

***Pythium*-aantasting: het gevolg van een verstoord biologisch evenwicht**

G.J. van Os

Laboratorium voor Bloembollenonderzoek

CPRO-DLO

IPO-DLO

LBO

Oktober 1995

ISBN: 910326

***Pythium*-aantasting: het gevolg van een verstoord biologisch evenwicht**

Eindverslag van het project
'Bestrijding van *Pythium spp.* in de
bloembollenteelt'

Kosten eindverslag Dfl. 10,--

Medewerkers:

G.J. van Os, W.J.M. van Gulik, A.Th.J. Koster,
A.S. van Bruggen, J. van Doorn, J. van Aartrijk

Onderzoekspartners 'Urgentieprogramma Bollenziekte-
en veredelingsonderzoek'

- DLO-Centrum voor Plantenveredelings- en
Reproductieonderzoek (CPRO-DLO)
- DLO-Instituut voor Planteziektenkundig Onderzoek
(IPO-DLO)
- Laboratorium voor Bloembollenonderzoek (LBO)

Financiering: 50% medefinanciering door het
Nederlandse bollenbedrijfsleven via het
Produktschap voor Siergewassen

Laboratorium voor Bloembollenonderzoek (LBO)
Vennestraat 22
Postbus 85, 2160 AB Lisse
Telefoon: 0252-462121
Telefax : 0252-417762

Inhoudsopgave

1.	Samenvatting	3
2.	Personele inzet	4
3.	Organisatie	5
4.	Probleembeschrijving en doelstelling bij aanvang van het onderzoek	5
5.	Tussentijdse evaluatie	6
6.	Werkwijze	6
6.1	<i>Pythium</i> -detectie	6
6.2	Veldproeven	7
6.3	Kasproeven	8
6.4	Laboratoriumproeven	9
7.	Onderzoeksresultaten	10
7.1	Ziekteverloop, laat planten, bewaartemperatuur plantgoed	10
7.2	Pathogeniteitstest	13
7.3	Tussengewassen	13
7.4	Inundatie	14
7.5	Chemische grondontsmetting	16
7.6	GFT-compost	17
7.7	Groeisnelheid door grond	18
7.8	Microbiële activiteit in grond	19
8.	Conclusies met betrekking tot doel- en probleemstelling	20
9.	Samenwerking	20
10.	Aanbevelingen	21
11.	Output	22
12.	Literatuur	25

Bijlage 1	Organisatieoverzicht Urgentieprogramma
Bijlage 2	Overzicht projecten Urgentieprogramma
Bijlage 3	Projectbeschrijving 1990
Bijlage 4	Recepten
Bijlage 5	Resultaten

1. Samenvatting

Pythium-schimmels vormen een belangrijk probleem voor de bollenteelt van o.a. hyacint, krokus, iris, en lelie. De schimmel veroorzaakt wortelrot in deze gewassen, hetgeen leidt tot vroegtijdige afsterving en slechte bolgroei. Bestrijding van de ziekte is zeer afhankelijk van de inzet van chemische middelen, hetzij breedwerkend van aard (grondontsmettingsmiddelen), hetzij met een specifiek werkingsmechanisme. De afgelopen jaren is de druk op het gebruik van deze middelen toegenomen door intrekking van toelatingen, stopzetting van de productie, het ontstaan van resistentie bij de schimmel of door regulering van de toepassing. Chemische alternatieven zijn niet aanwezig of veel minder effectief. Niet-chemische alternatieven ontbreken.

In 1990 is in het kader van het Urgentieprogramma Bloembollenziekten- en veredelingsonderzoek een vijfjarig onderzoek gestart naar de mogelijkheden voor niet-chemische beheersing van *Pythium*. Dit project heeft veel informatie opgeleverd op basis waarvan onderscheid kan worden gemaakt tussen factoren die weinig of geen bijdrage leveren aan het *Pythium*-probleem en factoren die van groot belang zijn.

Er is een toetssysteem ontwikkeld dat periodieke beoordeling van wortels en van aantasting in de vollegrond mogelijk maakt gedurende het teeltseizoen. Hiermee is een beeld verkregen van de wortelontwikkeling en het ziekteverloop in iris en krokus en van de populatiedynamiek van *Pythium*. *Pythium* blijkt het gehele teeltseizoen actief te zijn, ook bij lage bodemtemperaturen, en de schimmel komt voor in de gehele teeltlaag tot in het grondwater. Aangevoerd is verder dat de bewaartemperatuur van het plantgoed en de plantdatum de wortelontwikkeling en de vatbaarheid van het gewas voor *Pythium* beïnvloeden. Een hoge bewaartemperatuur en een late plantdatum kunnen leiden tot uitstel van de *Pythium*-aantasting, waardoor de planten langer gezonde wortels houden.

Bij bemonstering van praktijkpercelen is gebleken dat in elk perceel diverse *Pythium*-soorten voorkomen, waaronder zowel onschadelijke als ziekteverwekkende soorten. Er is geen verband gevonden tussen de totale hoeveelheid *Pythium* in de grond, de mate van aantasting in iris en diverse fysische en chemische bodemeigenschappen.

Een probleem bij de analyse van de resultaten is het feit dat betrouwbare determinatie van *Pythium*-soorten nog niet goed mogelijk was. Zeker voor veldsituaties onder praktijkomstandigheden is deze kennis vereist. Daarom is begonnen met de ontwikkeling van een determinatiemethode met behulp van DNA-technieken. Hierbij is gezocht naar soort-specifieke verschillen in het *Pythium*-DNA, die zichtbaar gemaakt kunnen worden in de vorm van een 'streepjescode'. De perspectieven voor toepasbaarheid van deze methode zijn zeer goed.

Pythium is een snel groeiende schimmel die grond snel kan koloniseren als er weinig of geen andere micro-organismen aanwezig zijn. Veld- en kasproeven hebben aangetoond dat in afwezigheid van andere micro-organismen in grond de aantasting door *Pythium* zeer snel kan verlopen. Dat het stomen van grond alle micro-organismen doodt en hiermee een biologisch vacuüm schept was reeds bekend. Bij introductie van *Pythium* in gestoomde grond kan de schimmel zich explosief ontwikkelen en een verhevigde aantasting veroorzaken. In het onderzoek is aangetoond dat ook bij inundatie een deel van de micro-organismen in de grond wordt gedood, terwijl *Pythium* overleeft en na de inundatie méér aantasting veroorzaakt. In besmette praktijkgrond leidde inundatie dan ook tot

een opbrengstreduktie in irissen, wanneer deze direkt na de inundatie werden geteeld. Uit kasproeven zijn resultaten verkregen die erop wijzen dat ook na chemische grondontsmetting een vergelijkbaar effect optreedt. Een *Pythium*-besmetting in chemisch ontsmette grond resulteerde in een zwaardere aantasting dan eenzelfde besmetting in niet-ontsmette grond.

In laboratoriumproeven is aangetoond dat na het steriliseren, inunderen of ontsmetten van grond de microbiële activiteit is verminderd en *Pythium* sneller door de grond kan groeien. Totdat het biologisch evenwicht in zekere mate weer is hersteld, is er bij een (her-)besmetting met *Pythium* een verhoogd risico op aantasting en kan beter geen *Pythium*-gevoelig gewas worden geteeld. Na inundatie kan bijvoorbeeld veilig narcis worden geteeld alvorens een *Pythium*-gevoelig gewas als iris te planten.

Naar aanleiding van deze proefresultaten wordt verwacht dat het *Pythium*-probleem in de bollenteelt nauw samenhangt met het verstoren en herstellen van het biologisch evenwicht in de grond. Herstel van het biologisch evenwicht op natuurlijke wijze kan een jaar of langer duren. Onderzocht is of het herstel van de microflora kan worden gestimuleerd door toediening van GFT-compost aan de grond; gerijpte GFT-compost bevat namelijk zeer veel micro-organismen. Resultaten uit kasproeven laten zien dat toediening van gerijpte GFT-compost de ziektevering tegen *Pythium* verhoogt in gesteriliseerde, geïnundeerde en chemisch ontsmette grond. Een hogere ziektevering leidt tot minder aantasting en een minder goede groei van *Pythium* door de grond.

Een deel van de bovenstaande onderzoeksresultaten is van direkt belang voor de praktijk. De in kasproeven verkregen inzichten en strategieën voor *Pythium*-beheersing worden thans onder veldomstandigheden beproefd in diverse gewassen.

2. Personele inzet

Het onderzoek is uitgevoerd op het LBO met de volgende personele inzet:

Additioneel

Onderzoeker	G.J. van Os	1.0 f.pl.	(01-05-1990 t/m 30-04-1995)
Assistent-onderzoeker	W.J.M van Gulik	1.0 f.pl.	(01-07-1990 t/m 30-04-1995)
Stagiaires	H. Hasselo Smits		(01-11-1992 t/m 30-04-1993)
	C. Tiel		(19-04-1993 t/m 16-07-1993)
	M. van Muijen		(01-09-1994 t/m 30-04-1995)

Niet additioneel

Onderzoekers	R.J.M. de Greeff	0.1 f.pl.	(01-05-1990 t/m 30-08-1991)
	A.S. van Bruggen	0.1 f.pl.	(01-11-1991 t/m 30-04-1995)
	A.Th.J. Koster	0.1 f.pl.	(01-05-1990 t/m 30-04-1995)
	J. van Doorn	0.1 f.pl.	(01-06-1993 t/m 31-02-1994)
	J. van Aartrijk	p.m.	(01-05-1990 t/m 30-04-1995)
Assistent-onderzoeker	W. de Haan	0.1 f.pl.	(01-06-1993 t/m 31-08-1993)
Gewasverzorging	div. (totaal)	0.1 f.pl.	(01-09-1990 t/m 30-03-1995)

3. Organisatie

Het onderzoek werd uitgevoerd binnen de afdelingen Gewasbescherming en Plantkwaliteit (identificatie-methode) van het LBO. Regelmatige bespreking van het onderzoek vond plaats bij de twee-wekelijkse werkbijeenkomsten van de afdeling Gewasbescherming en de maandelijkse onderzoeksbesprekingen van het LBO. Tweemaal per jaar vond overleg plaats met de medewerkers van de Urgentieprojecten 1.2 (Overleving en activiteit van virusoverdragende nematoden (*Trichodoridae*) in de bloembollenteelt) en 1.3 (*Rhizoctonia solani* in tulp en iris in relatie tot bodemreceptiviteit) van het IPO-DLO. Binnen deze groep werd het onderzoek in detail besproken.

Overleg met het Programmteam en het Programmabestuur vond plaats conform het organisatieoverzicht in bijlage 1.

4. Probleembeschrijving en doelstelling bij aanvang van het onderzoek

Zie ook de beschrijving van Probleem, aard en doel der activiteiten in bijlage 3, projectbeschrijving 1990.

Probleembeschrijving

Pythium-schimmels vormen een belangrijk probleem voor de bollenteelt van o.a. hyacint, crocus, iris en lelie in de belangrijkste bloembollenteeltgebieden op zandgrond in Nederland. In toenemende mate worden ook meldingen ontvangen van *Pythium*-aantastingen in - onder veldomstandigheden - minder vatbaar geachte gewassen (tulp, gladiolus).

Bestrijding van de ziekte is zeer afhankelijk van de inzet van chemische middelen, hetzij breedwerkend van aard (grondontsmettingsmiddelen dichloorpropeen, dichloorpropeen/ etridiazol, metanatrium), hetzij met een specifiek werkingsmechanisme (furalaxyl, metalaxyl). De druk op het gebruik van deze bestrijdingsmiddelen neemt toe door intrekking van toelatingen of stopzetting van de productie (cyproflumazone), door het ontstaan van resistentie bij de schimmel (furalaxyl, metalaxyl), of door regulering van de toepassing (grondontsmettingsmiddelen).

Chemische alternatieven zijn niet aanwezig of veel minder effectief.

Niet-chemische mogelijkheden voor de beheersing van *Pythium* zijn derhalve dringend nodig. Voor zover nu bekend bezit slechts een klein tot beperkt deel van het geteelde sortiment resistentie of relatief lage gevoeligheid voor *Pythium*-aantasting.

Doelstelling

Voor het ontwikkelen van bestrijdingsmethoden van *Pythium* is kennis over de biologie, de ecologie en de verspreiding van de schimmel in de grond en over het infectie- en ziekteproces essentieel. Resultaten van een dergelijk onderzoek kunnen relatief snel worden benut voor de diverse gewassen en cultivars.

Bij aanvang van het project waren er drie deeldoelstellingen:

1. Het vergaren van algemene informatie met betrekking tot het verloop van de *Pythium*-aantasting in vollegrond gedurende het teeltseizoen en het effect van teeltmaatregelen hierop.

2. Ontwikkeling van kwalitatieve en kwantitatieve detektiemethoden voor *Pythium* in grond; met deze methoden kunnen de onderzoeksmogelijkheden aanzienlijk worden uitgebreid.
3. Het ontrafelen van deelprocessen die een rol kunnen spelen bij de overleving, de vermeerdering en de aantasting door *Pythium*, zoals o.a. het (micro-)biologisch evenwicht in de grond, de wortelontwikkeling, de aanwezigheid van wortelresten en gewasrotatie.

Het gehele pakket aan onderzoek verschaft inzicht in de toepassingsmogelijkheden voor cultuurmaatregelen en/of biologische methoden ter beheersing van *Pythium*-wortelrot.

5. Tussentijdse evaluatie

Er heeft een tussentijdse evaluatie plaats gevonden over de periode van 01-05-1990 tot 01-11-1992. Bijstelling van het programma bleek niet nodig aangezien het onderzoek op schema lag en de eerder geschetste probleembeschrijving nog onverminderd van kracht was. Op basis van de verkregen resultaten is de nadruk in het onderzoek komen te liggen op aspecten die de ziektevering van grond tegen *Pythium* beïnvloeden. Tevens is op de tweede deeldoelstelling, met betrekking tot de ontwikkeling van kwalitatieve detektiemethoden, een zwaarder accent komen te liggen dan in de projectbeschrijving werd voorzien. Dit is toe te schrijven aan de problemen die zich voordeden bij het identificeren van *Pythium*-soorten. Door het LBO werd vanaf 1 februari 1994, buiten dit project, extra capaciteit ingezet om de ontwikkeling van een determinatie-methode met behulp van DNA-technieken te versnellen.

6. Werkwijze

6.1 *Pythium*-detectie

Kwantitatieve detectie

Voor een directe bepaling van de *Pythium*-dichtheid in grond is gebruik gemaakt van een uitplaatmethode (Stanghellini & Hancock, 1970; zie bijlage 4: uitplaatmethode). Hiermee kan het aantal actieve *Pythium*-deeltjes in grond worden bepaald. De *Pythium*-dichtheid wordt vervolgens uitgedrukt in 'colony forming units' per gram grond (CFU/g grond).

Voor de beoordeling van de mate van aantasting in een vatbaar gewas is gebruik gemaakt van een wortelrot-index. Dit is een cijfer op een schaal van 0 tot 5, waarbij de mate van aantasting toeneemt van 0 (gezonde wortels) tot 5 (zeer zwaar aangetaste wortels).

Proeven zijn altijd in herhalingen opgezet. Dit betekent dat van elke behandeling 3 tot 8 veldjes, potten, buizen, bakjes of monsters zijn ingezet en gescoord. De meeste proeven zijn bovendien twee of drie maal uitgevoerd, waarna de resultaten gezamenlijk statistisch zijn verwerkt. Bij de resultaten in de tabellen staan letters vermeld, zgn. significantie-indexen. Deze letters geven aan welke behandelingen wel of niet significant van elkaar verschillen. Behandelingen met eenzelfde letter zijn niet verschillend van elkaar, behandelingen met (uitsluitend) verschillende letters zijn wel significant verschillend.

Kwalitatieve detectie

Kwalitatieve detectie is bepalen tot welke *Pythium*-soort een isolaat behoort. Er bestaan meer dan honderd *Pythium*-soorten, waarvan slechts een aantal wortelrot kan veroorzaken op bolgewassen. Aan de aantasting of aan de groei van de schimmel op een kunstmatig medium (agar) is niet te zien om welke soort(en) het gaat. De conventionele methode om *Pythium*-soorten te determineren werkt op basis van morfologische eigenschappen met behulp van een microscoop. Deze methode is zeer tijdrovend, moeilijk en tamelijk onbetrouwbaar. Binnen dit project is in samenwerking met het Centraal Bureau voor de Schimmelcultures (CBS, Baarn) gestart met de ontwikkeling van een alternatieve determinatie-methode die sneller en betrouwbaarder is. Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van verschillen in het erfelijk materiaal, het DNA, van diverse *Pythium*-soorten. Deze verschillen in het DNA kunnen met speciale technieken zichtbaar worden gemaakt in een soort streepjescode; elke *Pythium*-soort heeft z'n eigen, specifieke streepjescode (Buchko & Klassen, 1990; Chen, 1992; Chen, Hoy & Schneider, 1992; Lévesque, Vrain & De Boer, 1994). Wanneer deze code voor elke soort bekend is, kan een onbekend *Pythium*-isolaat uit grond of uit aangetaste wortels aan de hand van zijn streepjescode worden gedetermineerd.

Deze determinatie-methode is vanaf februari 1994 verder ontwikkeld in een separaat LBO-project door drs. J. van Doorn. In de loop van 1995 zal deze techniek beschikbaar komen voor toepassing in het *Pythium*-onderzoek.

6.2 Veldproeven

Ziekteverloop

Veldproeven zijn uitgevoerd in drie achtereenvolgende jaren ter bestudering van o.a. het ziekteverloop en de gewasontwikkeling gedurende het teeltseizoen en het effect van laat planten bij de fijnbollige iris 'White van Vliet' (zift 5-6) en de krokussen 'Golden Bunch' (zift 7-8) en 'Flower Record' (zift 7-8). Hiertoe zijn PVC-buizen (lengte 60 cm, diameter 10 cm) gevuld met al of niet besmette grond, verticaal ingegraven op de LBO-proeftuin en beplant. Het plantgoed is voor de bewaring gedurende 15 minuten ontsmet in 1% formaline en tot aan de plantdatum bewaard bij 30°C (iris) of 23°C (krokus). Er zijn twee plantdata gehanteerd: vroeg = 1^e week oktober, laat = 3^e week november. Na het planten zijn maandelijks buizen gerooid en zijn waarnemingen gedaan aan gewasgroei, aantasting en *Pythium*-dichtheid in de grond. Tijdens de proeven werden de lucht- en bodemtemperatuur, neerslag en grondwaterpeil geregistreerd.

Door deze proefopzet in buizen was het technisch mogelijk om periodiek de gewassen te rooien zonder de wortels te beschadigen en tevens om grondmonsters te nemen op elke gewenste diepte tot onder het grondwatermivo (gemiddeld grondwaterpeil ca. 55 cm onder maaiveld).

Inundatieproeven

In de inundatiebakken op de LBO-proeftuin zijn in vier achtereenvolgende jaren inundatie-proeven uitgevoerd. Elke inundatiebak (lxbxh=140x85x85 cm) was gevuld met praktijkgrond met een natuurlijke *Pythium*-besmetting en is afzonderlijk al dan niet geïnundeerd gedurende acht weken. De bakken zijn vervolgens al dan niet behandeld met Fongarid en in oktober beplant met iris 'White van Vliet' of met narcis 'Carlton'. Na het rooien is per bak de opbrengst bepaald.

Tussengewassen

Twee achtereenvolgende jaren zijn veldproeven uitgevoerd op de LBO-tuin om na te gaan of de teelt van tussengewassen in de zomerperiode nadelige gevolgen kan hebben m.b.t. de schade door *Pythium* in een vatbaar volggewas. Met *Pythium* besmette grond is begin juli al of niet ingezaaid met gele mosterd (15 kg/ha), bladrammenas (20 kg/ha), Phacelia (8 kg/ha) of *Tagetes patula* (10 kg/ha). Om zaadvorming te voorkomen zijn de gewassen indien nodig afgemaaid (m.u.v. *Tagetes*). De gewassen zijn eind september gehakseld en half oktober ondergewerkt vlak voor het planten van krokus cv. Flower Record. Aan het eind van het teeltseizoen van de krokussen zijn opbrengstbepalingen gedaan.

6.3 Kasproeven

Om inzicht te krijgen in de invloed van diverse teeltmaatregelen c.q. grondbehandelingen op de vermeerdering en aantasting door *Pythium* en om inzicht te krijgen in de factoren die bijdragen aan de ziektevering van grond tegen *Pythium*, was het noodzakelijk om kasproeven uit te voeren onder geconditioneerde omstandigheden.

Substraat

De kasproeven zijn uitgevoerd in rivierzand of in bollengrond (grond van de LBO-proeftuin). Van nature komen er in elk praktijkperceel bodemziekten voor en bovendien diverse *Pythium*-soorten, die niet te onderscheiden zijn van de *Pythium* die kunstmatig wordt aangebracht voor de kasproeven. Daarom was het noodzakelijk om de bollengrond vóór gebruik te stomen. Hiermee werden echter behalve de ziekteverwekkers ook alle overige organismen in de grond gedood. Omdat dit resulteert in een zeer onnatuurlijke situatie, heeft de gestoomde grond vóór aanvang van de proeven minimaal zes maanden buiten gelegen om aan de lucht te herkoloniseren met micro-organismen. Deze niet-steriele, *Pythium*-vrije bollengrond heeft als substraat gediend voor de meeste kasproeven.

Besmetting

In alle kasproeven zijn zowel besmette behandelingen als onbesmette behandelingen (controles) ingezet. Een kunstmatige *Pythium*-besmetting is aangebracht door 2,5% tot 5% aardemeelcultuur van een of meer isolaten uit de LBO-collectie door de grond te mengen (zie bijlage 4: aardemeelcultuur *Pythium*). Voor proeven met iris, krokus en hyacint waren dit isolaten van respectievelijk *P. macrosporum*, *P. irregulare* en *P. intermedium*.

Grondbehandelingen

Sterilisatie van grond is uitgevoerd door te autoclaveren (2 x 1 uur bij 121°C met een tussenpoos van minimaal 24 uur).

Inundatie is uitgevoerd door kunstmatig besmette bollengrond gedurende 8 weken in potten onder water te zetten. Hierbij is enige doorstroming van het water gerealiseerd zoals die ook in de praktijk optreedt tijdens inundatie.

Chemische grondontsmetting is uitgevoerd met methylisothiocyanaat (MITC = werkzame stof van metamnatrium, 40%-oplossing, 250 l/ha) en dichloorpropeen (DCP = cis-dichloorpropeen, 1160 g/l, 160 l/ha) in dichtgesealde plastic zakken bij een temperatuur van 20°C gedurende 5 weken, gevolgd door 1 week uitwasemen. GFT-compost is vers gehaald bij de CAW, Middenmeer. Deze verse compost is vervolgens gedurende minimaal 5 weken nagerijpt bij 20°C en een vochtgehalte van ca. 50% (w/w). De compost is wekelijks omgezet. De maximaal toegestane dosering voor GFT-compost in de vollegrondsteelt is 6 ton/ha per jaar of 12 ton/ha eenmaal in twee jaar. 12 ton/ha is omgerekend voor de potexperimenten ca. 1% (w/v) rijpe GFT-compost. De gerijpte GFT-compost werd door de grond gemengd één week voordat de *Pythium*-besmetting werd aangebracht en de bollen werden geplant.

Keuze toetsgewas

De meeste bolgewassen zijn minder geschikt als toetsgewas voor een snelle jaarrond te gebruiken biotoets door beperkte beschikbaarheid, lange teeltduur en variabele gevoeligheid voor *Pythium*. Daarom is gezocht naar een geschikt zaaigewas dat gevoelig zou moeten zijn voor de *Pythium*-soorten die ook bolgewassen aantasten. Een dergelijk zaaigewas kon niet worden gevonden. Bovendien moesten voor zaaigewassen de proefomstandigheden dermate worden aangepast, dat de vertaalslag naar praktijkomstandigheden buitengewoon moeilijk zou worden. Uiteindelijk is gekozen voor iris cv. White van Vliet als toetsgewas. In enkele proeven zijn tevens crocus, hyacint, tulp en lelie gebruikt (5 bollen per pot). Alle bollen zijn voor de bewaring gedurende 15 minuten ontsmet in 1% formaline en als volgt bewaard:

gewas	cultivar	zift	bewaring	kas*
iris	White van Vliet	7-8	30°C, 8 wk 9°C + 2 wk 17°C	18°C
krokus	Golden Bunch	6-7	23°C, 8 wk 9°C droog + 7 wk 9°C geplant	18°C
hyacint	Pink Pearl	12*	25°C, 4 wk 17°C + 7 wk 9°C geplant	23°C
tulp	Gander	11	20°C, 1 wk 17°C + 1 wk 5°C	18°C
lelie	Enchantment	14	-1°C	13°/17°C

* kas: 18°C - klimaatkamer met kunstmatige belichting, 16 uur licht

23°C - kas (daglicht)

13°C - kas (daglicht), 4 weken

17°C - kas met belichting (Sont-T lampen), 8 weken

Waarnemingen

Rond de bloeitijd zijn de wortels van de planten met water schoongespoeld en is per pot de gemiddelde aantasting bepaald (wortelrot-index: van 0=gezond tot 5=zwaar aangetast). Tevens werd uit elke pot een grondmonster genomen om de *Pythium*-dichtheid te bepalen.

6.4 Laboratoriumproeven

Om een gedetailleerder beeld te krijgen van de processen die zich in de grond afspelen onder invloed van sterilisatie, inundatie, chemische grondontsmetting en toediening van 1% gerijpte GFT-compost, is op laboratoriumschaal gekeken naar de groeisnelheid van *Pythium* en de microbiële activiteit in al of niet behandelde grond.

Groeisnelheid van *Pythium* door grond

Om te bepalen of de groeisnelheid van *Pythium* door grond wordt beïnvloed door bovengenoemde grondbehandelingen zijn plastic bakjes (l x b x h = 20 x 9 x 9 cm) gevuld met al of niet behandelde bollengrond. Langs een korte zijde van de bakjes is vervolgens *Pythium* aangebracht. Om enige groei te garanderen is steeds 2 g/l haverhoutmeel door het zand gemengd als voedingsbron voor *Pythium*. Periodiek zijn op regelmatige afstand van het inoculum grondmonsters gestoken die zijn uitgelegd op een selectief medium voor *Pythium* (zie bijlage 4: selectief medium voor *Pythium*, CMA) om de aanwezigheid van de schimmel te kunnen scoren. Door de periodiciteit van de monsternames kon de groeisnelheid van de *Pythium* worden bepaald.

Microbiële activiteit in grond

Micro-organismen in grond produceren dehydrogenase-enzymen ten behoeve van hun energiehuishouding. De enzymactiviteit kan worden gemeten en wordt beschouwd als een goede maat voor de microbiële activiteit in de grond. Om na te gaan of de activiteit van de bodemmicro-organismen wordt beïnvloed door bovengenoemde grondbehandelingen is in al of niet behandelde grond de dehydrogenase-activiteit gemeten (Alef, 1991; Domsch *et al.*, 1979; Smith & Pugh, 1979; zie bijlage 4: bepaling dehydrogenase-activiteit). De dehydrogenase-activiteit zal grotendeels afhankelijk zijn van het aantal micro-organismen en de hoeveelheid beschikbaar voedingsstoffen in de grond; als er weinig voedingsstoffen zijn zullen de micro-organismen weinig activiteit vertonen. In verband hiermee zijn er bepalingen uitgevoerd zonder en met toevoeging van glucose als extra voedingsbron voor de micro-organismen.

7. Onderzoekresultaten

Bij bemonstering van diverse praktijkpercelen is in elk perceel *Pythium* gevonden. Verschillen in *Pythium*-dichtheden waren er tussen percelen, maar ook tussen monsterplaatsen binnen de percelen. Er is geen correlatie gevonden tussen de totale *Pythium*-dichtheid in de praktijkgrond en de mate van aantasting in iris (biotoets): veel *Pythium* in grond leidde niet zondermeer tot veel aantasting en omgekeerd geldt ook dat weinig *Pythium* veel aantasting kon veroorzaken. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat slechts een deel van de *Pythium*-soorten in de grond ziekteverwekkend (pathogeen) is. De verhouding wel/niet pathogene *Pythium*-soorten en ook de agressiviteit van de *Pythium*-soorten is waarschijnlijk niet in elk perceel hetzelfde. Om meer duidelijkheid te krijgen over de verschillende *Pythium*-soorten zijn betere identificatie-technieken noodzakelijk (zie §6.1).

In kasproeven is aannemelijk gemaakt dat toxische stoffen, die mogelijk worden uitgescheiden door *Pythium*, geen grote rol spelen bij de symptoomvorming in wortels.

In alle onderstaande tabellen staan steeds de resultaten vermeld van de besmette behandelingen van proeven; in de onbesmette behandelingen is geen *Pythium* waargenomen. In bijlage 5 staan voorlopige resultaten van proeven die slechts één maal zijn uitgevoerd.

7.1 Ziekteverloop, effect van laat planten en bewaartemperatuur van het plantgoed

Een veldproef in buizen is in drie achtereenvolgende jaren uitgevoerd ter bestudering van de wortelontwikkeling, het aantastingsverloop en de inoculumdichtheid gedurende het teeltseizoen en het effect van laat planten. De proef is uitgevoerd met de fijnbollige iriscultivar 'White van Vliet' en de krokuscultivars 'Golden Bunch' en 'Flower Record'. De plantdatum bleek bij beide gewassen de gewasontwikkeling en het moment van aantasting te beïnvloeden: vroeg geplante bollen/knollen werden over het algemeen binnen enkele weken aangetast, terwijl laat planten leidde tot uitstel van het moment van aantasting tot in januari. De eerste aangetaste wortelpuntjes verschenen altijd 0-5 cm onder de bol/knol, onafhankelijk van het moment van aantasting. Na verloop van tijd werden ook op grotere diepte symptomen zichtbaar en uiteindelijk trad verslijming en vervroegde afsterving van de wortels op. Laat planten leidde altijd tot uitstel van de aantasting, waardoor het gewas in het voorjaar gezondere wortels had.

De *Pythium*-besmetting, die over de hele diepte van de buizen was aangebracht, is gedurende het hele seizoen op elke diepte teruggevonden, ook onder het grondwatermivo. Er is geen correlatie gevonden tussen aantasting, inoculumdichtheid en bodemtemperatuur. Ook bij zeer lage bodemtemperaturen (1°C) was *Pythium* nog volop actief. Het lijkt dan ook aannemelijk dat het moment van aantasting niet alleen wordt bepaald door de hoeveelheid of de activiteit van de *Pythium* in de grond, maar ook door de conditie en de ontwikkeling van het gewas en de wortels.

Later planten betekent dat het plantgoed langer wordt bewaard. In kasproeven is aangetoond dat de bewaartemperatuur van het plantgoed de wortelontwikkeling en de vatbaarheid van de wortels voor *Pythium* kan beïnvloeden. Na een koude bewaring (9°C) waren de wortels van iris 'White van Vliet' dikker en tevens vatbaarder voor *Pythium* dan na een warme bewaring (30°C). Bij krokus 'Flower Record' trad er na een koude bewaring (13°C) een snellere wortelgroei en ook een zwaardere *Pythium*-aantasting op dan na een warme bewaring (23°C). De bewaartemperatuur had geen invloed op de wortelontwikkeling of de vatbaarheid van krokus 'Golden Bunch' (tabel 1).

Tabel 1: *Pythium*-aantasting in iris en krokus (0=gezond, 5=zware aantasting) na bewaring van het plantgoed bij verschillende temperaturen

bewaartemperatuur	iris 'White van Vliet'	krokus Flower Record'	krokus 'Golden Bunch'
9°C	2.5 a	-	-
13°C	-	3.0 a	1.9 a
17°C	2.6 a	-	-
23°C	-	1.4 b	1.5 a
30°C	0.3 b	-	-

Een combinatie van laat planten en een hoge bewaartemperatuur kan leiden tot uitstel van aantasting. Dit voordelige effect dient echter zorgvuldig te worden afgewogen tegen mogelijk nadelige effecten van laat planten en hoge bewaartemperaturen. Voor kleine plantgoedmaten van iris geldt dat laat planten en warm bewaren een positief effect kan hebben op de opbrengst; de vertraagde gewasgroei leidt in het voorjaar tot een latere opkomst van de spruit, waardoor minder vorstschade en bovengrondse infecties optreden. Dit geeft een opbrengstverbetering. Bij twijfelmaten echter wordt door laat planten het bloeipercantage verhoogd. Dit is ongewenst, omdat de bloei leidt tot een reductie van het aantal ronde, leverbare bollen. Bij krokus leidt laat planten en warm bewaren tot een verhoogde kans op penbreuk en verstening van de knollen. De vertraagde gewasgroei resulteert bij dit gewas door de kortere produktieperiode in een opbrengstreductie. Er zijn hierin echter grote verschillen tussen cultivars. Als een eventuele opbrengstderving wordt gecompenseerd door minder schade als gevolg van *Pythium*, dan is laat planten per saldo voordelig. Deze optelsom is afhankelijk van gewas, cultivar en ziftmaat.

Theoretisch kunnen cultivars worden ingedeeld in vier groepen, gebaseerd op hun vatbaarheid voor *Pythium* en gevoeligheid voor laat planten (al of geen opbrengstderving). In tabel 2 staat deze indeling, waaraan per groep een advies over vroeg of laat planten is gekoppeld. In de tabellen 3 en 4 staat vermeld tot welke groepen diverse iris- en krokus-cultivars behoren volgens deze indeling. De teelt van *Crocus vernus* beslaat meer dan de helft van het krokusareaal en met name deze grootbloemige krokussen vormen een groep waarvoor laat planten problematisch is (groep 4). In een veldproef met de grootbloemige krokuscultivar 'Flower Record' op besmette grond heeft laat planten niet geresulteerd in een significante opbrengstverbetering doordat de 'Flower Record' erg gevoelig is voor laat planten (resultaten in bijlage 5, tabel I). Wel mag worden verwacht dat er, als gevolg van minder aantasting, bij laat planten minder *Pythium*-besmetting in de grond is opgebouwd dan bij vroeg planten (dit is niet onderzocht). Het is tevens waarschijnlijk dat bij andere krokussoorten, die minder gevoelig zijn voor laat planten, de opbrengstbalans wel positief uitvalt. Voor een betere onderbouwing van de groepsindeling zal van meer cultivars de vatbaarheid voor *Pythium* en de gevoeligheid voor laat planten onder veldomstandigheden moeten worden getoetst. Mogelijk is ook met een optimalisering van de bewaartemperaturen nog winst te behalen.

Tabel 2: Theoretische groepsindeling voor iris en krokus met betrekking tot planttijdstip, gebaseerd op vatbaarheid voor *Pythium* en gevoeligheid voor laat planten

groep	vatbaarheid voor <i>Pythium</i> ¹⁾	gevoeligheid voor laat planten ²⁾	planttijdstip ³⁾
1.	-	-	vroeg/laat planten
2.	-	+	vroeg planten
3.	+	-	laat planten
4.	+	+	nog in onderzoek

1) aantasting : - < 2.5 < +

2) opbrengstreduktie <10%

3) iris : vroeg=half oktober, laat=eind november
 krokus : vroeg=eind september, laat=eind oktober

Tabel 3: Groepsindeling iris-cultivars

% areaal	soort	ziftmaat	vatbaarheid (1-5)*	
90	grobollige iris	kleine maat twijfelmaat	2.0	groep 1 groep 2
10	fijnbollige iris	kleine maat twijfelmaat	3.9	groep 3 groep 4

* 1=niet vatbaar, 5=zeer vatbaar voor *Pythium*
 (gegevens ontleend aan Van Keulen & Van Aartrijk, 1993)

Tabel 4: Groepsindeling krokus-soorten

% areaal	soort	geteste cultivar	vatbaarheid 1-5*	
56	<i>Crocus vernus</i> (grootbloemige)	Flower Record, Pickwick	3.5	groep 4
20	<i>Crocus chrysanthus</i>	Cream Beauty	2.9	groep 3/4
17	<i>Crocus flavus</i>	Grote Gele	3.0	groep 3
4	<i>Crocus tomasinianus</i>	Ruby Giant	1.7	groep 2
1	<i>Crocus ancyrensis</i>	Golden Bunch	5.0	groep 3/4
2	overig	-	1.0-5.0	?

* 1=niet vatbaar, 5=zeer vatbaar voor *Pythium*
(gegevens ontleend aan Van Keulen & Van Aartijk, 1993)

7.2 Pathogeniteitstest

In verband met gewasrotatie is het belangrijk te weten of bepaalde *Pythium*-soorten in staat zijn diverse bolgewassen aan te tasten. Met andere woorden, is voor elke pathogene (=ziekteverwekkende) *Pythium*-soort een waardplantenreeks vast te stellen? Vijftien *Pythium*-isolaten (waarvan zes waren gedetermineerd) zijn getest op hun vermogen om wortelrot te veroorzaken in iris, krokus, hyacint, tulp en lelie, een zgn. pathogeniteitstest. Veel isolaten bleken in staat om de toetsgewassen in meer of mindere mate aan te tasten (resultaten in bijlage 5, tabel II). Er waren verschillen in pathogeniteit tussen *Pythium*-soorten, maar ook tussen isolaten van dezelfde soort. Op basis van deze resultaten kan niet worden geconcludeerd of er sprake is van een waardplantenreeks per *Pythium*-soort. Te velde zal de mate van aantasting waarschijnlijk grotendeels afhankelijk zijn van omgevingsfactoren en de conditie van het gewas. Daar bovendien mag worden verwacht dat in elk perceel een mengsel van *Pythium*-soorten voorkomt in de grond, kan er geen conclusie worden getrokken over een algemeen advies voor gewasrotatie met bolgewassen. De opvatting dat een breed rotatieschema een bijdrage zou kunnen leveren aan de beperking van de infectiedruk blijft gehandhaafd.

7.3 Tussengewassen

De teelt van tussengewassen in de zomerperiode is in opkomst, onder andere doordat de toepassing van drijfmest voor de stuifbestrijding aan banden wordt gelegd. In het najaar worden de tussengewassen afgemaaid of gehakseld en vlak voor planten door de grond gewerkt. *Pythium* is een potentieel snel groeiende schimmel, die gebruik kan maken van o.a. gewasresten als voedingsbron. De vermeerdering en verspreiding van *Pythium* zou dus gestimuleerd kunnen worden door het telen van een vatbaar gewas of de aanwezigheid van gewasresten in de grond. In kasproeven met gele mosterd, bladrammenas, *Pacelia* en *Tagetes patula* (afrikaantjes) is onderzocht of deze gewassen vatbaar zijn voor *Pythium* en of de aanwezigheid van verse wortelresten van deze gewassen invloed heeft op de *Pythium*-aantasting in een vatbaar volggewas (iris).

In het zaailingstadium bleek *Phacelia* tamelijk vatbaar voor *Pythium*. Aantasting van de stengelbasis leidde tot omval en afsterving van de zaailingen. Zaailingen ouder dan twee weken werden resistent tegen *Pythium*. De zaailingen van *Tagetes* waren enigszins vatbaar, terwijl die van gele mosterd en bladrammenas niet vatbaar waren voor *Pythium*. Verder is gebleken dat de aanwezigheid van verse wortelresten van gele mosterd, bladrammenas, *Phacelia* en *Tagetes* in besmette grond niet leidde tot een toename van de *Pythium*-aantasting in iris. Veldproeven zijn ingezet met crocus 'Flower Record'. Gebleken dat een voorteeft met bijvoorbeeld *Tagetes* kan leiden tot een opbrengstderving (zie bijlage 5, tabel III). In hoeverre deze opbrengstgegevens in verband staan met een *Pythium*-aantasting kon niet uit de proeven worden herleid. Het onderzoek wordt voortgezet.

7.4 Inundatie

Pythium is erg gevoelig voor concurrentie door andere micro-organismen om voedsel en ruimte (Chen *et al.*, 1988; Elad & Chet, 1987; Kreutzer, 1965; Greenhalgh & Siobhan, 1984). Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het feit dat een *Pythium*-besmetting in praktijkgrond vaak slechts een lichte aantasting veroorzaakt, terwijl dezelfde besmetting in gesteriliseerde grond een zeer zware aantasting geeft. Op basis hiervan mag worden verwacht dat een ernstige verstering van de bodem-microflora kan resulteren in een verhoogd risico op *Pythium*-aantasting in geval van (her-)besmetting van de grond. Tijdens inundatie wordt een deel van de bodem-microflora gedood, waaronder een aantal ziekteverwekkers, maar ook nuttige micro-organismen. Onderzocht is of deze verstering van de bodemmicroflora kan leiden tot een verhoogd risico op *Pythium*-aantasting. In kasproeven met gesteriliseerde grond en een kunstmatige *Pythium*-besmetting had inundatie geen effect op de *Pythium*-aantasting in iris en krokus. Dit geeft aan dat *Pythium* niet direct wordt beïnvloed door inundatie. In kunstmatig besmette praktijkgrond echter veroorzaakte *Pythium* na inundatie een zwaardere aantasting dan in niet-geïnundeerde grond (zie tabel 5). Dit kan mogelijk worden verklaard door het wegvallen van de concurrentie door andere micro-organismen als gevolg van de inundatie.

Tabel 5: Effect van inundatie in besmette steriele- en niet-steriele grond op de *Pythium*-dichtheid (CFU/g grond) vlak voor planten en de aantasting in iris en krokus (0=gezond, 5=zwaar aangetast)

behandeling		<i>Pythium</i> -dichtheid		aantasting	
steriel	inundatie	iris	krokus	iris	krokus
+	-	250 a	181 a	4.1 c	4.6 a
+	+	106 b	111 a	3.9 c	4.0 a
-	-	15 c	43 b	1.2 a	2.3 b
-	+	11 c	50 b	2.5 b	4.4 a

In semi-praktijkproeven (in inundatiebakken) is aangetoond dat het inunderen van praktijkgrond met een natuurlijke *Pythium*-besmetting kan leiden tot een opbrengst-redukatie van 10-20% in iris (tabel 6 en 7). Dit was niet het geval in de *Pythium*-vrije behandeling (met Fongarid). Hierbij trad zelfs een opbrengstverbetering op, mogelijk doordat andere ziekten dan *Pythium* wél effectief werden bestreden door de inundatie. Het is derhalve beter om na inundatie een gewas te telen dat **niet** gevoelig is voor *Pythium*. Aangetoond is dat de nadelige effecten van de inundatie zijn verdwenen nadat één jaar het niet gevoelige gewas narcis was geteeld. Het jaar daarna is er in iris geen verhevigde *Pythium*-aantasting meer waargenomen (zie tabel 7).

Tabel 6: Relatieve opbrengst van iris na al of niet inunderen van besmette praktijkgrond met en zonder toevoeging van Fongarid vlak voor planten

behandeling		relatieve opbrengst
inundatie	Fongarid	
-	-	100 b
-	+	102 b
+	-	90 a
+	+	115 c

Tabel 7: Relatieve opbrengst van iris in besmette praktijkgrond bij teelt direct na al of niet inunderen en na de teelt van narcis

teeltschema:		jaar 2	relatieve opbrengst
jaar 1			
-	iris		100 a
inundatie	iris		80 b
-	narcis	iris	100 a
inundatie	narcis	iris	100 a

7.5 Chemische grondontsmetting

Chemische grondontsmetting wordt algemeen toegepast voor de bestrijding van ziekten en onkruiden. Onderzoek is gedaan naar de directe en indirecte effecten van grondontsmetting met dichloorpropeen (DCP) en methylisothiocyanaat (MITC, werkzame stof van metamnatrium) op *Pythium*. Aangetoond is dat een deel van de *Pythium*-populatie in de grond een grondontsmettingsbehandeling overleeft doordat:

1. de *Pythium*-dodende werking van dichloorpropeen beperkt is (resultaten kasproef bijlage 5, tabel IV)
2. bij meermalige toepassing van metamnatrium de micro-organismen in grond zich aanpassen (adaptatie), waardoor er een versnelde afbraak van het middel kan optreden; de *Pythium*-dodende werking zal daardoor afnemen (Lebbink, 1988)
3. diepere grondlagen (>30cm) niet worden ontsmet (Schik & Rouwette, 1986).

Door grondontsmetting worden behalve ziekteverwekkers ook nuttige micro-organismen gedood, zoals concurrenten en antagonisten van *Pythium*. In kasproeven is bekeken of deze verstoring van de bodemmicroflora ook kan leiden tot een verhoogd risico op aantasting, m.a.w. tot een afname van de ziektevering van de grond, wanneer een *Pythium*-besmetting optreedt vlak voor het planten. In steriele grond is géén effect waargenomen van de grondontsmetting met MITC of DCP op de *Pythium*-dichtheid en de aantasting. In de niet-steriele grond daarentegen, kon *Pythium* zich na grondontsmetting beter vermeerderen en een zwaardere aantasting veroorzaken dan zonder grondontsmetting (zie tabel 8 en bijlage 5 tabel V). Uitzondering hierop vormt de hyacint, waarbij in de ontsmette grond wel een hogere *Pythium*-dichtheid is gevonden maar geen zwaardere aantasting.

Tabel 8: Effect van chemische grondontsmetting met methylisothiocyanaat (MITC) of dichloorpropeen (DCP) in al of niet geautoclaveerde grond op de *Pythium*-dichtheid (CFU/g grond) en de aantasting in iris (0=gezond, 5=zwaar aangetast) na besmetting vlak voor planten

wel/niet steriel	ontsmet	<i>Pythium</i> - dichtheid	aantasting
+	-	55 a	3.7 a
+	MITC	50 a	3.8 a
+	DCP	52 a	3.7 a
-	-	7 d	0.5 c
-	MITC	26 b	3.0 b
-	DCP	16 c	2.5 b

Geconcludeerd kan worden dat chemische grondontsmetting geen 100% doding van *Pythium* geeft, terwijl de ziektevering van de grond tegen *Pythium* vermindert als gevolg van de ontsmetting. De (gedeeltelijke) doding van *Pythium* kan in de eerstvolgende teelt leiden tot minder aantasting, maar een verminderde ziektevering kan op termijn juist leiden tot een verhoogd risico op aantasting wanneer een vatbaar bolgewas wordt geteeld.

7.6 GFT-compost

Teeltmaatregelen zoals stomen, inundatie en chemische grondontsmetting hebben verstoring van het microbiologisch evenwicht in de grond tot gevolg. Deze maatregelen kunnen leiden tot een afname van de ziektevering tegen *Pythium*. Natuurlijk herstel van het biologisch evenwicht kost tijd (maanden, jaren). Gedurende die periode kan beter geen vatbaar gewas worden geteeld. Gezocht is naar mogelijkheden om het biologisch evenwicht en daarmee het *Pythium*-werend vermogen van de grond versneld te herstellen. Kunstmatige introductie in de grond van enkele specifieke antagonisten of concurrenten van *Pythium* heeft in kasproeven niet geleid tot minder aantasting door *Pythium*. Voorts zijn kasproeven ingezet waarbij gerijpte GFT-compost aan grond werd toegevoegd. Verse compost is op het LBO nagerijpt. Bij de narijping is getracht een zo hoog mogelijke microbiële bezetting en een zo laag mogelijke voedingswaarde van de compost te bewerkstelligen. Toediening van de compost aan de grond was vooral bedoeld als enting met micro-organismen. In eerste instantie is in de proeven uitgegaan van twee uitersten in ziektevering, namelijk wel en niet gesteriliseerde grond. Hieraan is GFT-compost toegevoegd in een voor de bollenteelt toegestane dosering van 12 ton/ha. Een week na de toediening van de compost is de grond kunstmatig besmet met *Pythium* en beplant. Om na te gaan of het effect van de compost inderdaad een biologische grondslag had is ook een behandeling met gesteriliseerde compost uitgevoerd. De resultaten van de proeven met iris staan in tabel 9. Het grote verschil in inoculumdichtheid en *Pythium*-aantasting tussen de wel en niet gesteriliseerde grond (zonder compost) is volgens verwachting. Immers, in afwezigheid van concurrenten en/of antagonisten (steriele grond) kan *Pythium* zich snel vermeerderen en een flinke aantasting veroorzaken. Door de beënting van de steriele grond met micro-organismen vanuit de compost zijn de inoculumdichtheid en de aantasting significant onderdrukt. Toediening van gesteriliseerde compost aan steriele grond en van compost aan niet-steriele grond had geen significant effect op de *Pythium*.

Geconcludeerd kan worden dat de toevoeging van GFT-compost aan een biologisch ernstig verstoorde grond kan bijdragen aan de beperking van de schade door *Pythium*. Om na te gaan of met deze toepassing van GFT-compost ook de ziektevering in geïnundeerde en chemisch ontsmette grond kan worden hersteld, zijn (éénmalig) kasproeven uitgevoerd met iris. Hierbij is gerijpte GFT-compost wel of niet toegediend aan geïnundeerde grond en aan chemisch ontsmette grond (methyliothiocyanaat). De voorlopige resultaten staan in bijlage 5, tabellen VI en VII. Het aantastingsnivo in de inundatieproef was erg laag. Er is echter wel een significante vermindering van de aantasting opgetreden in de geïnundeerde grond na de toediening van de compost. Een vergelijkbaar effect is waargenomen na het uitvoeren van grondontsmetting: de toediening van de compost aan ontsmette grond resulteerde in minder aantasting. Er was echter slechts een gedeeltelijk herstel van de ziektevering in de ontsmette grond. De voorlopige conclusie luidt dat gerijpte GFT-compost bijdraagt aan het verhogen van de ziektevering tegen *Pythium* in geïnundeerde en chemisch ontsmette grond.

Tabel 9: Effect van gerijpte GFT-compost in al of niet gesteriliseerde grond op de *Pythium*-dichtheid (CFU/g grond) en aantasting in iris (0=gezond, 5=zwaar aangetast) na besmetting vlak voor planten

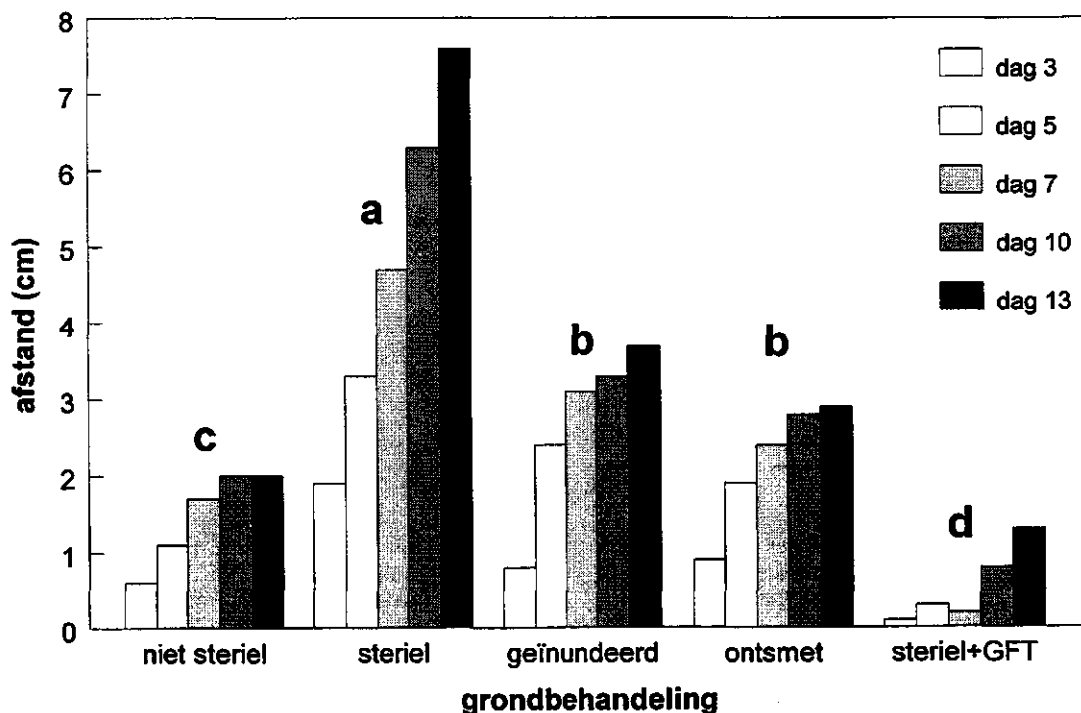
steriel	compost	<i>Pythium</i> -dichtheid	aantasting
+	-	75 a	3.7 a
+	+	72 a	3.9 a
+	+	10 b	1.4 b
-	-	4 bc	1.3 b
-	+	2 c	0.9 b

* gesteriliseerde compost

7.7 Groeisnelheid van *Pythium* door grond

In een laboratoriumproef is de groeisnelheid van *Pythium* gemeten in onbehandelde grond (niet steriel), gesteriliseerde grond, geïnundeerde grond, chemisch ontsmette grond (methylisothiocyanaat) en gesteriliseerde grond met 1% gerijpte GFT-compost. De vraagstelling voor deze proef was: is er een correlatie tussen de *Pythium*-aantasting in de kasproeven en de groeisnelheid van *Pythium* door de grond na het uitvoeren van de diverse grondbehandelingen. Verwacht zou kunnen worden dat de groeisnelheid van *Pythium* door de grond toeneemt naarmate de ziektevering van de grond minder is en de mate van aantasting zwaarder.

De resultaten van deze proef staan in figuur 1. De significantie-indexen zijn berekend op basis van de gemiddelde groei afstand per behandeling. In onbehandelde, niet steriele grond was er een geringe groei van de schimmel. In geïnundeerde grond en in ontsmette grond was een snellere groei te zien, en de snelste groei is waargenomen in steriele grond. Deze resultaten correleren goed met de aantasting in de kasproeven: een zware aantasting en een hoge *Pythium*-groeisnelheid na grondbehandelingen die de ziektevering verstoren. De toevoeging van compost aan steriele grond leidde tot een aanzienlijke reductie van de schimmelgroei die zelfs nog trager was dan die in onbehandelde grond. In de kasproeven was de aantasting in steriele grond met compost echter even zwaar als in niet steriele grond. Dit verschil tussen de laboratoriumproef en de kasproeven wordt mogelijk veroorzaakt doordat in de kasproeven het inoculum homogeen door de grond is gemengd, waardoor groei van de schimmel door de grond niet essentieel hoeft te zijn voor het optreden van aantasting. Behalve de groeisnelheid van *Pythium* door de grond spelen mogelijk ook andere factoren een rol bij de ziektevering.



Figuur 1: Groei van *Pythium* door grond na 3, 5, 7, 10 en 13 dagen

7.8 Microbiële activiteit in grond

Micro-organismen in grond produceren dehydrogenase-enzymen ten behoeve van hun energiehuishouding. De enzymactiviteit kan worden beschouwd als een goede maat voor de microbiële activiteit. Omdat *Pythium* bekend staat als een schimmel die zeer gevoelig is voor concurrentie door andere micro-organismen en dit tevens experimenteel is bevestigd, zou de dehydrogenase-activiteit een goede maat kunnen zijn voor de concurrentiekracht van de bodemmicroflora en daarmee een maat voor de ziektevering van de grond.

De dehydrogenase-activiteit is bepaald in niet-steriele grond, gesteriliseerde grond, geïnundeerde grond, ontsmette grond (methylisothiocyanaat) en steriele grond met GFT-compost.

Zonder toevoeging van extra voedingsstoffen waren er geen significante verschillen in enzymactiviteit tussen de niet-steriele grond en de overige grondbehandelingen. Na toevoeging van glucose als voedingsbron echter bleken er wel significante verschillen te zijn tussen de behandelingen (zie tabel 10). De laagste enzymactiviteit is gemeten in steriele grond. De enzymactiviteit in geïnundeerde en chemisch ontsmette grond was hoger dan die in steriele grond, maar lager dan in niet-steriele grond. En de hoogste activiteit is gemeten in steriele grond met compost. Deze resultaten zijn omgekeerd evenredig met de gemeten toename in groeisnelheid van *Pythium* door de grond en de aantasting in de kasproeven. Er is dus een afname van de microbiële activiteit gemeten na het uitvoeren van grondbehandelingen die de ziektevering verstoren. De toevoeging van compost leidde tot een aanzienlijke verhoging van de microbiële activiteit in de laboratoriumproef en een herstel van de ziektevering in de kasproeven.

Om goed te kunnen inschatten of deze relatief eenvoudige enzymbepaling een goede maat kan zijn voor de ziektevering van grond zijn meer bepalingen in kas- en veldproeven nodig.

Tabel 10: Dehydrogenase-activiteit (extinctie $\times 10^{-3}$) in al of niet behandelde grond met toevoeging van glucose als extra voeding

grond-behandeling	dehydrogenase-activiteit
geen (niet steriel)	176 c
gesteriliseerd	17 a
geïnundeerd	80 b
ontsmet (MIT)	112 b
gesteriliseerd + GFT-compost	634 d

8. Conclusies met betrekking tot doel- en probleemstelling

De oorspronkelijk beschreven onderzoeksdoelen zijn in grote lijnen gerealiseerd.

1. Er is een beeld verkregen van het aantastingsverloop in iris en krokus gedurende het teeltseizoen. Bij een vroege plantdatum worden de planten binnen enkele weken aangetast, terwijl laat planten leidt tot uitstel van het moment van aantasting tot in januari. Aangetoond is dat *Pythium* ook bij zeer lage bodemtemperaturen nog volop actief is. Tevens is gebleken dat de bewaartemperatuur van het plantgoed de vatbaarheid voor *Pythium* beïnvloedt. Het lijkt dan ook aannemelijk dat het moment van aantasting niet alleen wordt bepaald door de activiteit van de *Pythium*, maar ook door de conditie en de ontwikkeling van het gewas en de wortels.
2. Methoden zijn ontwikkeld en/of aangepast voor de kwalitatieve en kwantitatieve detectie van *Pythium*. Deze methoden zijn essentieel bij het uitvoeren van het onderzoek.
3. Aangetoond is dat de rol van micro-organismen in grond van doorslaggevend belang is voor de mate van aantasting door *Pythium*. Praktijkgrond bevat een natuurlijke mate van ziektevering tegen *Pythium*. Teeltmaatregelen als stomen, inundatie en chemische grondontsmetting blijken deze ziektevering ernstig te verstoren. De toediening van gerijpte GFT-compost kan leiden tot een (gedeeltelijk) herstel van de ziektevering in grond.

Op basis van de opgedane kennis kan onderscheid worden gemaakt tussen factoren die weinig of geen bijdrage leveren aan het *Pythium*-probleem en factoren die van groot belang zijn. Hiermee is het inzicht in de toepassingsmogelijkheden voor teeltmaatregelen en biologische bestrijdingsmethoden aanzienlijk vergroot. Het *Pythium*-probleem is hiermee echter nog niet opgelost, al is de richting voor een oplossing wel aangegeven. Een deel van de gegevens is gebaseerd op resultaten uit laboratorium- en kasproeven. Deze zullen eerst nog in meerjarige veldproeven worden getoetst voordat definitieve conclusies over praktische toepassing kunnen worden getrokken.

9. Samenwerking

Binnen het Urgentieprogramma waren er nauwe contacten met de onderzoeksgroepen van de projecten 1.2 (Overleving en activiteit van virusoverdragende nematoden (*Trichodoridae*) in de bloembollenteelt) en 1.3 (*Rhizoctonia solani* in tulp en iris in relatie tot bodemreceptiviteit) van het IPO-DLO, waarmee het onderzoek tot in detail werd besproken.

Binnen het LBO werd nauw samengewerkt met A.S. van Bruggen (*Pythium*-onderzoek in de tulpebroeierij), A.Th.J. Koster (geïntegreerde bestrijding van *Pythium*) en de gewasspecialisten van iris (J. Schipper), crocus (P. van Leeuwen) en hyacint (P. Vreeburg). Deze samenwerking bestond uit informatie-uitwisseling, overleg en afstemming bij de uitvoering van proeven. Voorts was er samenwerking met A. de Cock van het Centraal Bureau voor de Schimmelcultures (CBS, Baarn) met betrekking tot het onderzoek naar de mogelijkheden voor de determinatie van *Pythium* met behulp van DNA-technieken. Deze samenwerking omvatte uitwisseling van kennis en ervaring, het beschikbaar stellen van *Pythium*-isolaten en het uitwisselen van DNA-probes. De praktische uitvoering van het DNA-onderzoek werd op het LBO ondersteund en later overgenomen door J. van Doorn (Afdeling Plantkwaliteit).

Overleg en afstemming van het onderzoek vond tevens plaats met onderzoekers van de vakgroep Fytopathologie van de Landbouwwuniversiteit Wageningen (G. Bollen en G. Tuitert). Er zijn contacten gelegd met dr. J.G. White en dr. J.M. Whipps van Horticultural Research Institute (Engeland), beide onderzoekers met jarenlange ervaring in het *Pythium*-onderzoek.

Verder zijn de Zaadunie (Enkhuizen) en de Centrale Afvalverwerking West-Friesland (CAW, Middenmeer) bereid geweest om resp. zaden van diverse gewassen (voor de ontwikkeling van een biotoets) en GFT-compost kosteloos ter beschikking te stellen ten behoeve van het onderzoek.

10. Aanbevelingen

Toepassingsmogelijkheden

De ontwikkelde methoden en technieken zijn direkt toepasbaar in vervolgonderzoek. Dit betreft o.a. het buizensysteem voor veldproeven, de druppelmethode ter bepaling van de inoculumdichtheid, de determinatiemethode m.b.v. DNA-technieken en de meting van dehydrogenase-aktiviteit als maat voor de microbiële aktiviteit. De gegevens uit de kasproeven met inundatie, chemische grondontsmetting en de toepassing van GFT-compost zijn essentieel bij het uitvoeren van meerjarige veldproeven in vervolgonderzoek.

Er zijn sterke aanwijzingen verkregen over teeltmaatregelen die de natuurlijke ziektevering van grond kunnen verstoren c.q. herstellen. Op basis hiervan kunnen (on)mogelijkheden voor ontwikkeling en toepassing van alternatieve bestrijdingsmethoden beter worden ingeschat. Verwacht wordt dat maatregelen ter verbetering van de ziektevering tegen *Pythium* ook een gunstig effect zullen hebben op de ziektevering tegen *Rhizoctonia solani* en Trichodoride aaltjes (zie eindrapportage urgentieprojecten 1.2 en 1.3). De opgedane kennis wordt reeds toegepast op de geïntegreerde proefbedrijven De Noord en De Zuid en in aanvullend onderzoek van diverse gewasspecialisten op het LBO.

Aangezien over het verloop van het infectie- en ziekteproces in de bollenteelt en over de populatiedynamiek van de schimmel gedurende het teeltseizoen nog erg weinig bekend was, heeft het project veel nieuwe feiten en achtergrond-informatie opgeleverd.

Van een aantal proeven zijn de resultaten ook direkt van belang voor de praktijk, zoals de effecten van laat planten en de bewaar temperatuur van het plantgoed op de *Pythium*-aantasting en de teelt van narcis na inundatie alvorens een *Pythium*-gevoelig gewas als iris te telen (wellicht geldt dit ook voor gewassen als hyacint en krokus). Met het oog op de vruchtopvolging zullen, na voortzetting van het onderzoek, ook de resultaten van de proeven met de tussengewassen en de pathogeniteitsproeven van direkt belang zijn.

Kennisoverdracht

Kennisoverdracht naar de praktijk heeft plaatsgevonden in voorlichtende publicaties en lezingen en/of posterpresentaties bij Open Dagen op het LBO, de Programmadagen van het Urgentieprogramma en bij diverse bijeenkomsten van kwekers en voorlichters. Er is veelvuldig overleg geweest met de gewasspecialisten op het LBO en van de geïntegreerde proefbedrijven, waar de opgedane kennis reeds wordt toegepast. De verkregen kennis is en zal nog verder wetenschappelijk worden gepubliceerd. Dit verslag bevat de belangrijkste recepten die met name voor vervolgonderzoek van groot belang zijn.

Vervolgonderzoek

Met ingang van 1 mei 1995 is een vervolgproject gestart dat voor 50% via het PVS wordt gefinancierd door het bedrijfsleven. De in het Urgentieprogramma ontwikkelde en aangepaste onderzoeksmethoden en -technieken zijn direct toepasbaar in dit nieuwe project. Het onderzoek zal zich richten op beïnvloeding van de populatie en de agressiviteit van de ziekteverwekker en verhoging van de weerstand van de bodem en het gewas; de nadruk ligt hierbij op het uitvoeren van meerjarige veldproeven. Het onderzoek omvat o.a.:

- voortzetting van het toetsen van de effecten van inundatie en chemische grondontsmetting op de microbiële activiteit in de grond en de vermeerdering, verspreiding en aantasting door *Pythium*
- voortzetting van het toetsen van het effect van toediening van GFT-compost en andere biologische producten op het herstel van de ziektevering in grond en op de vermeerdering en aantasting door *Pythium*
- het toetsen van combinaties van bovengenoemde maatregelen.
- het ontrafelen van factoren en deelprocessen in de grond die de overleving, verspreiding, vermeerdering en aantasting door *Pythium* beïnvloeden (zoals microbiële activiteit, antagonisme, concurrentie)
- inventarisatie en determinatie van *Pythium*-soorten uit bloembollengronden en het bepalen van waardplantenreeksen (met het oog op vruchtwisseling)
- voortzetting van veldexperimenten met tussengewassen.

11. Output

De uitvoering van dit project heeft geresulteerd in de volgende output:

Rapportages

Projectbeschrijving (1990), 10 half-jaarlijkse verslagen, tussentijdse evaluatie (1990-1992) en een eindrapportage (1990-1995).

Wetenschappelijke publicaties

- Os, G.J. van, A.S. van Bruggen, W.J.M. van Gulik & T.L.J. Duineveld, 1993.
Pythium in bloembolgewassen: een (wortel-)rotprobleem. Gewasbescherming 24(5): 161-162.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1995. Effects of flooding, soil fumigation, and composted organic household waste on *Pythium* root rot in bulbous iris (abstract). Acta Bot. Neerl. (in press).
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik (in preparation). Disease development of *Pythium* root rot in ornamental bulb culture.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik (in preparation). Effect of flooding on *Pythium* root rot in bulbous iris.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik (in preparation). Effect of soil fumigation on the disease suppression of root rot in ornamental bulb crops caused by *Pythium* spp..
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik (in preparation). Effect of composted organic household waste on the disease suppression of *Pythium* root rot in ornamental bulb culture.

Voorlichtende publicaties

- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1991. Ecologische aanpak *Pythium*-probleem: Speurtocht naar alternatieve bestrijdingsvormen van wortelrot. Bloembollencultuur 7:28-29. Vakwerk 14:19-20.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1993. Wortelrot in teelt van iris en krokus: bewaartemperatuur beïnvloedt vatbaarheid voor *Pythium*. Bloembollencultuur 12:31 en Bloembollencultuur 13:5 (rectificatie). Vakwerk 20:32-33.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1994. *Pythium* wortelrot in iris en krokus: laat planten en warm bewaren beperken schade. Bloembollencultuur 12: 38-39. Vakwerk 22:12-13.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1995. Aantasting door *Pythium*: geen gevoelig gewas telen na inundatie. Bloembollencultuur 14:25. Vakwerk 24:32.

Posters

- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1992. Ecology of *Pythium* spp. in ornamental bulb culture. VI International Symposium on Flower Bulbs, 12-15 May, Skierniewice (Poland).
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1992. Effect of cultural practices on *Pythium* in ornamental bulb culture. PhD-Summerschool - Tritrophic systems in crop protection: an ecological approach, 24-28 augustus, Wageningen.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1992. Effect of cultural practices on *Pythium* in ornamental bulb culture. Scientific Symposium - Oost-Europa, 29-30 October, Lisse.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1993. Teeltmaatregelen en *Pythium*: wat gebeurt er in de grond? Open middagen LBO, 10-11 februari, Lisse.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1994. Bodemziekten en bouwplan: *Pythium*. Open middagen LBO, 16-17 februari, Lisse.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1994. Effects of flooding, soil disinfection and compost on *Pythium* root rot in bulbous iris. PhD-Summerschool - Quantitative ecology of pests and diseases, 5-8 september, Wageningen.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1995. *Pythium*-aantasting: het gevolg van een verstoord biologisch evenwicht. Open middagen LBO, 15-16 februari, Lisse.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1995. Possibilities for biological control of *Pythium* root rot in ornamental bulb culture with composted organic household waste. Congres "The Science of Composting", 30 mei t/m 2 juni 1995, Bologna.

Lezingen

- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1992. Bestrijding van *Pythium* spp. in de bloembollenteelt. Bijeenkomst Phytophthora en *Pythium* contactgroep, 28 feb. 1992, PTG Naaldwijk.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1992. Niet-chemische bestrijding van *Pythium* in de bloembollenteelt. Werkgroepvergadering bodempathogenen en bodemmicrobiologie, 6 november, Aalsmeer.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1992. Teeltmaatregelen en *Pythium*: wat gebeurt er in de grond? Programmadag Urgentieprogramma Bollenziekte- en veredelingsonderzoek, 30 september, Wageningen.
- Os, G.J. van & A.S. van Bruggen, 1993. *Pythium* in de bloembollen- en bolbloementeelt. Coachingsdag DLV, 17 maart, Lisse.
- Os, G. van, A. Landman, C. Conijn, A. Koster, C. Asjes, F. Zoon & H. van den Berg, 1993. Tussengewassen. Colloquium 21 oktober, LBO Lisse.
- Os, G.J. van & A.S. van Bruggen, 1993. *Pythium* in bloembolgewassen: een (wortel-)rotprobleem. KNPV najaarsbijeenkomst 11 november, Wageningen.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1994. *Pythium*-aantasting: het gevolg van een verstoord biologisch evenwicht. Programmadag Urgentieprogramma, 3 november Sassenheim.

- Os, G.J. van, 1994. *Pythium*-aantasting: het gevolg van een verstoord biologisch evenwicht. Werkgroep bodempathogenen en bodemmicrobiologie, 22 november, Wageningen.
- Os, G.J. van, 1994. Effecten van inundatie, grondontsmetting en GFT-compost op *Pythium* wortelrot in iris. Klankbordgroep NOVEM/VVAV GFT-compost en planteziekten, 25 november, Wageningen.
- Os, G.J. van & W.J.M van Gulik, 1994. Effect van GFT-compost op de *Pythium*-aantasting in iris. Contactgroep *Pythium* & *Phytophthora*, 9 mei, Roelofarendsveen.
- Os, G.J. van & W.J.M. van Gulik, 1995. *Pythium* in iris en krokus: verstoring en herstel van ziektevering in grond. Contactgroep *Pythium* & *Phytophthora*, 19 mei, Lelystad.
- Os, G.J. van, 1995. Effects of flooding, soil fumigation, and composted organic household waste on *Pythium* root rot in bulbous iris. Willie Commelin Scholten dag, 19 januari 1995, Utrecht.
- Os, G.J. van, 1995. *Pythium*-aantasting: het gevolg van een verstoord biologisch evenwicht. Bijeenkomst KAVB Produktgroep Iris, 25 januari 1995, Akersloot.
- Os, G.J. van, 1995. *Pythium* in iris en krokus: verstoring en herstel ziektevering. Vergadering contactgroep *Pythium* & *Phytophthora*, 9 mei 1995, Lelystad.
- Os, G.J. van, 1995. Effects of flooding, soil fumigation, and composted organic household waste on *Pythium* root rot in bulbous iris. International Plant Protection Congress, 7 juli 1995, Den Haag.

Reisverslagen

- Os, G.J. van & A.S. van Bruggen, 1992. Reisverslag studiereis Engeland, 14-21 juni.

Stageverslagen

Diverse studenten hebben de afgelopen jaren op het LBO bijgedragen aan het *Pythium*-onderzoek in de bollenteelt. De verkregen gegevens zijn weergegeven in stageverslagen, verkrijgbaar bij de LBO-bibliotheek.

Hasselo Smits-Hupkens, H., 1993. Biologische bestrijding van *Pythium* in de vollegrondse bollenteelt. Hogeschool van Amsterdam, HLO Biologie, 01-11-1992 t/m 30-04-1993.

Tiel, C., 1993. *Pythium* in de vollegrondse bloembollenteelt. Agrarische Hogeschool Delft, 19-04-1993 t/m 16-07-1993.

Muijen, M. van, 1995. *Pythium*-wortelrot in de bloembollenteelt. Reynevelt College Delft, 01-09-1994 t/m 31-05-1995.

Overig

Os, G.J. van & A.S. van Bruggen, 1992. Div. presentaties. Engeland, studiereis 14-21 juni.

Os, G.J. van & A.S. van Bruggen, 1993. *Pythium* in de bloembollen- en bolbloemeteelt: overzicht van het onderzoek. Directeuren Proefstations vergadering, 2 april, Lisse.

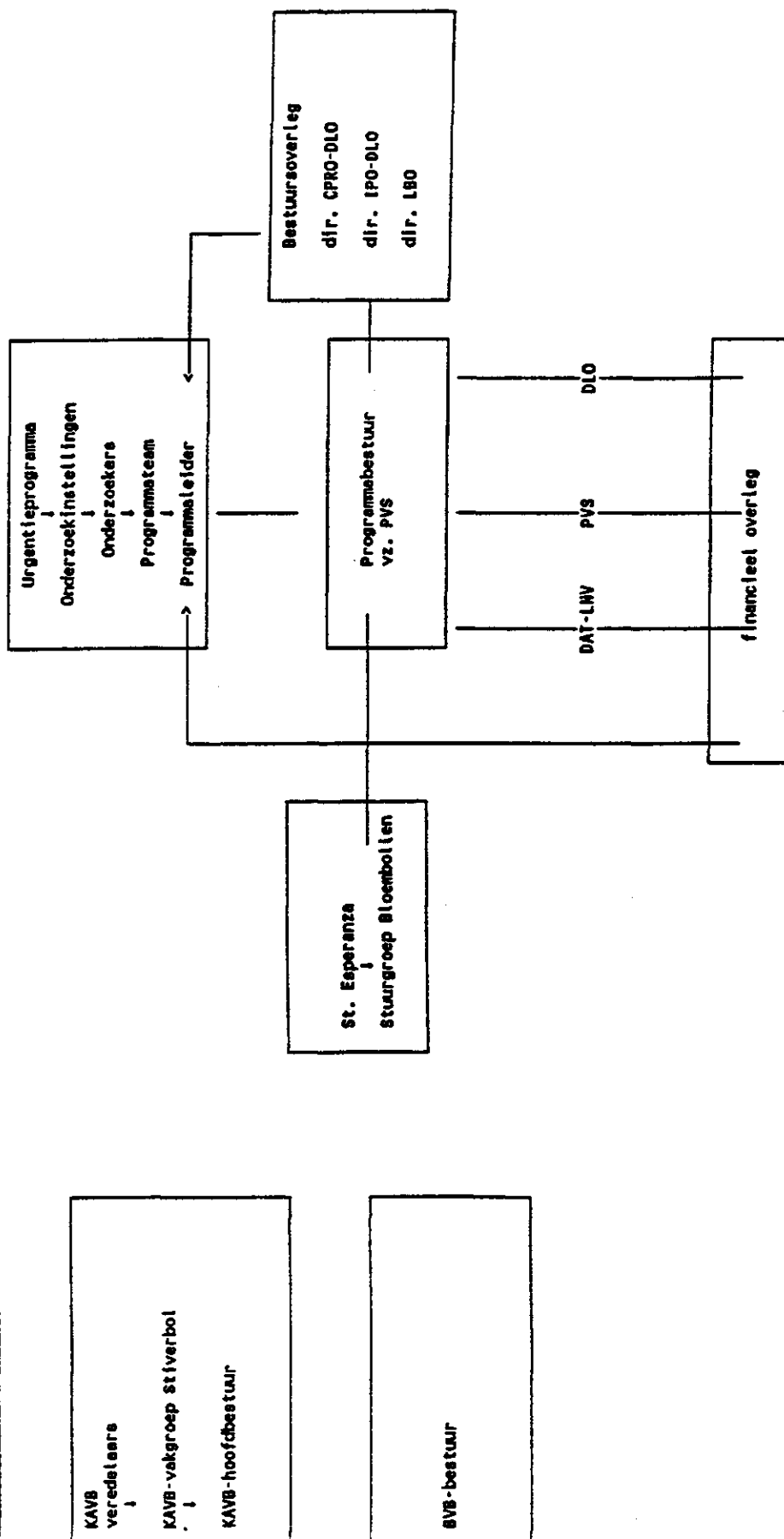
Os, G.J. van, 1994. Ecologie van een bodemschimmel. Delegatie Dienst Ruimte en Groen van de Provincie Zuid-Holland, 8 december, Lisse.

12. Literatuur

- Alef, K., 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. Ecomed, Germany.
- Buchko, J. and G.R. Klassen, 1990. Detection of length heterogeneity in the ribosomal DNA of *Pythium ultimum* by PCR amplification of the intergenic region. *Curr. Genetics* 18:203-205.
- Chen, W., 1992. Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. *Phytopathology* 82:1467-1472.
- Chen, W., H.A.J. Hoitink, A.F. Schmitthenner and O.H. Tuovinen, 1988. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 78:314-322.
- Domsch, K.H., Th. Beck, J.P.E. Anderson, B. Söderström, D. Parkinson and G. Trolldenier, 1979. A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* 142: 520-533.
- Elad, Y. and I. Chet, 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77: 190-195.
- Greenhalgh, G.C. and E.L. Siobhan, 1984. Effect of soil pasteurization on damping-off and root rot of subterranean clover caused by *Fusarium avenaceum* and *Pythium spp.*. *Soil Biol. Biochem.* 16:87-88.
- Keulen, H. van en J. van Aartrijk, 1993. Ziektegevoeligheid van cultivars van bloembolgewassen. Milieuplatform Bloembollensector, Hillegom, 43 pp..
- Kreutzer, W.A., 1965. Reinfestation of treated soil. In: *Ecology of soil-borne plant pathogens*. K.F. Baker and E.D. Snyder (eds.), Univ. of California Press, Berkely, p. 495-508.
- Lebbink, G., 1988. Effecten van grondontsmettingsmiddelen op het bodemleven in Noordoost Nederland. In: *Bodemziekten en Bodembescherming in Noordoost Nederland*, Hildebrands Laboratorium voor Bodemziekten, verslag HLB 88-3, p.17-25.
- Lévesque, C.A., T.C. Vrain and S. H. de Boer, 1994. Development of a species-specific probe for *Pythium ultimum* using amplified ribosomal DNA. *Phytopathology* 84:474-478.
- Schik, K.W. en H. Rouwette, 1986. Grondontsmetting in de bloembollenteelt in Zuid Nederland. Consulentenschap voor de akkerbouw en de tuinbouw, Goes.
- Smith, S.N. and G.J.F. Pugh, 1979. Evaluation of dehydrogenase as a suitable indicator of soil microflora activity. *Enzyme Microb. Technol.* 1: 279-281.
- Stanghellini, M.W. and J.G. Hancock, 1970. A quantitative method for the isolation of *Pythium ultimum* from soil. *Phytopathology* 60:551-552.

Bijlage 1 - Organisatieoverzicht Urgentieprogramma

Organisatieschema Urgentieprogramma



- PVS = Produktschap voor Siergewassen
- KAVB = Koninklijke Algemeene Vereeniging voor Bloembollencultuur
- SVB = Bord van Bloembollenhandelaren
- DAT-LNV = Directie Akker- en Tuinbouw, Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij
- DLO = Dienst Landbouwkundig Onderzoek
- CPRO-DLO = Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek
- IPO-DLO = Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek
- LBO = Laboratorium voor Bloembollenonderzoek

Bijlage 2 - Overzicht projecten Urgentieprogramma

1. Bollenziekte- en resistentieonderzoek

- 1.1 Bestrijding van *Pythium* spp. in de bloembolenteelt.
Drs.ir. G.J. van Os, LBO.
- 1.2 Overleving en activiteit van virusoverdragende nematoden (*Trichodoridae*) in de bloembollenteelt.
Ir. F.C. Zoon, IPO-DLO.
- 1.3 *Rhizoctonia solani* in tulp en iris in relatie tot bodemreceptiviteit.
Ir. J.H.M. Scheider, Dr.ir. G. Dijkstra, IPO-DLO.
- 1.4a Resistentieveredeling tegen *Fusarium oxysporum* bij lelie en gladiol.
Ir. Th.P. Straathof, CPRO-DLO.
- 1.4b Afweermechanismen in lelie en gladiol tegen aantasting door *Fusarium oxysporum*. Dr. R.P. Baayen, IPO-DLO.

2. Veredelingsonderzoek

- 1.5 Inbouw van virusresistentie in lelies via genetische manipulatie.
Dr. S. Langeveld, RUL/LBO.
- 2.1 Selectie en transformatie van pollen: analyse van de gen-expressie tijdens microsporogenese en pollenfunctie.
Ir. L. van der Leede-Plegt, CPRO-DLO.
- 2.2 Genetische manipulatie van tulp.
Drs. A. Wilmink, CPRO-DLO.
- 2.3 In vitro selectie met behulp van microsporen bij lelie.
Dr. R.W. van den Bulk, CPRO-DLO.
- 2.4 Protoplastregeneratie en somatische hybridisatie bij tulp en lelie.
Dr. I. Famelaer, CPRO-DLO.
- 2.5 Toepassing van bloembiologische technieken in soortkruisingsonderzoek bij lelie, tulp en gladiol.
Ir. M.G.M. van Crey, CPRO-DLO.
- 2.6 Veredelingsonderzoek naar houdbaarheid bij lelie en tulp.
Ir. J.J.M. van der Meulen, CPRO-DLO.
- 2.7 Lange termijn bewaring van bolgewassen.
Ir. F. Bonnier, CPRO-DLO.

Bijlage 3 - Projectbeschrijving 1990

Probleem, aard en doel van de activiteiten

Probleemstelling

Zowel de bloembollenteelt (lelie, iris, krokus, hyacint, e.a.) als ook de bolbloementeeft (tulp, iris, lelie), worden in toenemende mate bedreigd door problemen veroorzaakt door de bodemschimmel *Pythium* spp. Deze schimmel veroorzaakt wortelrot in de genoemde gewassen, hetgeen leidt tot vroegtijdige afsterving, slechte bolgroei respectievelijk bloemverdroging. Bestrijding van deze ziekte vond en vindt plaats door voornamelijk grondontsmettingen (dichloorpropeen/etridiazol in de bloembollenteelt van onder andere hyacint; methylbromide in de bolbloementeeft) en grondbehandelingen met specifieke middelen (etridiazol, fenamino-sulf, metalaxyl en tubosan). Verwacht wordt dat op korte termijn geen van deze middelen meer kan worden toegepast, hetzij door intrekking van toelatingen dan wel door stopzetting van produktie of het ontstaan van resistentie. Effectieve alternatieven ontbreken.

Pythium

Pythium is een zeer wijd verspreid bodempathogeen in de gematigde klimaatzones. Aantasting door *Pythium* spp. is sterk afhankelijk van de invloed van omgevingsfactoren op de conditie van de waardplant.

Behalve een pathogeen voor vele verschillende plantesoorten is de schimmel ook een goede saprofyt. Door z'n snelle groei is *Pythium* zeer goed aangepast voor de primaire kolonisatie van organische residuën. In de aanwezigheid van een geschikt substraat of een geschikte gastheer worden snel voortplantingsstructuren gevormd zoals sporangia en oösporen. Zo kan in korte tijd een enkele infectie leiden tot een aanzienlijke verhoging van de inoculumdruk in de grond. Ruststructuren worden aangelegd in de vorm van dikwandige oösporen. Deze zijn in staat om, in afwezigheid van nutriënten, lange periodes van koude, warmte, droogte of zuurstofgebrek te overleven. Het mag duidelijk zijn dat zonder het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen *Pythium* een hardnekkig probleem in de bodem kan zijn.

Fundamenteel voor de bestrijding van dit pathogeen is kennis over de biologie, de ecologie en de distributie van de schimmel in de grond en over het infectie- en ziekteproces.

Biologische bestrijding

Op het LBO in Lisse wordt al enige jaren onderzoek gedaan naar de bestrijding van wortelrot veroorzaakt door *Pythium*. Dit onderzoek wordt verricht door René de Greeff en is met name gericht op de tulpebroeierij. Gekeken wordt o.a. naar de verbetering van grond-wortel factoren en het gebruik van alternatieve substraten. Enkele jaren geleden is Emma Weststeijn van het WCS in Baarn een onderzoek gestart naar de biologische bestrijding in de tulpebroeierij, in samenwerking met René de Greeff; de resultaten met *Pseudomonas*-bacteriën lijken vooralsnog bemoedigend voor gebruik in de broeierij, met name in combinatie met andere alternatieve bestrijdingsmethoden. Dit onderzoeksproject is dit jaar echter stopgezet. Ander onderzoek naar mogelijke antagonisten wordt verricht aan o.a. *Pseudomonas fluorescens* en *P. putida* (Becker & Cook, 1988), *Pythium nunn* (Paulitz & Baker, 1987; Paulitz & Baker, 1988), *Trichoderma* spp. (Nelson et al., 1988) en *Gliocladium virens* (Lumsden & Locke, 1989).

Tevens is onlangs een samenwerkings-overeenkomst gesloten tussen de Verenigde Staten en Nederland met betrekking tot de biologische bestrijding van bol- en wortelrot veroorzaakt door o.a. *Pythium* spp.. In dit kader zijn er contacten tussen René de Greeff en de groep van R.D. Lumsden en J.C. Locke. Deze groep heeft veel ervaring op het gebied van biologische bestrijding van *Pythium*, *Rhizoctonia* en *Fusarium*. In samenwerking met het LBO wordt in het najaar van 1990 gestart met onderzoek naar de biologische bestrijding van *Pythium* in bolgewassen (in eerste

instantie in de tulpebroeierij). De samenwerking houdt in dat kennis en materiaal worden uitgewisseld, met het doel om via onderzoek effectieve antagonisten te selecteren.

Uit onderzoek is echter ook gebleken dat een zeer lage infectiedruk al grote problemen kan veroorzaken (Lumsden et al., 1976; Stanghellini, 1974). De verwachtingen van antagonisten als enige bestrijdingsmaatregel mogen dan ook niet te hoog gespannen zijn, omdat terugdringen van de inoculumdruk geen verzekering is voor een lager aantastingspercentage.

Raakvlakken met ander onderzoek

Bovengenoemd onderzoek naar de bestrijding van *Pythium* in de tulpebroeierij heeft raakvlakken met het onderzoek naar de *Pythium*-bestrijding in de vollegrondse bloembollenteelt, hoewel ook grote verschillen bestaan: bij het *Pythium*-probleem in de bollenteelt is er sprake van andere gewassen dan tulp, ander uitgangsmateriaal met een andere voorbehandeling, en een aanzienlijk langere teeltduur. Daar waar in de kas bovendien factoren als substraat, temperatuur en vochtigheid te manipuleren zijn, is dit in de vollegrond nagenoeg niet het geval. Het is dan ook niet moeilijk voor te stellen dat groei en ontwikkeling van zowel plant als schimmel en daarmee ook de aanpak van het onderzoek en de potentiële bestrijdingsmethoden in kas- en vollegrondsteelten van elkaar verschillen. Als raakvlakken kunnen o.a. alle gegevens over fysische omgevingsfactoren en over de effecten van antagonisten op *Pythium* worden genoemd.

Ook naar *Pythium* in de vollegrond is al veel onderzoek gedaan, met name in Amerika. Het betreft hier vooral *Pythium*-problemen in zaailingen (damping-off) van boon en katoen op leem- en kleigronden (Hancock, 1977; Hancock, 1981; Lumsden et al., 1976). Hierbij is geen relatie gevonden tussen bodemtype en fluctuatiepatronen van de *Pythium*-populaties in de grond (Hancock, 1977).

Verder is gebleken dat er een duidelijke variatie is in aantasting afhankelijk van omgevingsfactoren, cultuurmaatregelen en *Pythium*-soort (Stanghellini, 1974).

De Amerikaanse onderzoekresultaten over *Pythium* in zaailingen zijn dus niet zonder meer overdraagbaar naar de bollenteelt op zandgrond. De noodzaak is er derhalve om vergelijkbaar onderzoek te verrichten naar *Pythium* in de bollenteelt.

Over *Pythium* in de bollenteelt is nog nauwelijks iets bekend. Saaltink (1969) heeft onderzoek gedaan naar wortelrot in hyacinten. De nadruk in dit onderzoek lag vooral op de symptombeschrijving, het ontwikkelen van inoculatie- technieken en het testen van chemische bestrijdingsmiddelen.

Uit de praktijk en/of oriënterende proeven komen aanwijzingen dat bijvoorbeeld het laat planten van de bollen (bijv. eind november) en het planten in vaste grond veel schade door *Pythium* kunnen voorkomen. Tevens wordt al op kleine schaal geëxperimenteerd met o.a. inundatie, grondbedekking en antagonisten.

Om het *Pythium*-probleem in de bollenteelt en de achtergrond van bovengenoemde verschijnselen te kunnen doorgronden is nog veel onderzoek nodig, dat met behulp van beproefde methoden en technieken (Hancock, 1981; Kao & Ko, 1986; Lumsden et al., 1976) kan worden uitgevoerd.

Fundamenteel onderzoek naar de biologie van *Pythium ultimum* en het infectieproces bij bolgewassen zal plaatsvinden in nauwe samenwerking met René de Greeff.

Het in dit project beschreven onderzoek aan *Pythium* spp. en dat aan *Rhizoctonia solani* (Urgentieproject 1.3, IPO-DLO) kennen beide een ecologisch fytopathologische aanpak. Onderzoek naar antagonisten voor deze schimmels in relatie tot damping-off wordt ook wel gecombineerd (Lumsden & Locke, 1989). Samenwerking tussen LBO en IPO ligt dan ook voor de hand, met name wanneer het onderzoek naar antagonisten en ontwikkeling van methodieken betreft.

Motivering en te verwachten effecten

Onderzoek is noodzakelijk om in de toekomst de bloembollen en bolbloementeel te kunnen vrijwaren van *Pythium*-problemen. Het onderzoek van dit project zal zich vooral moeten richten op de *Pythium*-problemen in de vollegrondsteelt van bloembollen. Verwacht mag worden dat het project binnen de gestelde periode van 5 jaar inzicht verschaft in het verloop van het infectie- en ziekteproces in de vollegrond, in de populatiedynamiek van de schimmel onder invloed van het weer en teeltmaatregelen, en in de toepassingsmogelijkheden voor biologische bestrijdingsmiddelen en/of cultuurmaatregelen.

Aangezien van deze aspecten bij bolgewassen in de vollegrond nog erg weinig bekend is zal het project veel nieuwe informatie opleveren, op basis waarvan maatregelen ter voorkoming (o.a. teelt- en cultuurmaatregelen) en/of bestrijding (biologische bestrijding) voor de praktijk kunnen worden geadviseerd.

Fundamentele kennis over de interacties tussen schimmel en wortel en het infectieproces bij bolgewassen zouden aangrijpingspunten kunnen verschaffen voor onderzoek naar resistentieveredeling in de toekomst.

Werkwijze (methodiek en hulpmiddelen)

Het project omvat veld-, kas- en laboratorium-experimenten, verzamelen van informatie uit de praktijk, literatuurstudie, analyse van data en rapportage van resultaten.

Het eerste half jaar zal gestart worden met de eerste vier van de hieronder genoemde aandachtspunten. De effectieve voortgang van de later genoemde benaderingen zal mede afhankelijk zijn van het succesvol verlopen van de punten 1 t/m 4.

Tenzij anders vermeld in de proefomschrijving zal een vatbare iris-cultivar als toetsgewas worden gebruikt. De resultaten zullen derhalve betrekking hebben op iris. Om uitspraken te kunnen doen over andere bolgewassen dan iris zullen de proeven t.z.t. herhaald moeten worden met deze bolgewassen.

1. Het testen van de pathogeniteit van diverse *Pythium*-soorten en -isolaten voor diverse bolgewassen:
Een aantal isolaten van *P. ultimum* en *P. intermedium* van verschillende herkomst (iris, hyacint, lelie, krokus) zal getest worden op hun pathogeniteit op iris, hyacint, lelie en krokus. De proef zal uitgevoerd worden in de kas, waarbij de bollen in kunstmatig geïnfecteerde grond worden geplant. Na verloop van tijd zullen wortelontwikkeling en *Pythium*-aantasting worden beoordeeld. Getracht zal worden om voor elk isolaat een waardplantenreeks vast te stellen voor wat betreft de gebruikte bolgewassen. Met het oog op de herkomst van de isolaten zou een dergelijke waardplantenreeks direct informatie kunnen geven over mogelijkheden voor vruchtopvolging in de praktijk.
2. Nagaan wanneer in de teeltperiode infectie(s) plaatsvindt (vinden) :
In een veldproef zullen een vatbare iris- en een krokus-cultivar worden geplant op een perceel met een natuurlijke *Pythium*-besmetting. Periodiek zullen gedurende het hele teeltseizoen bollen van beide gewassen gerooid worden, waarna het wortelstelsel zowel macroscopisch als microscopisch onderzocht zal worden op *Pythium*-aantasting.
Tevens zullen wortelsegmenten uitgelegd worden op een selectief voedingsmedium voor *Pythium*. Door de periodiciteit van de waarnemingen moet een beeld ontstaan van het verloop van de *Pythium*-aantasting gedurende het teelt-seizoen.

Parallel aan de bemonstering van de bollen zal ook de inoculum-dichtheid in de bodem bepaald worden met behulp van de druppelmethode volgens Stanghellini & Hancock (1970). Tevens zullen bodemtemperatuur en neerslag geregistreerd worden. Gezocht zal worden naar correlaties tussen bovengenoemde waarnemingen.

3. Het ontwikkelen van een (liefst jaarrond te benutten) toetssysteem, waarvan de resultaten overdraagbaar zijn naar de praktijkomstandigheden: Voor het meten van de infectiedruk van *Pythium* in grond zal de bruikbaarheid van zaailingen worden beproefd (in de kas). Hiervoor zal gebruik worden gemaakt van een *Pythium*-isolaat afkomstig van iris en van zaailingen van een aantal groente- en bloemgewassen die in de literatuur aangemerkt worden als goede gastheren voor *Pythium* spp.. Voor overleg, informatie en het leveren van zaden is contact gelegd met een zaadfirma. Zaden zullen gezaaid worden in kunstmatig geïnfecteerde grond met diverse inoculum-dichtheden. De kiemkracht van de zaailingen en de gevoeligheid voor *Pythium* zullen bepaald kunnen worden. En het kiemingspercentage zal een maat zijn voor de infectiedruk in de grond. Om een correlatie tussen het kiemingspercentage van de zaailingen en de *Pythium*-aantasting bij een bolgewas aan te kunnen tonen wordt ook een vatbare iris-cultivar in de besmette grond geplant. Tevens zal de inoculum-dichtheid in de grond in vitro worden bepaald met behulp van de druppelmethode volgens Stanghellini & Hancock (1970), om een correlatie aan te tonen tussen deze meetmethode en de biotoets met de zaailingen.
4. Bestudering van het infectieproces in vitro: Getracht zal worden een of meer systemen te ontwikkelen, waarin het infectieproces en het verloop van de wortelaantasting in vitro kan worden waargenomen. Via een dergelijk systeem zou evt. ook de invloed van diverse biotische en abiotische factoren op de infectie bestudeerd kunnen worden. Als plantmateriaal wordt vooralsnog overwogen om iris en/of diverse zaailingen te gebruiken.
5. Het bestuderen van de ecologie van *Pythium* (en eventueel antagonisten) onder invloed van diverse teelt- en cultuurmaatregelen (teeltplan, antagonisten, inundatie, grondafdekking, diepploegen, e.d.).
6. Selectie en ontwikkeling van toetssystemen voor effectieve antagonisten (*Trichoderma* spp., niet pathogene *Pythium* spp., *Pseudomonas* sp., *Laetisaria arvalis*, e.a.) en optimalisering van de introductie (onder andere formulering) van deze antagonisten ten behoeve van de biologische bestrijding van *Pythium*, voor zover dit wenselijk is gebleken in bovengenoemde onderzoekspunten.

Literatuur

- Ayers, W.A. and R.D. Lumsden, 1975. Factors affecting production and germination of oospores of three *Pythium* species. *Phytopathology* 65:1094-1100.
- Becker, J.O. and R.J. Cook, 1989. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased- growth response of fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology* 78:778-782.
- Bouhot, D., 1979. Estimation of inoculum density and inoculum potential: techniques and their value for disease prediction. Uit: Soil borne plant pathogens, eds.: B. Schippers and W. Gams. Academic Press, London. p. 21-34.
- Chen, W., H.A.J. Hoitink, A.F. Schmitthenner and O.H. Tuovinen, 1988. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 78:314-322.

- Hancock, J.G., 1977. Factors affecting soil populations of *Pythium ultimum* in the San Joaquin Valley of California. *Hilgardia* 45:107-122.
- Hancock, J.G., 1979. Occurrence of soils suppressive to *Pythium ultimum*. In: Soil borne plant pathogens. B. Schippers & W. Gams (eds.), Academic Press, London, 686 pp.
- Hancock, J.G., 1981. Longevity of *Pythium ultimum* in moist soils. *Phytopathology* 71:1033-1037.
- Hendrix, F.F., Jr. and W.A. Campbell, 1973. *Pythiums* as plant pathogens. *Ann. Rev. Plantpathol.* 11:77-98.
- Johnson, L.F. and T. Arroyo, 1983. Germination of oospores of *Pythium ultimum* in the cotton rhizosphere. *Phytopathology* 73:1620-1624.
- Kao, C.W. and W.H. Ko, 1986. Suppression of *Pythium splendens* in a Hawaiian soil by calcium and microorganisms. *Phytopathology* 76:215-220.
- Lifshitz, R. and J.G. Hancock, 1984. Environmental influences on the passive survival of *Pythium ultimum* in soil. *Phytopathology* 74:128-132.
- Loper, J.E., 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78: 166-172.
- Lumsden, R.D. and W.A. Ayers, 1975. Influence of soil environment on the germinability of constitutively dormant oospores of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 65:1101-1107.
- Lumsden, R.D., W.A. Ayers, P.B. Adams, R.L. Dow, J.A. Lewis, G.C. Papavizas and F.G. Kantzes, 1976. Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. *Phytopathology* 66:1203-1209.
- Miller, C.R., W.M. Dowler, D.H. Petersen and R.P. Ashworth, 1966. Observations on the mode of infection of *Pythium ultimum* and *Phytophthora cactorum* on young roots of peach. *Phytopathology* 56:46-49.
- Nelson, E.B., G.E. Harman and G.T. Nash, 1988. Enhancement of Trichoderma-induced biological control of *Pythium* seed rot and pre-emergence damping-off of peas. *Soil Biological Biochem.* 20:145-150.
- Osburn, R.M., M.N. Schroth, J.G. Hancock and M. Henderson, 1989. Dynamics of sugar beet seed colonization by *Pythium ultimum* and *Pseudomonas* species: effects on seed rot and damping-off. *Phytopathology* 79:709-715.
- Paulitz, T.C. and R. Baker, 1987. Biological control of *Pythium* damping-off of cucumbers with *Pythium nunn*: population dynamics and disease suppression. *Phytopathology* 77:335-340.
- Paulitz, T.C. and R. Baker, 1988. The formation of secondary sporangia by *Pythium ultimum*: the influence of organic amendments and *Pythium nunn*. *Soil Biol. Biochem.* 20:151-156.
- Pieczarka, D.J. and G.S. Abawi, 1978. Populations and biology of *Pythium* species associated with snap bean roots and soils in New York. *Phytopathology* 68: 409-416.
- Saaltink, G.J., 1969. Root rot of hyacinths caused by species of *Pythium*. *Neth. J. Pl. Pathol.* 75:343-354.
- Stanghellini, M.E., 1974. Spore germination, growth and survival of *Pythium* in soil. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* 1:211-214.
- Stanghellini, M.E. and J.G. Hancock, 1970. A quantitative method for the isolation of *Pythium ultimum* from soil. *Phytopathology* 60:551-552.

Bijlage 4 - Recepten

Selectief medium voor *Pythium*, CMA⁺:

Commeal agar (CMA; Oxoid, LTD, Hampshire, UK)

25 ppm pimarinine

25 ppm terramycine

Aardemeelcultuur *Pythium*:

Ter voorbereiding van kasproeven dient *Pythium* vermeerderd te worden ter besmetting van de grond.

- bollengrond en rivierzand mengen 1:1
- vochtgehalte stellen op 10% (w/w)
- per liter grondmengsel 6 g havermoutmeel toevoegen
- steriliseren in autoclaaf bij 121°C gedurende 60 min.
- 48 uur later sterilisatie herhalen
- aardemeelmengsel besmetten met ponsjes van CMA met *Pythium* en in het donker bij kamertemperatuur laten groeien gedurende 3 weken

Uitplaatmethode

Voor het bepalen van de *Pythium*-dichtheid in grond is de methode van Stanghellini & Hancock (1970) als volgt aangepast:

- grondmonster goed homogeniseren
- grondsuspensie maken van 1 of 5 g grond (gecorrigeerd voor het vochtgehalte) in 5 ml 0.2% wateragar
- indien nodig de suspensie verdunnen in 0.2% wateragar tot een geschikte concentratie ontstaat waarbij na uitplaten het aantal *Pythium*-kolonies per plaat niet groter is dan 6 (evt. diverse verdunningen uitplaten)
- grondsuspensie 30 sec. schudden op Vortex en vervolgens gedurende 5 sec. de grofste gronddeeltjes laten bezinken
- met een automatische pipet (Rainin motorpipet) 1 ml van de suspensie opzuigen en in druppels van 10 µl uitplaten/neerleggen op CMA⁺, 40 druppels per grondsuspensie, 10 druppels per plaat
- platen incuberen bij kamertemperatuur in het donker
- na 2 dagen per suspensie (40 druppels) het aantal druppels met *Pythium* scoren en de score terugrekenen naar het aantal kolonie-vormende eenheden per gram grond (CFU/g grond)

Bepaling dehydrogenase-activiteit

De dehydrogenase-activiteit is bepaald volgens de methoden van Domsch *et al.* (1979) en Smith & Pugh (1979) met en zonder toevoeging van glucose als extra voedingsbron voor de micro-organismen:

- van elk grondmonster 2 maal 5 g grond afwegen (corrigeren voor vochtgehalte)
 - 5 g grond + 1 ml steriel demi-water
 - 5 g grond + 1 ml 0.1% glucose-oplossing
- 2 ml trisbuffer met 2,3,5 triphenyltetrazoliumchloride (0.1M, pH 7.6, 1% TTC) toevoegen
- als blanco wordt gebruikt
 - 5 g grond + 1 ml steriel demi-water + 2 ml Trisbuffer (zonder TTC)
- goed schudden op Vortex (NB. TTC is licht-gevoelig, handelingen uitvoeren in schemerlicht)
- 18 uur incuberen bij 30°C (donker)
- 3 ml methanol toevoegen om de reactie te stoppen
- schudden op Vortex en filtreren over Schleicher & Schüll 595 1/2 filtreerpapier naspoelen met 6.0 ml methanol (totaal volume 12 ml)
- extinctie meten met fotospectrometer bij 485 nm

Bijlage 5 - Resultaten

Tabel I: Invloed van plantdatum op de relatieve opbrengst van krokus cv. 'Flower Record' in praktijkgrond met een natuurlijke *Pythium*-besmetting

plantdatum	- Fongarid	+ Fongarid
12 oktober	100 a	137 b
28 oktober	114 a	129 b
24 november	112 a	124 b

Tabel II: Aantasting (0=gezond, 5=zwaar aangetast) door 15 *Pythium*-isolaten in iris, krokus, hyacint, tulp en lelie

isolaat	soort	iris	krokus	hyacint	tulp	lelie
1 (i)*	<i>P.macrosporum</i>	2.0+	2.0+	0.6+	0.3	1.3
2 (i)	<i>P.species</i>	2.0+	5.0+	1.8+	0.0	2.5+
3 (i)	<i>P.species</i>	4.1+	3.9+	0.9+	3.7+	4.6+
4 (k)	<i>P.irregulare</i>	0.5	4.5+	4.0+	2.0+	.
5 (k)	<i>P.irregulare</i>	1.0	5.0+	3.0+	1.0+	.
6 (k)	<i>P.species</i>	0.1	2.1+	0.8+	0.7+	1.8+
7 (k)	<i>P.species</i>	0.6	2.4+	0.7+	0.6+	2.0+
8 (h)	<i>P.intermedium</i>	0.0	4.0+	2.5+	1.0	.
9 (h)	<i>P.species</i>	0.3	2.9+	4.4+	0.1	0.8
10 (h)	<i>P.species</i>	0.6	1.8+	0.5	0.3	1.8+
11 (t)	<i>P.ultimum</i>	0.5	3.0+	1.0+	5.0+	.
12 (t)	<i>P.species</i>	0.2	2.5+	0.4	1.6+	2.8+
13 (t)	<i>P.species</i>	0.2	3.5+	0.6+	3.9+	4.3+
14 (l)	<i>P.ultimum</i>	1.5+	3.0+	2.5+	3.0+	.
15 (l)	<i>P.species</i>	0.1	2.1+	0.6+	0.5+	1.3

* eerste letter van gewas van herkomst: iris, krokus, hyacint, lelie, tulp

+ significant zwaardere aantasting dan in onbesmette controle

Tabel III: Effect voorteelt tussengewassen op de relatieve opbrengst van krokus cv. 'Flower Record

voorteelt	rel. opbrengst
braak	100 ab
gele mosterd	109 a
bladrammenas	86 c
Phacelia	89 bc
Tagetes patula	79 c

Tabel IV: Effect van grondontsmetting met methylisothiocyanaat (MITC) of dichloorpropeen (DCP) van besmette grond op de aantasting (0=gezond, 5=zwaar aangetast) in iris, krokus en hyacint en de *Pythium*-dichtheid (CFU/g grond, mengsel van *Pythium*-isolaten uit krokus en hyacint)

behandeling <i>Pythium</i> ontsmet		aantasting crocus hyacint		<i>Pythium</i> -dichtheid crocus hyacint	
+	-	2.8	4.2	433 a	438 a
+	MITC	0.0	0.3	0 c	7 c
+	DCP	2.9	1.9	134 b	194 b

Tabel V: Effect van chemische grondontsmetting (MITC = methylisothiocyanaat, DCP = dichloorpropeen) in al of niet geautoclaveerde grond op *Pythium*-dichtheid (CFU/g grond) en aantasting in krokus en hyacint (0 = gezond, 5 = zwaar aangetast) na besmetting vlak voor planten

wel/niet steriel	ontsmet	crocus		hyacint	
		P-dichtheid	aantasting	P-dichtheid	aantasting
+	-	279 a	4.3 a	4110 a	4.5 a
+	MITC	248 a	4.1 a	.	.
+	DCP	.	.	4420 a	4.4 a
-	-	169 b	2.8 b	1260 b	3.3 b
-	MITC	266 a	4.3 a	.	.
-	DCP	.	.	4570 a	3.5 b

Tabel VI: Effect van GFT-compost in al of niet geïnundeerde grond op de *Pythium*-dichtheid (CFU/g grond) en de aantasting in iris (0=gezond, 5=zwaar aangetast) na besmetting vlak voor planten

behandeling inundatie	compost	<i>Pythium</i> - dichtheid	aantasting
-	-	6.2 a	0.2 a
-	+	5.3 a	0.4 a
+	-	11.8 b	1.2 b
+	+	5.7 a	0.3 a

Tabel VII: Effect van GFT-compost in al of niet met metamnatrium ontsmette grond op de *Pythium*-dichtheid (CFU/g grond) en de aantasting in iris (0=gezond, 5=zwaar aangetast) na besmetting vlak voor planten

behandeling ontsmet	compost	<i>Pythium</i> - dichtheid	aantasting
-	-	10 a	0.3 a
-	+	14 a	0.4 a
+	-	85 c	3.6 c
+	+	73 b	2.9 b