is in hoeverre *V. dahliae* na een dergelijke introductie in het systeem kans ziet om zich te verspreiden naar andere planten in het systeem. Met name het gerecirculeerde drainagewater lijkt daarbij een mogelijke verspreidingsroute. Om een indruk te krijgen van het gevaar hiervan is in 2012 en 2013 een verkenning gedaan die bestond uit twee delen:

- Een beknopte literatuur studie naar verspreiding van *V. dahliae* met irrigatiewater in tuinbouw of vollegronds gewassen.
- Kunstmatige infectie van een deel van de planten in een goot, gevolgd door een in de loop van het groeiseizoen regelmatig herhaalde analyse van het drainwater uit die goot. Na een eerste verkenning van de mogelijkheden in 2012, is dit experiment is op grotere schaal herhaald in 2013.

In deze notitie worden de resultaten van beide onderdelen beschreven, gevolgd door enkele daaruit te trekken conclusies en een overzicht van de gevonden relevante literatuur. Technische gegevens betreffende het onderzoek naar natuurlijke besmetting in het plantgoed, de moleculaire analyse van de watermonsters in 2012 en 2013, en het onderzoek naar de verspreiding van de schimmel in geïnoculeerde planten zijn opgenomen in een viertal bijlagen.



## 2 Literatuurgegevens

De belangrijkste wijzen van verspreiding van *Verticillium* zijn via besmet plantgoed en met besmette grond. Ook afgevalen en door de wind verspreid blad van zieke planten kan sterk bijdragen aan de verspreiding van *Verticillium*. Dit mechanisme is uitgebreid beschreven voor o.a. katoen, aardappel en verschillende boomsoorten (voor bomen samengevat in Hiemstra & Harris, 1998). In reviews over *Verticillium* in olijf wordt daarnaast algemeen vermeld dat *V. dahliae* ook verspreid kan worden met irrigatiewater, drainagewater en oppervlakkig afstromend water (o.a. Pegg & Brady, 2002; Tsrör, 2011; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

Om meer zicht te krijgen op de mogelijke rol van water bij de verspreiding van *Verticillium* bij de teelt van laanbomen in een gotensysteem is een beknopte literatuurstudie uitgevoerd. Daarbij is via de CAB abstracts database (1910-2013) gezocht naar relevante publicaties met behulp van de zoektermen *Verticillium dahliae* AND (distribution OR dispersal OR spread) AND water. Dit leverde in eerste instantie bijna 200 hits, waarvan na selectie op basis van de titel en abstract nog 13 interessante artikelen overbleven. Het overgrote deel heeft betrekking op *Verticillium* in olijf, daarnaast is er beperkt informatie gevonden betreffende verspreiding van *Verticillium* via water in de teelt van tuinbouwgewassen in Nederland (substraat en volle grond) en in de aardappelteelt.

### 2.1 Substraatteelt

Runia (1988 en 1994) en Runia *et al.* (1988) onderzochten hoe het drainwater van substraatteelten kan worden ontsmet. Ultra-filtratie en een hittebehandeling bleken effectieve wijzen om *V. dahliae* in het recirculatiewater te doden. Behandeling met ozon doodde wel de conidiën van de schimmel, maar microsclerotiën bleken zelfs na een behandeling van 210 minuten nog tot infectie in staat. In een literatuurstudie (Hazendonk 2000) wordt vermeld dat voor verspreiding van *V. dahliae* in de volle grond door besmet drainagewater in de literatuur geen aanwijzingen zijn gevonden; maar over verspreiding met besmet drainwater in de substraatteelt wel. Daarbij wordt verondersteld dat het hierbij vooral om conidiën zou gaan, het uitdraineren van microsclerotiën wordt als zeer onwaarschijnlijk gezien. Overigens kunnen microsclerotiën in de bodem kiemen en conidiën vormen (Farley *et al.*, 1970).

### 2.2 Vollegrondsteelten

De Werd *et al.* (2003) onderzochten de verspreiding van wortelziekten na hergebruik van niet ontsmet drainagewater in de vollegrondsteelt van chrysanten. *V. dahliae* werd daarbij eenmaal direct en eenmaal indirect in een lage dichtheid in het drainagewater gevonden (resp. 71 ms/l water; en 1.8 ms/g grond behandeld met niet ontsmet drainagewater). Zij onderzochten ook de overleving van conidiën in drainagewater d.m.v. het toevoegen van een bekende hoeveelheid en het bepalen van het nog levende percentage daarvan met de tijd. Daarbij bleek dat na het toevoegen het aantal levende conidiën snel afneemt, maar dat er na 20 dagen nog steeds levende conidiën aanwezig zijn. Hun conclusie is dat *V. dahliae* in drainagewater aanwezig kan zijn, zelfs als de buizen op 90 cm liggen, en op deze wijze mogelijk kan worden verspreid.

Green (1969) komt tot vergelijkbare conclusies wat betreft de overleving van *V. dahliae* in de bodem. Indien in een potexperiment met een zandige leemgrond de schimmel werd toegevoegd in de vorm van conidia nam het aantal infectieuze eenheden in de eerste weken na toevoegen snel af; indien microsclerotia werden toegevoegd bleef het aantal in de loop van de 14 weken van de proef circa gelijk. Zelfs in het geval van toegevoegde conidiën kon de schimmel echter na 14 weken nog uit de bodem worden geïsoleerd. Ook na besmetting via conidiën kan *V. dahliae* dus gedurende langere tijd in een bodem aanwezig blijven.

Easton *et al.* (1969) rapporteerden op basis van onderzoek in een kunstmatig geïnfecteerd aardappelveld met een zeer hoge inoculumdichtheid dat de microsclerotiën kunnen worden opgepikt door een overmaat van irrigatiewater dat tussen de ruggen met aardappels afstroomt. In water verzameld aan het einde van de

voren tussen de ruggen met aardappels werden grote hoeveelheden microsclerotia gedetecteerd. Daarnaast werden deze ruststructuren aangetoond in het bezinksel van een irrigatiebassin en in het stof van een stofstorm wat 20 voet boven de grond werd verzameld.

## 2.3 Geïrrigeerde teelt van olijf

Voor *Verticillium* in olijf wordt algemeen gemeld dat de schimmel kan worden verspreid via irrigatie- en drainwater. Tijdens de literatuurstudie werden 3 publicaties gevonden die hiervoor ook kwantitatieve gegevens vermelden. Garcia-Cabello *et al.* (2012) toonden de aanwezigheid van microsclerotia aan in verschillende delen van het irrigatiesysteem waaronder de hoofdleiding, de tank van het pompstation, waterreservoirs en het zandbed van het filter. De microsclerotia werden daarbij zowel vrij “drijvend” in het water als in het sediment aangetroffen. In het bezinksel was de gemeten concentratie 2.7-6.7 ms/g sediment en in het water uit de druppelaars werden 3.75 ms/m<sup>3</sup> water aangetroffen. Zij concluderen dat irrigatiewater een belangrijke bron van verspreiding van *V. dahliae* over korte en middellange afstand is. Lopez-Escudero *et al.* (2010) en Rodriguez *et al.* (2007) komen tot vergelijkbare resultaten en conclusies.

## 2.4 Conclusies

*V. dahliae* kan dus aanwezig zijn in het recirculatiewater van substraatteelten zowel als in irrigatie- en drainagewater van vollegrondsteelten. In het laatste geval is de schimmel niet alleen aangetoond in drainagewater en het water van irrigatiekanalen etc., maar zelfs in het water dat via een druppelsysteem wordt toegediend. Tevens is aangetoond dat niet alleen de zeer lang levende microsclerotia een risico vormen. Ook conidia kunnen bijdragen aan de verspreiding van de ziekte omdat deze gedurende meerdere weken kiemkrachtig kunnen blijven zowel in water als in de bodem.

## 3 Veldproeven

### 3.1 Werkwijze en resultaten in 2012

In 2012 werden in mei (week 20) éénjarige spullen van rode esdoorn (*Acer rubrum*) uitgeplant in 4 goten van op het proefveld in Randwijk. De goten waren gevuld met substraat op basis van veen en vormden één systeem; het drainagewater werd in één vat opgevangen. De planten werden gedurende het groeiseizoen van water voorzien via een geautomatiseerd druppelsysteem. Zodra gewasontwikkeling goed op gang was gekomen (goede bladontwikkeling) werd één op de acht bomen geïnoculeerd met een *V. dahliae* suspensie (Foto 1). In totaal zijn 45 bomen geïnoculeerd waarvoor ongeveer 10 ml inoculum (concentratie  $1.5 \times 10^6$  conidiën per ml) nodig was. De inoculatie is op 3 juli uitgevoerd (1 op de 8 planten; 2 goten over de volledige lengte, 2 goten tot de helft). De inoculatie is bij vrijwel alle planten geslaagd; in de loop van augustus begonnen steeds meer planten duidelijke symptomen van *Verticillium* verwelking (verkleuring, verwelking, necrose en afvallen van het blad) te vertonen (Foto 2 en 3).



Foto 1. *Staminoculatie met conidiën-suspensie van V. dahliae (op de foto inoculatie van een jonge iep).*



Foto 2 (links). *Symptomen van Verticillium verwelking op jonge rode esdoorn*



Foto 3 (rechts). *Overzicht gotensysteem met rode esdoorns en vroegtijdig afgefallen blad eronder.*

In de periode juli – eind oktober is het recirculatievat 7x bemonsterd. De monsters bestonden uit flessen water (2 x 0,5 l) uit het recirculatiesysteem die tot de verwerking in de koelkast zijn bewaard. Op het laboratorium in Lisse zijn deze monsters m.b.v. Q-PCR onderzocht op de aanwezigheid van *Verticillium dahliae* (Vd). Daarbij is gebruik gemaakt van de Vd-specifieke primers en de methodiek zoals ontwikkeld in het EU-Verticeen project. De resultaten zijn samengevat in Tabel 1.



Tabel 1. Samenvatting van de resultaten van de analyse van de drainwatermonsters in 2012

Monstergegevens		Bewerking		Opmerkingen	Resultaat	
Nr	Datum	Filteren <sup>1</sup>	Centrifugeren		Vd aanwezigheid	Ct-waarde
1	06-07-2012	x	X		neg	
2	21-08-2012	x	X		neg	
3	06-09-2012		X		neg	
4	20-09-2012		X		neg	
5	03-10-2012		X		pos	34.65
6	16-10-2012		X		pos	38.19
7	31-10-2012		X		neg	No Ct
ntc			X	Neg. controle (geen Vd)	neg	No Ct
EU+			X	Pos. controle (Vd aanw)	pos	15.87
Herhalingen						
4	20-09-2012		X	Originele monster	neg	No Ct
4+			X	10 <sup>5</sup> conidia toegevoegd	pos	35.96
5+			X	10 <sup>5</sup> conidia toegevoegd	pos	29.93
5*			X	Idem 1/100 verdund	pos	34.82
6+			X	10 <sup>5</sup> conidia toegevoegd	pos	30.28
6*			X	Idem 1/100 verdund	pos	35.52
7+			X	10 <sup>5</sup> conidia toegevoegd	pos	31.60

<sup>1</sup> Alleen toegepast voor de eerste 2 monsters, zie tekst voor toelichting

Filteren van de watermonsters bleek geen goede methode. De concentratie van *Verticillium* in het drainwater, als de schimmel al aanwezig is, is naar verwachting laag. Daarom moet een relatief grote hoeveelheid water worden verwerkt. De beschikbare filters blijken hiervoor niet geschikt, door de aanwezige organische verontreinigingen verstoppen deze voordat er voldoende water is gefilterd. Daarom is deze methode alleen voor de eerste twee monsters uitgetoetst, daarna is de eventueel in het monster aanwezige *Verticillium* geconcentreerd d.m.v. centrifugeren.

De monsters zijn om praktische redenen op verschillende data geanalyseerd, maar op alle data is standaard een positieve en een negatieve controle (resp. een monster met Vd DNA uit het EU-Verticeen project, en steriel water zonder DNA) in de analyses meegenomen. De resultaten voor de controles waren altijd zoals verwacht, in tabel 1 is dit slechts 1 maal vermeld. Om te onderzoeken of de gebruikte methode om de watermonsters te analyseren inderdaad geschikt is om de aanwezigheid van *V. dahliae* aan te tonen zijn een aantal van de negatieve monsters opnieuw geanalyseerd na toevoeging van een Vd conidiën in twee verschillende concentraties. Deze monsters (gemarkt met + en \*) waren zonder uitzondering wel positief. Zonder deze toevoeging was monster nummer 4 ook bij de tweede analyse negatief. Meer details over de monsterbewerking en de resultaten van de analyses zijn opgenomen in Bijlage 2.

Uit de resultaten van de analyses in 2012 kan het volgende worden geconcludeerd:

- Het in het gotensysteem uitgeplante plantgoed was al besmet met *V. dahliae*.
- De gebruikte analyse methode is geschikt om *V. dahliae* in watermonsters aan te tonen.
- In monsters van het drainwater verzameld op twee verschillende data in oktober werd *V. dahliae* aangetoond.

## 3.2 Werkwijze en resultaten in 2013

In 2013 werden in mei eenjarige spullen van Noorse esdoorn (*Acer platanoides*) uitgeplant in 2 goten op het proefveld in Randwijk. De goten waren gevuld met veensubstraat (Klasmann) en vormden één systeem; het drainagewater werd in één vat opgevangen. De planten werden gedurende het groeiseizoen van water voorzien via een geautomatiseerd druppelsysteem. Zodra gewasontwikkeling goed op gang was gekomen

(goede bladontwikkeling) werden de planten in de achterste helft van de goot geïnoculeerd met een *V. dahliae* suspensie. In totaal zijn 113 bomen geïnoculeerd waarvoor ongeveer 20 ml inoculum (concentratie  $1.5 \times 10^7$  conidiën per ml) nodig was. De inoculatie is op 17 juli uitgevoerd (2 goten tot de helft alle bomen). Op 3 oktober werd aan de hand van de waargenomen symptomen (verkleuring, verwelking, necrose en afvallen van het blad) vastgesteld dat de inoculatie bij minstens 50% van de bomen is geslaagd (Foto 4 en 5).



Foto 4 (links). Symptomen van *Verticillium* verwelking in jonge Noorse esdoorn in het gotensysteem in Randwijk: verkleuring, verwelking, necrose en afvallen van het blad.

Foto 5 (rechts). Als afbeelding 4, aanzicht uiteinde van de goot.

Ook de analyse van de watermonsters op de aanwezigheid van *V. dahliae* is op dezelfde wijze uitgevoerd als in 2012; met behulp van de binnen het EU-Vertigeeen project ontwikkelde Q-PCR detectie techniek. Daarbij zijn de monsters van alle data in tweevoud geanalyseerd en is een verdunningsreeks meegenomen om de gevoeligheid van de methode vast te stellen. De analyseresultaten voor 2013 zijn samengevat in Tabel 2, de details over de gevolgde werkwijze en de ruwe resultaten zijn opgenomen in Bijlage 3.

Tabel 2. Samenvatting van de resultaten van de analyse van de drainwatermonsters in 2013

Nr.	Datum van opname	Monster	DNA isolatie	Ct-waarde	Resultaat***
				<b>Fig. 3, 4</b>	
1	18 juli 2013	1	28 aug	No Ct	neg
2	18 juli 2013	2	28 aug	No Ct	neg
3	31 juli 2013	1	28 aug	No Ct	neg
4	14 augustus 2013	1	28 aug	No Ct	neg
5	14 augustus 2013	2	28 aug	No Ct	neg
6	28 augustus 2013	1	3 sep	No Ct	neg
7	28 augustus 2013	2	3 sep	37.91	pos
8	10 september 2013	1	17 sep	36.34	neg
9	10 september 2013	2	17 sep	35.22	neg
10	30 september 2013	1	9 okt	No Ct	neg
11	30 september 2013	2	9 okt	No Ct	neg
12	18 oktober 2013	1	22 okt	No Ct	neg
13	18 oktober 2013	2	22 okt	No Ct	neg
14	4 november 2013	1	12 nov	35.25	neg
15	4 november 2013	2	12 nov	33.53	pos
16	28 augustus 2013	2+*	3 sep	38.68	pos

	Pos Controle	Conc.**	11.41	pos
*	monster 2 van 28 augustus met toevoeging van Vd (procedure controle)			
**	concentratie Vd DNA 10 ng/µl			

Er is twee maal *Verticillium* aangetoond in monsters van het drainwater in 2013 (rood in tabel). In beide gevallen was slechts één van de twee herhalingen positief. In combinatie met de hoge Ct-waarde geeft dit aan dat de hoeveelheid *V. dahliae* in het drainwater zeer laag was (nabij de detectiegrens). Op twee andere data (lichtblauw in tabel) was er ook een (hoge) Ct waarde aangenomen, maar uit analyse van de smeltcurve (zie bijlage 3) bleek dat het hierbij niet om detectie van *V. dahliae* ging (vals positief).

In 2013 is de gevoeligheid van de gebruikte Q-PCR onderzocht door een verdunningsreeks uitgaande van 10 ng/ul in stappen van 10 te analyseren met dezelfde methode als de watermonsters. De resultaten laten zien dat de methode inderdaad zeer gevoelig is. Zelfs bij de laagste concentratie van 0,1 tot 1 pg/ul (Ct-waardes tussen 28 en 36) werd Vd gedetecteerd (zie bijlage 3 voor details). Dit betekent dat *V. dahliae* in watermonsters minstens tot een concentratie van 1 pg/ul valt te detecteren.

## 4 Conclusies en discussie

Samenvattend kunnen er uit de resultaten de volgende conclusies worden getrokken:

- Uit de beschikbare literatuur blijkt dat *Verticillium dahliae* kan worden verspreid door water; zowel via oppervlakkige afstroming als via irrigatiewater, ook indien het water wordt toegediend via een druppelsysteem.
- Plantgoed dat in het gotensysteem wordt uitgeplant kan al door *V. dahliae* geïnfecteerd zijn bij het uitplanten in de goten en is dus een mogelijke bron van infectie.
- De gebruikte analysemethode (Q-PCR na centrifugatie van een deelmonster van 100ml) is geschikt om *Verticillium dahliae* aan te tonen in watermonsters.
- In beide onderzoeksjaren is het drainwater uit een gotensysteem met daarin esdoorns met *Verticillium* een aantal malen positief getest op de aanwezigheid van *Verticillium*; de in het water gevonden concentratie is zeer laag.

Er zijn een aantal overgebleven/nieuwe vragen:

- Het is onduidelijk in welke vorm *V. dahliae* in het water aanwezig is; microsclerotiën of conidia. Beide typen zijn een mogelijke bron van infectie; microsclerotiën zijn veel persistenter en moeilijker te doden, maar ook conidia kunnen meerdere weken overleven.
- De daarmee samenhangende vraag hoe *Vd* in het water terecht is gekomen, kan op basis van deze gegevens niet worden beantwoord. Mogelijke routes zijn via sporulatie of vorming van microsclerotiën op afgevallen blad van zieke planten, of via groei in de geïnoculeerde planten naar de wortel en vorming van sclerotiën of conidia op het worteloppervlak. Het in 2012 uitgevoerde oriënterende onderzoek naar de verspreiding van de schimmel in enkele geïnoculeerde planten (Bijlage 4) geeft te weinig informatie om hierover conclusies te kunnen trekken.
- Ten slotte is onduidelijk hoe groot het gevaar van uitbreiding van *Verticillium* via het drainagewater in een gotensysteem is. De gevonden hoeveelheid in het water is enerzijds erg laag; anderzijds is de schadedrempel voor aantasting van gevoelige soorten zoals esdoorn ook erg laag.

Als slotconclusie kan worden gesteld dat het is aangetoond dat *V. dahliae* in het drainagewater van een gotensysteem met door *Verticillium* geïnfecteerde esdoorns aanwezig kan zijn. Dit vormt in principe een gevaar voor verdere verspreiding. In de literatuur is voor meerdere teeltsystemen gerapporteerd dat *V. dahliae* via drain- en irrigatiewater kan worden verspreid. Hoe groot dat gevaar in de praktijk in een gotensysteem met esdoorns is kan op basis van dit beperkte onderzoek niet worden vastgesteld. Dat het risico zeker aanwezig is wanneer het drainwater wordt gerecycleerd lijkt zeker.



## 5 Literatuur

- DE WERD, H.A.E.; AMSING, J.J.; KORSTEN, P.H.J., 2003. Verspreiding van wortelziekten bij chrysant na hergebruik van niet-ontsmet drainagewater; inventarisatie *Verticillium* en wortelaaltjes. PPO sector Glastuinbouw, rapport 568, 31 blz.
- EASTON, G.D.; NAGLE, M.E.; BAILEY, D.L., 1969. A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation waste water. *Phytopathology* 59: 1171-1172.
- FARLEY, J.D.; WILHELM, S.; SNYDER, W.C., 1970. Repeated germination and sporulation of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 61: 260-264.
- GREEN JR., R.J., 1969. Survival and inoculum potential of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 59: 874-876.
- GARCIA\_CABELLO, S.; PEREZ-RODRIGUEZ, S.; BLANCO-LOPEZ, M.; LOPEZ-ESCUADERO, F.J.; 2012. Distribution of *Verticillium dahliae* through watering systems in widely irrigated olive growing areas in Andalucia (southern Spain). *Eur. J. Plant Pathol.* 133: 877-885.
- HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I., 2008. The study of fungi in drinking water. *Mycological Research* 113:165–172.
- HAZENDONK, A., 2000. Verspreiding van wortellesie-aaltjes en *Verticillium dahliae* bij chrysant in de volle grond door hergebruik van drainwater; literatuurstudie. Proefstation voor de Bloemisterij en glasgroente, Aalsmeer. Rapport 301, 13 blz.
- HIEMSTRA, J.A.; HARRIS, D.C., 1998. A compendium of *Verticillium* wilts in trees. CPRO-DLO / HRI-EM, Wageningen/East-Malling, 80 S.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.; CIRULLI, M.; BUBICI, G.; JIMÉNEZ-GASCO, M; ANTONIOU, P.P.; TJAMOS, E.C., 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. *Plant Disease* 96: 304-329.
- LOPEZ-ESCUADERO, F.J.; GARCIA-CABALLO, S.; BLANCO-LOPEZ, M.A., 2010. Distribution of *Verticillium dahliae* through watering systems in irrigated olive orchards in Andalucia. *IOBC/WPRS Bulletin* 59:9.
- LOPEZ-ESCUADERO, F.J.; MERCADO-BLANCO, F.J.; ROCA, J.; VALVERDE-CORRDOR, J.M.; BLANCO-LOPEZ, M.A., 2010. *Verticillium* wilt of olive in the Guadalquivir Valley (southern Spain): relations with some agronomical factors and spread of *Verticillium dahliae*. *Phytopathol. Mediterranea* 49: 370-380.
- PEGG, G.F.; BRADY, B.L., 2002. *Verticillium Wilts*. Wallingford, UK: CABI publishing. 416 S.
- RODRIGUEZ-JURADO, D.; BEJARANO-ALCAZAR, J., 2007. Dispersión de *Verticillium dahliae* en el agua utilizada para el riego de olivares en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas* 33: 547-562.
- RUNIA, W.T.; 1988. Elimination of plant pathogens in drainwater from soilless cultures. *Proceedings International Congress in Soilless Culture*: 429-443.
- RUNIA, W.T.; 1994. Disinfection of recirculation water from closed cultivation systems with ozone. *Acta Horticulturae* 361: 388-402.
- RUNIA, W.T.; VAN OS, E.A.; BOLLEN, G.J., 1988. Disinfection of drainwater from soilless cultures by heat

treatment. *Neth. J. of Agric. Science* 36: 231-238.

TSROR, L., 2011. Epidemiology and control of Verticillium wilt on olive. *Israel Journal of Plant Sciences* 59: 59-69.

# Bijlage 1

PRAKTIJKONDERZOEK PLANT & OMGEVING (PPO)  
SECTOR BOOMKWEKERIJ  
POSTBUS 85  
2160AB LISSE

Monsternr. 43901	Tarief: Gratis	Datum ingekomen: 16 juli 2012
Gewas:	Boomkwekerijproducten	
Soort:	ACER	
Herkomst:	PROEF HENK V. REULER	
Uitslag:	VERTICILLIUM IN PLANT NR. 3 EN 4 GEEN VERTICILLIUM IN PLANT NR. 2	

Henk,

Wij ontvingen monstermateriaal van Acer via Jelle Hiemstra met het verzoek om dit te beoordelen en onderzoeken op aanwezigheid van Verticillium-verwelkingsziekte. Het materiaal was afkomstig uit een gotenproef waarbij afwijkende planten zijn aangetroffen waarvan jullie wilden weten of het verband zou kunnen houden met een reeds in het uitgangsmateriaal aanwezige aantasting door Verticillium.

Ik heb de drie apart genummerde planten beoordeeld en in plant nummer 3 en 4 onmiskenbare symptomen vastgesteld van een aantasting door Verticillium. In plant nr. 2 werden geen symptomen van verwelkingsziekte door Verticillium vastgesteld.

Uit de verschillende planten zijn isolaties gemaakt. Het bleek dat uit de planten met nummer 3 en 4 uit de donker verkleurde vaatbundels volop en uitsluitend de schimmel Verticillium kon worden geïsoleerd.

Bij plant nummer 2 werden geen donkere vaatbundels aangetroffen. Isolaties uit deze plant leverden geen uitgroei van Verticillium op maar uitsluitend verschillende secundaire schimmels.

Op verzoek van Jelle zullen de isolaten in collectie worden gehouden. Ze zullen daarom aan Suzanne Breeuwsma worden gegeven zodat zij ze kan opnemen in een Verticillium-collectie t.b.v. het onderzoek.

Met vriendelijke groet,

Peter Vink  
Diagnostiekservice PPO Lisse

## Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

DATUM  
**16 juli 2012**

BEHANDELD DOOR  
**Peter Vink**

DOORKIESNUMMER  
**(0252) 46 21 09**

E-MAIL  
**peter.vink@wur.nl**

**Praktijkonderzoek  
Plant & Omgeving  
Postbus 85  
2160 AB Lisse**

BEZOEKADRES  
**Prof. van Slogterenweg 2  
2161 DW Lisse**

TELEFOON  
**(0252) 46 21 21**

FAX  
**(0252) 46 21 00**

KVK  
**09098104, Arnhem**

INTERNET  
**www.ppo.wur.nl**

Praktijkonderzoek Plant &  
Omgeving is binnen de  
Stichting DLO onderdeel van  
het onderzoeksinstituut  
Praktijkonderzoek Plant &  
Omgeving / Plant Research  
International (PPO/PRI).





# Bijlage 2 Gegevens en resultaten analyse watermonsters 2012

## Analyse monsters 1-4

### Geanalyseerde monsters

Nr.	Datum van opname, Beschrijving op fles	Opmerking
1	06-07-2012, Randwijk	Vuil (veel 'losse' deeltjes); water gekleurd
2	21-08-2012, onbekend	
3	06-09-2012, TdGV	
4	20-09-2012, Groot Randwijk	

### Bij de analyse van de monsters gevolgd werkwijze

- 100ml (vacuüm)filteren over 0,2 um filter, de retentaat (wat overblijft op filter) opnemen in 400 ul lysis buffer voor DNA isolatie (voor monsters 1 en 2).
- 70 ml (2X35ml) centrifugeren voor 1 uur op 29000 rpm, "pellet" opnemen in 400ul lysis buffer voor DNA isolatie (voor monsters 1, 2, 3 en 4).
- DNA isolatie met Qiagen DNA isolatiekit (en ook KingFischer methode)
- Q-PCR met PCR toets voor *V. dahliae* die ook gebruikt bij Vertigeeen project, als controle is naast 2 controle (Eu1 en Eu2) ook een 'standaard' mee geanalyseerd.

### Resultaten (zie tabel op de volgende blz. voor de ruwe data):

Nr.	Monster	Bewerking voor analyse		Ct-waarde ( zie Fig. 1 en 2)
		Filteren (*)	Centrifugeren	
1	06-07-2012, Randwijk	Negatief	Negatief	No
2	21-08-2012,	Negatief	Negatief	No
3	06-09-2012, TdGV		Negatief	No
4	20-09-2012, Groot Randwijk		Negatief	43.87

(\*) data not shown

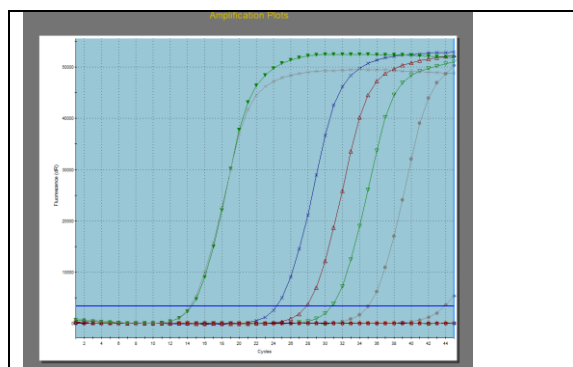


Fig. 1 positieve reacties alleen bij pos C en ijk lijn

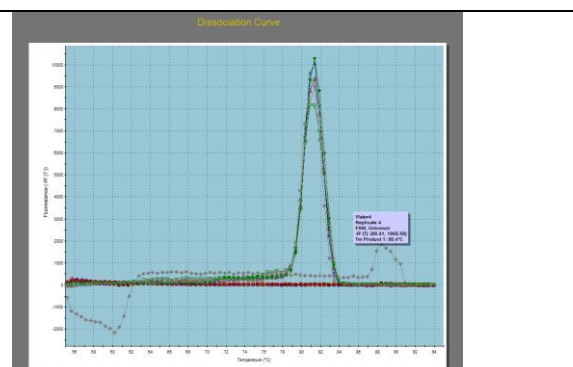


Fig. 2 zwak signaal bij monster 4 is valse positief

### Conclusies:

Vd is in alle tot nu toe geanalyseerde monsters niet aangetoond. Het zwakke signaal bij monster 4 is een vals positief; uit de smeltcurve analyse blijkt dat het niet om *V. dahliae* gaat. De vraag is nu of de concentratie van Vd in het water misschien te laag is voor detectie. Meer volume per watermonster analyseren is dan een optie. Dit ligt echter niet erg voor de hand. De gebruikte Q-PCR is een zeer gevoelige detectiemethode en analyse van een volume in deze orde van grootte is volgens de literatuur gebruikelijk en gewoonlijk afdoende (Hageskal, Lima & Skaar, 2008).

### Ruwe data van de Q-PCR

Replicate	Well Name	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
1	Water1,Qia	Unknown	3343.367	No Ct
2	Water2	Unknown	3343.367	No Ct
3	Water3	Unknown	3343.367	No Ct
4	Water4	Unknown	3343.367	43.87
5	Water1,KF	Unknown	3343.367	No Ct
6	Water2	Unknown	3343.367	No Ct
7	Water3	Unknown	3343.367	No Ct
8	Water4	Unknown	3343.367	No Ct
9	Vd1/10	Unknown	3343.367	24.42
10	Vd2	Unknown	3343.367	27.86
11	Vd3	Unknown	3343.367	30.83
12	Vd4	Unknown	3343.367	35.05
13	Vd5	Unknown	3343.367	No Ct
14	Vd6	Unknown	3343.367	No Ct
15	Vd7	Unknown	3343.367	No Ct
16	Vd8	Unknown	3343.367	No Ct
17	NTC	Unknown	3343.367	No Ct
18	NTC	Unknown	3343.367	No Ct
19	Eu1	Unknown	3343.367	14.53
20	Eu2	Unknown	3343.367	14.37

## Analyse watermonsters 5 en 6

### Geanalyseerde monsters

Nr.	Monster naam	Datum van opname,	Opmerking
1	water5	03-10-2012, TdgU	Water monster 5
2	water5+		Water monster 5 met toevoeging van Vd sporen
3	water6	16-10-2012, TdgU	Water monster 6
4	water6+		Water monster 6 met toevoeging van Vd sporen
5	1/100w5+		Verdunning 1/100 van DNA van water5+
6	1/100w6+		Verdunning 1/100 van DNA van water6+
7	ntc		non template controle, negatieve controle
8	EU+		<i>Verticillium dahliae</i> , positieve controle

### Bij de analyse van de monsters gevolgd werkwijze

- 70 ml (2X35ml) centrifugeren voor 1 uur op 29000 rpm, "pellet" opnemen in 400ul lysisbuffer voor DNA isolatie (voor monsters nr. 1, 2, 3 en 4 in tabel 1). 10<sup>5</sup> sporen is toegevoegd aan watermonster 5 en 6 (water 5+ en 6+) als controle voor de verwerking procedure.
- DNA isolatie met Qiagen DNA isolatiekit.
- Q-PCR met PCR toets voor *V.dahliae* die ook gebruikt bij Vertigeeen project, als controle is naast pos controle (Eu1 en Eu2) ook een 'standaard' mee geanalyseerd.

## Resultaten:

Nr.	Monster naam	Ct-waarde ( zie Fig. 1 en 2)	<i>Verticillium dahliae</i>
1	water5	34.65	positief
2	water5+	29.93	positief
3	water6	38.19	positief
4	water6+	30.28	positief
5	1/100w5+	34.82	positief
6	1/100w6+	35.52	positief
7	ntc	No Ct	negatief
8	EU+	15.87	positief

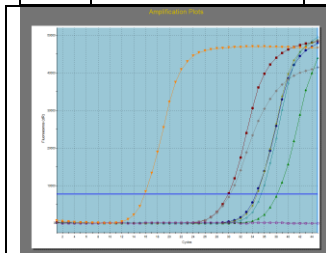


Fig. 1 Amplificatie curve, hoe hoger de Ct-waarde hoe lager de concentratie van aangetoonde Vd.

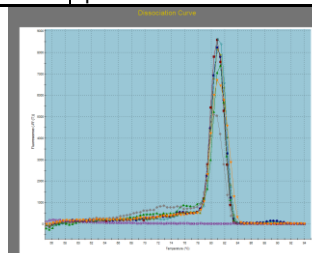


Fig. 2 smeltcurven geven aan dat correcte producten zijn geamplificeerd.

## Conclusies:

- *Verticillium dahliae* is aangetoond in watermonster 5 en watermonster 6
- Uit de Ct-waardes (34.65 en 38.19) volgt dat er meer Vd aanwezig is in watermonster 5 dan in 6.
- De Ct waarden van alle controles (toevoeging, verdunning) kloppen met de verwachtingen. De bewerking procedure voor de monsters is goed.

## Ruwe PCR data

Replicate	Well Name	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
1	water5	Unknown	7659.459	34.65
2	water5+	Unknown	7659.459	29.93
3	water6	Unknown	7659.459	38.19
4	water6+	Unknown	7659.459	30.28
5	1/100w5+	Unknown	7659.459	34.82
6	1/100w6+	Unknown	7659.459	35.52
7	ntc	Unknown	7659.459	No Ct
8	EU+	Unknown	7659.459	15.87

## Analyse monster 7 en herhaling monster 4

### Geanalyseerde monsters

Nr.	Monster naam	Datum van opname,	Opmerking
1	Water4	20-09-2012	Water monster 4
2	Water4+		Water monster 4 met toevoeging van Vd sporen
3	Water7	31-10-2012	Water monster 7
4	Water7+		Water monster 7 met toevoeging van Vd sporen
5	ntc		non template controle, negatieve controle
6	EU1+		<i>Verticillium dahliae</i> , positieve controle

**Bij de analyse van de monsters gevolgde werkwijze:**

- 70 ml (2X35ml) centrifugeren voor 1 uur op 29000 rpm
- "pellet" opnemen in 400ul lysisbuffer voor DNA isolatie (voor monsters nr. 1, 2, 3 en 4 in tabel 1).
- 10<sup>5</sup> sporen is toegevoegd aan watermonster 7 en 10<sup>4</sup> is toegevoegd aan watermonster 4 (water 7+ en 4+) als controle voor de verwerking procedure.
- DNA isolatie met Qiagen DNA isolatiekit.
- Q-PCR met PCR toets voor *V.dahliae* die ook gebruikt bij Vertigeeen project, als controle is naast pos controle (Eu1 en Eu2) ook een 'standaard' mee geanalyseerd.

**Resultaten:**

Nr.	Monster naam	Ct-waarde ( zie Fig. 1 en 2)	<i>Verticillium dahliae</i>
1	Water4	No Ct	Negatief
2	Water4+	35.96	positief
3	Water7	No Ct	Negatief
4	Water7+	31.60	positief
7	ntc	No Ct	negatief
8	EU+	15.87	positief

**Conclusies:**

- *Verticillium dahliae* is niet aangetoond in watermonster 7 (ook niet in watermonster 4, voor de tweede keer)
- De Ct waarden van de controles (toevoeging van Vd) kloppen met de verwachting (minder sporen toegevoegd aan monster nr. 4 dan aan monster nr. 7 en de Ct-waarde bij 4+ is inderdaad hoger dan bij 7+).

# Bijlage 3 Gegevens en resultaten analyse watermonsters 2013

Watermonsters uit Randwijk werden ca. 2 keer per maand genomen voor analyse, 2 monsters per keer

## Bij de analyse van de watermonsters gevolgde werkwijze

- Uit analyse van vorige jaar bleek dat filtreren van water geen optie was gezien het mogelijk dichtslippen van de filter.
- Er werd daarom gekozen voor de ultra centrifuge methode (45 minuten 29000rpm) om de eventueel aanwezige *V. dahliae* te concentreren, 2 buizen per monster (2x35ml).
- DNA uit het verkregen pellet (soms niet zichtbaar) werd geïsoleerd met Qiagen DNA isolatiekit.
- Detectie van *V. dahliae* is uitgevoerd met de Q-PCR toets die ook bij het EU-Verteigen project gebruikt wordt.
- Alle watermonsters (m.u.v. het monster van 31 juli) zijn in duplo geanalyseerd.
- Als controle is een 'standaard' (verduunningsreeks) mee geanalyseerd.

## PCR resultaten (14 nov 2013)

Nr.	Datum van opname	Monster	DNA isolatie	Ct-waarde	Resultaat***
				<b>Fig. 3, 4</b>	
1	18 juli 2013	1	28 aug	No Ct	neg
2	18 juli 2013	2	28 aug	No Ct	neg
3	31 juli 2013	1	28 aug	No Ct	neg
4	14 augustus 2013	1	28 aug	No Ct	neg
5	14 augustus 2013	2	28 aug	No Ct	neg
6	28 augustus 2013	1	3 sep	No Ct	neg
7	28 augustus 2013	2	3 sep	37.91	pos
8	10 september 2013	1	17 sep	36.34	neg
9	10 september 2013	2	17 sep	35.22	neg
10	30 september 2013	1	9 okt	No Ct	neg
11	30 september 2013	2	9 okt	No Ct	neg
12	18 oktober 2013	1	22 okt	No Ct	neg
13	18 oktober 2013	2	22 okt	No Ct	neg
14	4 november 2013	1	12 nov	35.25	neg
15	4 november 2013	2	12 nov	33.53	pos
16	28 augustus 2013	2+*	3 sep	38.68	pos
	Pos Controle			11.41	pos
				<b>Fig. 1, 2</b>	
	Ijklijn	Conc.**	10 <sup>-1</sup>	11.41	pos
			10 <sup>-2</sup>	14.97	pos
			10 <sup>-3</sup>	18.58	pos
			10 <sup>-4</sup>	25.18	pos
			10 <sup>-5</sup>	27.8	pos
			10 <sup>-6</sup>	35.48	pos
			10 <sup>-7</sup>	36.77	pos
			Neg C	No Ct	

\* monster 2 van 28 augustus met toevoeging van Vd (procedure controle)

\*\* concentratie 10 ng/μl

\*\*\* gebaseerd op smeltcurve

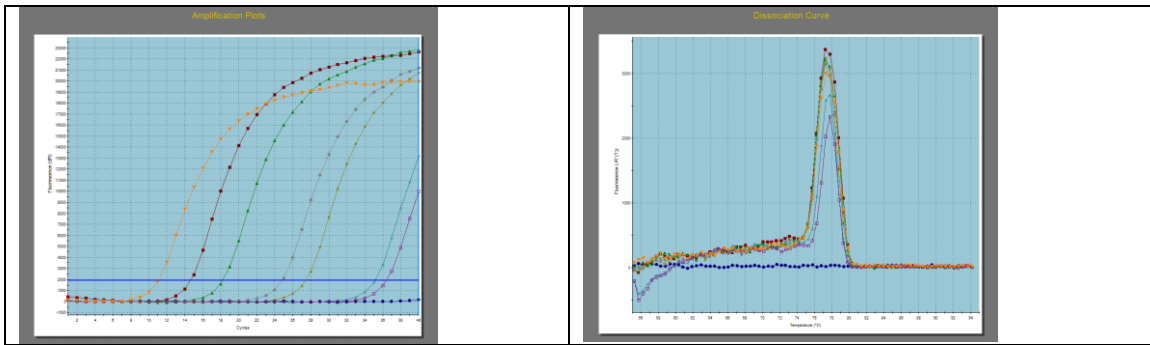


Fig. 1 ijk lijn

Fig. 2 Smelt curve

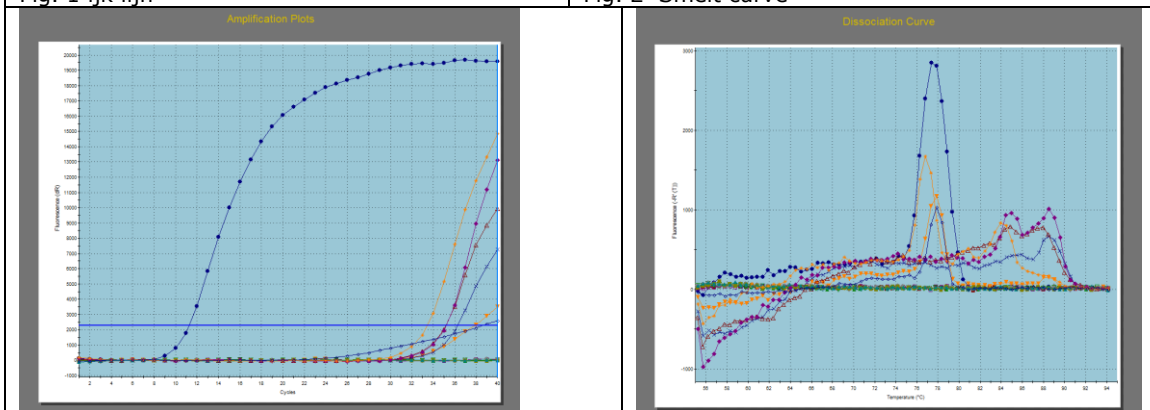


Fig. 3

Fig. 4

### Conclusies

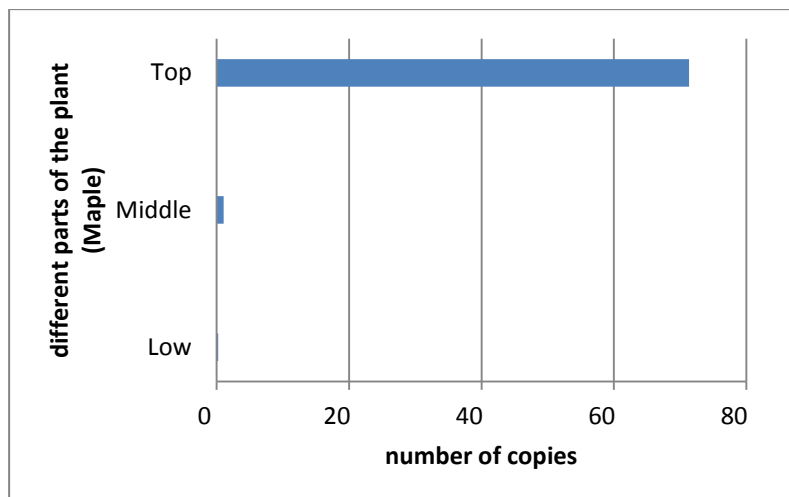
- Vd is alleen aangetoond in monster nr. 2 van 28 augustus 2013 en nr. 2 van 4 november 2013 (mede bepaald op basis van de smeltcurve analyse).
- De Ct-waarde is 37,91 voor monster 2 van 28 augustus en 33,53 voor monster 2 van 4 november. Omgerekend is dit rond 1-10 fg DNA van Vd (zeer weinig dus).

## BIJLAGE 4    Verspreiding van *Verticillium dahliae* in geïnoculeerde planten (verkenning door M. Keykha Saber)

### Distribution pattern of *Verticillium dahliae* in Stem Puncture Inoculated maple (*Acer rubrum*)

In this research, one year old maple (*A. rubrum*) plants were stem puncture inoculated. At the end of the growing season the quantity of pathogen in lower, middle and upper parts of the shoots of the infected plants was examined by exploiting QPCR technique. Sampling was carried out from 10-15 cm up the inoculation point to the top part of the tree (Figure 1). Total DNA from different parts of the shoots of 5 inoculated trees was isolated and after equalizing the concentrations they were tested for the relative amount of pathogen DNA. The results indicated that the colonization of pathogen in upper parts of the shoot is considerably more than in middle and lower parts (Graph 1). Furthermore, in middle parts of the infected plants the density of pathogen is more than lower parts.

Figure 1: Sampling points in lower, middle and upper parts of the plant.



Graph1: Relative DNA quantity (copies of molecule / $\mu$ l) of pathogen in low, middle and top parts of the maple trees inoculated with *V. dahliae* according to comparison with a standard curve.

In another part of this experiment the distribution of pathogen in leaves as well as colonization of pathogen in roots after stem puncture inoculation has been studied. 50 leaves from five infected plants were randomly selected and 3 parts of the leaves (petiole, middle part and top part; Figure 2) were tested separately for detecting and quantifying the pathogen. In addition, from each plant some pieces of root were taken and examined for pathogen infection.

The results did not show any infection for both leaves and roots.



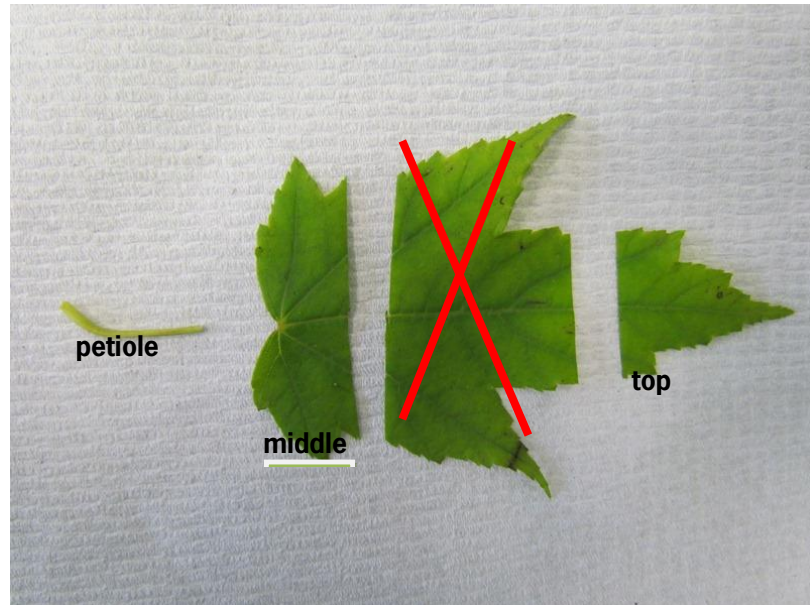


Figure 2: Petiole, middle and top parts of the leaves which tested separately for pathogen detection.

In addition 5 plants that showed inconspicuous disease symptoms which might be caused by a natural infection by *V. dahliae* (infected planting stock) were examined by Q-PCR as well. Some of the samples gave positive results but analysis of dissociation curves of Q-PCR results showed that the melting temperature of samples is a bit different from controls (*Verticillium* genomic DNA). So, to become sure about the main causal agent of disease symptoms plate assay was carried out and at least 4 fungi did grow on the plates. From each colony the ITS region was amplified and fragments were sent for sequencing. The results of sequencing demonstrated that there were several other fungi present (including *Phomopsis* spp., *Phyllosticta papayae*, *Botryosphaeria* spp. and even *Alternaria* spp.) but *Verticillium* was not detected.