



Chalara wortelrot in perkplanten

Ontwikkelen van een systeem om effecten van teeltmaatregelen en middelen op uitval bij Petunia door *Chalara* te kunnen bepalen.

Jos Wubben, Dirk Jan van der Gaag, Ineke Bosker en Conny Lanser, Jeroen van der Hulst

NIET VOOR PUBLICATIE

Project 41103306

© 2003  eningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw te Zoetermeer



Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Glastuinbouw

Adres : Linnaeuslaan 2a, 1431 JV, Aalsmeer

Tel. : 0297 - 352 303

Fax : 0297 - 35 22 70

E-mail : info@ppo.dlo.nl

Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1 INLEIDING	4
2 MATERIAAL EN METHODEN	5
2.1 Schimmelisolaten en cultuurmedium.....	5
2.2 Inoculum productie voor infectieproeven.....	5
2.3 Plantmateriaal en infectieproeven.....	6
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	7
3.1 Effect isolaat op uitval	7
3.2 Effect inoculatiemethode	7
4 CONCLUSIE.....	9
GERAADPLEEGDE LITERATUUR.....	10

1 Inleiding

Uitval in perkgoed door *Chalara elegans* (ook wel *Thielaviopsis basicola* genoemd) is op de meeste bedrijven een groot probleem met uitvalpercentages oplopend tot 100%. Schade wordt niet alleen veroorzaakt door directe uitval. Bij automatische verwerking van het plantmateriaal (verspenen en oppotten) leidt uitval tot extra arbeid omdat de trays handmatig ingeboet moeten worden.

PPO Glastuinbouw heeft medio 2002 een inventarisatie uitgevoerd welke een literatuurstudie en bedrijfsinventarisatie omvatte. Naar aanleiding van deze inventarisatie werden een aantal aanbevelingen gedaan. Door aanpassing van de teeltcondities en/of optimale toediening van chemische middelen op basis van carbendazim, kan uitval door *Chalara* vermoedelijk worden verminderd. Om het effect van diverse maatregelen op uitval te kunnen bepalen is een toetssysteem nodig. De doelstelling van het onderzoek dat in dit verslag beschreven wordt, is het ontwikkelen van een systeem om effecten van teeltmaatregelen en middelen op uitval bij *Petunia* door *Chalara* te kunnen bepalen.

Zowel uit literatuurgegevens als uit eigen onderzoek is gebleken dat besmettingsproeven met *Chalara* niet altijd tot het gewenste resultaat leiden. Verschillende oorzaken kunnen hieraan ten grondslag liggen. Isolaten kunnen gespecialiseerd zijn voor een bepaalde waardplant. Een andere mogelijkheid is dat isolaten het infecterend vermogen kunnen verliezen tijdens opslag. Bij aanvang van het onderzoek zijn verschillende isolaten van *C. elegans* verzameld uit een bestaande collectie, uit plantmateriaal uit de praktijk, en uit plantmateriaal afkomstig van de Plantenziektenkundige Dienst. Vervolgens is bekeken in hoeverre deze isolaten groeiden op kunstmatige voedingsbodems en of deze isolaten in staat waren om *Petunia* zaailingen te besmetten wanneer de schimmel in overmaat aan de potgrond toegevoegd werd. Van een drietal isolaten die aantasting bij *Petunia* veroorzaakten werd in een uitgebreide infectieproef onderzocht welke vorm en welke concentratie van de schimmel een gemiddelde aantasting van zaailingen geeft. De resultaten hiervan staan in de volgende hoofdstukken beschreven.

2 Materiaal en methoden

2.1 Schimmelisolaten en cultuurmedium

Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van verschillende bronnen van *C. elegans*. Een isolaat was afkomstig uit de isolatencollectie van PPO Glastuinbouw (isolaat 5.1). Een isolaat is verkregen door isolatie van de schimmel uit aangetast plantmateriaal beschikbaar gesteld door de Plantenziektenkundige Dienst (isolaat PD). Daarnaast zijn een aantal isolaties uitgevoerd uit aangetast plantmateriaal (violen zaailingen) afkomstig van een perkplantenteler (Isolaat Chal1-4).

Voor opkweek van *C. elegans* is gebruik gemaakt van Wortelagar. Voor de isolatie van *C. elegans* uit besmet plantmateriaal is gebruik gemaakt van TB-CEN medium.

5% wortel agar

Per liter

50 ml wortelsap (biologisch wortelsap, Albert Heijn)

20 gram Agar

aanvullen tot 1 liter met gedemiraliseerd water en autoclaveren bij 121°C gedurende 20 min.

TB-CEN medium

Per liter

50 ml wortelsap (biologisch wortelsap, Albert Heijn)

Etriazol 400 mg

Nystatin 250,000 units

Streptomycin Sulphate 500 mg

Chlortetracycline HCL 30 mg

CaCO₃ 1 g

Agar 15-20 g

aanvullen tot 1 liter en met gedemiraliseerd water en autoclaveren bij 121°C gedurende 20 min.

2.2 Inoculum productie voor infectieproeven

Voor de verschillende infectieproeven werd gebruik gemaakt van drie verschillende soorten inoculum; (1) Chlamydosporen (= aleuriosporen), (2) endoconidiën, (3) en aardemeelculturen. De verschillende inoculum bronnen werden als volgt geproduceerd.

Endoconidiën

Productie van endoconidiën werd in grote lijnen uitgevoerd zoals beschreven door Hood en Shew (1997 a en b). Volgroeide cultures van *C. elegans* op 5% wortelagar worden met 10 ml milliQ water van de voedingsbodem geschraapt met een spatel. De sporensuspensie werd vervolgens over een RVS zeef gegoten met een doorlaat van 0,053 mm. De concentratie van endoconidiën in het filtraat werd bepaald met een sporenteller. De endoconidiën werden met het petunia zaaimengsel gemengd en hiermee werden de zaaitrays gevuld. De proef met petunia zaailingen is ingezet met 3 concentraties endoconidiën namelijk 10-100-1000 sporen/ml grond.

Chlamydosporen of aleuriosporen.

Productie van chlamydosporen werd uitgevoerd zoals beschreven door Hood en Shew (1997 b). Volgroeide cultures van *Chalara* op 5% wortelagar werden overgebracht in een bekersglas met steriel milliQ water en hiervan werd met behulp van een staafmixer een suspensie gemaakt. Deze suspensie werd verder gemixt

met behulp van de Ultra Turrax om de chlamydosporen los te maken van de schimmeldraden. De suspensie werd vervolgens over een RVS zeef met 0,053 mm poriegrootte gefiltreerd. De myceliumresten blijven voornamelijk op dit filter liggen en chlamydosporen en endoconidiën zitten in het filtraat. Dit filtraat werd over een 0,025 mm RVS filter gegoten waarbij de endoconidiën grotendeels door het filter gaan en de chlamydosporen op het filter blijven liggen. De concentratie chlamydosporen werd geteld met een sporenteller. De chlamydosporen werden met petunia zaaimengsel gemengd en dit mengsel werd in de zaaitrays overgebracht. De proef werd ingezet met 3 concentraties chlamydosporen (10-100-1000 sporen/ml grond).

Aardemeel cultuur

Potgrond werd gezeefd (2-4 mm zeef) en gemengd met gemalen haverhout (2% w/w). Hieraan werd kraanwater toegevoegd zodanig dat het mengsel tot een bal te drukken was zonder dat er water uitliep. Het mengsel werd in een wijdhals erlenmeyer 300 ml overgebracht om vervolgens twee maal te steriliseren bij 121 ° gedurende 20 min. Het gesteriliseerde grondmengsel werd geënt met een ponsje van *C. elegans*. De volgende twee tot drie weken werd de grondcultuur enige malen gemengd. Na deze periode was de aardemeelcultuur volgroeid en werd deze gemengd met het zaaimengsel en overgebracht in de zaaitrays. Petunia werd hierin gezaaid en opgekweekt. Een besmettingsproef werd ingezet met 2 concentraties aardemeelcultuur in het potgrondmengsel (0,1 en 1,0 % [v/v]).

2.3 Plantmateriaal en infectieproeven

Voor de verschillende infectieproeven werd petunia gezaaid in breektrays gevuld met petunia zaaimengsel waarbij op verschillende manier *Chalara* aan het zaaimengsel toegevoegd was. Na opkomst van het plantmateriaal werd percentage uitval bepaald welke veroorzaakt zou zijn door *Chalara*.

Teeltomstandigheden:

Opkweek van zaaigoed in breektrays (42 gaten per tray)

Zaaimengsel: 0.75 PG-mix/L, pH 5,5

Gaten vullen met zaaimengsel, aandrukken en zaaien.

Zaaigoed: Petunia rood-witte cultivar

Watergift / voedingsoplossing: Bijna dagelijks water geven EC 0,5 opklimmend naar 1 met laag stikstof!

Na 3 weken remmiddel Alar 3 g/L in water wanneer 1^e blad duidelijk aanwezig is. Alar spuiten op de planten dusdanig dat de plant niet al te snel droog is.

Temperatuur instelling kasruimte: 18 °C voor de eerste twee weken en vervolgens terug naar 15 °C.

Zaaitrays werden de eerste week afgedekt met plastic om voldoende vochtige omstandigheden voor kieming te creëren. Na kieming van de zaadjes werd het plastic verwijderd.

3 Resultaten en discussie.

3.1 Effect isolaat op uitval

Voor een zestal isolaten is een 10 % aardemeelcultuur besmetting uitgevoerd zoals beschreven in 2.2 en 2.3. Per isolaat is de opkomst van de petunia zaailingen vastgesteld en het aantal zaailingen dat vervolgens uitviel. Er was een groot verschil in de opkomst van de zaailingen veroorzaakt door de aanwezigheid van grote hoeveelheid *Chalara* (Tabel 1).

Tabel 1. Opkomst en uitval van Petunia zaailingen als gevolg van inoculatie met verschillende isolaten van *Chalara* door middel van 10% aardemeelcultuur.

Isolaat	Opkomst totaal	Uitval 09-01-2003
PD	4	4
5.1	0	-
<i>Chalara</i> 1	8	9
<i>Chalara</i> 2	0	-
<i>Chalara</i> 3	11	9
<i>Chalara</i> 4	25	8

De wortels van omgevallen zaailingen waren duidelijk aangetast door *Chalara* zoals zichtbaar door de vorming van aleuriosporen op de aangetaste wortels. Aan de hand van deze resultaten kon nog geen definitieve keuze gemaakt worden welk isolaat voor de vervolgprouven gebruikt zou worden. Het is wel duidelijk dat de opgebouwde collectie een aantal isolaten bevat die geschikt zijn voor de ontwikkeling van het toetssysteem.

3.2 Effect inoculatiemethode

Met de isolaten PD, 5.1 en *Chalara* 3 werd een inoculatieproef uitgevoerd waarbij de zaailingen besmet werden met verschillende concentratie van drie verschillende inoculumsoorten zoals omschreven in hoofdstuk 2.2. Deze zaailingen zijn in een klimaatcel opgekweekt. De temperatuur werd ingesteld zoals onder hoofdstuk 2.3 beschreven. Relatieve luchtvochtigheid stond ingesteld op 80%. Met drie isolaten en acht inoculum behandelingen kwamen we inclusief onbehandelde controle op 25 behandelingen. Proef werd uitgevoerd in vier herhalingen. Bij geen van de behandelingen werd uitval direct na opkomst waargenomen. Er was enige variatie in opkomst (Tabel 2) maar hierin was geen duidelijk trend als gevolg van de behandelingen te herleiden (geen statistische analyses uitgevoerd).

Tabel 2. Opkomst van Petunia zaailingen na besmetting met *C. elegans*. Weergegeven is het gemiddeld aantal opgekomen Petunia zaailingen (max is 42) nadat de grond besmet was met verschillende concentraties van verschillende sporenvormen van een drietal isolaten van *C. elegans*.

Isolaat	controle	5.1	Ch 3	PD
controle	38			
Chlamydosporen 10 sporen/ml		38	38	36
Chlamydosporen 100 sporen/ml		34	36	37
Chlamydosporen 1000 sporen/ml		31	32	31
Endoconidiën 10 sporen/ml		39	37	32
Endoconidiën 100 sporen/ml		37	33	38
Endoconidiën 1000 sporen/ml		36	37	36
aardemeelcultuur 0,1% (w/w)		33	35	38
aardemeelcultuur 1,0% (w/w)		32	36	30
gemiddelde totaal		35	36	34

Een aantal zaailingen vertoonden duidelijk vergeling. Dit beeld kwam overeen met symptomen welke in de praktijk waargenomen zijn. Het optreden van de vergeling per behandeling is weergegeven in Tabel 3. Gemiddeld komt de vergeling in gelijke mate voor bij alle behandelingen (inclusief controle). Het is daarom niet waarschijnlijk dat dit veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van *C. elegans*.

Tabel 3. Percentage van Petunia zaailingen met chlorose verschijnselen na besmetting met *C. elegans*. Weergegeven is het gemiddeld percentage van de Petunia zaailingen met chlorose verschijnselen nadat de grond besmet was met verschillende concentraties van verschillende sporenvormen van een drietal isolaten van *C. elegans*.

Isolaat	controle	5.1	Ch 3	PD
controle	16			
Chlamydosporen 10 sporen/ml		11	11	13
Chlamydosporen 100 sporen/ml		14	10	15
Chlamydosporen 1000 sporen/ml		10	7	19
Endoconidiën 10 sporen/ml		14	14	12
Endoconidiën 100 sporen/ml		13	12	13
Endoconidiën 1000 sporen/ml		15	14	11
aardemeelcultuur 0,1% (w/w)		21	9	20
aardemeelcultuur 1,0% (w/w)		18	16	17
gemiddelde totaal		14	12	15

De resultaten van deze inoculatieproef zijn onbevredigend, temeer daar er in een eerste proef duidelijk uitval als gevolg van *Chalara* besmetting gevonden werd. Het belangrijkste verschil tussen deze proeven is de hogere inoculum hoeveelheid welke voor de eerste proef gehanteerd werd (10 % aardemeelcultuur). Mogelijk is dit ook de belangrijkste oorzaak van het uitblijven van aantasting bij deze proef. De concentratie van de schimmel kan te laag zijn. Het verdient aanbeveling om bij volgende proeven standaard een hoge concentratie inoculum mee te nemen.

4 Conclusie

Dit onderzoek heeft in zoverre niet het beoogde resultaat opgeleverd dat er geen duidelijk systeem ontwikkeld is waarmee de effecten van teeltmaatregelen en middelen op uitval bij Petunia door Chalara bepaald kan worden. Er zijn wel een aantal isolaten van *C. elegans* verzameld die Petunia zaailingen kunnen aantasten. Ondertussen is het onderzoek naar *Chalara* voortgezet (project 4110 3316) en hierbij is ondertussen wel een goed toetsysteem ontwikkeld uitgaande van 10% aardemeelcultuur als besmettingsbron. Een te lage inoculum concentratie is mogelijk een oorzaak van volledig ontbreken van uitval in de proef beschreven in hoofdstuk 3.2.

Geraadpleegde literatuur

Gaag D.J. van der, Hulst, J. van der (2002) Chalara wortelrot in perkplanten. Een inventarisatie. Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Wageningen. Intern verslag project 438550.25

Hood, M.E. & Shew, H.D. (1997a) Initial cellular interactions between *Thielaviopsis basicola* and tobacco root hairs. *Phytopathology* 87:228-235.

Hood, M.E. & Shew, H.D. (1997b) Reassessment of the role of saprophytic activity in the ecology of *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* 87:1214-1219.