



Beheersing van de schimmel *Phoma exigua* in witlof

ir. G. van Kruistum en L.J. Esselink

© 2002 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving BV.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, 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 stelt zich niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit projectrapport (vertrouwelijk) geeft de resultaten weer van het onderzoek dat het Praktijkonderzoek Plant & Omgeving heeft uitgevoerd in opdracht van:

Productschap Tuinbouw
Louis Pasteurlaan 6
2719 EE ZOETERMEER

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving BV, sector AGV

Adres : Edelhertweg 1, Lelystad
: Postbus 430, 8200 AK Lelystad
Tel. : 0320 – 29 11 11
Fax : 0320 – 23 04 79
E-mail : info@ppo.dlo.nl
Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING	4
1. INLEIDING	5
2. ACHTERGROND	5
3. AANPAK EN FASERING VAN HET ONDERZOEK	5
4. UITGEVOERD ONDERZOEK	6
5. RESULTATEN 2000/2001	7
Foto 1. Overzicht experiment wortelplakken (cv. Focus) in augustus/september 2001 (zie tabel 5).	10
6. DISCUSSIE EN CONCLUSIES	16

SAMENVATTING

In opdracht van het Productschap Tuinbouw is door PPO-AGV in 1998 onderzoek gestart naar de bestrijding van de schimmel *Phoma exigua* in witlof. Met het wegvallen van de stof carbendazim, in witlof tot 1998 toegelaten ter bestrijding van *Sclerotinia*, zijn er in Nederland geen middelen meer beschikbaar om *Phoma* te controleren. De laatste jaren neemt de aantasting van witlofwortels door *Phoma* in de praktijk dan ook sterk toe en kan een behoorlijke financiële tegenvaller ontstaan. In het onderzoek is samengewerkt met onderzoekinstellingen in België en Frankrijk. Doel is om een effectieve chemische of biologische bestrijdingsmethode van *Phoma* in witlof te ontwikkelen.

In eerste instantie is een protocol ontwikkeld voor kunstmatige infectie van witlofwortels met *Phoma*. Hierbij kwam naar voren dat infectie met een sporensuspensie het meest effectief is. Randvoorwaarde voor een goede infectie is vooral het crushen van het te infecteren weefsel, gevolgd door een zekere mate van uitdroging (vitaliteitsverlies). In seizoen 2000/2001 is een nieuwe formulering van het middel A10466A (Syngenta Crop Protection) getoetst, samen met het tegen *Sclerotinia* toegelaten middel Rovral en het biologische middel Contans. In seizoen 2001/2002 is het onderzoek voortgezet waarbij het middel Contans is vervallen en ter vergelijking met het middel A10466A, het middel Lirotect Fl. is opgenomen.

Het middel A10466A vertoonde een goede werking bij een dosering van 40 ml per ton wortels. Het middel kan bij hogere doseringen een groeiremmend effect veroorzaken. Rovral vertoont in de toegelaten dosering van 130 ml per ton wortels een goede nevenwerking tegen *Phoma*. Op de korte termijn wordt dan ook geadviseerd de bespuiting bij inslag met Ronilan tegen *Sclerotinia* te vervangen door Rovral. Een effect van de worteltemperatuur gecombineerd met kunstmatige infectie of een Rovral dosering op *Phoma* aantasting werd in de uitgevoerde proeven niet waargenomen, wel was Rovral effectief in het onderdrukken van een *Phoma* aantasting.

1. INLEIDING

Tot 1998 was *Phoma* in witlof geen groot probleem, omdat het middel carbendazim (gebruikt tegen *Sclerotinia*) tevens *Phoma* onderdrukte. De toelating van carbendazim in witlof werd in Nederland eind 1997 ingetrokken en aangezien een goed alternatief ontbreekt, waren er grote problemen te verwachten. Het zoeken naar alternatieve chemische of biologische middelen was dringend gewenst. In opdracht van het Productschap Tuinbouw is het PPO-AGV in 1998 een vierjarig onderzoeksproject gestart naar de chemisch en mogelijk biologische bestrijding van *Phoma exigua* in witlof. Voor het toetsen van nieuwe middelen werden de experimenten zo ingericht dat deze voor het College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen (CTB) kunnen dienen ter ondersteuning van een eventuele aanvraag voor toelating. In dit onderzoek vond samenwerking plaats met het Provinciaal Onderzoek- en Voorlichtingscentrum voor Land- en Tuinbouw (POVLT) te Rumbeke (België), de Nationale Proeftuin voor Witloof (NPW) te Herent (België) en het Station Expérimentale de l'Endive te Arras (Frankrijk). Door het opstellen van een gemeenschappelijk protocol voor toetsing van middelen tegen *Phoma* is getracht het onderzoek in internationaal verband te bevorderen en een eventuele toelatingsaanvraag voor een nieuw middel in een groot deel van de EU te laten gelden.

2. ACHTERGROND

Phoma exigua var. *exigua* is een wijd verbreide schimmel en kan bijvoorbeeld in aardappel het zogenoemde duimrot veroorzaken. *Phoma exigua* var. *foveata* veroorzaakt in aardappel gangreen of droogrot. Beide typen zijn sterk verwant en zijn in relatie tot aardappel vaak bestudeerd. Deze studies vormden een bron van informatie voor de wijze van aanpak van *Phoma* in witlof.

Een aantasting door *Phoma exigua* bij witlof kenmerkt zich door een zwartbruine verkleuring van het wortelweefsel met een scherpe grens tussen ziek en gezond weefsel. *Phoma* wordt een "koude schimmel" genoemd, omdat de schimmel zich onder koude en natte omstandigheden goed ontwikkelt. De kans op een *Phoma* aantasting neemt toe wanneer de bodemstructuur van een perceel slecht is.

De schimmel ontwikkelt zich tijdens de wortelteelt met name op afstervend loof. De schimmelsporen kunnen voor of tijdens de oogst de pennen infecteren. De aantasting begint op een verwonding, meestal vlakbij de wortelpunt, of via afstervende bladeren op de kop waardoor kropvorming achterwege blijft. In de bewaarcel groeit *Phoma* in de aangetaste pennen langzaam door. Vooral door direct contact met andere wortels kan de infectie uitbreiden.

3. AANPAK EN FASERING VAN HET ONDERZOEK

Voor het toetsen van middelen tegen *P. exigua* is een egaal besmette partij wortels nodig. Dit is te bereiken door wortels kunstmatig te besmetten als deze de bewaring ingaan. Hiervoor is een besmettingsmethode ontwikkeld en vastgelegd in een internationaal protocol. Het protocol voor deze besmettingsmethode is in 2000 opgesteld en verder geoptimaliseerd. Voorts is er in 2000/2001 gewerkt aan screenings onderzoek met nieuwe middelen volgens het internationale protocol. In 2001/2002 is dit onderzoek voortgezet. In overleg met de betrokken gewasbeschermingsfirma, het CTB en de LTO zullen verdere stappen moeten worden ondernomen om voor het getoetste middel ook in Nederland toelating te verkrijgen.

4. UITGEVOERD ONDERZOEK

4.1 Onderzoek 2000/2001

In februari 2000 is een infectieproef ingezet met op verschillende wijzen voorbehandelde en beschadigde witlofwortels. De infectie is uitgevoerd met in vloeibaar medium gekweekt *Phoma* mycelium. Vervolgens is *Phoma* gekweekt op gesteriliseerde tarwe korrels in erlenmeyers en is een sporensuspensie bereid. In september 2000 is een eerste test met de nieuwe methode van kunstmatige infectie door middel van *Phoma* sporen uitgevoerd. Voor het toetsen van de effectiviteit van nieuwe middelen tegen *Phoma* is een Engelstalig protocol geschreven dat in november 2000 met België en Frankrijk is besproken. In de loop van het seizoen 2000/2001 is het protocol aangepast met betrekking tot de kweek van *Phoma* en de bereiding van de sporensuspensie voor kunstmatige infectie. Eind november 2000 zijn op het PPO-Lelystad middelenproeven ingezet met cv. Focus. Het middel Rovral (iprodion), toegelaten tegen *Sclerotinia* is getoetst op nevenwerking tegen *Phoma* in combinatie met twee verschillende worteltemperaturen bij inslag. Verder is een middel in nieuwe formulering van Syngenta Crop Protection B.V. (A10466A) getoetst. Het middel Contans met de antagonist *Coniothyrium minitans* tegen *Sclerotinia* is eveneens getoetst op nevenwerking tegen *Phoma*. De trek vond plaats in februari 2001. Begin februari 2001 zijn deze proeven herhaald en in april 2001 geforceerd. In maart, april en eind augustus 2001 zijn 3 series experimenten met wortelplakken ingezet met als doel de effectiviteit van kunstmatige infectie te verbeteren. In juni 2001 tenslotte is een effectiviteitstoets ingezet met de middelen A10466A, Rovral (iprodion) en Ronilan (vinchlozolin) waarbij de wortelpunten volgens een nieuwe methode zijn beschadigd. Trek vond plaats in augustus/september 2001.

4.2 Onderzoek 2001/2002

Eind november 2001 is volgens het internationale protocol wederom een proef ingezet, nu met de middelen A10466A (Syngenta Crop Protection) in 2 doseringen, Lirotect Flowable met omgerekend een gelijke hoeveelheid actieve stof, Rovral (iprodion) en Ronilan (vinchlozolin) in de standaard dosering. Na een periode van opslag zijn de wortels eind januari 2002 opgezet en geforceerd in de minitrek installatie. Op 7 februari 2002 is een identieke middelenproef ingezet die in april 2002 is geforceerd.

Eind november 2001 zijn wortels in palletkisten à 1 m³ (cv. Platine) bij een temperatuur van 6°C geplaatst en na 24 uur geïnfecteerd met *Phoma*-sporen. Vervolgens zijn 12 behandelde palletkisten à 1 m³ bij 6°C teruggedraaid en na 48 uur al dan niet in tweevoud behandeld met de middelen Rovral, Ronilan en A10466A in 2 doseringen. Eind januari 2002 zijn de wortels vooraf trek beoordeeld op *Phoma*-aantasting en in 2-voud geforceerd. In april 2002 is de trekproef herhaald met hetzelfde, eind november 2001 behandelde, wortelmateriaal.

5. RESULTATEN 2000/2001

5.1 Verbetering effectiviteit kunstmatige infectie

Kunstmatige infectie met bij kamertemperatuur in vloeibaar medium gekweekt *Phoma*-mycelium bleek een beperkt resultaat op te leveren (tabel 1). De infectie slaagde het best in een zuurstofrijk milieu bij een lage worteltemperatuur en wanneer het met *Phoma* doorgroeide medium een koudeschok had ondergaan. Het beschadigen van de wortelpunten met een staalborstel sorteerde geen effect.

Tabel 1. **Aantasting wortelpunten (cv. Focus) door *Phoma* na kunstmatige infectie met in vloeibaar medium gekweekt mycelium bij verschillende voorbehandelingen. Infectie datum: 14 februari, beoordeling op 6 maart 2000 na resp. 48 uur 6°C, 5 dagen 0°C en 3 weken 12°C Aantasting uitgedrukt in Phoma-index¹⁾. PPO-AGV, maart 2000.**

Phoma inoculum	Zuurstofrijk		Zuurstofarm	
	Wortels 1-2°C	Wortels 48 uur 12°C	Wortels 1-2°C	Wortels 48 uur 12°C
Onbesmet	0,6	0,9	0	0
Besmet na koudeschok, 6 uur 3-4°C	18,4	10,6	2,8	1,9
Besmet op kamertemperatuur	2,6	9,1	0,3	2,5
Lsd ($p=0,05$)	4,3	4,3	4,3	4,3

1) PHOMA-INDEX BEREKEND OP BASIS VAN DE DIAMETER VAN NECROSEN IN WORTELPUNT. 0=NIET AANGETAST, 100=VOLLEDIG AANGETAST.

De nieuwe uitgewerkte methode van kunstmatige infectie van *Phoma* door middel van een sporensuspensie kan echter veel beter slagen (tabel 2). Door de *Phoma* te laten groeien op haverkorrels in speciale broedzakken in plaats van op tarwekorrels, kon een beduidend snellere vermeerdering worden bereikt met veel hogere dichtheden bij het bereiden van een sporensuspensie.

Tabel 2. ***Phoma* aantasting wortels (cv. Focus) na verschillende methoden van beschadigen en infectie met verschillende dichtheden van een sporensuspensie. Infectie op 1 sept. 2000 met wortels uit 1999, op 11 sept. 2000 met wortels uit 2000. Na spray infectie wortels opgeslagen bij 7°C onder geperforeerde folie en regelmatige bevochtiging. Eindbeoordeling aantasting op 6 november 2000. PPO-AGV, 2000**

methode van beschadigen	dichtheid inoculum	datum infectie	
		1 sept. 2000	11 sept. 2000
		% wortels met <i>P.exigua</i>	% wortels met <i>P.exigua</i>
Punt afsnijden	10 ⁶	4	79
Punt afsnijden	10 ⁵	75	41
Punt afsnijden	onbesmet	13	13
Zijkant raspen	10 ⁶	23	75
Zijkant raspen	10 ⁵	13	36
Zijkant tandwiel	10 ⁶	*	62
Zijkant tandwiel	10 ⁵	0	15

Opvallend is dat de 'oude' wortels uit 1999 waarvan de wortelpunt is afgesneden met een lagere dichtheid van het inoculum veel sterker werden aangetast. Uit deze toets komt naar voren dat de sporensuspensie circa 10⁵ sporen per ml moet bevatten voor een goede slagingskans van de kunstmatige infectie. In principe geeft beschadiging door middel van het afsnijden van de wortelpunt reeds voldoende invalspoorten voor een succesvolle infectie. Bepaling van de sporendichtheid gebeurt met een haemocytometer.

In aanvullende experimenten met wortelschijfjes in maart, april en september 2001 is de temperatuur tijdens infectie, de invloed van de vochtvoorziening, de dichtheid van de sporensuspensie en de wijze van beschadiging op de aantasting door *Phoma* nader bestudeerd.

In plastic bakken zijn 25 wortelschijfjes, 3 cm dik en diameter > 4 cm, geplaatst op nat filterpapier, vervolgens zijn deze geïnfecteerd met een sporensuspensie oplopend van 10³ tot 10⁹ sporen per ml. Na 1 week bij 6°C met deksel (vochtig) zijn de bakken gedurende 2 weken met of zonder deksel bij 3°C geplaatst. Tot slot nog 2 weken bij 3°C of 20°C. Uit tabel 3 blijkt dat bij wortelschijfjes een toenemende aantasting plaats te vinden bij een oplopende concentratie sporen, vooral in de range 10⁶ tot 10⁸. Het verwijderen van het deksel na 1 week waardoor de schijfjes wat uitdrogen vergroot de aantasting door

Phoma, vooral bij de hoogste dichtheden. Het verhogen van de temperatuur in de laatste 2 weken had geen invloed. Opvallend was dat binnen een week na infectie de wortelplakken, behandeld met hoge dichtheden, sterk rood verkleurden. Bij het beoordelen van de mate van aantasting werd bij het afsnijden van de wortelplakjes een snelle verkleuring van glazig groen naar donkerbruin of zwart, waargenomen, eveneens bij de hogere dichtheden.

Tabel 3. Invloed dichtheid sporensuspensie, temperatuur regiem en vocht op aantasting van wortelschijfjes (cv. Focus) door *Phoma*, uitgedrukt in een index van 0 tot 100. Inzet op 6 maart 2001, beoordeling aantasting op 10 april 2001.

Temperatuur regiem	deksel	Dichtheid sporensuspensie						
		10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
6-3-3	+	0	0	4	24	23	45	41
6-3-3	-	0	0	5	17	35	77	61
6-3-20	+	0	0	6	19	32	44	35
6-3-20	-	0	1	0	24	37	69	69
gemiddeld		0	0	4	21	32	59	52

In april 2001 is de invloed van het afspoelen van het melksap, de aard van het wondvlak (glad of gecrushed), het temperatuurverloop na infectie en de mate van verzwakking van het wortelmateriaal bestudeerd op de effectiviteit van *Phoma*-aantasting na kunstmatige infectie. Er is gewerkt met wortelschijfjes met een dikte van 3 cm en een diameter > 4 cm, 25 per plastic bak op nat filtreerpapier. Standaard is geïnoculeerd met een sporensuspensie met een dichtheid van 10^7 . Na inoculatie zijn de wortelschijfjes 1 week met deksel bij 6°C geplaatst. Vervolgens 2 weken bij 3°C zonder deksel en tot slot 2 weken bij 12°C. In experiment 1A is duidelijk dat het afspoelen van melksap de aantasting door *Phoma* nadelig beïnvloedt (tabel 4). Het crushen van het wondvlak bevordert de aantasting in sterke mate.

De temperatuur na infectie blijkt in de range van 0-12°C geen invloed te hebben op de mate van aantasting (experiment 1B). Standaard zijn de wortelplakken afgespoeld en niet gecrushed. Het temperatuurverloop na inoculatie was gedurende 3 weken resp. 0, 3, 6, 9 en 12°C (de eerste week met deksel), gevolgd door 2 weken 12°C.

In experiment 1C is het uitgangsmateriaal verzwakt door de wortels vooraf 1 week op te slaan bij 6°C onder drogende condities, onder water te zetten bij 6°C of 'in te vriezen' bij -3°C. Vervolgens zijn de wortels in plakken gesneden, standaard afgespoeld en al dan niet gecrushed. Crushen is sterk bevorderlijk voor de aantasting (tabel 4), een voorbehandeling door middel van 'invriezen' lijkt de infectie te versterken.

Tabel 4. Invloed voorbehandeling wortels, aard wondvlak, afspoelen melksap en temperatuur na kunstmatige infectie van wortelplakken (cv. Focus) met een sporensuspensie (10^7) op aantasting door *Phoma*. Start experimenten: 20 april 2001; eindbeoordeling: 25 mei 2001. PPO-AGV, Lelystad

experiment	voorbehandeling	aard wondvlak	afspoelen melksap	temperatuur regiem	Phoma-index ¹⁾
1A	geen	glad	wel	6-3-12	19
1A	geen	glad	niet	6-3-12	68
1A	geen	crushed	wel	6-3-12	83
1A	geen	crushed	niet	6-3-12	89
1B	geen	glad	afspoelen	0-12	48
1B	geen	glad	afspoelen	3-12	32
1B	geen	glad	afspoelen	6-12	45
1B	geen	glad	afspoelen	9-12	45
1B	geen	glad	afspoelen	12-12	52
1C	indrogen	glad	afspoelen	6-3-12	25
1C	indrogen	crushed	afspoelen	6-3-12	95
1C	invriezen	glad	afspoelen	6-3-12	49
1C	Invriezen	crushed	afspoelen	6-3-12	100
1C	Onder water	glad	afspoelen	6-3-12	23
1C	Onder water	crushed	afspoelen	6-3-12	91

¹⁾ Phoma-index berekend op basis klasse-indeling; 0=geen aantasting; 1=0-10% van schijfoppervlak aangetast; 2=10-50% aantasting en 3=50-100% aantasting.

Op 27 augustus 2001 is met de rassen Platine en Focus een derde proefserie met wortelplakjes ingezet om het effect van de dichtheid van de sporensuspensie op een gecrushed wondvlak na te gaan. Proefeenheid: Plasticbakken met 25 wortelplakken, 3 cm dik, doorsnede > 4 cm op filtreerpapier. Wondvlak standaard crushen tenminste 3 mm diep met hamertje met M6 boutjes, wondvlak niet afspoelen. Temperatuur 7 dagen na infectie 6°C met deksel, vervolgens 14 dagen 3°C zonder deksel (voorkom wel te sterke uitdroging wortelplakken) en tot slot 14 dagen 12°C. Beoordeling 5 weken na inzet, op 1 oktober 2001.

Uit de in tabel 5 vermelde resultaten blijkt duidelijk het effect van een toenemende concentratie sporen op de aantasting door *Phoma*. Vanaf een dichtheid van 5×10^5 sporen per ml treedt er een aanzienlijke aantasting op. Zie ook foto 1. Bij de hoogste dichtheden was het wondvlak 5 weken na inoculatie vrijwel geheel aangetast. De beide cultivars reageerden in ongeveer gelijke mate op de concentratiereeks.

Tabel 5. Invloed concentratie sporensuspensie op aantasting door *Phoma* van standaard gecruste wortelplakken van cv. Platine en cv. Focus. Inzet experiment: 27 augustus 2001, eindbeoordeling op 1 oktober 2001. PPO-AGV, Lelystad.

Cultivar	dichtheid	Phoma-index ¹⁾
Platine	onbehandeld	1
Platine	5×10^3	36
Platine	5×10^5	64
Platine	5×10^7	97
Focus	onbehandeld	3
Focus	5×10^2	16
Focus	5×10^5	23
Focus	5×10^4	32
Focus	5×10^5	59
Focus	5×10^6	67
Focus	5×10^7	84
Focus	5×10^8	91

¹⁾ Phoma-index berekend op basis klasse-indeling; 0=geen aantasting; 1=0-10% van schijfoppervlak aangetast; 2=10-50% aantasting en 3=50-100% aantasting



Foto 1. Overzicht experiment wortelplakken (cv. Focus) in augustus/september 2001 (zie tabel 5).

5.2 Resultaten middelentoetsing in mini-trekcel

Eind november 2000 is volgens het internationale protocol in de mini-trekcel een proef ingezet met de middelen A10466A (Syngenta Crop Protection) in 4 doseringen, Rovral (iprodion) en Contans WG (*C. minitans*) in de standaard dosering. De kunstmatige infectie is 48 uur eerder uitgevoerd met een sporensuspensie met een dichtheid van 10^5 Phoma-sporen per ml, gespoten op een glad afgesneden wondvlak. Na een periode van opslag zijn de wortels in februari 2001 opgezet en geforceerd in de minitrek installatie. Uit deze eerste toets komt naar voren dat zowel Rovral als A10466A de aantasting door Phoma kan beperken (tabel 6). De aantasting door Phoma in het onbehandelde, kunstmatig besmette object was echter gering.

Tabel 6. Effectiviteit diverse middelen tegen Phoma aantasting van witlofwortels (cv. Focus), aanvang trek 6 februari, oogst 27 februari 2001.

Object code	Omschrijving	Behandeling	Phoma-index voor trek*	Phoma – index na trek*	Lofproductie 100 wortels	KI.I (%)	Pit (%)
A	Controle	Onbehandeld; niet besmet	7	17	13,4	99	33
B	Controle	Onbehandeld; besmet	9	10	12,9	99	31
C	A10466A	20 ml/ton	3	3	12,3	99	33
D	A10466A	40 ml/ton	2	1	10,7	99	28
E	A10466A	80 ml/ton	2	2	10,1	99	27
F	A10466A	160 ml/ton	4	0	10,9	97	29
G	Rovral	130 ml/ton	3	1	13,0	100	30
H	Contans WG	50 g/ton	3	21	13,2	100	29
Isd (p=0,05)			4,3	7,6	1,3	1,7	4,6

*Phoma-index berekend op basis klasseindeling: 0=geen aantasting; 1=0-10% van schijfoppervlak aangetast; 2=10-50% aantasting en 3=50-100% aantasting

Het middel A10466A kan in hogere doseringen de groei remmen. Toepassing van Rovral, toegelaten tegen *Sclerotinia* in een dosering van 130 ml per ton wortels, gaf een goede werking zonder groeiremming. Het middel Contans vertoonde geen werking tegen Phoma.

Op 5 februari 2001 is een identieke middelenproef ingezet die in april 2001 is geforceerd. De aantasting in het onbehandelde, besmette object was nu significant hoger dan in het onbesmette object (tabel 7).

Tabel 7. Effectiviteit diverse middelen tegen Phoma aantasting van witlofwortels (cv. Focus), aanvang trek 5 april, oogst 27 april 2001.

Object code	Omschrijving	Behandeling	Phoma-index voor trek	Phoma – index na trek	Lofproductie 100 wortels	KI.I (%)	Pit (%)
A	Controle	Onbehandeld; niet besmet	3	22	11,6	90	44
B	Controle	Onbehandeld; besmet	3	39	11,3	94	45
C	A10466A	20 ml/ton	3	18	10,6	89	42
D	A10466A	40 ml/ton	2	6	10,6	87	41
E	A10466A	80 ml/ton	3	0	10,4	85	41
F	A10466A	160 ml/ton	3	0	9,9	84	41
G	Rovral	130 ml/ton	3	3	11,8	87	44
H	Contans WG	50 g/ton	2	26	12,1	82	46
Isd (p=0,05)			3,7	11,6	1,2	8,4	5,3

Vooraf vanaf een dosering van 40 ml per ton wortels geeft het middel A10466A een goede bescherming tegen Phoma. In hogere doseringen treedt echter enige groeiremming op en neemt het aandeel klasse I-lof licht af. Het middel Rovral voldoet in de toegelaten dosering tegen *Sclerotinia* goed zonder aantoonbare groeiremming. Het middel Contans vertoont geen duidelijke werking tegen Phoma.

Op 14 juni 2001 is een derde middelenproef ingezet, nu met het ras Platine. De concentratie van de sporensuspensie is verhoogd naar 10^7 en het wondvlak is na afsnijden gecrushed. De dosering van het middel A10466A is beperkt tot 10 en 20 ml per ton wortels. Tevens is ter vergelijking het middel Ronilan (vinchlozolin) opgenomen. Uit de vermelde resultaten in tabel 8 komt naar voren dat de lofproductie matig tot slecht was bij een lage lofkwiteit. Duidelijk is dat het besmettingsniveau van het uitgangsmateriaal al hoog was, na kunstmatige besmetting nam de mate van aantasting niet toe. De hoge Phoma-index kan tevens een gevolg zijn van het crushen van de wondvlakken. Het middel Rovral vertoonde de beste werking. De werking van het middel A10466A was in de toegepaste lage doseringen onvoldoende. Het middel Ronilan

werkt onvoldoende tegen *Phoma*.

Tabel 8. Effectiviteit diverse middelen tegen *Phoma* aantasting van witlofwortels (cv. Platine), aanvang trek 21 augustus, oogst 13 september 2001.

Object code	Omschrijving	Behandeling	Phoma-index voor trek	Phoma – index na trek	Lofproductie 100 wortels	KI.I (%)	Pit (%)
A	Controle	Onbehandeld; niet besmet	10	83	7,9	17	37
B	Controle	Onbehandeld; besmet	8	64	9,3	30	40
C	A10466A	10 ml/ton	3	69	8,9	31	33
D	A10466A	20 ml/ton	9	51	9,3	37	34
G	Rovral	130 ml/ton	8	28	9,6	31	38
H	Ronilan	35 ml/ton	4	49	8,8	25	37
Isd (p=0,05)			15,7	18,9	1,3	21,9	6,6

5.3 Effect worteltemperatuur op *Phoma*-aantasting in combinatie met Rovral

Op 15 november 2000 zijn vers gerooide wortels in palletkisten à 1 m³ (cv. Focus) bij een temperatuur van 12 °C geplaatst om wondheling te bewerkstelligen. De overige wortels zijn bij 1°C geplaatst. Op maandag 20 november 2000 zijn de wortels gereinigd (grond en tarra verwijderd, wortelpunten bijgesneden) en zijn 6 palletkisten à 1 m³ bij 12°C of 1°C teruggeplaatst. Op 21 november zijn van elke temperatuur 4 palletkisten over de band geïnfecteerd met een suspensie van *Phoma*-sporen (10⁵ per ml) en weer bij 12°C of 1°C teruggeplaatst. Vervolgens zijn 48 uur na infectie per temperatuur 2 kuubskisten behandeld met Rovral (130 ml per ton in 10 liter water) en bij de twee temperaturen teruggeplaatst. 5 dagen na de Rovral bespuiting zijn alle 12 kuubskisten gedurende 2 weken bij 3°C gezet onder regelmatige bevochtiging en is daarna de temperatuur verder verlaagd tot 0°C. Begin februari 2001 zijn de wortels vooraf trek beoordeeld op *Phoma*-aantasting en in 2-voud geforceerd (2 trekbakken per object). In tabel 9 zijn de resultaten weergegeven. De aantasting door *Phoma*, ook na kunstmatige infectie, bleek zeer beperkt te zijn. Verschillen tussen de objecten waren niet aantoonbaar.

Tabel 9. Effectiviteit Rovral in relatie tot worteltemperatuur tijdens kunstmatige infectie met *Phoma* sporensuspensie. Aanvang trek 5 februari, oogst 23 februari 2001

Object code	Temp. Tijdens infectie	Kunstmatige Infectie Phoma-sporen	Bespuiting Rovral	Phoma-index voor trek	Phoma – index na trek	Lofproductie 100 wortels	KI.I (%)	Pit (%)
A	12	Niet	Niet	2	5	15,3	95	36
B	12	Wel	Niet	3	8	16,7	96	39
C	12	Wel	Wel	3	2	16,0	97	42
D	1	Niet	Niet	2	10	15,3	96	39
E	1	Wel	Niet	4	9	14,5	96	42
F	1	Wel	Wel	0	2	14,3	96	43
Isd (p=0,05)				5,6	9,7	3,1	4,9	7,6

Op 5 februari 2001 is deze proef herhaald met 24 poolfusteenheden à circa 90 wortels per eenheid. Hiervan zijn 12 kisten vooraf gedurende 5 dagen bij 12°C geplaatst. Op 5 februari zijn de wortelpunten bijgesneden en zijn de wortels van 8 kisten per temperatuur over de band kunstmatig geïnfecteerd met een sporensuspensie (10⁵ per ml). Na 2 dagen zijn 2 geïnfecteerde kisten per temperatuur met Rovral behandeld en weer teruggeplaatst bij de respectieve temperaturen. Een week na infectie zijn alle behandelingen tot aan de trek opgeslagen bij 3°C onder afdekking met geperforeerd folie. De resultaten van deze proef zijn in tabel 10 vermeld.

Tabel 10. Effectiviteit Rovral in relatie tot worteltemperatuur tijdens kunstmatige infectie met *Phoma* sporensuspensie. Aanvang trek 5 april, oogst 26 april 2001.

Object code	Temp. Tijdens infectie	Kunstmatige Infectie Phoma-sporen	Bespuiting Rovral	Phoma-index Voor trek	Phoma – index na trek	Lofproductie 100 wortels	KI.I (%)	Pit (%)
A	12	Niet	Niet	5	33	11,3	90	63
B	12	Wel	Niet	10	18	13,7	94	68
C	12	Wel	Wel	0	7	13,7	89	70
D	1	Niet	Niet	3	19	13,2	95	55

E	1	Wel	Niet	7	21	13,1	98	56
F	1	Wel	Wel	1	10	12,9	92	61
lsd ($p=0,05$)				10,7	10,6	1,4	5,6	5,4

Bij aanvang trek waren geen verschillen in *Phoma*-aantasting aantoonbaar. Na afloop van de trek bleek het onbehandelde niet geïnfecteerde, bij 12 °C voorbehandelde object A, de hoogste aantasting te hebben en de laagste lofproductie. De verschillen tussen de overige objecten waren klein, echter het effect van Rovral was juist significant.

RESULTATEN 2001/2002

5.4 Effectiviteitsonderzoek mini-trekcel

Eind november 2001 is volgens het internationale protocol wederom een proef ingezet, nu met de middelen A10466A (Syngenta Crop Protection) in 2 doseringen, Lirotect Flowable met omgerekend een gelijke hoeveelheid actieve stof, Rovral (iprodion) en Ronilan (vinchlozolin) in de standaard dosering. De kunstmatige infectie is 48 uur eerder uitgevoerd met een sporensuspensie met een dichtheid van 10^7 Phoma-sporen per ml, gespoot op een met een hamertje gecrushed wondvlak. Na een periode van opslag zijn de wortels eind januari 2002 opgezet en geforceerd in de minitrek installatie. De Phoma-aantasting was in het onbehandelde, niet besmette object na de trek met een index van 48 al vrij hoog (tabel 11). Blijkbaar was er reeds een natuurlijke besmetting aanwezig. Infectie met Phoma-sporen leidde tot een betrouwbaar hogere Phoma-index. Duidelijk komt naar voren dat zowel Rovral als A10466A en Lirotect de aantasting door Phoma sterk kan beperken.

Tabel 11. Effectiviteit diverse middelen tegen Phoma aantasting van witlofwortels (cv. Platine), aanvang trek 28 januari, oogst 21 februari 2002.

Object code	Omschrijving	Behandeling	Phoma-index voor trek*	Phoma-index na trek*	Lofproductie 100 wortels	KI.I (%)	Pit (%)
A	Controle	Onbehandeld; niet besmet	3	48	13,8	99	26
B	Controle	Onbehandeld; besmet	13	73	14,8	99	31
C	A10466A	40 ml/ton	6	11	14,2	100	32
D	Lirotect Fl.	45 ml/ton	7	7	14,4	100	31
E	A10466A	80 ml/ton	2	6	13,1	100	27
F	Lirotect Fl.	90 ml/ton	4	9	13,1	100	29
G	Rovral	130 ml/ton	8	24	16,0	100	34
H	Ronilan	35 ml/ton	11	56	14,4	100	26
lsd (p=0,05)			8,6	7,7	1,4	0,8	9,0

* Phoma-index berekend op basis klasse-indeling; 0=geen aantasting; 1=0-10% van schijfoppervlak aangetast; 2=10-50% aantasting en 3=50-100% aantasting

Zowel het middel A10466A als Lirotect Fl. kan in de hoogste dosering de groei wat remmen. Toepassing van Rovral, toegelaten tegen *Sclerotinia* in een dosering van 130 ml per ton wortels, gaf een wat minder goede werking tegen Phoma, echter wel met de hoogste lofproductie. Het middel Ronilan vertoonde, zoals verwacht, geen duidelijke werking tegen Phoma.

Op 7 februari 2002 is een identieke middelenproef ingezet die in april 2002 is geforceerd. De Phoma-aantasting in het onbehandelde, besmette object was nu niet significant hoger dan in het onbesmette object (tabel 12). De natuurlijke infectiedruk was blijkbaar reeds hoog, extra kunstmatige besmetting heeft nu weinig resultaat gehad. Vanaf een dosering van 40 ml per ton wortels gaf het middel A10466A nog juist een wat betere bescherming tegen Phoma. Het middel Rovral gaf nu evenals Lirotect Fl. geen effect te zien.

Tabel 12. Effectiviteit diverse middelen tegen *Phoma* aantasting van witlofwortels (cv. Focus), aanvang trek 9 april, oogst 29 april 2001.

Object code	Omschrijving	Behandeling	Phoma-index voor trek	Phoma-index na trek	Lofproductie 100 wortels	Kl.I (%)	Pit (%)
A	Controle	Onbehandeld; niet besmet	0	66	15,8	98	42
B	Controle	Onbehandeld; besmet	1	70	13,7	98	44
C	A10466A	40 ml/ton	3	44	14,2	99	42
D	Lirotect Fl.	45 ml/ton	0	59	14,7	99	45
E	A10466A	80 ml/ton	0	44	14,3	98	43
F	Lirotect Fl.	90 ml/ton	2	53	13,3	99	47
G	Rovral	130 ml/ton	2	62	13,2	99	45
H	Ronilan	35 ml/ton	3	66	14,1	98	41
lsd (p=0,05)			4,0	22,8	1,3	2,2	8,6

5.5 Effectiviteitsonderzoek kuubskisten

Eind november 2001 zijn wortels in palletkisten à 1 m³ (cv. Platine) bij een temperatuur van 6°C geplaatst en na 24 uur geïnfecteerd met *Phoma*-sporen (10⁷ per ml). Direct voor infectie zijn per kuubskist circa 500 wortels gecrushed. Vervolgens zijn 12 behandelde palletkisten à 1 m³ bij 6°C teruggeplaatst en na 48 uur al dan niet in tweevoud behandeld met een aantal middelen. Eind januari 2002 zijn de wortels vooraf trek beoordeeld op *Phoma*-aantasting en in 2-voud geforceerd (2 trekbakken per object). In tabel 13 zijn de resultaten weergegeven. De aantasting door *Phoma* na kunstmatige infectie, bleek goed te zijn aangeslagen met een index van 51 na de trek. Ook voor de trek was kunstmatige infectie reeds zichtbaar. Behandeling met het middel A10466A gaf het beste resultaat, echter in de hoogste dosering remt dit middel de kroppgroei wat af. Rovral remt de *Phoma*-ontwikkeling, de werking verschilde echter niet van Ronilan.

Tabel 13. Effectiviteit diverse middelen tegen *Phoma* aantasting van witlofwortels in kuubskisten (cv. Platine), aanvang trek 29 januari, oogst 18 februari 2002.

Object code	Omschrijving	Behandeling	Phoma-index voor trek	Phoma-index na trek	Lofproductie 100 wortels	Kl.I (%)	Pit (%)
A	Controle	Onbehandeld; niet besmet	7	16	14,7	99	37
B	Controle	Onbehandeld; besmet	23	51	13,2	97	37
C	Rovral	130 ml/ton	2	14	14,5	97	41
D	Ronilan	35 ml/ton	5	16	14,5	98	41
E	A10466A	40 ml/ton	3	6	13,7	97	37
F	A10466A	80 ml/ton	3	2	12,6	97	36
lsd (p=0,05)			4,7	13,8	1,6	3,9	13,4

In april 2002 is de trekproef herhaald met hetzelfde, eind november 2001 behandelde, wortelmateriaal. Uit de resultaten in tabel 14 komt naar voren dat de *Phoma*-aantasting langzaam heeft doorgezet. Het middel A10466A gaf in de laagste dosering het beste resultaat.

Tabel 14. Effectiviteit diverse middelen tegen *Phoma* aantasting van witlofwortels in kuubskisten (cv. Platine), aanvang trek 11 april, oogst 2 mei 2002.

Object code	Omschrijving	Behandeling	Phoma-index voor trek	Phoma-index na trek	Lofproductie 100 wortels	Kl.I (%)	Pit (%)
A	Controle	Onbehandeld; niet besmet	3	52	17,8	98	49
B	Controle	Onbehandeld; besmet	12	72	15,9	94	52
C	Rovral	130 ml/ton	2	53	15,7	98	45
D	Ronilan	35 ml/ton	2	56	17,0	98	52
E	A10466A	40 ml/ton	1	40	16,7	98	43
F	A10466A	80 ml/ton	0	39	15,9	96	51
lsd (p=0,05)			3,7	14,6	3,8	5,3	17,9

6. DISCUSSIE EN CONCLUSIES

6.1 Kunstmatige infectie

Kunstmatige infectie van witlofwortels met de schimmel *Phoma exigua* kan het best met een sporensuspensie worden uitgevoerd. Niet in alle gevallen werd een goed resultaat geboekt, mogelijk doordat er in enkele gevallen verontreiniging optrad door sporen van *Penicillium*. Duidelijk is dat de vitaliteit van het uitgangsmateriaal een grote rol speelt. 'Oude' wortels werden reeds met een lagere sporendichtheid flink aangetast dan 'verse' wortels. Uit literatuur is bekend dat bij aardappel een te hoge sporensuspensie bij kunstmatige infectie vanwege verdringing een minder goed infectieresultaat kan geven, dit effect zou bij witlof eveneens kunnen gelden. Uit de bij witlof uitgevoerde infectieproeven komt naar voren dat de temperatuur tijdens de incubatieperiode, variërend van 0 tot 12°C, geen effect heeft op de mate van aantasting. Ook de aanwezigheid van melksap is niet nadelig, eerder bevorderlijk voor de mate van aantasting. Het grootste effect wordt bereikt wanneer de witlofwortels worden gecrushed, ofwel met stalen pennetjes worden bewerkt waardoor het weefsel plaatselijk wordt vermalen. Dit scheidt de beste invalsporten voor *Phoma*. Het na een incubatieperiode van een week wat droger houden van de wortels bevordert eveneens de aantasting. Bij voorkeur is de dichtheid van de sporensuspensie tenminste 5×10^6 per ml waarbij de wortels vooraf met stalen pinnetjes worden beschadigd ('gecrushed'). Vervolgens wordt een incubatieperiode van 1 week bij 6°C aangehouden onder vochtige condities waarbij de sporen kunnen kiemen en infecteren. Daarna wordt de temperatuur teruggebracht naar 3°C en vervolgens naar 0°C bij langere bewaring. Het is noodzakelijk om voorgaand aan de infectie te controleren of de *Phoma*-isolaten op de haverkorrels ook voldoende kiemkrachtige sporen leveren. Met de verzamelde kennis uit de infectieproeven is het protocol voor de uitvoering van effectiviteitsonderzoek verder aangepast.

6.2 Effectiviteitsonderzoek

Uit de effectiviteitsproeven met de verschillende middelen in 2001/2002 komt een goede werking van het middel A10466A (Syngenta Crop Protection) en Rovral naar voren. Het middel A10466A controleert de *Phoma* goed bij een dosering van 40 ml per ton wortels, daarboven kan enige groeiremming optreden. Een lagere dosering van 10 of 20 ml per ton sorteerde geen effect. Het is van belang om de behandeling met de middelen reeds voor opslag toe te passen. Wanneer hier enkele maanden mee wordt gewacht kan een natuurlijke infectie zich in de bewaarcel uitbreiden waardoor een latere behandeling niet of veel minder effectief is.

Het middel Rovral, toegepast ter bestrijding van *Sclerotinia*, heeft een goede tot uitstekende nevenwerking tegen *Phoma*. Het reduceert in de meeste gevallen de aantasting tot een acceptabel laag niveau zonder nadelige consequenties voor de kropproductie en kropkwaliteit. Het verdient dan ook aanbeveling om bij inslag de standaardtoepassing met Ronilan tegen *Sclerotinia* te vervangen door Rovral. De voordelen in de vorm van veel minder uitval door *Phoma* en een hogere lofproductie wegen ruimschoots op tegen het enige nadeel dat dan circa 3,5 maal meer middel wordt gedoseerd. Hierdoor vallen de kosten van een *Sclerotinia* behandeling met Rovral hoger uit. Het biologische middel Contans vertoonde geen nevenwerking tegen *Phoma*.

Uit het onderzoek naar de invloed van de worteltemperatuur tijdens infectie in combinatie met een Rovral bespuiting komen geen duidelijke aanwijzingen naar voren dat de infectie bij lagere temperaturen vanwege een minder snelle wondheling, effectiever is. Dit komt in een latere bepaling van de *Phoma* aantasting niet tot uitdrukking. Toepassing van Rovral is ook in deze proeven effectief in het onderdrukken van *Phoma*. De worteltemperatuur tijdens en na infectie of bespuiting met Rovral heeft in deze experimenten geen invloed gehad op de mate van *Phoma* aantasting, hetgeen ook wordt bevestigd door het experiment met de wortelplakken.