

Voorkómen en bestrijden van latent zuur in tulp

Huidmondjes en zuur

Droge ontsmetting

Effect van ethyleen direct na de oogst op zuur

Martin van Dam, Marjan de Boer, Henk Gude

© 2009 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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 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.

Gefinancierd door:



Het in de proeven gebruikte FreshStart werd ter beschikking gesteld door Floralife®



Projectnummer: PPO: 32 360444 00
PT : 12957

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2 Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 - 462121

Fax : 0252 - 462100

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 HUIDMONDJES EN ZUUR.....	7
1.1 Inleiding	7
1.2 Materiaal en methode.....	7
1.3 Resultaten.....	8
1.4 Discussie	10
1.4.1 Ethyleen en huidmondjes	10
1.4.2 CO ₂	11
1.4.3 Beschadiging.....	11
1.5 Conclusies	11
2 DROGE ONTSMETTING TEGEN LATENT ZUUR.....	13
2.1 Inleiding	13
2.2 Materiaal en methode.....	13
2.2.1 Onderzoek naar een geschikte CO ₂ -dosering.....	13
2.2.2 Droge bolontsmetting tegen latent zuur	14
2.3 Resultaat.....	16
2.3.1 Onderzoek naar een geschikte CO ₂ -dosering.....	16
2.3.2 Resultaat droge bolontsmetting	17
2.4 Discussie	19
2.5 Conclusie.....	19
3 ETHYLEEN EN FRESHSTART DIRECT NA ROOIEN	21
3.1 Inleiding	21
3.2 Materiaal en methode.....	21
3.3 Resultaat.....	22
3.4 Discussie	23
3.5 Conclusies	24
4 ALGEMENE CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN.....	25
LITERATUUR.....	27

Samenvatting

Latente infecties van zuur in tulp kunnen niet bestreden worden met ontsmettingsmiddelen of fungiciden. Eén verklaring daarvoor is dat na de infectie schimmel in rust gaat. Op deze manier is latent zuur beter bestand tegen fungiciden dan normaal mycelium of kiemende sporen. Een andere verklaring is dat latent zuur niet kan worden bestreden doordat de schimmel in de huidmondjes binnendringt. Door Hans de Wild is (2005, AFSG) is ontdekt dat onder bepaalde omstandigheden (ethyleen, laag zuurstof of hoog CO₂-gehalte) de wasprop tijdelijk kan verdwijnen. Fusarium dringt dan de bol binnen via een huidmondje. Onder droge omstandigheden kan de schimmel in zijn latente vorm overgaan en deze wordt vervolgens afgedekt door de zich herstellende waspropjes. Hierdoor kunnen middelen de schimmel niet bereiken. Dit mechanisme biedt mogelijkheden voor de bestrijding van latent zuur door de waspropjes opzettelijk te laten verdwijnen, door bijvoorbeeld een behandeling met CO₂. Hierdoor wordt de latent aanwezige schimmel weer bereikbaar voor fungiciden of ontsmettingsmiddelen.

Ethyleen en zuur

Onderzoek bij PPO richt zich al enkele jaren op het voorkómen en bestrijden van latent zuur in tulp. In 2006 kwam uit het onderzoek naar voren dat huidmondjes een belangrijke invalspoort zouden kunnen zijn voor de zuurschimmel. In proeven werd aangetoond dat waspropjes, die de huidmondjes afsluiten, verdwijnen als de bollen in contact worden gebracht met ethyleen. Bollen waarvan de huidmondjes onder invloed van ethyleen waren geopend werden sneller geïnfecteerd door de zuurschimmel en er werd een veel groter percentage ziek, vergeleken met bollen die niet aan ethyleen waren blootgesteld. Tijdens het onderzoek kwam naar voren dat de zuuraantasting wel toenam na toediening van ethyleen maar niet werd beïnvloedt als CO₂ werd gebruikt voor het openen van de huidmondjes. Dit onderzoek, ondersteund door resultaten van zuuronderzoek van Jan Dijksterhuis van het Centraal Bureau voor Schimmelcultures waaruit o.a. blijkt dat er zich relatief maar zeer weinig huidmondjes op een tulpenbol bevinden, leidde tot de (nieuwe) conclusie dat het sterke effect dat ethyleen heeft op het ontstaan van zuur niet alleen ontstaat door het verdwijnen van de wasprop op zich. Ethyleen heeft kennelijk ook zodanige effecten op de interactie tussen de tulpenbol en de Fusariumschimmel dat er sneller en meer zuur ontstaat. Bij de met ethyleen behandelde bollen ontstonden zeer hoge percentages zuur. Als daarbij vooraf FreshStart (een stof die de werking van ethyleen op de bol voorkomt) was toegediend aan de bollen werd de hoge zuuraantasting voorkomen.

In 2007 werd ook gestart met onderzoek naar de mogelijkheid van ontsmetting tegen latent zuur, dat tot nu toe altijd moeilijk te bestrijden blijkt. Het vermoeden bestond dat middelen niet bij de latent aanwezige schimmel in de bol kunnen komen omdat de latente infectie een soort ingekapselde infectie in de bol is die zich in een huidmondje zou kunnen bevinden. Met CO₂- of ethyleen kunnen de waspropjes verdwijnen, waardoor de latente infectie bloot komt te liggen zodat de middelen de schimmel wel kunnen bestrijden.

In dit onderzoek werden na pogingen om de huidmondjes te openen, droog toepasbare middelen ingezet en getoetst op effectiviteit tegen latent zuur. De middelen waren Ozon, Jet-5 (verneveld) en chloordioxidegas. Bij het gebruik van ethyleen als voorbehandeling tegen de waspropjes bleek juist extra latent zuur opgewekt te worden. Dit percentage werd dan vervolgens weer tot de helft gereduceerd door de ontsmettingsmiddelen. De drie middelen hadden nagenoeg hetzelfde effect.

Uit zowel het huidmondjesonderzoek als het ontsmettingsonderzoek bleek dat ethyleen de belangrijkste factor was bij het ontstaan van hoge zuurpercentages. Het is nog niet duidelijk of dit komt door beïnvloeding van de weerstand van de bol of van de agressiviteit van de schimmel. Er zijn aanwijzingen voor beide mogelijkheden.

CO₂

In het onderzoek werd ook CO₂ gebruikt om de waspropjes op huidmondjes te laten verdwijnen. De gedachte daarachter was dat hiermee op een veilige manier de bollen konden worden voorbehandeld voordat ontsmetting werd toegepast. Met ethyleen zou dat niet kunnen. Dat werkt weliswaar goed op de waspropjes, maar ethyleen heeft daarnaast teveel nadelige invloeden op tulpen (zoals o.a. bloemverdroging en verklistering). Uit het onderzoek kon echter de invloed van CO₂ op waspropjes niet worden aangetoond. De bollen

werden na een voorbehandeling met CO₂ niet extra ziek en er trad ook geen toename van het gewichtsverlies op. Dit duidt erop dat de waspropjes niet verdwenen onder invloed van CO₂. In het ontsmettingsonderzoek werd na CO₂ ook geen ontsmettend effect van de middelen waargenomen. Voor de bollenteler betekent dit resultaat dat er voor latent zuur nog geen bestrijdingsmethode is.

Rooien

In een derde proef binnen dit project werd de invloed van ethyleen kort na het rooien onderzocht. Het feit dat direct na het rooien vaak hoge ethyleengehaltes voorkomen in de bewaarcel en dat dit kan leiden tot een hogere zuuraantasting vormt een gevaarlijke combinatie voor tulpen. Met de ethyleenremmer FreshStart kan bij tijdige toepassing de extra aantasting door zuur worden voorkomen. Er werd daarom nagegaan of toepassing van FreshStart bruikbaar is als toepassing direct na het rooien van de tulpenbollen. Uit de proeven kwam weer naar voren dat ethyleen de kans op zuur inderdaad verhoogt en dat deze verhoogde gevoeligheid minstens 17 dagen aanwezig blijft. Een preventieve toepassing van FreshStart voorkomt deze toename van zuur. Het voorkómen van extra zuur door FreshStart werd aangetoond voor een ethyleengehalte van 10.000 ppb. Ook bij 1000 ppb bleek er nadelige invloed van ethyleen op het ontstaan van zuur en het vermoeden bestaat dat de ondergrens nog lager ligt.

Advies

Het onderzoek naar het ontstaan en bestrijden van zuur bij tulp heeft een aantal bruikbare inzichten opgeleverd. Tulpen moeten bij voorkeur ethyleenvrij worden bewaard. Niet alleen vanwege de al bekende negatieve effecten van ethyleen (gommen, verklisteren, bloemverdroging) etc.) maar ook omdat door contact met ethyleen de bollen gevoeliger worden voor zuur. Door ethyleen wordt het zuurprobleem steeds weer vergroot. De bollen moeten daarom vanaf het eerste mogelijke contact met ethyleen daartegen worden beschermd. Door vanaf het rooien snel te drogen en vooral veel te ventileren wordt al veel bereikt. Als (door meting) blijkt dat er toch ethyleenwaarden boven 100 ppb zijn, dan is het toedienen van FreshStart een goede maatregel. Dit moet echter worden gegeven vooraf aan de ethyleenblootstelling of zo snel mogelijk anders komt de maatregel te laat.

1 Huidmondjes en zuur

1.1 Inleiding

Dit onderzoek naar de rol van huidmondjes bij het ontstaan van zuur is een voortzetting van onderzoek uit 2006 (Dam, M van e.a. project 360294, juni 2007). Daarin werd aangetoond dat tulpenbollen na behandeling met ethyleen veel gevoeliger werden voor zuur. Dit effect werd (voorzichtig) toegeschreven aan het openen van de huidmondjes op de bolrok door ethyleen, waarna de schimmel via het huidmondje kan binnendringen. Hans de Wild (2005, AFSG) had enkele jaren daarvoor aangetoond dat de huidmondjes van de tulpenbol in schone lucht afgesloten zijn door een wasprop en dat deze wasprop verdwijnt door een verhoogd ethyleen- of CO₂-gehalte van de lucht.

In het PPO-onderzoek in 2006 werd voor het openen van huidmondjes ethyleen gebruikt. Ethyleen in combinatie met verwondingen bleek steeds een zeer sterke toename van zuur te veroorzaken. Uit het onderzoek kwam ook naar voren dat de toepassing van een ethyleenremmer de toename van extra infectie door ethyleen grotendeels voorkwam. In het hieronder beschreven onderzoek werd nogmaals de rol van de huidmondjes bij het ontstaan van zuur onderzocht. Dit keer werd niet alleen ethyleen maar ook CO₂ gebruikt om de huidmondjes te openen. Als de toepassing van CO₂ om de huidmondjes te openen even goed werkt als ethyleen heeft dat twee grote voordelen. Ten eerste kan het onderzoek naar de rol van huidmondjes bij het ontstaan van latente infecties zuiverder worden uitgevoerd aangezien CO₂ veel minder nadelige effecten op de tulpenbol heeft dan ethyleen. Ten tweede zou CO₂ kunnen worden gebruikt om de huidmondjes te openen om zo latent zuur in de geopende huidmondjes te bestrijden (zie hoofdstuk 2).

1.2 Materiaal en methode

Als basismateriaal werden tulpenbollen van de cultivar 'Leen van der Mark' gebruikt, 250 bollen per behandeling, geen herhalingen. Deze cultivar staat bekend als gevoelig voor zuur. De gebruikte partij was een nagenoeg zuur- en sporenvrije partij geteeld op zand in Egmond. Na het rooien en drogen werden de bollen achtereenvolgens al dan niet:

- beschadigd (over een verwerkingslijn van ontklisteraar, pelmachine en pelband en daarna opgevangen in een gaasbak)
- blootgesteld aan CO₂ (2 dagen 2%) of ethyleen (2 dagen, 10 ppm)

De toegediende behandelingen staan schematisch in tabel 1 (hoofdstuk 1.3. Resultaten).

N.B. Bij het doseren van CO₂ werd gestreefd naar een waarde van minimaal 2%. Hiertoe werd 1% toegediend in de vorm van zuiver CO₂ in begassingstanks (10 liter gas per m³). Omdat de bollen zuurstof verbruiken en CO₂ afstaan door de ademhaling, loopt de CO₂ waarde in de tanks op. Door periodiek de tanks te luchten en weer CO₂ toe te dienen werd gemiddeld een concentratie van ruim 2% gedoseerd.

Van de behandelingen (Nr 1 t/m 18) werd 1/3 deel droog bewaard, 1/3 deel in water gedompeld en werd 1/3 deel in een sporensuspensie gedompeld (100.000 sporen per ml *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae*, een mix van 2 stammen: CBS 116593 en CBS 118730 van Centraalbureau voor Schimmelcultures).

Een aantal monsters (behandeling 19 t/m 24) werd na het drogen behandeld met FreshStart vóór het wel of niet beschadigen.

De bollen werden tot 27 september 2007 bewaard bij 20°C en gedurende deze bewaring beoordeeld op het percentage zuur. De bollen werden daarna 6 dagen bewaard in een klimaatkast bij 25°C en 100% RV om latent zure bollen zichtbaar zuur te maken. Na afloop daarvan werd gedurende 2 weken enkele malen het zuurpercentage bepaald.

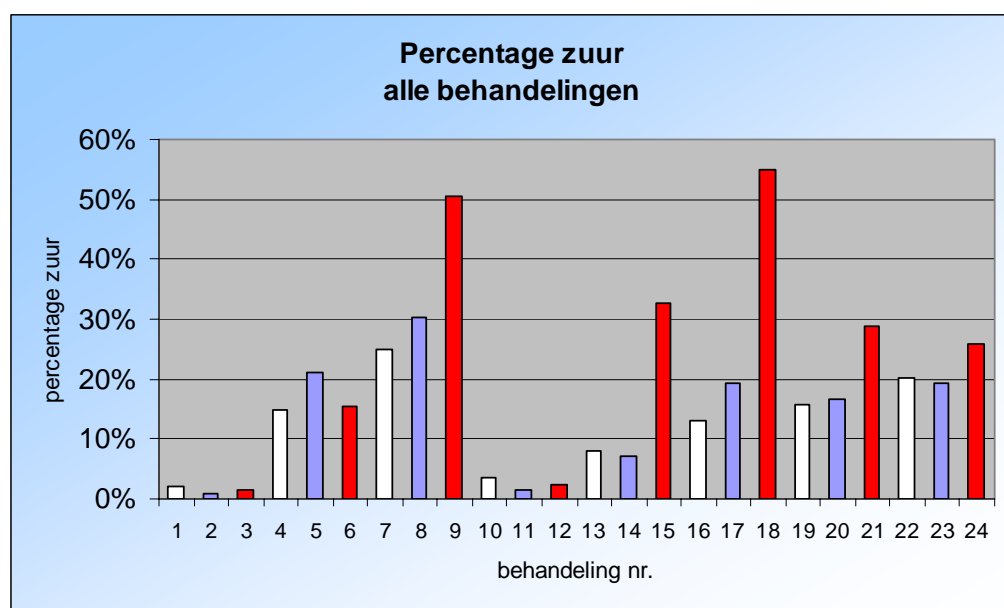
Bij de behandelingen met ethyleen en CO₂ werd per behandeling nog 2 x 40 bollen extra behandeld. Deze werden na de behandeling enkele keren gewogen. Het gewichtsverlies werd vergeleken met dat van de bollen zonder ethyleen of CO₂-behandeling en de bollen die met FreshStart waren behandeld. Een sterker gewichtsverlies is een aanwijzing voor geopende huidmondjes.

1.3 Resultaten

Het zuurpercentage per behandeling (cumulatief) aan het eind van de bewaring staat vermeld in tabel 1 en tevens in de grafiek daaronder (Figuur 1). Er zijn geen herhalingen uitgevoerd, elke behandeling werd uitgevoerd met 250 bollen.

Tabel 1. Behandelingschema en tevens resultaten (zuurpercentages) van de proeven waarbij de effecten van CO₂ en ethyleen op infectie door Fusarium (zuur) werd bepaald.

Behandeling		bollen	CO ₂ /ethyleen	besmetting	zuur
1		gaaf	geen	nee, droog	2%
2		gaaf	CO ₂	nee, droog	1%
3		gaaf	ethyleen	nee, droog	2%
4		gaaf	geen	nee, water	15%
5		gaaf	CO ₂	nee, water	21%
6		gaaf	ethyleen	nee, water	15%
7		gaaf	geen	sporensuspensie	25%
8		gaaf	CO ₂	sporensuspensie	30%
9		gaaf	ethyleen	sporensuspensie	51%
10		beschadigd	geen	nee, droog	4%
11		beschadigd	CO ₂	nee, droog	2%
12		beschadigd	ethyleen	nee, droog	2%
13		beschadigd	geen	nee, water	8%
14		beschadigd	CO ₂	nee, water	7%
15		beschadigd	ethyleen	nee, water	33%
16		beschadigd	geen	sporensuspensie	13%
17		beschadigd	CO ₂	sporensuspensie	19%
18		beschadigd	ethyleen	sporensuspensie	55%
	FreshStart				
19	ja	gaaf	geen	sporensuspensie	16%
20	ja	gaaf	CO ₂	sporensuspensie	17%
21	ja	gaaf	ethyleen	sporensuspensie	29%
22	ja	beschadigd	geen	sporensuspensie	20%
23	ja	beschadigd	CO ₂	sporensuspensie	19%
24	ja	beschadigd	ethyleen	sporensuspensie	26%



Figuur 1. Zuurpercentage per behandeling (voor omschrijving zie tabel 1).
Betekenis van de kleuren: wit = controle, blauw = met CO₂ en rood = met ethyleen behandeld.

In de grafiek (figuur 1) zijn de controles wit, de behandelingen met CO₂ blauw en de behandelingen met ethyleen rood gekleurd. Behandelingen 1 t/m 18 waren zonder voorafgaande behandeling met FreshStart, bij de nrs. 19 t/m 24 was van tevoren FreshStart gebruikt.

Effecten van besmetting (droog, alleen water of besmet met sporen)

- Bij de *niet besmette en droog bewaarde* bollen (behandeling 1 t/m 3 en 10 t/m 12) werd een laag percentage zuur aangetroffen; gemiddeld 1,9% (onbeschadigd 1,4 en beschadigd 2.5%).
- De in alleen *water gedompelde* bollen vertoonden duidelijk meer aantasting door zuur (door kieming van reeds aanwezige sporen). Onbeschadigde bollen (beh. 4, 5 en 6) werden gemiddeld 17% zuur en beschadigde bollen (beh. 13, 14 en 15) werden gemiddeld 16% zuur. Bij de laatste viel op dat de beschadigde bollen van de controle en CO₂ minder zuur hadden dan bij de onbeschadigde bollen. Behandeling 15 daarentegen (beschadigde bollen+ ethyleen) gaf juist extra veel zure bollen.
- De trend van toename van zuur zette zich voort bij de bollen die werden besmet. Bij de onbeschadigde, besmette bollen (behandeling 7, 8 en 9). Hier werd gemiddeld 35% zuur geteld en gaf ethyleen een uitschieter naar boven van 51% zuur. Bij de beschadigde en besmette bollen werd gemiddeld 29% zuur geteld. Zoals bij de domping in alleen water waren ook hier controle en CO₂ lager dan verwacht en toonden de met ethyleen behandelde bollen een uitschieter naar boven van 55%.

Effecten van beschadiging (gaaf of beschadigd)

Het viel bij deze proevenreeks op dat beschadiging weinig effect had op het ontstaan van zuur. Gemiddeld was er bij de gave bollen (beh. 1 t/m 9) 18% zuur en bij de beschadigde bollen 16% zuur (beh. 10 t/m 18). In het voorgaande jaar (PPO rapport 360294. De rol van huidmondjes bij het ontstaan van zuur) was dat verschil er wel. De beschadigde bollen hadden toen 3,5 x meer zuur dan de onbeschadigde bollen.

Effecten van voorbehandeling met CO₂ of ethyleen.

Ethyleen had een duidelijk effect op het ontstaan van zuur. Het gemiddelde zuurpercentage van de behandelingen met ethyleen (de nrs. 3, 6, 9, 12, 15 en 18, rood in de grafiek) bedroeg 26%, terwijl dat bij de controlebehandelingen (wit in de grafiek) 11% was. De behandeling met CO₂ had geen effect op het ontstaan van zuur. Alle behandelingen met CO₂ gaven gemiddeld 13,4% zuur.

De behandelingen die vooraf met FreshStart waren behandeld zijn genummerd van 19 t/m 24. Nummer 19, 20 en 21 zijn vergelijkbaar met 7, 8 en 9: gave bollen die waren besmet met sporen. De nummers 22, 23 en 24 zijn vergelijkbaar met 16, 17 en 18: beschadigde bollen, besmet met sporen. Het extra zuur dat ontstond bij nummer 9 en 18 (respectievelijk 51 en 55%), was volledig of nagenoeg volledig voorkomen bij behandeling 21 en 24 (29 en 26% zuur). De behandeling met FreshStart vermindert het percentage zure bollen met 20%. Hierdoor was ook het gemiddelde zuurpercentage van de behandelingen met FreshStart lager dan zonder FreshStart, zie tabel 2.

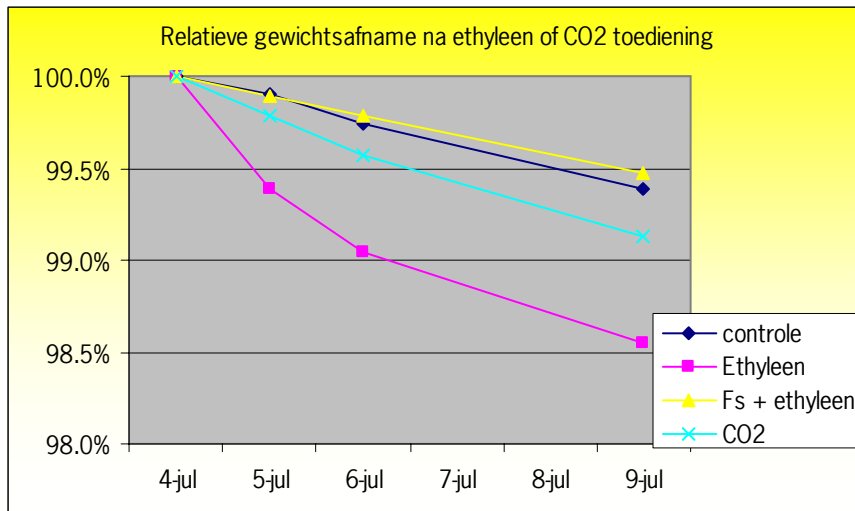
Tabel 2. Effect van FreshStart op het percentage zuur (gemiddelde waarde van controle, CO₂- en ethyleen behandelde bollen.

Nrs	behandeling	zuur		Nrs	behandelingen met FreshStart	zuur
7, 8, 9	gaaf + besmet	35%		19, 20, 21	FreshStart+gaaf + besmet	20%
16, 17, 18	beschadigd + besmet	29%		22, 23, 24	FreshStart+beschadigd+ besmet	22%

De invloed van CO₂ op het openen van huidmondjes en infectie door Fusarium

Van enkele zakken werd direct na de behandeling met ethyleen of CO₂ dagelijks het gewichtsverlies bepaald (een toegenomen gewichtafname duidt op geopende huidmondjes). Het relatieve gewicht (startgewicht = 100%) staat weergegeven in de grafiek van figuur 2. Bij de met ethyleen behandelde bollen is het gewichtsverlies in het begin sterker (de roze lijn daalt sterker) dan de controlebehandeling. Door de toediening van FreshStart vooraf aan de ethyleentoediening treedt er geen extra gewichtsverlies op. Na een CO₂ behandeling is geen duidelijke toename van gewichtsverlies gemeten t.o.v. de controle.

Dat door CO₂ geen extra gewichtsverlies optrad kan duiden op het feit dat CO₂ niet het verwachte effect op de waspropjes had. De wasprop bleef intact en daarmee het huidmondje gesloten. Van een toename van zuur door CO₂ was in deze proeven nauwelijks sprake (tabel 1). Een geringe toename was te zien bij behandeling 5 t.o.v. 4 en bij behandeling 8 t.o.v. 7. Iets meer toename werd geconstateerd bij behandeling 17 t.o.v. 16. In de andere gevallen (behandeling 2, 11, 14, 20 en 23) was het zuurpercentage na een CO₂-behandeling gelijk aan de bijbehorende controle.



Figuur 2. Relatief gewicht (startgewicht is 100%) van tulpenbollen na een behandeling met CO₂, ethyleen, FreshStart plus ethyleen en een controlebehandeling. (Fs = FreshStart)

1.4 Discussie

1.4.1 Ethyleen en huidmondjes

In het voorgaande onderzoek naar de rol van huidmondjes (Van Dam, 2007) werd geconcludeerd dat geopende huidmondjes een invalspoort vormen voor zuur en dat deze invalspoort belangrijker was dan alleen beschadiging. In dat onderzoek werd de wasprop in de huidmondjes verwijderd door een ethyleenbehandeling. In dit (huidige) onderzoek was er ook duidelijk effect op zuur als ethyleen wordt toegepast. Ook kon (evenals in het voorgaande onderzoek) dit effect worden voorkómen als FreshStart werd gebruikt vóór de ethyleenbehandeling.

Door Dijksterhuis (2009) is de groei van *Fusarium* op de bolrok microscopisch bestudeerd. Hij komt daarbij tot de conclusie dat *Fusarium*mycelium vanaf de gave bolrok niet in staat is om binnen 48 uur meer dan 1 mm naar een verwonding te groeien. Vanuit een wond, echter, kunnen schimmeldraden wel een langere afstand overbruggen en mogelijk ook huidmondjes binnendringen.

De kiembuis van kiemende *Fusarium*sporen kan minder afstand overbruggen dan het mycelium. Als sporen worden aangebracht in een wond verloopt de infectie voorspoedig. Sporen naast een wond (op meer dan 1 mm afstand van de wond) kiemen wel maar infecteren vervolgens de wond niet. Kiemende sporen en mycelium hebben blijkbaar het vocht en het voedsel nodig van beschadigde cellen, om daarna vanuit die eerste infectie eventueel een huidmondje binnen te dringen.

Voor een infectie via huidmondjes is het dus nodig dat:

- de wasprop is verdwenen
- er daarna een spore kiemt in de opening (die spore moet dus dan nog eerst daar terechtkomen) òf
- er mycelium vanuit een wondje naast het huidmondje naar binnen groeit.

Infectie via huidmondjes lijkt daarmee bijna niet mogelijk en is meer een toevalligheid. Een en ander leidt tot de (nieuwe) conclusie dat het sterke effect dat ethyleen heeft op het ontstaan van zuur niet ontstaat door het verdwijnen van de wasprop op zich. Ethyleen heeft kennelijk zodanige effecten op de interactie tussen de tulpenbol en de *Fusarium* schimmel dat er sneller en meer zuur ontstaat. Er zijn daarbij verschillende processen denkbaar waarbij ethyleen een rol speelt, zoals:

- Versnelde afbraak van celwandpectine, (hierdoor is er meer voedsel en een makkelijke entree voor de schimmel; Jan Dijksterhuis, mondelinge mededeling)
- Verstoorde aanmaak van tulipaline (Beijersbergen 1973)

- Versterking van de virulentie van de Fusariumschimmel (dergelijke reacties van schimmels op ethyleen zijn waargenomen bij andere schimmelsoorten (Cristescu et al. 2007)).

Van ethyleen is echter ook bekend dat het in zijn algemeenheid bij planten juist een rol speelt bij de verdediging tegen indringende schimmels bij verwonding. De ingewikkelde dubbelrol van ethyleen bij de infectie door Fusarium bij tulp maakt verklaring van de waarnemingen niet eenvoudig.

1.4.2 CO₂

Na de CO₂-behandeling van 2 dagen met een concentratie van 2% treedt geen extra gewichtsverlies op. Het ontbreken van extra gewichtsverlies brengt in twijfel of het openen van huidmondjes in deze proeven is geslaagd. Dit kan te wijten zijn aan een te laag gehalte CO₂. In het onderzoek van (De Wild, 2005) werd een duidelijk effect op het vochtverlies gezien. Het verdwijnen van de wasprop werd visueel bevestigd door de waarnemingen met de elektronenmicroscoop en doordat het vochtverlies merkbaar toenam. Hier waren de bollen blootgesteld gedurende 2 dagen aan 10% CO₂, met daarbij de opmerking dat bij een lager gehalte het effect op de waspropjes ook kan optreden.

Als door CO₂ de wasprop niet verdwijnt dan heeft dat gevolgen voor de toepassing van CO₂ als voorbehandeling bij een droge bolontsmetting. In hoofdstuk 2 wordt nader ingegaan op proeven naar de droge ont-smetting en het bepalen van de juiste CO₂ dosering.

Na de voorbehandeling met CO₂ nam het zuurpercentage niet toe. Dit kan dezelfde oorzaak hebben als hierboven, namelijk: de wasprop verdwijnt niet op bij de gekozen CO₂-dosering. Daarnaast is bekend dat CO₂ een veel minder grote rol speelt in diverse processen in de plant dan ethyleen. De kans is erg groot dat CO₂ helemaal geen effect heeft op de interactie tussen de tulpenbol en de schimmel waar ethyleen dat wel heeft.

1.4.3 Beschadiging

In de uitvoering van dit onderzoek kwam naar voren dat de beschadigde bollen niet meer zuur kregen dan de onbeschadigde bollen. Logischerwijs zou je door beschadiging méér zuur verwachten. In het onderzoek hieraan voorafgaand (Van Dam 2007, de rol van huidmondjes op het ontstaan van zuur) was er door de aangebrachte beschadiging wél meer zuur. Het is echter niet zo dat meer beschadiging van de bollen altijd tot meer zuur leidt. Dat kwam tot uiting in de proeven en het wordt ook geconstateerd in de praktijk. De kans op zuur neemt door beschadiging wel toe, maar of er zuur ontstaat hangt ondermeer af van de omstandigheden waaronder bollen worden bewaard. Daarbij moet worden gedacht aan de mate van drogen en RV in de cel, omstandigheden die van invloed zijn op de wondheling, de mate van besmetting en de gevoeligheid voor zuur van de partij.

In dit onderzoek ontstond er alleen meer zuur bij beschadiging als de bollen ook bloot waren gesteld aan ethyleen. Het lijkt er dus op dat ethyleen beschadigd weefsel extra gevoelig maakt voor zuur. Het is echter onduidelijk welke processen hierbij een rol spelen.

1.5 Conclusies

Bollen die een ethyleenbehandeling hebben gehad worden vaker en meer door zuur aangetast.

De gevonden resultaten leiden tot de conclusie dat het sterke stimulerende effect van ethyleen op de ontwikkeling van zuur niet wordt veroorzaakt door het verwijderen van de wasprop in een huidmondje. De beschikbare open huidmondjes door de toepassing van ethyleen spelen dus geen rol in het stimulerende effect van ethyleen op zuur.

Het sterke stimulerende effect van ethyleen kan alleen worden verklaard doordat ethyleen de interactie tussen de tulpenbol en de schimmel zodanig beïnvloedt dat er meer zuur ontstaat. Welke processen daarbij een rol spelen is niet duidelijk maar zowel het tulpenweefsel als de schimmel kunnen worden beïnvloed door ethyleen.

Als bollen zijn beschadigd én tevens aan ethyleen worden blootgesteld ontstaat het meeste zuur. Als door toepassing van FreshStart de werking van ethyleen wordt geblokkeerd voordat de bollen aan ethyleen worden blootgesteld wordt de sterke toename van zuur voorkomen. Er ontstaat dan nog wel evenveel zuur als in de situatie met alleen beschadigingen.

De werking van een CO₂-behandeling op het openen van huidmondjes kon in dit onderzoek niet worden aangetoond. Na een voorbehandeling met CO₂ neemt het zuurpercentage niet toe.

2 Droge ontsmetting tegen latent zuur

2.1 Inleiding

Latente infecties van zuur in tulp kunnen niet bestreden worden met ontsmettingsmiddelen of fungiciden. Eén verklaring daarvoor is de volgende: na de initiële infectie in de bol gaat de gekiemde schimmel in rust in de vorm van een verdikt mycelium of als spore. Deze schimmelstadia zijn beter bestand tegen fungiciden dan normaal mycelium of kiemende sporen. Bovendien zitten deze schimmelstadia al in de bol en zijn zo minder bereikbaar voor fungiciden. Een andere verklaring is dat latent zuur niet kan worden bestreden doordat de schimmel in de huidmondjes binnendringt als de waspropjes verdwenen zijn en onbereikbaar wordt voor fungiciden als zich weer waspropjes hebben gevormd in de huidmondjes. Onder bepaalde omstandigheden (ethyleen, laag zuurstof of hoog CO₂-gehalte) kan de wasprop tijdelijk verdwijnen. *Fusarium* dringt dan de bol binnen via een huidmondje. Onder droge omstandigheden kan de schimmel in zijn latente vorm overgaan en deze wordt vervolgens afgedekt door de zich herstellende waspropjes. Hierdoor kunnen middelen de schimmel niet bereiken (Het onderzoek is uitgevoerd op basis van deze theorie. Later zou blijken dat infectie door via huidmondjes onwaarschijnlijk is).

Het hierboven beschreven mechanisme biedt mogelijk kansen in de bestrijding van latent zuur door de waspropjes opzettelijk te laten verdwijnen, door bijvoorbeeld een behandeling met CO₂. Hierdoor wordt de latent aanwezige schimmel weer bereikbaar voor fungiciden of ontsmettingsmiddelen. Het toepassen van het ontsmettingsmiddel vraagt hierbij de nodige voorzichtigheid. Als het via dompeling wordt aangebracht worden de bollen weer nat en ontstaan er juist weer gunstige omstandigheden voor kieming van sporen of het uitbreken van latent zuur. Er bestaan ook droge(re) ontsmettingsmethoden. In dit onderzoek zijn Ozon, chloordioxide (gas) en Jet5 (toegediend als nevel) op hun bruikbaarheid getoetst.

Naast de voorbehandeling met CO₂ werd ook ethyleen toegepast om de waspropjes te laten verdwijnen. Met ethyleen gaat dit erg effectief en dat maakt het geschikt voor het doen van proeven. Aan het gebruik van ethyleen in de praktijk kleven echter bezwaren, omdat dit gas allerlei nadelige effecten veroorzaakt bij tulpen (bloemverdroging, sterke verklistering, gommen, bevorderen zijspuiten, etc.).

In dit onderzoek werd allereerst gezocht naar een geschikte CO₂-dosering (tijd en concentratie). De droge ontsmettingsmethoden werden in twee proefjaren getest en vergeleken.

2.2 Materiaal en methode

2.2.1 Onderzoek naar een geschikte CO₂-dosering.

Door een hoge concentratie CO₂ verdwijnen de waspropjes in de huidmondjes van de bol. In onderzoek (H. de Wild, 2005) werd dit effect aangetoond bij 10% CO₂. Het effect was zichtbaar op foto's (SEM opnamen) en aan de hand van het toegenomen gewicht(vocht)verlies van de bollen.

In dit deel van het onderzoek werd bepaald of er bij een lager CO₂-gehalte ook effecten op de waspropjes c.q. het openen van de huidmondjes merkbaar zijn. Daartoe werden bollen gewogen en vervolgens blootgesteld aan 0%, 2% en 4% CO₂, gedurende 1, 2 en 4 dagen. Na afloop werd het vochtverlies vastgesteld door de behandelde bollen te wegen op 7, 9 en 11 dagen na de start van de CO₂-behandeling. Waar 0% CO₂ werd gegeven wordt in feite de natuurlijke hoeveelheid CO₂ in de luchtsamenstelling bedoeld: 0,03%. De proef werd in 3 herhalingen uitgevoerd.

Het doel van deze proef was om een bruikbare CO₂-dosering te vinden die kon worden toegepast ter verwijdering van de waspropjes bij de ontsmettingsproeven die in de volgende paragrafen worden beschreven.

De resultaten van de proeven werden statistisch verwerkt met de Anova methode met behulp van het programma Genstat (12^e editie).

2.2.2 Droge bolontsmetting tegen latent zuur

2.2.2.1 Proeven in 2007

Bollen van de cultivar 'Leen van der Mark' werden latent ziek gemaakt met sporen van *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae*. Op een later tijdstip werden de waspropjes verwijderd door de bollen bloot te stellen aan ethyleen of aan CO₂. Direct daarna werden de bollen ontsmet. Hiervoor werden 3 methoden /middelen gebruikt. De besmetting vond plaats door middel van een dompeling (15 minuten) in een sporensuspensie met daarin 100.000 sporen per ml. De bollen werden daarna 24 uur bij ca 20°C bewaard zonder ze te drogen. Daarna werden ze snel gedroogd en verder bewaard bij 20°C.

Om de wasprop te laten verdwijnen (de voorbehandeling) werden de bollen 48 uur blootgesteld aan 10 ppm ethyleen of aan 10% CO₂. (Er werd in het eerste deel van dit onderzoek geen geschikte lagere CO₂ dosering gevonden als voorbehandeling. Om die reden is ervoor gekozen de dosering van het onderzoek van 2005 (H. de Wild) te hanteren).

De bollen werden aansluitend op de voorbehandeling ontsmet met een van de volgende 3 middelen:

Ozon

Met een ionisatie-apparaat werd in een licht geventileerde bewaarcel een ozonconcentratie opgewekt van gemiddeld 0,4 ppm. Hierin werden de te ontsmetten bollen geplaatst gedurende 48 uur.

Jet-5

In een licht geventileerde cel van ca 45 m³ inhoud werd een 2% oplossing van Jet-5 in water verneveld. In deze ruimte hebben de te ontsmetten bollen 1 uur gestaan. In dat uur werd 290 ml water met 2% Jet-5 verbruikt. Bij deze vorm van ontsmetten loopt de RV in de bewaarruimte op tot 100%.

Chloordioxide

In een afgesloten container van 1 m³ werd chloordioxide in gasvorm toegediend. De dosering daarvan was 10 mg chloordioxide per kg bollen. Dit was bepaald in overleg met de leverancier (ICA TriNova, LLC.) en op basis van ervaringen met narcis (onderzoek van G.A. Chastagner 2002). De bollen werden 2 uur aan dit gas blootgesteld.

De controlebehandelingen in deze proef waren:

- Dompeling in Topsin M (15 minuten in water + 0,5% Topsin M; na uitdruppen terugdrogen en bij 20°C opslaan)
- Bollen niet ontsmetten
- Niet besmette bollen die ook niet werden ontsmet.

De proef werd in 3 herhalingen uitgevoerd. De nummering en behandelingen staan samengevat in tabel 3.

Tabel 3. Behandelschema van de proeven met droge bolontsmetting zoals uitgevoerd in 2007.

Nr.	Behandeling om waspropjes te verwijderen	Ontsmettingsmiddel
1	geen	Ozon
2	geen	Jet-5
3	geen	ClO ₂
4	geen	Topsin M 0,5%
5	geen	geen
6	ethyleen 10 ppm 2 dgn.	Ozon
7	ethyleen	Jet-5
8	ethyleen	ClO ₂
9	ethyleen	Topsin M 0,5%
10	ethyleen	geen
11	CO ₂ 10 % x 2 dgn	Ozon
12	CO ₂	Jet-5
13	CO ₂	ClO ₂
14	CO ₂	Topsin M 0,5%
15	CO ₂	geen

Na de ontsmettingsbehandeling werden de bollen gedurende 5 dagen vochtig en warm (25°C) bewaard bij minimaal 98% RV. Door deze vochtige bewaring werd latent zuur opgewekt tot zichtbaar zuur. Het effect van de ontsmetting op het doden van latent zuur werd vastgesteld aan de hand van het percentage zuur dat daarna ontstond.

2.2.2.2 Proeven in 2008

In 2008 is de proef uit 2007 herhaald waarbij:

- a. het aantal behandelingen met de ontsmettingsmiddelen werd uitgebreid,
- b. de voorbehandeling met ethyleen niet werd uitgevoerd, er werd dus alleen nog CO₂ gebruikt
- c. de controlebehandeling met Topsin M achterwege is gelaten.

Ad a.

Aan de ozonbehandeling zoals die in 2007 is gegeven werden een dubbele en een halve doseringstijd toegevoegd. Voor 2008 kwam dit neer op 1, 2 en 4 dagen bij 0,4 ppm in een licht geventileerde cel. Bij de toepassing van Jet-5 is berekend wat de dosering per kilo bollen zou moeten zijn zoals ook het geval is bij chloordioxide. De standaarddosering voor Jet-5 werd gesteld op 50 mg / kg bollen vanuit het uitgangspunt dat chloordioxide als microbicide 5 maal zo sterk is als perazijnzuur. (Bron http://www.lenntech.nl/ontsmetting_vergelijking.htm). Ook hier werd een halve en een dubbele dosering (25 en 100 mg per kg bollen) aan de standaardbehandeling toegevoegd. Van chloordioxide (gas) werd in 2007 10 mg per kg gedoseerd gedurende 2 uur. Aan deze behandeling werden in 2008 de doseringen 5 mg en 20 mg / kg toegevoegd. Omdat het gas enige tijd nodig heeft om vrij te komen werden de bollen nu ook gedurende 5 uur aan het gas blootgesteld.

Ad b.

In 2007 veroorzaakte de voorbehandeling met ethyleen extra zuur. Daarom is deze voorbehandeling in 2008 achterwege gelaten.

De bollen voor deze proeven werden op verschillende manieren besmet, om te achterhalen of bij het opwekken van latent zuur geen nieuwe infecties ontstonden door de aanwezige sporen. Eén deel werd daartoe na het besmetten en drogen ontsmet in formaline om de uitwendige sporen te doden (0,5% formaline gedurende 15 minuten, daarna direct terugdrogen). Tevens werd een deel van de bollen niet besmet en werd tenslotte nog eens een deel bollen na het dompelen in de sporensuspensie direct gedroogd.

De resultaten van de proeven werden statistisch verwerkt met de Anova methode met behulp van het programma Genstat (12^e editie).

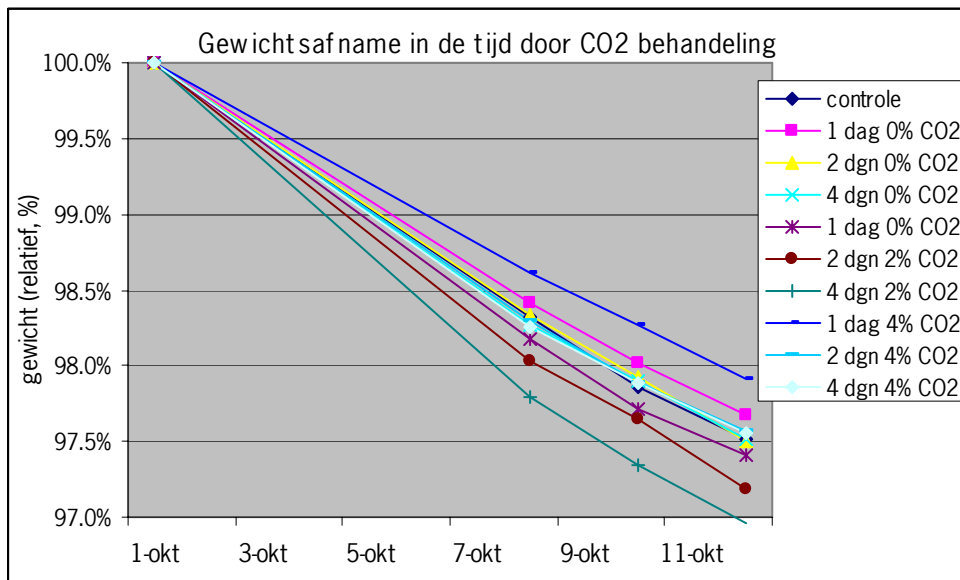
2.3 Resultaat

2.3.1 Onderzoek naar een geschikte CO₂-dosering.

De resultaten van de metingen van het bolgewicht zijn in tabel 4 en figuur 3 weergegeven. De CO₂-dosering bleek niet erg effectief in het beïnvloeden van de gewichtafname. De verschillen waren klein en de lijnen liepen dan ook erg dicht bijeen. De controle (behandeling 1) liep daar middendoor. Het grootste gewichtsverlies was bereikt na 4 dagen 2% CO₂, het kleinste na 1 dag 4% CO₂.

Tabel 4 Relatief gewicht van de bollen op 4 tijdstippen na een aantal CO₂-behandelingen. (1 okt is 100%)

Behandeling			meetdata			
Nr.	CO ₂ – dosering	aantal dagen	1-okt	8-okt	10-okt	12-okt
1	0.03%		100%	98.3%	97.9%	97.5%
2	0.03%	1 dg	100%	98.4%	98.0%	97.7%
3	0.03%	2 dg	100%	98.3%	97.9%	97.5%
4	0.03%	4 dg	100%	98.3%	97.9%	97.5%
5	2%	1 dg	100%	98.2%	97.7%	97.4%
6	2%	2 dg	100%	98.0%	97.6%	97.2%
7	2%	4 dg	100%	97.8%	97.3%	97.0%
8	4%	1 dg	100%	98.6%	98.3%	97.9%
9	4%	2 dg	100%	98.3%	97.9%	97.6%
10	4%	4 dg	100%	98.3%	97.9%	97.6%



Figuur 3 Gewichtsafname in de tijd van tulpenbollen na een CO₂-behandeling. De bijbehorende waarden staan in tabel 4.

Door de toedieningsduur van CO₂ werd geen noemenswaardig verschil in gewichtsafname veroorzaakt (tabel 5). Op de eerste meetdatum (8 oktober) was het gewichtsverlies na een behandeling van 4 dagen met CO₂ groter dan na een behandeling van 1 dag. Op de tweede en derde meetdatum (10 en 12 oktober) werd het verschil groter, maar nam ook de spreiding in de waarnemingen toe, waardoor er toen geen statistisch verschil meer was.

Het gewichtsverlies was na een behandeling met 2% CO₂ groter dan na de behandeling zonder extra CO₂ (tabel 6). Opvallend was dat het gewichtsverlies na blootstelling aan 4% CO₂ kleiner was dan dat aan 2%. Bij 4% CO₂ was het gewichtsverlies gelijk aan dat bij 0,03%.

Tabel 5 Gewichtsverlies (verschil met 100%) na 1, 2 of 4 dagen behandelen met CO₂. n.s. = niet significant

	1 dag CO ₂	2 dagen CO ₂	4 dagen CO ₂	lsd
gewichtsverlies na 7 dagen	1.6% a	1.8% ab	1.9% b	0.2
gewichtsverlies na 9 dagen	2.0%	2.2%	2.3%	n.s.
gewichtsverlies na 11 dagen	2.3%	2.6%	2.7%	n.s.

Tabel 6 Gewichtsverlies (verschil met 100%) na blootstelling van de bollen aan 0,03, 2 of 4% CO₂.

	0.03% CO ₂	2% CO ₂	4% CO ₂	lsd
gewichtsverlies na 7 dagen	1.7% a	2.0% b	1.6% a	0.2
gewichtsverlies na 9 dagen	2.1% a	2.4% b	2.0% a	0.2
gewichtsverlies na 11 dagen	2.4% a	2.8% b	2.3% a	0.3

2.3.2 Resultaat droge bolontsmetting

2.3.2.1 Proeven in 2007

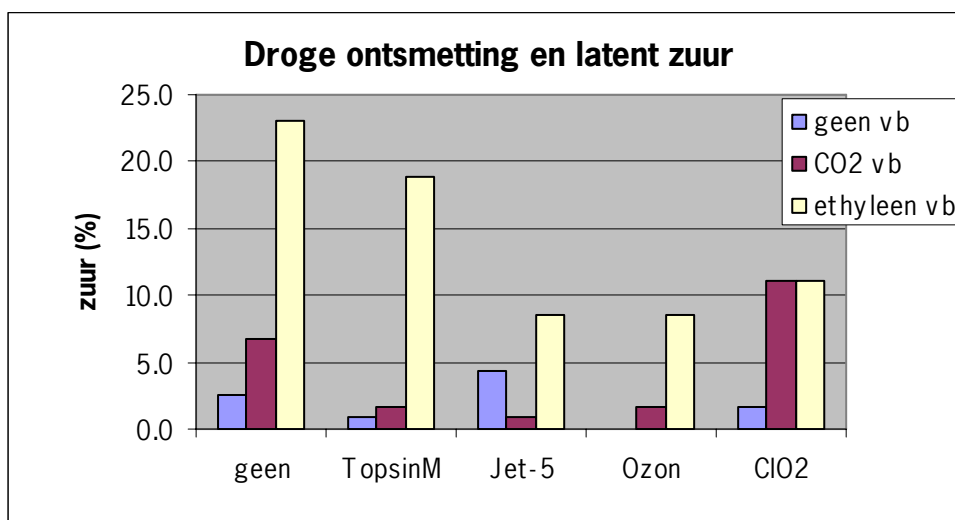
Bij het bepalen van het zuurpercentage bleek dat het effect van de ontsmetting afhankelijk van de voorbehandeling verschilde. In tabel 7 staan de uitslagen gegroepeerd per voorbehandeling (geen voorbehandeling, CO₂ of ethyleen). Bij geen voorbehandeling trad gemiddeld 1,9% en maximaal 4,3% zuur op en was er geen verschil tussen de ontsmettingsmiddelen.

Bij de behandelingen waarbij CO₂ was gebruikt als middel om de waspropjes te verwijderen was het gemiddelde zuurpercentage 4,4%. Met name bij geen ontsmetting en ontsmetting met chloordioxide waren de percentages zuur hoger: geen ontsmetting 6,8% en chloordioxide 11,1%. Dit laatste was significant hoger dan de percentages zuur bij ontsmetting met Jet-5, Ozon en Topsin M. Bij de onbesmette controle (niet in tabel) trad geen aantasting door zuur op.

Na gebruik van ethyleen om de waspropjes te verwijderen steeg het zuurpercentage gemiddeld naar 14%. Als niet werd ontsmet trad 23,1% zuur op. Na gebruik van een ontsmettingsmiddel werd dit getal verlaagd naar 8,5% (door Jet-5 en Ozon) en naar 11,5% (chloordioxide). Topsin-M had geen reducerend effect op het zuurpercentage. Een grafische weergave van het effect op zuur van de diverse ontsmettingsmethoden wordt gepresenteerd in figuur 4.

Tabel 7 Resultaat van de ontsmettingsproef zoals uitgevoerd met de eerste serie bollen. Lsd = 7,3. Uitslagen met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (dus gelijk) aan elkaar.

Voorbehandeling	Ontsmetting	Zuurpercentage (%)
geen	Ozon	0.0 a
geen	Jet-5	4.3 abc
geen	ClO ₂	1.7 ab
geen	Topsin-M	0.9 a
geen	geen	2.6 ab
CO ₂	Ozon	1.7 ab
CO ₂	Jet-5	0.9 a
CO ₂	ClO ₂	11.1 c
CO ₂	Topsin-M	1.7 ab
CO ₂	geen	6.8 abc
ethyleen	Ozon	8.5 bc
ethyleen	Jet-5	8.5 bc
ethyleen	ClO ₂	11.1 c
ethyleen	Topsin-M	18.8 d
ethyleen	geen	23.1 d



Figuur 4 Grafische weergave van het percentage zuur bij combinaties van een voorbehandeling (vb) en een ontsmettingsmiddel.

2.3.2.2 Droge bolontsmetting in 2008

In de volgende 3 tabellen (tabel 8, 9 en 10) staan de zuurpercentages aan het eind van de bewaring en nadat latent zuur was opgewekt. Bij geen van de 3 ontsmettingsmiddelen (toegepast na een voorbehandeling met CO₂) of doseringen trad een vermindering van het percentage zuur op ten opzichte van de niet ontsmette controle.

Tabel 8 Percentage zuur van de bollen die waren ontsmet met 0,4 ppm ozon gedurende 1, 2 of 4 dagen. n.s.: niet significant

Ozon doseertijd	controle	1 dag	2 dagen	4 dagen	
percentage zuur	27%	37%	29%	24%	n.s.

Tabel 9 Percentage zuur na een ontsmetting met Jet-5 (25, 50 of 100 mg perazijnzuur per kg bollen).

Jet-5 doseertijd	controle	25mg/kg bollen	50 mg / kg	100 mg / kg	
percentage zuur	27%	32%	32%	29%	n.s.

Tabel 10 Zuurpercentage van tulpen na diverse combinaties van tijd dosering van chloordioxide (gas).

dosering \ tijd	controle	5 mg /kg	10 mg/kg	20 mg/kg	
2 uur	27%	29%	28%	30%	n.s.
5 uur	27%	28%	30%	33%	n.s.

Voor deze proef waren de bollen op meerdere manieren besmet. Bovenstaande resultaten zijn verkregen met de bollen die na besmetting 24 uur vochtig hadden gestaan.

In tabel 11 staan de gemiddelde zuurpercentages van deze en de andere besmettingswijzen vermeld. Hierin was een duidelijk effect waarneembaar. Bollen zonder besmetting werden maar voor 1,8% zuur zien en met besmetting resulteerde dat in 19,5% zuur als direct na de besmetting werd gedroogd. Hieruit bleek dat de gebruikte partij 'Leen van der Mark' een zeer lage eigen besmetting had en dat snel drogen (nog steeds) zinvol is ter voorkoming van zuur.

Als de bollen eerst 24 uur nat (niet geventileerd) stonden voordat ze werden gedroogd leverde dat gemiddeld 29,9% zuur op. Ten opzichte van direct drogen was hier sprake van een stijging met ruim 10% zuur. Met de dompeling in formaline werden wellicht wel sporen gedood op de bol, maar door de extra dompeling ontstond nog een paar procent meer zuur, als gevolg van de extra bevochtiging hierdoor.

Ondanks de verschillen in zuuraantasting als gevolg van de wijze van besmetten zijn er hier geen effecten van de droge bolontsmetting waargenomen.

Tabel 11 Verschillen in zuurpercentage als gevolg van de wijze van besmetten.

Besmettingswijze van de bollen	Zuur (%)
Niet besmet	1.8 a
besmet + 24 uur nat (langzaam drogen)	29.9 c
idem maar uitwendig ontsmet met Formaline	34.1 d
besmet en direct drogen	19.5 b

LSD = 2.5

2.4 Discussie

Droge ontsmetting heeft soms een bestrijdend effect op zuur. In het eerste jaar werd een reductie op het ontstaan van zuur van 50% gerealiseerd in de behandelingen waar was voorbehandeld met ethyleen. Dit positieve resultaat kon in 2008 niet worden herhaald. In dat tweede jaar werd geen ethyleen meer gebruikt om de waspropjes te laten verdwijnen. Met CO₂ bleek in geen van beide proefjaren een effect op te treden op het percentage zuur in de controle. Bovendien was er ook geen effect van de droge ontsmettingsbehandelingen op het percentage zuur.

De aangetoonde ontsmettende werking van de verschillende behandelingen lijkt meer verband te houden met de wijze van voorbehandeling (ethyleen of CO₂). Ethyleen stimuleert dus niet alleen het ontstaan van zuur in de tulpenbol (zoals reeds geconcludeerd in hoofdstuk 1 van dit rapport), maar ook het opwekken van latent zuur.

Om meer zekerheid te krijgen omtrent de mogelijkheid van het toepassen van droge ontsmetting, is vervolgonderzoek gestart in 2009.

2.5 Conclusie

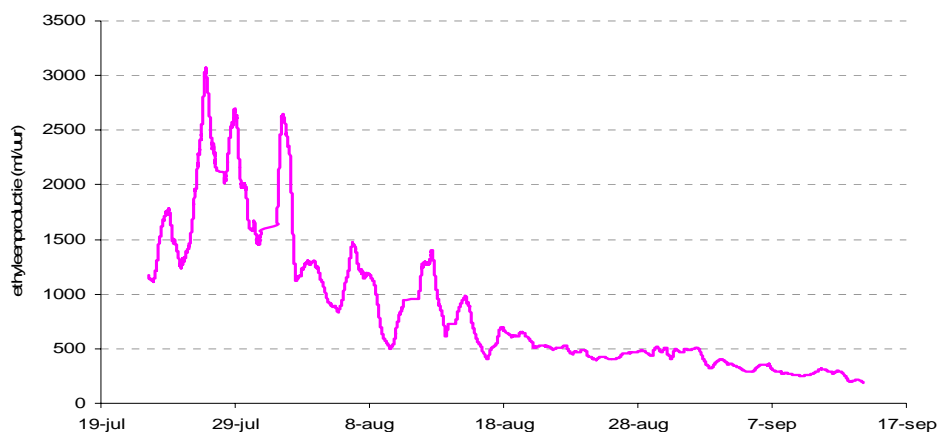
- De middelen Ozon, Jet-5 (verneveld) en chloordioxide (gas) kunnen onder bepaalde omstandigheden een latente infectie door *Fusarium* deels bestrijden.
- Voorbehandeling met CO₂ blijkt uit dit onderzoek niet geschikt om effectief een droge ontsmetting uit te voeren.
- Een bijkomende conclusie (heeft geen directe relatie met het doel van dit hoofdstuk) is dat latent zure bollen door ethyleen worden opgewekt tot zichtbaar zure.

3 Ethyleen en FreshStart direct na rooien

3.1 Inleiding

Ethyleen, afkomstig van zure bollen, veroorzaakt bij tulpen een aantal ongunstige effecten. Het bevordert bijspuiten, verkleistering, gommen, bloemverdroging en kernrot. Ethyleen verhindert ook de aanmaak van tulipaline (Beijersbergen 1973). Daarmee verlaagt ethyleen de weerstand van de bol tegen de zuurschimmel. In recent onderzoek (van Dam 2007) bleek de combinatie van ethyleen en beschadiging van de bol tot sterk verhoogde percentages zuur te leiden. Het ging dan om een verdubbeling tot zelfs verzesvoudiging van het percentage. Deze sterke toename van zuur door ethyleen treedt al op bij waarden van 1000 ppb. Dergelijke ethyleenconcentraties zijn in de praktijk niet ongebruikelijk. Eén van die situaties is de periode kort na het rooien: de bollen produceren dan veel ethyleen als gevolg van de stress door het rooien. Als er ook nog zuur aanwezig is, loopt de concentratie snel op naar nog hogere waarden. Ter illustratie wordt in figuur 4 de ethyleenproductie van een partij tulpen uit de praktijk weergegeven. Hierin is goed te zien dat de ethyleenproductie in het begin van de bewaring (na het rooien) veel hoger ligt dan later in de bewaring. De negatieve invloed van ethyleen moet op een zo vroeg mogelijk moment worden voorkomen. Het vermoeden bestaat dat de toegenomen gevoeligheid door zuur blijvend is.

Dit onderzoek bestudeert de invloed van ethyleenophoping rond het moment van rooien op zuur. Daarbij is onderzocht of de ethyleenremmer FreshStart de negatieve invloed van die ophoping kan verminderen. Uit het Fusariumonderzoek in voorgaande jaren is al meer dan eens gebleken dat extra uitval door zuur als gevolg van ethyleen door FreshStart kon worden voorkomen (zie ook hoofdstuk 1 van dit rapport). Het lijkt daarbij logisch om het middel zo vroeg mogelijk na het rooien toe te passen. Als tweede doelstelling is onderzocht hoe lang het effect van ethyleen op de verhoogde gevoeligheid voor zuur aanwezig bleef in de bollen.



Figuur 4. Praktijkvoorbeeld van ethyleenproductie van tulpen tijdens de bewaring vanaf het rooien. (Bron J. Wildschut 2009).

3.2 Materiaal en methode

Bollen van de cultivar Oratorio werden gerooid op 30 juni en direct gedurende 24 uur blootgesteld aan ethyleen; een deel aan 1000 ppb en een deel aan 10.000 ppb. Bollen die aan 10.000 ppb werden blootgesteld waren daarvoor eerst al dan niet met FreshStart behandeld. De bollen werden vervolgens gedroogd en bewaard bij 20°C. Daarna werd een deel van de bollen na 3 en een deel na 17 dagen gepeld, besmet met sporen (Fusarium) en gedurende 24 uur nat opgeslagen voordat ze weer werden gedroogd (de eerder be-

schreven methode om latent zuur te laten ontstaan; zie schema in tabel 12). Als controle werd ook een aantal bollen vanaf het rooien en drogen onbehandeld bewaard.

Pellen en besmetten na 3 en 17 dagen was zo gekozen, omdat dan een deel bollen nog binnen de werkingsduur van FreshStart (12 dagen 100% bescherming) en een deel van de bollen buiten die werkingsduur een infectiekans kregen.

De proef werd uitgevoerd met eenheden van 100 bollen in 3 herhalingen. Eind september werden de bollen 5 dagen aan hoge RV blootgesteld. Daarna werd het percentage zuur van de behandelingen beoordeeld. De resultaten van de proeven werden statistisch verwerkt met de Anova-methode met behulp van het programma Genstat (12^e editie).

Tabel 12 behandelingschema FreshStart en ethyleen direct na het rooien, zoals uitgevoerd in juni 2008.

Nr	Behandeling direct na rooien	Pellen+besmetten na...
1	geen (controle ongepeld)	(niet gepeld)
2	geen (controle gepeld)	3 dagen
3	geen (controle gepeld)	17 dagen
4	ethyleen 1000 ppb	3 dagen
5	ethyleen 1000 ppb	17 dagen
6	ethyleen 10.000 ppb	3 dagen
7	ethyleen 10.000 ppb	17 dagen
8	FreshStart + ethyleen (10.000 ppb)	3 dagen
9	FreshStart + ethyleen (10.000 ppb)	17 dagen

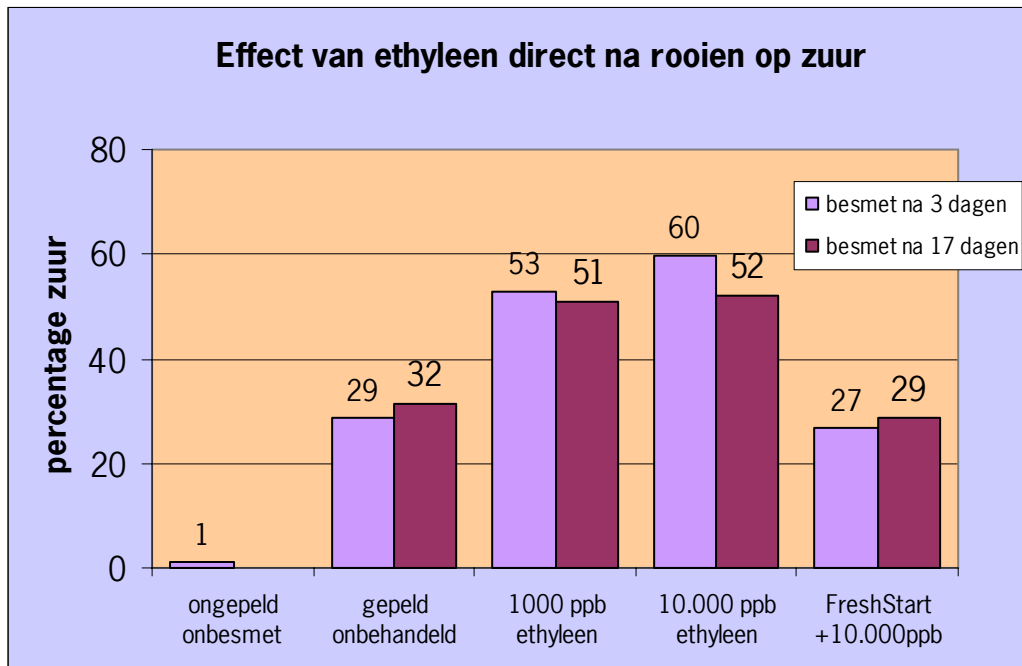
3.3 Resultaat

De resultaten van deze proef staan vermeld in Tabel 13 en in Figuur 5. In de bollen uit de controle (geen behandeling met FreshStart of ethyleen, wel gepeld en besmet) werd gemiddeld over de 2 besmettingsperiodes (na 3 of na 17 dagen) 30% zuur gevonden. In de bollen die direct na het rooien aan ethyleen waren blootgesteld was er bijna een verdubbeling van dat percentage naar gemiddeld 52% zuur bij 1000 ppb ethyleen en 56% zuur bij 10.000 ppb ethyleen. Bij de bollen die waren behandeld met FreshStart voordat ze aan ethyleen waren blootgesteld trad 28% zuur op. Dit percentage was gelijk aan het percentage zuur bij de bollen die niet aan ethyleen waren blootgesteld.

Er was geen verschil in het percentage zure bollen tussen de behandelingen die 3 of 17 dagen na rooien waren besmet. Ethyleen had een duidelijk stimulerend effect op het percentage zure bollen. Dit effect was even groot voor de beide toegepaste doseringen van ethyleen (1000 of 10.000 ppb). Bij de met FreshStart behandelde bollen was de hoogste concentratie ethyleen gegeven. De preventieve werking van de ethyleenremmer was hier nog steeds afdoende.

Tabel 13 Zuurpercentage aan het eind van de bewaring van bollen die blootgesteld waren aan ethyleen (soms voorafgegaan door FreshStart) kort na het rooien.

Nr	Behandeling direct na rooien	Pellen+besmetten na...	zuur (%)	zuur gemiddeld 2 datums (%)
1	geen (controle ongepeld)	niet gepeld	1 a	1
2	geen (controle gepeld)	3 dagen	29 cd	
3	geen (controle gepeld)	17 dagen	32 cd	30
4	ethyleen 1000 ppb	3 dagen	53 e	
5	ethyleen 1000 ppb	17 dagen	51 e	52
6	ethyleen 10.000 ppb	3 dagen	60 e	
7	ethyleen 10.000 ppb	17 dagen	52 e	56
8	FreshStart + ethyleen (10.000 ppb)	3 dagen	27 cd	
9	FreshStart + ethyleen (10.000 ppb)	17 dagen	29 cd	28
LSD = 9				



Figuur 5 Zuurpercentages als gevolg van blootstelling aan ethyleen kort na het rooien. Bollen zijn gepeld en besmet op de 3^e of 17^e dag na rooien.

3.4 Discussie

De proef laat zien dat de aanwezigheid van ethyleen kort na de oogst de kans op zuur sterk verhoogt. Het effect is zowel bij besmetten 3 dagen na rooien als bij besmetten 17 dagen na rooien te zien en is op beide tijdstippen even groot.

Een verklaring hiervoor is dat blootstelling aan ethyleen de aanmaak van tulipaline in de eerste rok verhindert (Beijersbergen 1973). De weerstand van de tulp tegen zuur infectie neemt daardoor af. Tulipaline wordt in de eerste dagen na het rooien aangemaakt. Als het aanmaakproces van tulipaline is gestopt is daarna de bol blijvend verzwakt voor zuur. Een hoog percentage zuur kan daardoor ook ontstaan op een veel later tijdstip. Voor een dergelijke uitbraak is de aanleiding vaak een behandeling waarbij beschadiging optreedt of omstandigheden met hoge RV.

Er is geen verschil in de mate van aantasting tussen de twee concentraties ethyleen (1000 ppb of 10.000 ppb) die zijn toegepast. Dit geeft een duidelijke aanwijzing dat 1000 ppb waarschijnlijk al een maximale toename van zuur veroorzaakt. Dit betekent dat het stimulerende effect van ethyleen op de zuuraantasting waarschijnlijk al optreedt bij lagere ethyleengehaltes. Het is nog niet bekend bij welke combinaties van ethyleengehalte of blootstellingsduur er gevaar dreigt, Het verdient aanbeveling om de proef ook uit te voeren bij in de praktijk veel voorkomende lagere ethyleengehaltes (tussen 100 en 300 ppb).

Gezien de resultaten van deze proef zouden hoge percentages zuur door ethyleen op bedrijven voorkómen kunnen worden. Dit kan door sterk te ventileren om daarmee de ethyleenconcentraties laag te houden. Er blijken ondanks ventilatie toch nog regelmatig situaties voor met (gemeten) waarden tussen 300 en 1000 ppb. Een tweede mogelijkheid is om ethyleeneffecten te voorkómen door voorbehandeling met FreshStart. Extra zuur door ethyleen werd in dit onderzoek inderdaad voorkomen door het toepassen van FreshStart. Ervaring met het toepassen van FreshStart tijdens de bewaring op een later tijdstip is al opgedaan (Gude 2009) met de bedoeling om invloed uit te oefenen op de verkleistering en het voorkomen van gommen en bloemverdroging. De toepassing van FreshStart tegen zuur zal bij voorkeur zeer snel na het rooien moeten worden uitgevoerd, voordat de bollen in contact komen met ethyleen. Dat is met de huidige werkwijze niet altijd praktisch uitvoerbaar. Bollen moeten na het rooien soms over grote afstand worden vervoerd. Daarbij

is voor een goede werking van FreshStart toediening in een vrijwel dichte bewaarcel nodig. De bollen moeten tijdens de behandeling minimaal 8 uur zonder ventilatie in de cel blijven staan. Tenslotte: de behandeling met FreshStart is niet goedkoop, maar de kosten kunnen opwegen tegen de baten door minder uitval. Een advies voor de toepassing van FreshStart tegen zuur kan nog niet worden gegeven. Er zal daarvoor eerst moeten worden onderzocht of de behandeling in een kortere tijd kan worden gegeven en of dat dit kan in een licht geventileerde ruimte of in afsluitbare kuubskisten.

Conclusies uit het onderzoek van Proeftuin Zwaagdijk (2003 t/m 2007) zijn, dat vroeg pellen (1 week na rooien) en laat pellen (meer dan 5 weken na rooien) gunstiger zijn t.a.v. zuur dan pellen 3 weken na het rooien. Voor een geschikt pelmoment zal in ieder geval de aanmaak van tulipaline in de bolrok veiliggesteld moeten zijn. Hiervoor is 4 tot 6 dagen nodig (Beijersbergen 1973). FreshStart kan dit proces versnellen. Vervolgens moeten de bollen ook zo snel mogelijk droog zijn om de kans op infectie in te dammen. Theoretisch ontstaat daarmee het eerst mogelijke, gunstige pelmoment tussen een halve week en 1 week na het rooien. Of dit ook praktijk zal blijken te zijn valt te betwijfelen. Er zijn zeer veel factoren en nog onbekende processen die het ontstaan van zuur bepalen.

3.5 Conclusies

- Tulpenbollen worden gevoeliger voor zuur na blootstelling aan ethyleen. Deze verhoogde gevoeligheid blijft minstens 17 dagen aanwezig.
- Bollen die worden beschermd tegen ethyleen door een behandeling met FreshStart vooraf, vertonen niet deze toename van zuur.
- Goede ventilatie direct vanaf het rooien eventueel aangevuld met een toepassing met FreshStart voorkomt extra zuur door ethyleen. De aanvulling met FreshStart direct na rooien is met name effectief omdat de eerste 4 à 5 dagen na het rooien het ethyleengehalte niet altijd voldoende laag kan worden gehouden met ventilatie.

4 Algemene conclusies en aanbevelingen

In de voorgaande hoofdstukken werd onderzoek beschreven naar de rol van huidmondjes bij het ontstaan van zuur (hoofdstuk 1), en hoe latent zuur al dan niet in huidmondjes kan worden bestreden met een droge ontsmettingstechniek (hoofdstuk 2). Ook werd de rol van ethyleen direct na het rooien van de bollen onderzocht (hoofdstuk 3).

Ethyleen kwam tijdens deze onderzoeken steeds naar voren als een sterk bevorderende factor in het ontstaan van zuur. Daarbij bleek dat de stimulerende rol niet werd veroorzaakt door het verwijderen van de wasprop voor de huidmondjes, maar dat dit te maken heeft met een interactie tussen ethyleen en de tulp enerzijds en ethyleen en de schimmel anderzijds. Welke processen daarbij precies een rol spelen is nog niet duidelijk maar zowel het tulpenweefsel (weerstand) als de schimmel (agressiviteit) kunnen worden beïnvloed door ethyleen. Naar deze en andere factoren die invloed hebben op de infectiekans is een project gestart door PPO, in samenwerking met PRI en de Universiteit van Utrecht en gefinancierd door LNV. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een techniek die het mogelijk maakt de schimmel zichtbaar te maken (d.m.v. fluorescentie) tijdens de infectie en groei in een plant.

Voor de praktijk zou de vraag bij welke minimale ethyleenconcentratie en blootstellingsduur er nog effect van ethyleen op zuur optreedt, nog moeten worden beantwoord.

Ethyleen had niet alleen een stimulerend effect op het infectieproces van *Fusarium*, maar ook op het opwekken van latente infecties. Dat bleek in de proeven waarin geprobeerd werd latente infecties te bestrijden met droge ontsmettingstechnieken na pogingen om de huidmondjes te openen met behulp van ethyleen of CO₂. Droge ontsmetting had in één van de twee proefjaren effect. Er trad een halvering van het zuurpercentage op als de stoffen werden toegepast na een blootstelling van tulpen aan ethyleen om de waspropjes te laten verdwijnen. Na toediening van CO₂ werden geen effecten van de ontsmettingsmiddelen geconstateerd. In het tweede jaar was ervoor gekozen om de voorbehandeling met ethyleen niet in de proefopzet op te nemen. Het idee van een droge ruimteontsmetting blijft interessant omdat de bollen droog blijven en de toediening erg praktisch en makkelijk uitvoerbaar is. Verder onderzoek is nodig om de eerste resultaten te bevestigen en om de middelen te testen in een groter aantal combinaties van concentratie en toepassingsduur.

Extra zuur ontstaat als tulpenbollen worden blootgesteld aan ethyleen. Als preventief FreshStart wordt toegepast kan deze toename van zuur consequent worden voorkomen. Een FreshStarttoediening kort na het rooien lijkt zeer effectief de bol te kunnen beschermen tegen ethyleen. Op deze wijze kunnen de bollen veilig door de periode (tot ca 5 dagen na het rooien) met veel ethyleenophoping worden geloodst. Voor de praktijk betekent dit dat het toepassen van FreshStart, het monitoren van de ethyleenconcentratie en het sturen van de bewaarcondities hierop kunnen bijdragen aan het voorkómen van zuur in tulpen. Aan vroege toepassing van FreshStart kleven nog veel praktische bezwaren. Om hierover een goed advies te kunnen geven is herhaling van dit deel van het onderzoek nodig, waarbij een aantal experimentele toedieningsmethoden worden gescreend op bruikbaarheid en effectiviteit.

Literatuur

Anoniem. Informatie pamflet van ICA TriNova LLC, Georgia USA. Chlorine dioxide gas products.

Beijersbergen, J.C.M. en Bergman, B.H.H., 1973. The influence of ethylene on the possible resistance mechanism of the tulip (*Tulipa* spp.) against *Fusarium oxysporum*. *Acta botanica neerlandica*, Jg:1973 Vol:22 Pg:172

Bergman, B. H. H., 1965. Field infection of tulip bulbs by *Fusarium oxysporum*. *Neth. J. Pl. Path.* 71: 129–135.

Bergman, B. H. H., 1975. A device for the incubation of *Fusarium*-inoculated tulip bulbs in a constant air stream. *Neth. J. Pl. Path.* 81: 154–156.

Bergman, B. H. H. & Beijersbergen, J. C. M., 1971. A possible explanation of variations in susceptibility of tulip bulbs to infection by *Fusarium oxysporum*. *Acta Hort.* 23: 225–229.

Chastagner, Dr. Gary A., 200?. Update on new fungicides and the use of chlorine dioxide gas to control diseases on ornamental bulb crops. University paper.

Chastagner, Dr. Gary A., Riley, Kathleen L., 2002. Potential use of chlorine dioxide to prevent the spread of *Fusarium* basal rot during the hot water treatment of daffodil bulbs. Proceedings 8th international symposium on flowerbulbs. *Acta Hort.* 570, ISHS 2002, p267- 273.

Cristescu, Simona M., Woltering, Ernst J., Harren, Frans J.M., 2007. Real time monitoring of ethylene. Hoofdstuk 2 van dit boek. Radboud Universiteit Nijmegen.

Dam, M.F.N. van, Gude, H., Werd, H.A.E. de en Koster, A., juni 2007. De rol van huidmondjes op de bol in het ontstaan van zuur bij tulpen. PPO rapport 3236029400.

Dijksterhuis, J., et al 2009. Duurzame bolontsmetting. Rapport van Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

Gude, H., Dam, M.F.N. van, Dijkema, M. 2009 FreshStart voorkomt ethyleenproblemen in tulp. Poster Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Kreuk, Frank, Proeftuin Zwaagdijk 2008. Praktische aanpak zuur in tulpen. Lezing gehouden in voorjaar 2008 van onderzoek lopend vanaf 2003.

Olsen, Nora L., Kleinkopf, Gale E. and Woodell, Lyn K., 2003. Efficacy of Chlorine dioxide for disease control on stored potatoes. *American Potato Journal*, 80: p387-395.

Werd, H.A.E. de, en Breeuwsma S.J., 2007. Ruimteontsmetting d.m.v. verneveling van reinigingsmiddelen. Praktijkonderzoek Plant & Omgeving BV, sector Bloembollen, juni 2007 PPO project 3234039700.

Wild, H. de. 2005. Wasprop in tulpenbollen biedt weerstand tegen verdroging en *Fusarium*. *Bloembollencultuur* (2005) 69, p24-25.