

Kali-vinasse tegen
ascosporen vorming in
Conference blad

Verlag van een éénjarig
experiment

Bart Timmermans
Pieter Jans Jansonius
Riekje Bruinenberg

In Nederland vindt het meeste onderzoek voor biologische landbouw en voeding plaats in voornamelijk door het ministerie van LNV gefinancierde onderzoeksprogramma's. Aansturing hiervan gebeurt door Bioconnect, het kennisnetwerk voor de Biologische Landbouw en Voeding in Nederland (www.bioconnect.nl). Hoofduitvoerders van het onderzoek zijn de instituten van Wageningen UR en het Louis Bolk Instituut. Zij werken in de cluster Biologische Landbouw (LNV gefinancierde onderzoeksprogramma's) nauw samen. Dit rapport is binnen deze context tot stand gekomen.

De resultaten van de onderzoeksprogramma's vindt u op de website www.biokennis.nl. Vragen en/of opmerkingen over het onderzoek aan biologische landbouw en voeding kunt u mailen naar: info@biokennis.nl.

© [2009] Louis Bolk Instituut

Kali-vinasse tegen ascosporen vorming in Conference blad, Verslag van een éénjarig experiment; Timmermans, B., omvang 21 pag., Trefwoorden: Vinasse, Venturia pirina, ascosporenreductie, Conference pears, organic.

Inhoud

Toepassing in de boomgaard	11
Proefopzet en proefveldindeling	11
Blad verzamelen	11
Blad overwinteren	11
Monsternamen en telling ascosporen	12
Statistiek	13
Effect van de bespuiting op de boom.	15
Effect op ascosporenuitsluit na overwintering	15
Referenties	
Bijlage 1. Statistische analyse	

Samenvatting

In een éénjarig experiment onder boomgaardomstandigheden werd in een biologische Conference boomgaard een éénmalige bespuiting met 500 l/ha Vinasse getest als middel om de vorming van ascosporen in het overwinterend blad te testen.

De Vinasse werd toegediend met de boomgaardspuit, 1;1 verdund met water bij het begin van de bladvalperiode. Na het voltooien van de bladval werden grote hoeveelheden blad verzameld en buiten op de open bodem overwinterd in gazen kooien die niet toegankelijk waren voor regenwormen.

In het voorjaar toen de ascosporen rijp waren werden uit deze kooien monsters genomen voor onderzoek naar de hoeveelheid rijpe ascosporen. Dit onderzoek werd uitgevoerd door middel van een waterbadmethode, na een incubatieperiode in het laboratorium.

Deze toediening van Vinasse leidde niet zoals verwacht tot een reductie van de ascosporenvorming maar tot een toename van de ascosporenuitstoot met 45%. Dit resultaat is tegenstrijdig aan resultaten uit ander onderzoek. Een sluitende verklaring voor dit verschil ontbreekt. Voorlopig moet praktijktoepassing van Vinasse op gevallen blad daarom worden ontraden.

Summary

In a one year experiment under orchard conditions in an organic Conference orchard, a single treatment with 500 l/ha beetroot Vinasse was tested as a means to reduce the formation of ascospores in the over wintering leaves. Vinasse was applied with an orchard sprayer at the beginning of the leaf-fall period, diluted 1;1 with water. Directly after the completion of the leaf-fall large amounts of leaves were gathered in the orchard to be over wintered in wire mesh cages on the open ground. The fine wire mesh did not allow large earthworms to come in and take away the leaves. When ascospores were ripe in spring, samples were taken from these cages for the detection of ascospores. This was done using a water bath method after an incubation period in the laboratory. Vinasse applied in this way did not lead as expected to a reduction of the potential ascospore discharge but, on the contrary to an increase in ascospore discharge of 45%. This result differs from results in earlier trials. A satisfying explanation could not be found thus far. For the time being the leaf fall treatment with Vinasse against scab should be advised against.

1 Inleiding

In de biologische teelt is de beheersing van perenschurft (*Venturia pirina*) erg lastig. De beschikbare middelen zwavel, kalkzwavel en kaliumbicarbonaat zijn relatief zwak en worden bovendien door het ras Conference slecht verdragen. Om toch tot een bevredigend resultaat te komen moeten alle randvoorwaarden worden geoptimaliseerd. Binnen het Bioconnect programma is er in het project "Conference anders telen" (2006-2008) en de opvolger "Systeemontwikkeling in de biologische perenteelt" door telers in de Werkgroep Biologische Perenteelt, de voorlichters Gerjan Brouwer (DLV Plant) en Marc Trapman (BioFruitAdvies) en de onderzoekers hard gewerkt aan het ontwikkelen en toetsen van een pakket maatregelen dat een stabiele en rendabele biologische perenteelt in Nederland mogelijk moet maken.

Het handhaven van een open en tijdig afsluitend gewas en het laag houden van de infectiedruk zijn twee belangrijke peilers van de strategie om schurft beheersbaar te houden.

In vergelijking met appel is schurft op peer een ingewikkelde ziekte. Naast de overwintering op het afgefallen blad is bij peer de overwintering op het hout als de zogenaamde takschurft een belangrijke factor in de infectiedruk in het voorjaar. Om deze infectiedruk laag te houden moet het optreden van takschurft eigenlijk ten allen tijde voorkomen worden. Daarnaast of misschien daaraan voorafgaand is er de infectiedruk vanuit het overwinterende blad. Een lichte infectie op het blad in het ene jaar kan leiden tot een sterkere druk het voorjaar daarop, vervolgens een zwaardere infectie op het blad en ook op het hout. In de jaren daarna kan de infectiedruk dan snel oplopen waarmee de ziekte alleen controleerbaar wordt met zeer frequente bespuitingen.

Het verlagen van de ascosporeuitstoot uit het overwinterde blad is dus een van de factoren in de totale strategie. De ascosporen uitstoot wordt verlaagd door het bevorderen van de bladvertering en door het remmen van het ontstaan van vruchtlichamen van schurft in het afgefallen blad. In de gangbare teelt zijn er fungiciden en de meststof Ureum die wanneer ze net voor respectievelijk net na de bladval op het blad worden gespoten deze vorming van vruchtlichamen tegen kunnen gaan. Deze middelen zijn voor de biologische teelt niet beschikbaar. Er zijn wel andere middelen beschikbaar die mogelijk een vergelijkbaar effect kunnen hebben (Pfeiffer, B. et al. 2004). Eén van deze middelen is de meststof Kali-Vinasse, een restproduct uit de suikerindustrie met een paar procent stikstof en hoge zoutgehaltes (met onder andere kalium en fosfaat).

In het EU project REPCO (Replacement of Copper) is gezocht naar middelen die het kopergebruik in Europa op o.a. appel kunnen helpen terugdringen. In één van de experimenten binnen dit project werd blad van Jonagold met veel schurft erop net voor de bladval geplukt, gedompeld in Kali-Vinasse en vervolgens overwinterd op de grond. In het voorjaar bleek deze behandeling te hebben geleid tot rond 95% reductie van de ascosporen vorming (Köhl, J., 2007). In een tweejarige proef van PPO en LaMi wordt na 2008 (1^e proefjaar) aan dit onderzoek gerefereerd: hier werd blad twee tot vier maal bespoten met Vinasse via een beregeningsinstallatie, in de periode van oktober tot begin december (Aanjager, mei 2009). De resultaten zijn nog niet gepubliceerd.

In het experiment dat in dit verslag wordt besproken is geprobeerd voor de praktijk op peer zo dicht mogelijk dit resultaat te bereiken. De resultaten zijn tegengesteld aan die in het bovengenoemde REPCO experiment. Iets dergelijks al eerder vastgesteld in Duitsland (Pfeiffer, B. et al. 2004). Het is kennelijk zo dat het balletje twee verschillende kanten op kan rollen. Een mogelijke verklaring hiervoor ligt in de heel verschillende manier van toepassen in de verschillende experimenten.

2 Materiaal en methoden

Toepassing in de boomgaard

De Kali-Vinasse is bedoeld als meststof en zodanig ook toegestaan in de biologische teelt was afkomstig van Nedalco Er is geen analyse beschikbaar van het toegepaste materiaal.

De Vinasse is één op één verdund met water en verspoten met de boomgaardspuit. In totaal is per ha 500 l Vinasse met 500 l water verspoten.

De bomen zijn één maal bespoten op 28 oktober aan het begin van de bladval. Op dat moment was er naar schatting 5 % bladval. Er is gekozen voor dit moment om een eventuele bladverbranding en daarmee mogelijk de terugtrekking van voedingsstoffen zo lang mogelijk uit te stellen.

Het streven was om wel zo veel mogelijk blad aan de boom te raken. Het blad zou ook kunnen worden bespoten na de bladval maar dan is de bedekking veel slechter omdat het blad op elkaar komt te liggen waardoor slechts één zijde wordt geraakt of soms helemaal niets.

De bespuiting werd uitgevoerd in de middag op een droog gewas bij windstil weer. Het product is heel goed zichtbaar op het blad en er kon worden vastgesteld dat er een zeer homogene bedekking op zowel de onderzijde als de bovenzijde was. Vinasse vloeide in deze concentratie slecht uit en droogde dus op als druppels. In de dagen na de toepassing was het droog.

Proefopzet en proefveldindeling

Blad verzamelen

Een cruciaal probleem in de methode van onderzoek naar effecten van middelen op schurftoverwintering op het blad is de grote variatie. In veel gevallen is slechts een beperkt percentage van de bladeren aangetast. Wanneer daarvan een monster van beperkte omvang wordt genomen dan is de kans dat je zo'n blad treft vrij klein. Dit is op te lossen door gericht bladeren te zoeken waarop schurft voorkomt. In deze situatie was dat om meerdere redenen niet mogelijk:

- Een betrouwbare waarneming van schurft was niet mogelijk zo laat in het seizoen door de veelheid aan beschadigingen en schimmels die op het blad zaten.
- Door de bespuiting en de daarop volgende verkleuring werd het blad nog moeilijker te beoordelen.

In dit onderzoek is ervoor gekozen om van acht bomen in het midden van ieder veldje, direct na het vallen van het laatste blad op 20 november praktisch al het blad te verzamelen (ca. 3 kg blad per veldje)

Blad overwinteren

Dit bladmonster werd goed gemengd en overwinterd in gazen kooien van 100 x 50 x 15 cm. Deze kooien waren aan de onderzijde voorzien van fijnmazig nylon gaas om te voorkomen dat regenwormen het blad zouden opeten tijdens

de winter. De bovenzijde was voorzien van kippengaas tegen het wegwaaien. De kooien werden buiten overwinterd op kale grond. In het voorjaar werden de gaaskooien verplaatst naar een locatie nabij het meetlaboratorium. De plek bevond zich op zandgrond, waar van te voren het onkruid verwijderd was, zodanig dat alle bakken evenveel vocht uit de ondergrond zou kunnen opnemen en evenveel zonlicht van boven zou kunnen ontvangen. In geval van naderende regen werd doorzichtig plastic boven de gaasramen gespannen, zodanig dat het bladmateriaal niet nat kon regenen en er nog voldoende ventilatie mogelijk was. Dit om te voorkomen dat de sporen voortijdig vrijkwamen. Het moment van het monsternamen uit de bakken werd bepaald door een aaneengesloten warme en droge periode, circa 20°C overdag. De eerste bemonstering vond plaats op 15-4-2009, waarna het aantal ascosporen op het blad is gemeten. Voor de tweede bemonstering is 100 g blad uit elke kooi op 22-4-2009 verzameld, en vervolgens een week geïncubeerd in aluminium bakken op vochtig filterpapier afgedekt met plastic bij kamertemperatuur, waarna op 29-4-2009 het aantal ascosporen is gemeten.



Foto 1 Kooien met overwinterend blad

Monsternamen en telling ascosporen

Voor de telling werd een methode gebruikt die gebaseerd is op de waterbadmethode van A. Kollar (2000) waarbij relatief grote hoeveelheden bladeren kunnen worden behandeld. Door deze monstergrootte kan de spreiding worden verkleind waardoor gemakkelijker tot betrouwbare resultaten kan worden gekomen. Het idee om te incuberen is overgenomen uit het REPCO project, naar mondelinge mededelingen van B. Heijne, PPO Fruit.

Bij monsternamen werd de toplaag met droog bladmateriaal bovenin een gaaskooi opzij geschoven en werd het losse licht vochtige bladmateriaal daaronder bemonsterd. Onderin bevond zich een zeer natte aaneengeplakte laag bladmateriaal, die ook werd vermeden. Zo werd Circa 25 gram blad uit elk gaasraam genomen. Het blad vulde

een 1-liter pot bijna tot de rand, en werd hierin geschud met 500ml demiwater gedurende 1 uur, zodanig dat al het bladmateriaal onder water stond. Het blad werd afgegoten en het afgietsel gezeefd over een 0.25mm zeef om grof vervuilend materiaal eruit te halen, en met een 53 μm zeef zodat kleinere vervuilingen hierop achterbleven (grote ascosporen van *Venturia inaequalis*: 5-7 μm breed, 11-15 μm lang). Van het verkregen filtraat werd 20 ml gecentrifugeerd, 5' 3300rpm. Het supernatant werd afgepipetteerd en pellet geresuspendeerd in ca 1 ml. Het concentraat en de rest van het filtraat werd ingevroren bij ca -20°C . Het aantal ascosporen werd vervolgens geteld in het concentraat met een Bürker telkamer bij een vergroting van 400x. Voor het bladmonster dat op 15-4-2009 genomen is zijn twee tellingen gedaan uit 1 concentraat voor elke behandeling, voor het bladmonster genomen op 22-4-2009 is dit verhoogd tot 3 tellingen uit 1 concentraat voor elke behandeling.

Statistiek

Statistische analyse is gedaan door ANOVA in Genstat (versie 11.1.0.1575). Hiertoe zijn alle tellingen van blad uit dezelfde gaaskooi gezien als subheralingen. Alleen blad dat afkomstig was uit een ander blok van de proef in de boomgaard, en in een eigen gaaskooi overwinterde, is gezien als een echte herhaling.

3 Resultaten

Effect van de bespuiting op de boom.

In de dagen na de bespuiting kleurde het blad bruin aan de boom. De niet bespoten bomen vertoonden een geleidelijke overgang van groen naar geel/oranje. Zie bomen op de achtergrond van foto 2. Er was geen sprake van echte verbranding. Bij het uitlopen in 2009 viel niets bijzonders op aan de bladstand of de bloei. Er zijn geen tellingen verricht aan deze aspecten.



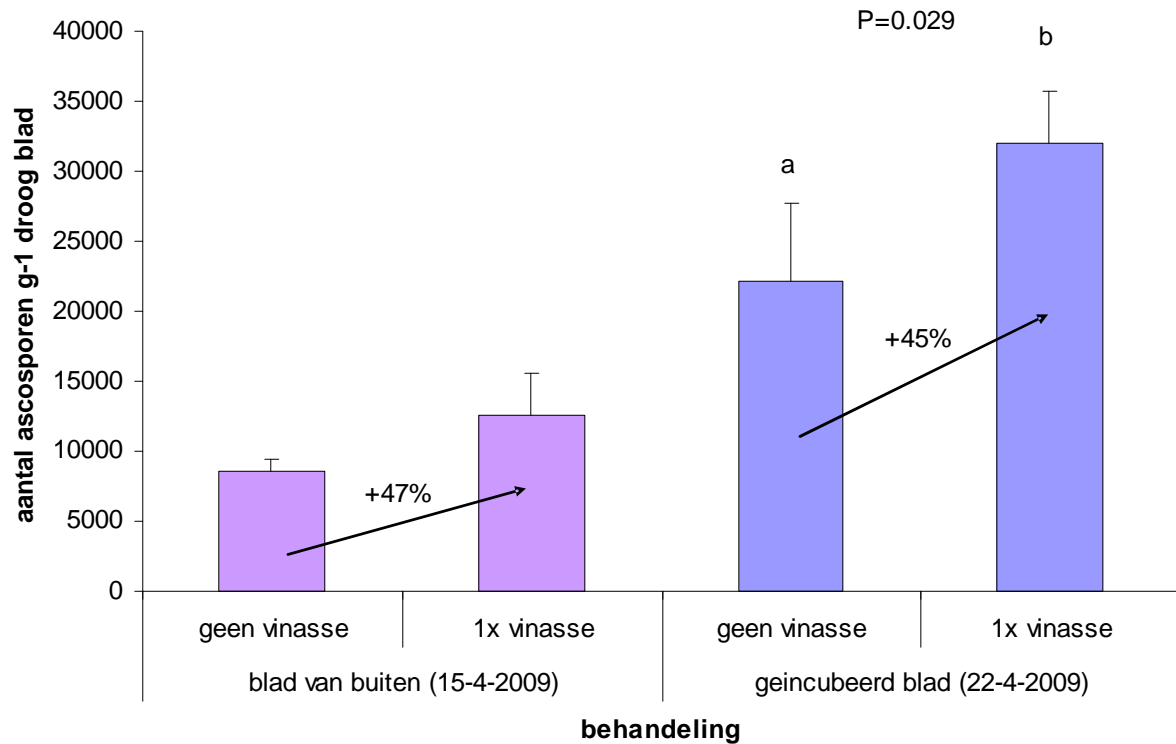
Foto 2 Bruinverkleuring van het blad na bespuiting met Vinasse

Effect op ascosporenuitsluit na overwintering

Het aantal ascosporen op het blad in de gaaskooien is gemeten op 15-4-2009. Hierbij bleek, dat na twee tellingen uit hetzelfde filtraat, en in vier herhalingen, er geen significante verschillen waren tussen aantallen ascosporen op blad met en zonder vinassebehandeling (Fig. 1). Het totaal aantal getelde sporen per telling was echter laag (en dus relatief erg variabel) wat tot veel onbetrouwbaarheid in de meting geeft. De trend in de gemiddelden was een (onverwachte) toename in de hoeveelheid ascosporen van 47%.

Om verbeteringen in de methodiek aan te brengen, en te zorgen dat er meer sporen per telling geteld werden, is blad op 22-4-2009 bemonsterd, en vervolgens 1 week geïncubeerd onder warme vochtige omstandigheden zodat sporenrijping kon plaatsvinden. Vervolgens is na spoelen en concentreren op het filtraat een drietal tellingen gedaan

(ipv. twee tellingen) zodat de meting van het aantal sporen nog betrouwbaarder werd. Inderdaad was het totaal aantal ascosporen in alle behandelingen na incubatie ongeveer 2.5 maal hoger dan dat op het blad buiten (toename van 9000 en 13000 ascosporen g^{-1} droog blad naar 22000 en 32000 ascosporen g^{-1} droog blad). De relatieve verschillen tussen de behandeling bleven echter van gelijke grootte, en waren nu ook significant ($P=0.029$): 45% toename in ascosporen per gram droog blad na 1x bespuiten met Vinasse (500l/ha). Zie bijlage 1.



Figuur 1. Het aantal ascosporen op het blad in het voorjaar, gemeten op blad afkomstig van buiten (15 april 2009) en op blad afkomstig van buiten (verzameld op 22-4-2009) dat vervolgens 1 week precies geincubeerd is bij kamertemperatuur en onder optimale omstandigheden. Foutbalken geven standaardfout van het gemiddelde, en verschillende letters geven significante verschillen ($P<0.05$).

4 Conclusies

Een enkele vinassebespuiting met 500 l/ha in het begin van de bladval, op het blad op de boom, heeft niet het gewenste resultaat gehad zoals verwacht aan de hand van andere proeven, en het aantal ascosporen op perenblad flink gereduceerd.

Juist het tegendeel werd bewerkstelligd: een toename in ascosporenaantal van zo'n 45 % op het blad behandeld met Vinasse. Vooralsnog is de reden van deze verassende resultaten onduidelijk: de dosis lijkt overeen te komen met die van andere proeven, echter vaker bespuiten zou een van de oorzaken van het verschil kunnen vormen.

Er mag echter wel geconcludeerd worden dat Vinassebespuiting niet zondermeer een solas biedt tegen schurft in de fruitteelt. Voorlopig moet deze toepassing worden ontraden.

5 Referenties

Vinasse als veelbelovend nieuw wapen tegen schurft. Poref PPO en LaMi wijzen uit hoe groot effectiviteit is. De Aanjager, mei 2009.

Vinasse vermindert de vorming van ascosporen van schurft op appel. Persbericht, PPO, nr. 2007-1, 11 januari 2007.

Köhl, J.; REPCO Final Activity Report, 2007

Pfeiffer B., Alt.S., Häfner C., Hein B., Schulz C., Kollar A., 2004; Investigations on alternative substances for control of apple scab, results from sanitation trials. In: Proceedings to the 11th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing, 2004

Kollar, A., 2000; A waterbath method for the detection of potential ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. Bulletin IOBC wprs, Vol.23 (12), 53-60.

6 Bijlage: Statistische analyses

Anova output van Genstat, voor 15 april 2009 (eerste telling, 2 subherhalingen per concentraat, niet significant)

Analysis of variance

Variate: average

Source of \ d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F	pr.
rep straturr	3 32033242	10677747			0.36
rep.*Units* stratum					
treatment	1 31974679	31974679		1.08	0.375
Residual	3 88732068	29577356			
Total	7 1.53E+08				

Tables of means

Variate: average

Grand mean 10540.

treatment	1	2
	8541	12539

Standard errors of differences of means

Table	treatment
rep.	4
d.f.	3
s.e.d.	3845.6

Least significant differences of means (5% level)

Table	treatment
rep.	4
d.f.	3
l.s.d.	12238.4

Anova output voor 22-4-2009. tweede telling, drie subherhalingen per concentraat, meer sporen, significant en ook een significant blok effect.

Analysis of variance

Variate: aantal_gblad

Source of va	d.f.	s.s.	m.s.	v.r.	F	pr.
herh stratum	3	5.11E+08	1.7E+08	13.61		
herh.*Units* stratum						
behandeling	1	1.94E+08	1.94E+08	15.51	0.029	
Residual	3	37577805	12525935			
Total	7	7.43E+08				

Tables of means

Variate: aantal_gblad

Grand mean 27028.

behandeling	1	2
	22101	31956

Standard errors of differences of means

Table	behandeling
rep.	4
d.f.	3
s.e.d.	2502.6

Least significant differences of means (5% level)

Table	behandeling
rep.	4
d.f.	3
l.s.d.	7964.4