

Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente  
Vestiging Aalsmeer  
Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer  
Tel. 0297-352525, fax 0297-352270

ISSN 1385 - 3015

## **EPIDEMIOLOGIE *PHYTOPHTHORA MULTIVESICULATA* BIJ CYMBIDIUM**

Project 3004

A. Hazendonk  
J.P. Wubben  
C. Lanser  
K. Uitermark  
P. Schrama  
Aalsmeer, oktober 2000

Rapport 299  
Prijs f 20,00

# INHOUD

1.	INLEIDING	5
2.	LITERATUURONDERZOEK <i>P. MULTIVESICULATA</i>	6
2.1	PHYTOPHTHORA ALGEMEEN	6
2.2	<i>PHYTOPHTHORA MULTIVESICULATA</i>	6
3.	DE WIJZE VAN BESMETTING EN DE SNELHEID VAN AANTASTING DOOR <i>P. MULTIVESICULATA</i>	8
3.1	1 <sup>E</sup> KASPROEF	8
3.1.1	Proefomstandigheden	8
3.1.2	Behandelingen	8
3.1.3	Waarnemingen	9
3.1.4	Resultaten	9
3.1.5	Conclusie	9
3.1.6	Extra proef: toevoegen van vermalen voedingsbodems met mycelium aan Cymbidiumplanten	9
3.2	2 <sup>E</sup> KASPROEF	10
3.2.1	Proefomstandigheden	10
3.2.2	Behandelingen	10
3.2.3	Waarnemingen	11
3.2.4	Resultaten	11
3.2.5	Conclusie	14
3.2.6	Extra proef: toevoegen van drainwater van met Phytophthora besmette planten aan gezonde planten	14
3.3	3 <sup>E</sup> KASPROEF	14
3.3.1	Kasklimaat plantmateriaal	14
3.3.2	Experimenten	15
3.3.3	Verspreiding vanuit plantresten van aangetaste planten	15
3.3.4	Verspreiding door slakken	16
3.3.5	Verspreiding door teelthandelingen	16
3.4	CONCLUSIES	17
4.	DE INVLOED VAN DE TEMPERATUUR OP DE GROEI-SNELHEID VAN <i>P. MULTIVESICULATA</i>	18
4.1	LABORATORIUMPROEVEN	18
4.2	INVLOED VAN DE TEMPERATUUR OP DE AANTASTING IN DE KAS	20
4.3	CONCLUSIES	20
5.	MOGELIJKHEDEN OM EEN AANTASTING DOOR <i>P. MULTIVESICULATA</i> TE BESTRIJDEN EN VOORKOMEN	21
5.1	CHEMISCHE BESTRIJDING	21
5.2	ANDERE MOGELIJKHEDEN OM AANTASTING TE BESTRIJDEN OF TE VOORKOMEN	21
	LITERATUURLIJST	22
	BIJLAGEN	23

# 1. INLEIDING

Uitval als gevolg van *Phytophthora* komt op *Cymbidium*bedrijven regelmatig voor. Uit monsters die de Plantenziektenkundige Dienst (PD) sinds 1991 ontvangen heeft, blijkt het om de tot nu toe onbekende soort *P. multivesiculata* te gaan. De literatuur over deze *Phytophthora* omvat slechts één artikel (Ilieva e.a., 1998), waarin de schimmel als nieuwe soort wordt beschreven.

Ondanks verschillende bestrijdingsmogelijkheden van *Phytophthora* blijkt het probleem voor *Cymbidium*telers niet of moeilijk beheersbaar. Er bestaan wel grote verschillen tussen bedrijven. Er zijn bedrijven die absoluut geen problemen hebben. Eénmaal een aangetaste partij op het bedrijf betekent wel dat men niet meer van deze aantasting afkomt. Volledige bestrijding van de schimmel is bijna niet mogelijk, omdat de schimmel op plaatsen groeit waar het bestrijdingsmiddel moeilijk komt. Problemen komen met name voor onder natte teeltomstandigheden. De aantasting begint bij de bladpunten wanneer deze in contact komen met de ondergrond. Daarna gaat de aantasting verder richting bulb, waarna de bulb en uiteindelijk de gehele plant wegroet. Soms is de aantasting te stoppen door het aangetaste deel van het blad weg te knippen, vaak is men echter te laat. De teelt van *Cymbidium* op betonvloeren met een eb/vloedsysteem heeft vanwege het optreden van *Phytophthora* een vroegtijdig einde gevonden. Enkele bedrijven hebben zelfs de betonvloeren weer verwijderd. In die periode werd *Phytophthora* 'betonrot' genoemd. Daarnaast wordt in de praktijk waargenomen dat een *Phytophthora*-aantasting ook kan beginnen bij de bulb. Mogelijk dringt de *Phytophthora* de plant binnen via de wortels. De omvang van het probleem is dermate groot dat de LTO-commissie *Cymbidium* in november 1998 onderzoek met betrekking tot *Phytophthora* bij *Cymbidium* met de hoogste prioriteit naar voren geschoven heeft.

Het doel van het onderzoek was nagaan op welke wijze en met welke snelheid *P. multivesiculata* de plant aantast. Daarnaast is uitgezocht in welke mate de temperatuur van invloed is op de groeisnelheid van deze *Phytophthora*.

De uitvoering van het onderzoek bestond uit drie onderdelen:

1 literatuuronderzoek;

2 onderzoek naar de wijze van besmetting en de snelheid van aantasting (kasproef);

3 onderzoek naar de mate waarin de temperatuur van invloed is op de groeisnelheid van *P. multivesiculata* (laboratoriumproef).

Deze onderdelen worden in het verslag besproken. Daarnaast wordt aangegeven welke mogelijkheden er op dit moment zijn op het gebied van biologische en/of chemische bestrijding.

Het onderzoek is vanuit de LTO-commissie *Cymbidium* begeleid door N. van Winden en L. Zwinkels.

## 2. LITERATUURONDERZOEK *P. MULTIVESICULATA*

### 2.1 PHYTOPHTHORA ALGEMEEN

Phytophthorasoorten behoren tot de klasse van de Oomycetes. Elke Phytophthora-soort vormt sporangia (sporendragers) en zoösporen (Erwin e.a., 1996).

Zoösporen worden bij lage temperaturen gevormd in het sporangium dat zich aan een uitloper van een hypha (schimmeldraad) bevindt. Een zoöspore bezit een flagel (zwemstaart). Zoösporen van Phytophthorasoorten, die wortels aantasten, worden aangetrokken door stoffen, die door de wortels worden uitgescheiden (chemotaxis). Aangekomen bij de wortel gaat de zoöspore encystreren (wordt een cyste, die zich aan de wortel hecht), de zoöspore wordt immobiel en kiemt. Hierna wordt de wortel gepenetreerd. Een cyste is een bolletje met een celwand dat ook gevormd wordt als de omstandigheden ongunstig worden, of als het te lang duurt voor een zoöspore een waardplant kan binnendringen. Ook door trillingen kunnen zoösporen aangezet worden tot encystreren. Cysten hechten zich aan oppervlakten.

Zoösporen van deze schimmels hebben een beperkte levensduur: van een half uur voor de ene soort tot 24/36 uur voor de andere soort. Hoe hoger de temperatuur, des te sneller gaan de sporen over tot cystevorming of gaan de sporen dood. Een zoöspore bevat niet veel energie.

Sporangia en zoösporen zijn de belangrijkste structuren waarmee de schimmel zich verspreidt. Deze structuren worden alleen in een waterig milieu gevormd.

Andere sporentypen die gevormd kunnen worden, zijn oösporen en chlamydo-sporen. Deze dragen minder bij aan de verspreiding.

Oösporen zijn geslachtelijke sporen, die ontstaan als een antheridium en een oögonium met elkaar versmelten en er uitwisseling van genetisch materiaal plaatsvindt. Oösporen zijn gevoelig voor uitdroging, maar kunnen droge omstandigheden beter doorstaan dan sporangia en zoösporen.

Chlamydo-sporen zijn sporen die door het mycelium gevormd kunnen worden als de omstandigheden voor de schimmel om te overleven ongunstig worden. Ze kunnen gevormd worden beneden een bepaalde temperatuur en bij vochtstress.

Chlamydo-sporen verdragen ongunstige omstandigheden. Ze hebben een iets dikkere wand dan de sporangia en kunnen in de grond en/of het plantenweefsel lange tijd overblijven.

### 2.2 PHYTOPHTHORA MULTIVESICULATA

In een artikel van Ilieva e.a., 1998, wordt de schimmel taxonomisch beschreven. Het gaat om een nieuwe Phytophthora-soort. Er wordt vermeld dat *P. multivesiculata* mycelium, sporendragers, zoösporen, antheridia, oögonia en oösporen vormt. Chlamydo-sporen worden niet genoemd. Het is bekend dat dit type sporen niet door alle Phytophthorasoorten gevormd worden (Erwin e.a., 1996). Ook cysten worden niet genoemd.

*P. multivesiculata* verspreidt zich dus waarschijnlijk alleen via sporangia, zoösporen en oösporen.

In het mycelium komen vaak ronde, op elkaar gestapelde zwellingen voor.

Ilieva e.a., 1998, hebben ook de symptomen van de aantasting beschreven. Bij aantasting van het blad van Cymbidiumplanten is verdroging van het blad te zien. Het blad wordt eerst 'glazig' en daarna lichtbruin. Op het bruin geworden blad komen soms horizontale zebra-achtige strepen voor. Een aangetaste bulb heeft nat donkerbruin verkleurd weefsel. Bij kunstmatig geïnfecteerd blad wordt de aantasting na zes dagen zichtbaar. De zebra-achtige strepen komen na kunstmatige infectie vrijwel niet voor.

### **3. DE WIJZE VAN BESMETTING EN DE SNELHEID VAN AANTASTING DOOR *P. MULTIVESICULATA***

#### **3.1 1<sup>E</sup> KASPROEF**

##### **3.1.1 Proefomstandigheden**

Voor de proef is de vroege grootbloemige cultivar Baltic Starlight 'Perfection' gebruikt. De planten waren afkomstig van meristeem en 2,5 jaar oud. In de proef stonden 80 planten. De planten hebben tijdens de proef niet gebloeid; de bloemtak is zo nodig voor de bloei verwijderd.

De kastemperatuur was aanvankelijk ingesteld op 17°C overdag en 14°C 's nachts. De temperatuur is, na overleg met L. Zwinkels, een maand later bijgesteld naar 20°C overdag en 's nachts. Op relatieve luchtvochtigheid werd niet geregeld. Deze lag gedurende de proef tussen de 50 en 60%.

De 80 planten waren in de kas verdeeld over zes betonnen bakken met een lengte van 10 meter. In elke bak was plaats voor dertien of veertien planten. De planten stonden los van elkaar op een omgekeerde emmer, waardoor er geen (drain)contact tussen de planten was. De planten kregen water met een EC van 0,6 mS/cm<sup>2</sup> via druppellaars. Tijdens de watergeefbeurt is er een drain gerealiseerd van 25%.

In de proef zijn planten besmet met *Phytophthora*. Voor het verkrijgen van de zoösporensuspensie is gewerkt met één isolaat van *Phytophthora multivesiculata* (95/8679) afkomstig van de PD. De methode, waarmee de zoösporensuspensie is verkregen, staat beschreven in Bijlage 1.

De 1<sup>e</sup> kasproef is uitgevoerd in de periode september tot en met december 1999.

##### **3.1.2 Behandelingen**

Het doel was na te gaan hoe *Phytophthora* de plant kan binnendringen. In de proef waren vier behandelingen opgenomen. In drie behandelingen werden de planten besmet met een zoösporensuspensie van *P. multivesiculata*. Per behandeling zijn twintig jonge, niet bloeiende, *Cymbidium*planten besmet via:

- de bladeren. Gedurende 24 uur zijn twee bladeren per plant met hun bladpunt ondergedompeld in een zoösporensuspensie van *Phytophthora*.
- het substraat. Door het éénmaal aangieten van een sporensuspensie op de pot. Dit is te vergelijken met het gebruikelijke watergeefstelsel, waarbij water wordt gegeven via druppellaars en sproeipennen.
- de wortels. Hierbij zijn de planten gedurende 24 uur op schotels met daarin een zoösporensuspensie van *Phytophthora* geplaatst.

Per plant per behandeling is 100 ml met een concentratie van 1000 sporen/ml toegediend. Dit betekent in het geval van de bladbesmetting dat de twee bladeren per plant ieder 50 ml kregen toegediend. De planten zijn op 20 september 1999 besmet.

De vierde behandeling bestond uit een onbesmette controle.  
De behandelingen waren over de planten verloot.

### **3.1.3 Waarnemingen**

De waarnemingen zijn tweemaal per week uitgevoerd. Hierbij is beschreven of een plant was aangetast en hoe de aantasting verliep.

### **3.1.4 Resultaten**

In deze proef werd slechts één plant aangetast door Phytophthora. Deze plant was besmet via het blad. Vijf dagen nadat het blad in de sporensuspensie had gehangen, is het eerste zwarte vlekje waargenomen. Na acht dagen zaten er zes kleine en twee grote vlekken op de bladpunt. Na twaalf dagen was er op 6 cm van de bladpunt een 'glazige' band over de volle breedte van het blad zichtbaar. Na vijftien dagen was de band 4 cm breed. De aantasting breidde zich uit in de richting van de bulb en later ook in de richting van de bladpunt. De aantasting (bandbreedte) groeide tussen de 0,5 en 1,75 cm per dag; de gemiddelde toename was 0,9 cm per dag. Aan het eind van deze proef was 45 cm van het blad aangetast. De aantasting had de bulb nog niet bereikt. Dit gebeurde pas een maand later. De aantasting ging vervolgens van de zieke bulb over op gezonde bulben.

### **3.1.5 Conclusie**

Cymbidium kan worden aangetast door zoösporen van Phytophthora via een bladpunt. De aantasting zag eruit als een 'glazige' band die met een gemiddelde snelheid van 0,9 cm per dag in de richting van de bulb groeide.

### **3.1.6 Extra proef: toevoegen van vermalen voedingsbodems met mycelium aan Cymbidiumplanten**

Het toevoegen van een zoösporensuspensie om de planten te besmetten met Phytophthora had in deze proef weinig succes. In eerdere Phytophthoraproeven met andere Phytophthorasoorten is gebleken dat het toevoegen van vermalen voedingsbodems, waarop mycelium (en sporangia en oösporen) zijn gegroeid wel leidde tot aantasting van de plant. Om meer inzicht te krijgen in de symptomen van een aantasting door Phytophthora is een extra proef gedaan. Na het beëindigen van de eerste proef zijn de controleplanten gebruikt om na te gaan of het toevoegen van vermalen voedingsbodems met mycelium op het substraat en in de bladscheden op de bulb wel leidde tot een aantasting door Phytophthora. Hiervoor zijn vijf planten per behandeling gebruikt. Ter controle is bij vijf planten water op het substraat gegoten en is bij vijf planten water in de bladscheden op de bulb gegoten. Acht dagen na het toevoegen van Phytophthora waren de bulben van de planten, die in de bladscheden waren besmet, aangetast. De bulben kregen donkerbruine vlekken. Na veertien dagen had de aantasting zich uitgebreid door de

bulb en voorbij de scheurrand in de richting van de bladpunt. De oudere bladeren van een bulb werden het eerst aangetast. Als een deel van een blad was aangetast, werd de rest van het blad geel.

Na negen dagen waren bulben van twee planten, waarbij de *Phytophthora* op het substraat was gegoten, aangetast. Na veertien dagen waren drie planten aangetast. De aantasting verliep op dezelfde wijze als bij de planten die in de bulben waren besmet. Bij deze behandeling werden twee planten niet aangetast. Dit komt waarschijnlijk doordat bij deze planten het op het substraat gegoten myceliummengsel de bulben niet heeft geraakt. Bij de aangetaste planten was dit waarschijnlijk wel het geval.

## 3.2 2<sup>E</sup> KASPROEF

### 3.2.1 Proefomstandigheden

De opzet van de 2<sup>e</sup> proef is vergelijkbaar met die van de 1<sup>e</sup>. Ook voor deze proef is de vroege grootbloemige cultivar Baltic Starlight 'Perfection' gebruikt. De planten waren afkomstig van meristeem en ruim 2,5 jaar oud. In de proef stonden 80 planten. De planten hebben tijdens de proef niet gebloeid; de bloemtak is zo nodig voor de bloei verwijderd.

De kastemperatuur was ingesteld op 20°C overdag en 's nachts. De relatieve luchtvochtigheid werd niet geregeld. Deze lag tijdens de proef tussen de 50 en 60%.

De 80 planten waren in de kas verdeeld over zes betonnen bakken met een lengte van 10 meter. In elke bak was plaats voor dertien of veertien planten. De planten stonden los van elkaar op een omgekeerde emmer, waardoor er geen (drain)contact tussen de planten was. De planten kregen water met een EC van 0,6 mS/cm<sup>2</sup> via druppellaars. Tijdens de watergeefbeurt is er een drain gerealiseerd van 25%. De druppellaars waren voor de proef vervangen.

In de proef zijn planten besmet met *Phytophthora*. Voor het verkrijgen van de zoösporensuspensie is gewerkt met één isolaat van *Phytophthora multivesiculata* (95/8679) afkomstig van de PD. De methode, waarmee de zoösporensuspensie is verkregen, staat beschreven in Bijlage 1.

De 2<sup>e</sup> kasproef is uitgevoerd in de periode januari tot en met maart 2000.

### 3.2.2 Behandelingen

Het doel was na te gaan hoe *Phytophthora* de plant kan binnendringen. In de proef waren vier behandelingen opgenomen. In drie behandelingen werden de planten besmet met een zoösporensuspensie van *P. multivesiculata*. De planten zijn niet één, maar drie keer besmet. Per behandeling zijn twintig jonge, niet bloeiende, *Cymbidium*planten besmet via:

- de bladeren. Gedurende drie keer 24 uur zijn twee bladeren per plant met hun bladpunt ondergedompeld in een zoösporensuspensie van *Phytophthora*.
- het substraat. Door het driemaal aangieten van een sporensuspensie op de pot. Dit is te vergelijken met het gebruikelijke watergeefstelsel, waarbij water wordt gegeven via druppellaars en sproeipennen.



- de bladscheden op de bulb. Door het driemaal in de bladscheden op de bulb pipetteren van een zoösporensuspensie van Phytophthora.

In de drie behandelingen is het aantal sporen, dat aan een plant is toegediend, gelijk gehouden. Dit aantal bedroeg bij de eerste besmetting  $1,2 \cdot 10^5$  sporen, bij de tweede besmetting  $2,6 \cdot 10^5$  sporen en bij de derde besmetting  $1,0 \cdot 10^5$  sporen. Aan een plant, die via de bladeren of via het substraat is besmet, is drie keer 100 ml sporensuspensie toegediend. Dit betekent in het geval van de bladbesmetting dat de twee bladeren per plant ieder 50 ml per keer kregen toegediend. Aan een plant, die via de bladscheden is besmet, is per keer respectievelijk 7,5, 8,5 en 8,5 ml sporensuspensie toegediend. De planten zijn op 10, 11 en 13 januari 2000 besmet.

De vierde behandeling bestond uit een onbesmette controle.

De behandelingen waren over de planten verloot.

### 3.2.3 Waarnemingen

De waarnemingen zijn tweemaal per week uitgevoerd. Hierbij is beschreven of een plant was aangetast en hoe de aantasting verliep. Er is gedurende 77 dagen waargenomen.

### 3.2.4 Resultaten

In deze proef werden in totaal zeventien planten aangetast door Phytophthora. Een overzicht van het aantal besmette planten per behandeling staat in tabel 1.

*Tabel 1-* Aantal door Phytophthora aangetaste planten na besmetting via blad, substraat of bladschede

Behandeling	Aantal aangetaste planten
1) niet besmet	0
2) besmet via bladpunten	15
3) besmet via substraat	1
4) besmet via bladscheden	1

In deze proef is (opnieuw) duidelijk geworden dat een Cymbidiumplant aangetast kan worden door Phytophthora als de bladpunten in met Phytophthora besmet water komen te hangen. Dit komt overeen met ervaringen uit de praktijk, waarin een aantasting door Phytophthora vaak voorkwam op bedrijven die betonvloeren met een eb/vloedsysteem hadden. In de proef werden de eerste symptomen van de aantasting zeven dagen (bij veertien planten) en tien dagen (bij één plant) na de eerste besmetting gevonden. Planten, die waren aangetast na besmetting via het substraat of via de bladscheden, werden pas na 29 respectievelijk 21 dagen waargenomen. Een beschrijving van de aantasting op het moment van de eerste waarneming staat in Tabel 2. Een glazige band of vlek begon 0,5 tot 5 centimeters boven de bladpunt. Bij een glazige bladpunt was het blad vanaf de punt aangetast.

**Tabel 2- Beschrijving van de eerste waarneming van de aantasting**

Behandeling	Plantnr	Bladnr	Symptoom
Besmet via bladpunten	1	1	Glazige band
	2	1	Glazige vlek
	3	1	Glazige band
	4	1	Glazige bladpunt en glazige vlekken
		2	Glazige band
	5	1	Glazige bladpunt
	6	1	Glazige vlek
	7	1	Glazige bladpunt en glazige band
	8	1	Glazige bladpunt
	9	1	Bruinzwarte lesies
		2	Glazige bladpunt
	10	1	Bruinzwarte lesies en glazige vlek
	11	1	Glazige bladpunt en glazige band
		2	Bruinzwarte lesies
	12	1	Glazige vlekken
13	1	Niet waargenomen	
14	1	Glazige band	
15	1	Glazige band	
Besmet via substraat	1		Donkerbruine vlekken op binnenste bladeren van een jonge bulb
Besmet via bladscheden	1		Donkerbruine vlekken op een bladschede van een jonge bulb

Bij een besmetting via de bladpunten begint de aantasting als bruinzwarte lesie van een paar millimeter. Deze groeit binnen enkele dagen uit via een glazige vlek over een deel van het blad tot een glazige band over de hele breedte van het blad. De aantasting groeit verder in de richting van de bulb. Als de aantasting boven de bladpunt is begonnen, groeit deze ook in de richting van de bladpunt totdat de hele bladpunt is aangetast. De bovenste 5 à 10 cm van de aantasting is glazig; de rest van het aangetaste blad is verdroogd en is lichtbruin van kleur. Soms ligt er een grijzige waas over dit deel van het blad.

Het verloop van de bladaantasting staat in Tabel 3. De lengte van de aantasting is bij iedere waarneming gemeten. Het dagnummer is berekend vanaf de dag dat de planten voor de eerste keer besmet zijn. De gemiddelde groeisnelheid is berekend door de totale lengte van de aantasting minus de lengte van de aantasting, zoals die de eerste keer is waargenomen, te delen door het dagnummer, waarop de maximale lengte van de aantasting bereikt is minus het dagnummer, waarop de lengte van de aantasting voor het eerst gemeten is.

Tabel 3- Verloop van de bladaantasting

Plantnr	Bladnr	Totale lengte van de aantasting (cm)	Lengte bereikt na (dagen)	Gemiddelde groeisnelheid (cm)
1	1	34	45	0.83
2	1	50	63	0.85
3	1	51	70	0.82
4	1	47	66	0.68
	2	43	63	0.74
5	1	53	73	0.77
6	1	40	59	0.76
7	1	43	59	0.77
8	1	51	66	0.82
9	1	38	66	0.64
	2	52	70	0.78
10	1	52	70	0.83
11	1	42	59	0.71
	2	42	63	0.75
12	1	50	66	0.85
13	1	56	66	0.85
14	1	35	52	0.67
15	1	59	70	0.90
gem		46.6	63.7	0.78

De bladaantasting nam tussen de 0,64 en 0,90 cm per dag toe. De periode, waarin de aantasting zich uitbreidde lag tussen de 45 en de 70 dagen. Er is gedurende 77 dagen waargenomen. De aantasting is bij alle bladeren gestopt. In één blad stopte de aantasting al na 45 dagen. Dit kwam doordat het blad geknikt was. Bij de overige bladeren was op het eerste gezicht geen reden aanwezig voor het tot stilstand komen van de aantasting. Bij deze bladeren werd de rand van de aantasting bruinzwart. Wanneer de rand over de hele breedte van het blad bruinzwart was geworden, stopte de aantasting. Bij een aantal bladeren werd vervolgens het groene, niet aangetaste deel van het blad geel en daarna bruin en viel af (op de scheurrand). Bij andere bladeren bleef het niet aangetaste deel van het blad groen en bleef het blad aan de plant zitten. De aantasting kwam op deze manier tot stilstand tussen dag 59 en dag 70 (tussen 9 en 20 maart). (De geregistreerde temperatuur was in deze weken en in de weken daarvoor niet hoger dan 20°-25°C en lijkt te laag om het stoppen van de aantasting te veroorzaken (Zie 4.2 Invloed van de temperatuur op de aantasting in de kas)).

Bij de aangetaste plant, die via het substraat besmet was, kregen de binnenste bladeren van een jonge bulb van de bulb naar de bladpunt donkerbruine vlekken. Deze bladeren werden geheel bruin. De niet aangetaste bladeren bleven gezond. Het leek erop dat ook deze aantasting gestopt was.

Bij de aangetaste plant, die via de bladscheden besmet was, kregen meerdere bladeren van een jonge bulb donkerbruine vlekken. Deze vlekken breidden zich langzaam uit in de richting van de bladpunt (door de scheurrand heen). Ook deze aantasting breidde zich na zo'n 70 dagen niet meer uit.

### **3.2.5 Conclusie**

Cymbidium kan worden aangetast door Phytophthora als een bladpunt in besmet water heeft gehangen. De aantasting begint als een bruinzwarte lesie van een paar millimeter. Deze groeit binnen enkele dagen uit via een glazige vlek over een gedeelte van het blad tot een glazige band over de hele breedte van het blad. De aantasting groeit verder in de richting van de bulb. Als de aantasting boven de bladpunt is begonnen, groeit deze ook in de richting van de bladpunt totdat de hele bladpunt is aangetast. De bovenste 5 à 10 cm van de aantasting is glazig; de rest van het aangetaste blad is verdroogd en is lichtbruin van kleur. De aantasting groeit met een gemiddelde snelheid van 0,78 cm per dag.

Een aantasting door Phytophthora via substraat of via de bladschede lijkt ook mogelijk.

Waarom de aantasting in deze proef bij alle planten is gestopt, is niet bekend.

### **3.2.6 Extra proef: toevoegen van drainwater van met Phytophthora besmette planten aan gezonde planten**

Het toevoegen van een zoösporensuspensie om de planten via het substraat of via de bladscheden te besmetten had in de tweede proef weinig succes. In deze extra proef is nagegaan of het besmetten van planten met drainwater afkomstig van de aangetaste planten uit de eerste proef, die met vermalen voedingsbodems met mycelium waren ziek gemaakt, mogelijk is. In het drainwater bevonden zich waarschijnlijk zoösporen.

Bij één plant is drainwater in de bladscheden en op het substraat gegoten. Ook is een bladpunt in het drainwater gehangen. Na vier dagen is de bladpunt uit het water gehaald en waren er glazige vlekken te zien. Na zeven dagen was het blad over de gehele breedte glazig geworden. Ook waren er donkerbruine vlekken op de bladscheden van twee jonge bulben te zien. Na elf dagen waren de bladscheden van drie jonge bulben aangetast. Na achttien dagen was dit het geval bij vier jonge bulben. De bruine vlekken breidden zich door de scheurrand heen uit in de richting van de bladpunt. Ook de vlekken op de bulb werden groter en uiteindelijk werd de hele bulb bruin. De aantasting ging in deze proef niet over naar een gezonde bulb. De aantasting van het blad nam met gemiddeld 0,8 cm per dag toe.

Bij een andere plant is een schotel met drainwater onder de pot gezet. De druppelaar is uit de pot gehaald, zodat de plant het water van de schotel op kan zuigen. De druppelaar is na zeven dagen weer bij de plant gestoken toen de schotel leeg was. Na drie weken was er nog niets te zien aan de wortels of aan de bulben.

## **3.3 3<sup>E</sup> KASPROEF**

### **3.3.1 Kasklimaat plantmateriaal**

Ook voor deze proef is de vroege grootbloemige cultivar Baltic Starlight 'Perfection' gebruikt. De planten waren afkomstig van meristeem en drie jaar oud. In de proef stonden 80 planten. De planten hebben tijdens de proef niet gebloeid; de bloemtak is zo nodig voor de bloei verwijderd.

De kastemperatuur was ingesteld op 20°C overdag en 's nachts. De gerealiseerde temperatuur lag in de eerste week van mei overdag 10°C hoger. De relatieve luchtvochtigheid werd niet geregeld. Deze lag tijdens de proef tussen de 40 en 60%.

De 80 planten waren in de kas verdeeld over vijf betonnen bakken met een lengte van 10 meter. In elke bak was plaats voor zestien planten. De planten stonden los van elkaar op een omgekeerde emmer. Er was geen draincontact tussen de planten, maar de bladeren van de planten raakten elkaar wel. De planten kregen water met een EC van 0,6 mS/cm<sup>2</sup> via druppelaars. Tijdens de watergeefbeurt is er een drain gerealiseerd van 25%. De druppelaars waren voor de proef vervangen.

De planten hebben in de kas gestaan van april tot juni 2000.

De planten zijn niet, zoals in de voorgaande proeven gebruikt voor één besmettingsproef, maar voor een aantal kleinere experimenten.

### 3.3.2 Experimenten

Uit de eerste twee proeven is duidelijk geworden dat het blad van *Cymbidium* kan worden aangetast door *Phytophthora multivesiculata* als het blad in besmet water heeft gehangen.

Als drainwater van een aangetaste plant bij een gezonde plant wordt gegoten, wordt de gezonde plant aangetast. *Phytophthora* kan zich dus verspreiden via besmet (drain)water. In de praktijk is er geen draincontact, maar vindt er toch verspreiding van de schimmel plaats. De aantasting is vaak het eerst zichtbaar bij de bulb. *Phytophthora* kan dus kennelijk ook op een andere manier verspreid worden. In deze derde proef zal gekeken worden naar diverse andere mogelijkheden van verspreiding. Hierbij wordt gedacht aan:

- verspreiding vanuit plantresten van aangetaste planten;
- verspreiding door slakken;
- verspreiding door teelthandelingen.

### 3.3.3 Verspreiding vanuit plantresten van aangetaste planten

In verdroogd aangetast blad bevinden zich oösporen. Dit is onder de microscoop waargenomen na een kleuring met katoenblauw. Van andere *Phytophthora*soorten is over oösporen bekend dat ze na kiemen sporangia kunnen vormen die zelf plantmateriaal kunnen infecteren of zoösporen kunnen vormen, die ook in staat zijn plantmateriaal te infecteren. De vraag is of de sporen die zich in verdroogd aangetast blad bevinden, voor een nieuwe aantasting kunnen zorgen als het blad op de pot ligt. Hiertoe is blad fijngemalen met een staafmixer of een vijzel. De bladstukjes zijn in bladscheden van gezonde planten gegoten. Over de planten is een plastic hoes gedaan om een vochtig klimaat te creëren. De hoes is na 48 uur weer verwijderd. Op de planten waren na vier weken nog geen symptomen van een aantasting te zien.

Het overbrengen van *Phytophthora* door fijngemalen bladstukjes met oösporen op gezond plantmateriaal te leggen, is in deze proef niet gelukt.

### 3.3.4 Verspreiding door slakken

Oösporen kunnen bijdragen aan de verspreiding van *Phytophthora*. In de literatuur (Gregg, 1957; Shaw, 1967) is beschreven hoe oösporen kunnen worden gehaald uit de uitwerpselen van slakken, die van een voedingsbodem, waarop mycelium, sporangia en oösporen van *Phytophthora* groeiden, hebben gegeten. Slakken zouden dus kunnen bijdragen aan de verspreiding van *Phytophthora*, wanneer ze *Phytophthorasporen* eten. In de teelt van *Cymbidium* kunnen slakken voorkomen. Het gaat om kleine huisjesslakken, die overdag in de pot zitten (eigen waarneming) of om naaktslakken (Teelttips uit Vakblad voor de Bloemisterij). De naaktslakken veroorzaken vraatschade aan de bloemen. Ze verbergen zich overdag in de pot en gaan 's nachts op zoek naar voedsel.

De huisjesslakken zijn gevangen en op voedingsbodems met *Phytophthora* gezet. De uitwerpselen zijn onder de microscoop bekeken. In deze uitwerpselen waren schimmelstructuren (mycelium, sporangia en oösporen) zichtbaar. Of het om oösporen van *Phytophthora* ging, hebben we niet vast kunnen stellen. Bij uitplaten groeiden er allerlei gisten, bacteriën en schimmels uit.

Verspreiding van *Phytophthora* door slakken is niet aangetoond, maar mag zeker nog niet uitgesloten worden.

### 3.3.5 Verspreiding door teelthandelingen

Uit de praktijk is bekend dat ziektes door teelthandelingen van ziek op gezond plantmateriaal kunnen worden overgebracht. De vraag is of *Phytophthora* aanwezig in een aangetast blad een niet aangetast blad kan infecteren, doordat de bladeren elkaar raken. In een eerste experiment zijn van vijf planten niet beschadigde aangetaste bladeren met knijpers op niet beschadigde gezonde bladeren geklemd. Op het moment dat de bladeren op elkaar werden gezet, bevond de aantasting zich voor het deel waar de bladeren elkaar raakten. Binnen twee weken was de aantasting voorbij de raakplek gegroeid zonder dat het gezonde blad werd geïnfecteerd.

Omdat besmetting van de planten in de proefkas niet tot een goede aantasting leidde, zijn voor het tweede en derde experiment *Cymbidium*planten uit een andere proef op het PBG gebruikt. Deze planten bleken besmet te zijn met *Phytophthora multivesiculata* en waren voor die proef niet bruikbaar meer. De planten hebben tijdens de experimenten in een gekoelde kas gestaan, waar de ingestelde temperatuur van 20°C ook de gerealiseerde temperatuur is geweest.

In het tweede experiment zijn van vijf planten niet beschadigde aangetaste bladeren met knijpers op beschadigde gezonde bladeren geklemd. Ter controle is niet beschadigd aangetast blad op niet beschadigd gezond blad geklemd. Op het moment dat de bladeren op elkaar werden gezet, bevond de aantasting zich voor het deel waar de bladeren elkaar raakten. Negen dagen later was bij één plant het beschadigde gezonde blad ook aangetast door *Phytophthora*.

In een derde experiment is het tweede experiment herhaald. Er zijn nu vier in plaats van vijf planten gebruikt. Twaalf dagen na het op elkaar klemmen van de bladeren was bij twee planten het beschadigde gezonde blad ook aangetast door *Phytophthora*.

Infectie door *Phytophthora* vanuit niet beschadigd aangetast blad op beschadigd gezond blad blijkt mogelijk.

### 3.4 CONCLUSIES

*Phytophthora multivesiculata* kan verspreid worden via besmet water (bv drain- of spatwater), door het raken van aangetast blad en beschadigd niet aangetast blad en mogelijk door slakken. De planten kunnen worden aangetast door zoösporen. Waarschijnlijk spelen ook sporangia en oösporen een rol bij de verspreiding. Een blad kan worden aangetast als een bladpunt in besmet water heeft gehangen. De aantasting begint als een bruinzwarte lesie van een paar millimeter. Deze groeit binnen enkele dagen uit via een glazige vlek over een gedeelte van het blad tot een glazige band over de hele breedte van het blad. De aantasting groeit verder in de richting van de bulb. Als de aantasting boven de bladpunt is begonnen, groeit deze ook in de richting van de bladpunt totdat de hele bladpunt is aangetast. De bovenste 5 à 10 cm van de aantasting is glazig; de rest van het aangetaste blad is verdroogd en is lichtbruin van kleur. De aantasting groeit met een gemiddelde snelheid van 0,78 cm per dag.

Bij aantasting van de bulb komen er op de bladscheden van de bulb (natte) donkerbruine vlekken. Deze vlekken breiden zich door de scheurrrand heen uit in de richting van de bladpunt. Als de aantasting doorzet, wordt uiteindelijk de hele bulb bruin. Het overgaan van de aantasting van een zieke naar een gezonde bulb is één keer waargenomen. Waardoor de aantasting van de bulb in de praktijk veroorzaakt wordt, is uit de proeven niet duidelijk geworden. Mogelijk spelen spatwater, teelthandelingen en slakken een rol bij de verspreiding.

## 4. DE INVLOED VAN DE TEMPERATUUR OP DE GROEI-SNELHEID VAN *P. MULTIVESICULATA*

### 4.1 LABORATORIUMPROEVEN

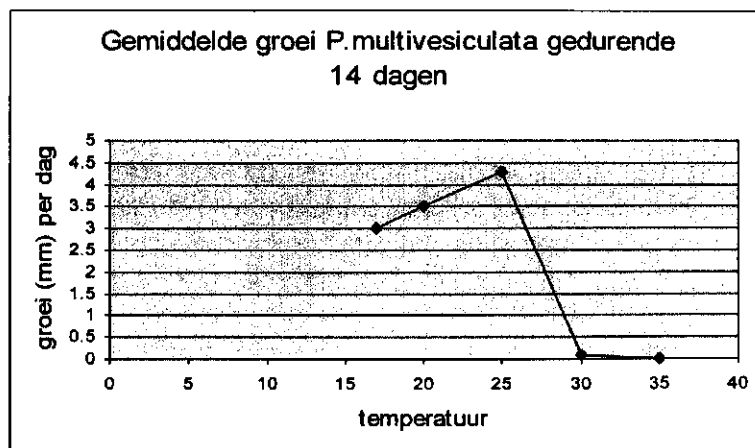
In het artikel van Ilieva e.a., 1998, wordt vermeld dat 35°C de maximale temperatuur is, waarbij *P. multivesiculata* groeit. Een optimumtemperatuur voor de groei wordt niet genoemd.

In een eerste experiment is gekeken naar de groeisnelheid van *P. multivesiculata* bij 17°C, 20°C, 25°C, 30°C en 35°C. Hiervoor zijn per temperatuur vijf voedingsbodems van PDA aangeënt met een ponsje mycelium met een diameter van 5 mm. Na 7, 14 en 21 dagen is de diameter van het uitgegroeide ponsje gemeten. In Tabel 4 staat de gemiddelde diameter van het mycelium op dag 0, 7, 14 en 21 per temperatuur weergegeven. Het mycelium groeit het snelst bij 25°C; bij 30°C is nauwelijks groei en bij 35°C is geen groei waargenomen.

Tabel 4- Gemiddelde diameter van het mycelium (mm) na 0, 7, 14 en 21 dagen groei bij 17°C, 20°C, 25°C, 30°C en 35°C.

Dag →	0		7		14		21	
Temp ↓	∅ (mm)	sa	∅ (mm)	sa	∅ (mm)	sa	∅ (mm)	sa
17°C	5.0	0.0	28.9	0.5	46.3	1.6	62.6	3.3
20°C	5.0	0.0	33.1	0.2	54.5	0.0	73.7	0.8
25°C	5.0	0.0	35.9	0.7	64.9	0.2	82.0	0.7
30°C	5.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0
35°C	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0

Uit deze gegevens is de gemiddelde groei van *P. multivesiculata* (weergegeven in het aantal mm per dag) gedurende veertien dagen berekend. Hiervoor is de gemiddelde diameter minus de begindiameter gedeeld door 14. De groeicurve staat weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1- Gemiddelde groei van *P. multivesiculata* (weergegeven in mm groei per dag) gedurende veertien dagen



In een tweede experiment is gekeken naar de invloed van temperatuurwisseling op de groeisnelheid van *P. multivesiculata*. Hiervoor zijn per begintemperatuur zes voedingsbodems van PDA aangeënt met een ponsje mycelium met een diameter van 5 mm. De schalen zijn weggezet bij 5°C, 10°C, 25°C, 30°C en 35°C. Na twee dagen zijn drie schalen per temperatuur overgezet naar 25°C. De andere drie schalen zijn bij de begintemperatuur blijven staan. 0, 3, 7, 10, 12, 14 en 17 dagen na het al dan niet overzetten is de diameter van het uitgegroeide ponsje gemeten. In Tabel 5 staat de gemiddelde diameter van het mycelium van de schalen, die bij de begintemperatuur zijn blijven staan, per temperatuur weergegeven. Het mycelium groeit het snelst bij 25°C; bij 5 en 10°C is nauwelijks groei en bij 30 en 35°C is geen groei waargenomen.

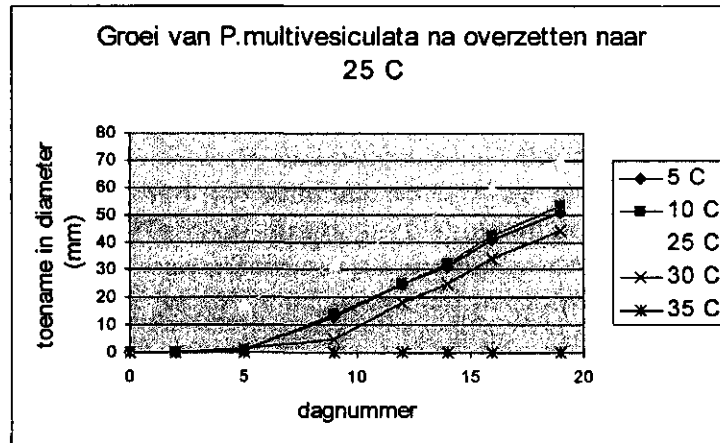
**Tabel 5-** Gemiddelde diameter van het mycelium (mm) bij 5°C, 10°C, 25°C, 30°C en 35°C

Dag	0		3		7		10		12		14		17	
	Ø	sa	Ø	sa	Ø	sa	Ø	sa	Ø	sa	Ø	sa	Ø	sa
5°C	5.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0
10°C	5.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	6.0	0.0	10.0	0.0
25°C	*	*	22.7	1.2	37.3	2.5	49.3	1.2	57.3	2.1	65.0	2.0	75.3	1.5
30°C	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0
35°C	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0

In Tabel 6 staat de gemiddelde groei weergegeven van het mycelium van de schalen, die na twee dagen zijn overgezet naar 25°C. De groei is de gemiddelde toename in diameter minus de diameter van het mycelium bij het inzetten van de proef (5 mm). Het mycelium dat bij 35°C heeft gestaan laat geen groei meer zien. De schalen afkomstig van 5, 10 en 30°C beginnen drie dagen na het overzetten weer te groeien. Het mycelium afkomstig van 30°C groeit tot zeven dagen na het overzetten langzamer. Hierna groeit het mycelium afkomstig van 5, 10, 25 en 30°C vrijwel even hard. Dit is te zien in Figuur 2.

**Tabel 6-** Gemiddelde groei van het mycelium (mm) 3, 7, 10, 12, 14 en 17 dagen na overzetten van 5°, 10°, 25°, 30° en 35°C naar 25°C

Begin-temp	Gem. groei (mm) .. dagen na overzetten					
	3	7	10	12	14	17
5°C	1.0	13.0	25.0	31.3	40.7	50.7
10°C	1.0	13.7	25.0	32.0	42.0	53.3
25°C	17.7	32.3	44.3	52.3	60.0	70.3
30°C	1.3	4.7	18.0	24.7	34.0	44.0
35°C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0



Figuur 2- Gemiddelde groei van *P. multivesiculata* na overzetten van 5°, 10°, 25°, 30° en 35°C naar 25°C

## 4.2 INVLOED VAN DE TEMPERATUUR OP DE AANTASTING IN DE KAS

De 3<sup>e</sup> kasproef is uitgevoerd in de maanden mei en juni 2000. De temperatuur was ingesteld op 20°C overdag en 's nachts. De gerealiseerde temperatuur lag in de eerste week van mei overdag zo'n 10°C hoger. In deze periode stopte de aantasting van blad of bulb binnen een paar dagen. Omdat besmetting van de planten in de proefkas niet tot een groeiende aantasting leidde, zijn voor het tweede en derde experiment, waarin werd nagegaan of aantasting veroorzaakt kan worden door teelthandelingen, Cymbidiumplanten uit een andere proef op het PBG gebruikt (zie 3.3.5). Deze planten bleken besmet te zijn met *P. multivesiculata*. Een deel van de besmette planten is overgezet naar de proefkas, een ander deel is in de gekoelde kas blijven staan. In deze kas was de ingestelde temperatuur van 20°C ook de gerealiseerde temperatuur. De aantasting in het blad stopte in de planten, die waren overgezet naar de proefkas, binnen een paar dagen. De aantasting in het blad ging verder in de planten, die in de kas van 20°C waren blijven staan. Deze waarnemingen komen overeen met de resultaten van de temperatuurproeven, die in het laboratorium zijn uitgevoerd. Bij 30°C groeide de *Phytophthora* niet of nauwelijks op de voedingsbodem.

Ook in de 2<sup>e</sup> kasproef stopte de aantasting in de planten. De gerealiseerde temperatuur is in de proefperiode januari tot en met april niet boven de 25°C geweest. Het stoppen van de aantasting lijkt in deze proef niet veroorzaakt te zijn door de temperatuur.

## 4.3 CONCLUSIES

*Phytophthora multivesiculata* heeft een optimumgroeitemperatuur rond de 25°C. De schimmel gaat dood bij 35°C. Bij lage temperatuur (onder de 10°C) groeit de schimmel niet of nauwelijks; als de temperatuur hoger wordt, gaat de schimmel weer groeien.

## **5. MOGELIJKHEDEN OM EEN AANTASTING DOOR *P. MULTIVESICULATA* TE BESTRIJDEN EN VOORKOMEN**

### **5.1 CHEMISCHE BESTRIJDING**

Het bestrijdingsadvies voor *P. multivesiculata* is gebaseerd op het advies voor de bestrijding van *Phytophthora* sp. bij roos op substraat (Amsing, 1999). Dit advies luidt als volgt:

- bestrijding tijdens de teelt kan met Paraat (2 tot 4 kg/ha) of Aliette (4 tot 6 kg/ha);
- begin met Paraat in de hoogste dosering;
- wissel na twee keer af met Aliette;
- herhaal de behandelingen vier keer, met tussenpozen van één tot twee weken.

Op het gebied van biologische bestrijding is nog geen goed werkend middel beschikbaar en toegelaten.

### **5.2 ANDERE MOGELIJKHEDEN OM AANTASTING TE BESTRIJDEN OF TE VOORKOMEN**

Naast het toepassen van een chemische bestrijding kan *Phytophthora* ook op andere wijze bestreden of voorkomen worden.

Als de *Phytophthora*-aantasting in het blad begint, kan deze worden gestopt door het aangetaste blad te verwijderen. Het blad moet dan wel voordat de aantasting de bulb heeft bereikt, weggehaald zijn.

Als de aantasting in een bulb begint, kan uitbreiding van de aantasting soms voorkomen worden door de gezonde bulben van de aangetaste plant te scheuren en opnieuw op te potten.

Als slakken *Phytophthora* verspreiden, dienen de slakken bestreden te worden.

In de praktijk is waargenomen dat er rasverschillen in gevoeligheid voor

*Phytophthora* zijn. Hiermee kan rekening gehouden worden bij de rassenkeuze.

In Teelttips in het vakblad voor de Bloemisterij 49, 1998, wordt vermeld dat een reden voor het verminderen van het wegvallen van planten door *Phytophthora* een watergeefstrategie is, waarin minder vaak water gegeven wordt.

Om een *Phytophthora*-aantasting in het blad te voorkomen, mag het blad niet met besmet water in aanraking komen.

## LITERATUURLIJST

- Amsing, J.J., 1999. Adviezen in de strijd tegen *Phytophthora*. Jarenlang onderzoek voor roos op steenwol afgesloten. Vakblad voor de Bloemisterij 22:58-59
- Erwin, D.C. and O.K. Ribeiro, 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, The American phytopathological society. 562p
- Gregg, M., 1957. Germination of oospores of *Phytophthora erythroseptica*. Nature (London) 180:150
- Ilieva, E., W.A. Man in 't Veld, W. Veenbaas-Rijks and R. Pieters, 1998. *Phytophthora multivesiculata*, a new species causing rot in *Cymbidium*. European Journal of Plant Pathology 104: 677-684
- Shaw, D.S., 1967. A method of obtaining single-oospore cultures of *Phytophthora cactorum* using live water snails. Phytopathology 57:454

## **Bijlage 1. Verkrijgen van zoösporen**

Voor het verkrijgen van zoösporen is een isolaat van *Phytophthora multivesiculata* van de PD gebruikt (95/8679). Ponsjes van de schimmel zijn geënt op erwten-medium. De voedingsbodems zijn veertien dagen weggezet bij 25°C. Na veertien dagen waren de schalen bijna geheel volgegroeid. Per voedingsbodem zijn ponsjes van de rand van de schimmelplek overgebracht in een petrischaal, waaraan 10 ml Cyclamen-voedingsoplossing is toegevoegd. Het mycelium lag omhoog, maar niet geheel ondergedompeld. De schalen zijn zeven dagen weggezet bij 25°C. Het mycelium groeide in deze tijd verder in de voedingsoplossing. Hierna is een temperatuurschok gegeven. De schalen zijn één uur weggezet bij 4°C, gevolgd door één uur bij 25°C. Door de koudeschok ging de schimmel zoösporen produceren. De voedingsoplossing is door gaasdoek gegoten, waarna een suspensie met zoösporen overbleef. Het aantal sporen is geteld en binnen twee uur in de juiste concentratie aan de planten toegediend.