



Effect van concentratie en besmettingsmethode op mate van aantasting van begonia door *Fusarium foetens*

Onderzoek naar ontwikkeling en bestrijding/beheersing van
Fusarium foetens in Begonia

J.P.Wubben, I. Bosker, H. Bonneville, J. Klap, H. Koedijk

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

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

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

Uitgevoerd door Praktijkonderzoek Plant & Omgeving als onderaannemer van DLV Facet.

Projectmanager Helma Verberkt, DLV Facet

In samenwerking met DLV Facet en Naktuinbouw

Gefinancierd door:

Productschap  Tuinbouw

Productschap tuinbouw, Postbus 280, 2700 AG Zoetermeer

Projectnummer: PPO 4110 3204

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Business Unit Glastuinbouw

Adres : Linnaeuslaan 2a
: 1431 JV Aalsmeer
Tel. : 0297 – 35 23 03
Fax : 0297 - 35 22 70
E-mail : jos.wubben@wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODEN	7
2.1 Schimmelisolaten en inoculum productie.....	7
2.2 Infectieproeven van begonia planten.....	7
2.3 Waarnemingen.....	8
2.4 Statistische analyses	8
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	9
3.1 Snelheid van aantasting.....	9
3.2 Effect van uitgangsmateriaal.....	9
3.3 Effect van inoculum concentratie.....	11
3.4 Effect van macro- of microsporen besmetting.....	12
3.5 Inoculatie op de schotel of in de pot.....	13
3.6 Cultivar gevoeligheid.....	14
4 CONCLUSIE.....	15
LITERATUUR.....	17
BIJLAGE 1: PROEFVELDINDELING PROEF 2_1 (A5) EN 2_2 (A4)	18
BIJLAGE 2: GEMIDDELDE DAGTEMPERATUUR PROEFKAS.....	19

1 Inleiding

Sinds twee jaar wordt in de begonia-teelt uitval gevonden veroorzaakt door een nieuwe *Fusarium* vaatschimmel welke recentelijk de naam *Fusarium foetens* gekregen heeft. Uitval op verschillende bedrijven is aanzienlijk en aantasting is moeilijk te beheersen en te bestrijden. DLV Facet heeft in samenwerking met Praktijkonderzoek Plant & Omgeving Business Unit Glastuinbouw en Naktuinbouw een stappenplan (4 fasen) uitgewerkt waarmee in de praktijk een verbeterde beheersing van de ziekte gerealiseerd moet worden. De volgende vier fasen zijn omschreven:

1. Praktijkinventarisatie.
2. Kennisontwikkeling.
3. Bestrijding en ontsmetting.
4. Implementatie.

Uitvoering van de verschillende onderdelen wordt gecoördineerd door DLV Facet in samenwerking met Naktuinbouw en PPO Business Unit Glastuinbouw.

In dit korte verslag worden de resultaten van enkele proeven beschreven waarbij het effect van concentratie en besmettingsmethode op mate van aantasting van begonia door *Fusarium foetens* bestudeerd is.

De doelstelling van het hier beschreven onderzoek is te bepalen wat de invloed van infectiedruk op de mate en snelheid van aantasting van *F. foetens* is op begonia is.

2 Materiaal en methoden

2.1 Schimmelisolaten en inoculum productie

De isolaten voor deze proeven zijn beschikbaar gesteld door R. Hoofman van Naktuinbouw. De volgende isolaten zijn in eerste instantie verkregen: Naktuinbouw 306, 311, 327 en 336. Door Naktuinbouw en de Plantenziektenkundige Dienst is de identiteit van deze isolaten bevestigd als zijnde *Fusarium foetens*. Op basis van uniforme groei op aardappel dextrose agar medium (PDA) is isolaat Naktuinbouw 327 gebruikt voor de infectieproeven.

Voor de infectieproeven is gebruik gemaakt van verschillende soorten sporen van de schimmel. Voor een eerste kasproef werden de sporen geproduceerd in vloeibaar Czapek Dox medium met gist extract. Het medium werd geënt met een ponsje mycelium van de schimmel en na twee weken groei bij 22°C werden grote hoeveelheden microsporen in het medium geproduceerd. Deze sporen werden door middel van filtratie over glaswol gescheiden van de overige schimmeldeeltjes en verdunningen van deze sporensuspensie in water werden direct gebruikt voor de besmettingen van de planten.

Macrosporen productie werd uitgevoerd op Carnation Leaf Agar (CLA, anjer blad agar) zoals beschreven door Fisher et al (1982). Maximale hoeveelheid macrosporen werd gevonden bij dag/nacht temperatuur van 25/20 °C en blacklight gedurende 12 uur per dag. Macrosporen werden van het medium geschraapt en na filtratie en tellen direct gebruikt voor de besmettingen van de planten.

2.2 Infectieproeven van begonia planten.

In de tijd zijn twee proeven uitgevoerd bij PPO Glastuinbouw te Aalsmeer (proef 2_1 en proef 2_2). Hierbij werd de invloed van de infectiedruk op incubatietijd onderzocht bij begonia planten van verschillende uitgangsstadia (onbeworteld stek, beworteld stek, halfwasplanten, bloeiende planten). Planten staan in deze proef op schotels om onderlinge besmetting te vermijden. De inoculaties voor proef 2_1 zijn uitgevoerd op 12 juni (dag 156) en de laatste waarnemingen zijn uitgevoerd op 5 september (dag 248). Proef 2_2 is gestart op 3 september (dag 246) en de laatste waarnemingen zijn uitgevoerd op 6 december (dag 340). Voor de inoculatie zijn microconidiën of macroconidiën gebruikt zoals hierboven beschreven. Er werd op **twee verschillende manieren geïnoculeerd**; a. aangieten op de grond, b. aangieten op de schotel. Voor de inoculatie gebruiken we 50 ml sporensuspensie per plant met oplopende hoeveelheid sporen. De reeks sporenhoeveelheid die voor beide proeven gebruikte werden verschilden in zoverre dat voor de eerste reeks $0-10^2-10^3-10^4-10^5-10^6$ sporen/plant gebruikt werden en voor de tweede reeks $0-10^3-10^4-10^5-10^6-10^7$ sporen/plant. Totaal **6 sporenconcentraties**. Voor iedere behandeling werden 5 planten per concentratie per herhaling gebruikt.

In de eerste proef werden de planten op vier verschillende plantstadia aangegoten met sporen: 1. onbeworteld stek, 2. beworteld stek, 3. halfwas planten, 4. bloeiende planten. Bij de tweede proef is geen besmetting uitgevoerd met bloeiende planten. Hiervoor in de plaats is een proef uitgevoerd om het infecterend vermogen van micro- en macrosporen te vergelijken. Een overzicht van de proefvelden is weergegeven in de bijlage 1.

De proeven zijn uitgevoerd met twee begonia cultivars waarvan verondersteld werd dat deze verschilden in gevoeligheid voor *F. foetens*. De cultivar Berseba is ingezet bij alle behandelingen. De cultivar Dark Britt is bij een deel van de behandelingen getoetst en dan vaak uitsluitend in een herhaling.

Bij proef 2_1 stonden de planten op schotels op plastic op de ondergrond van de kas. Bij proef 2_2 stonden de planten op schotels op teelttafels met plastic in de kas. Onderlinge besmetting van de planten door spatwater werd voorkomen door direct op de schotels voedingsoplossing bij te gieten. Er was geen

drainwatercontact tussen planten onderling. Klimaat werd gestuurd op temperatuur waarbij een dag/nacht temperatuur van 18/20 °C nagestreefd werd. Daggemiddelden van gerealiseerde temperatuur staan weergegeven in bijlage 2.

2.3 Waarnemingen

Vanaf het moment dat de besmetting uitgevoerd werd is wekelijks de aantasting van de planten visueel beoordeeld. De mate van aantasting is vastgesteld door middel van onderstaande index.

- 0 geen zichtbare symptomen
- 1 enkel blad vergeeld, niet met zekerheid het gevolg van *Fusarium foetens*
- 2 duidelijke vergeling enkele bladeren, eerste verwelkingssymptomen
- 3 ernstige vergeling en verwelking, circa 50 % plant bovengronds aangetast
- 4 zeer ernstige vergeling en verwelking, meer dan 80 % plant bovengronds aangetast en/of sporulatie op bovengrondse delen
- 5 plant dood

De waarnemingen zijn 2 à 3 maal per week uitgevoerd zodat een goed beeld van ontwikkeling van aantasting in de tijd verkregen werd.

In de grafieken is in alle gevallen de gemiddelde aantasting voor een bepaalde behandeling weergegeven. Normaal gesproken kan dit niet berekend worden wanneer een klasse indeling voor de aantastingniveaus gebruikt wordt. Omdat aan het einde van de proefperiode voornamelijk klasse 0 en klasse 5 waargenomen werd is de waarde van de gemiddelde aantasting een goede weergave van het percentage aangetaste planten voor de verschillende behandelingen. Bijvoorbeeld bij een gemiddelde aantasting van 1 is er algemeen sprake van 20% uitval van planten in voor deze behandeling. Bij een gemiddelde aantasting van 3 is er sprake van 60% uitval van planten en bij een gemiddelde aantasting van 5 is er sprake van 100% uitval van planten.

2.4 Statistische analyses

De ontwerp van de proef in een (hiërarchische) blokstructuur en de waarneming van de belangrijkste responsvariabelen in een reeks opeenvolgende klassen, bepaalde in belangrijke mate de techniek die toegepast moest worden bij de statistische verwerking van de proefresultaten en het toetsen van de significantie van verschillen tussen de onderzochte behandelingen. De waarnemingen bestonden uit een score van het schadebeeld op een schaal van 0 (geen schade) tot 5 (volledig beschadigd). Deze klassen waren weliswaar opeenvolgend maar niet noodzakelijkerwijs even breed of op gelijke onderlinge afstand. Bovendien werd de verdeling over de verschillende klassen binnen de onderzochte eenheden van belang geacht.

De combinatie van de blokstructuur en de klasse-indeling maakte het noodzakelijk om gebruik te maken van de procedure IRCLASS uit het statistische pakket GenStat (GenStat, 2002; Keen & Engel; 1997). De IRCLASS-procedure is toegepast op alle waarnemingsmomenten afzonderlijk, alsmede voor de laatste waarneming. De laatste waarneming hoeft niet voor iedere plant (of eenheid van een grotere maat) op hetzelfde tijdstip te vallen. Voor alle proefactoren zijn de verschillen tussen de verschillende behandelingen getoetst, gebruik maken van de uitkomsten van deze analyse, tegen een drempel voor de betrouwbaarheid van 5%. Significante verschillen tussen de behandelingen worden bij de resultaten aangeduid met verschillende letters.

Verder is een analyse uitgevoerd van het gemiddelde tijdstip van aantasting en de snelheid van aantasting door een analyse te maken van de S-curves per plant door de opeenvolgende waarnemingen in de tijd. Vanwege numerieke en rekentechnische redenen is dit in drie stappen gedaan. Eerst is op de gehele dataset een (niet lineaire) analyse gedaan van de (fictieve) grenzen tussen de onderzochte klassen. Vervolgens zijn deze klassegrenzen gebruikt om per plant een S-curve te schatten in het verloop van de

aantasting, lopend van 0 naar 5. Per plant is uit deze S-curve een maat afgeleid voor het omslagpunt en de steilheid. Dit zijn resp. maten voor het tijdstip van gemiddelde aantasting en voor de snelheid van de aantasting (van licht naar zwaar). Omdat niet alle planten aangetast raakten voor het einde van de proef, is bovendien een variabele wel/niet aangetast gedefinieerd. De resulterende drie variabelen zijn vervolgens met een 'normaal' GLMM geanalyseerd (GenStat® -procedure IRREML; Schall, 1991; Engel, 1997), het wel/niet aangetast zijn met een binomial verdeling, het tijdstip van gemiddelde aantasting met een normale verdeling en de snelheid van aantasting met een Poisson-verdeling. Ook hier is effect van de proeffactoren op het resultaat getoetst tegen een drempel voor de betrouwbaarheid van 5%.

3 Resultaten en discussie

3.1 Snelheid van aantasting

De inoculaties van de eerste proef werden uitgevoerd op 12 juni. Op 15 juli werd de eerste aantasting waargenomen in de halfwasplanten. Dit duidt op een latentieperiode onder de geldende omstandigheden van ongeveer 5 weken (gemiddelde dagtemperatuur is aangegeven in bijlage 2). Het gemiddelde tijdstip van aantasting voor stek, beworteld stek, halfwas of een bloeiend gewas was verschillend (Tabel 1). De eerste zichtbare aantasting werd met name geconstateerd in het halfwas materiaal en in de bloeiende planten. Aan de hand van de waarnemingen is ook berekend of snelheid van verloop van klasse 1 (lichte aantasting) naar klasse 5 (plant dood) al of niet beïnvloed werd door het plantstadium. Hiervoor zijn geen aanwijzingen naar voren gekomen uit de berekeningen die op de proefresultaten uitgevoerd zijn. De inoculaties voor de tweede proef werden uitgevoerd op 3 september. Hier werd een eerste aantasting waargenomen in halfwas materiaal op 3 oktober. Er zou hier dus sprake zijn van een latentieperiode van 30 dagen. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat voor deze waarnemingen een inoculum concentratie met een factor 10 hoger gebruikt werd.

Tabel 1. Periode na besmetting waarop de aantasting bij de verschillende plantstadia geconstateerd is.

Plantstadium	Theoretisch berekende moment waarop de helft van de planten aangetast was (dagen na besmetting)
stek	99
Beworteld stek	70
halfwas materiaal	56
Bloeiend materiaal	58

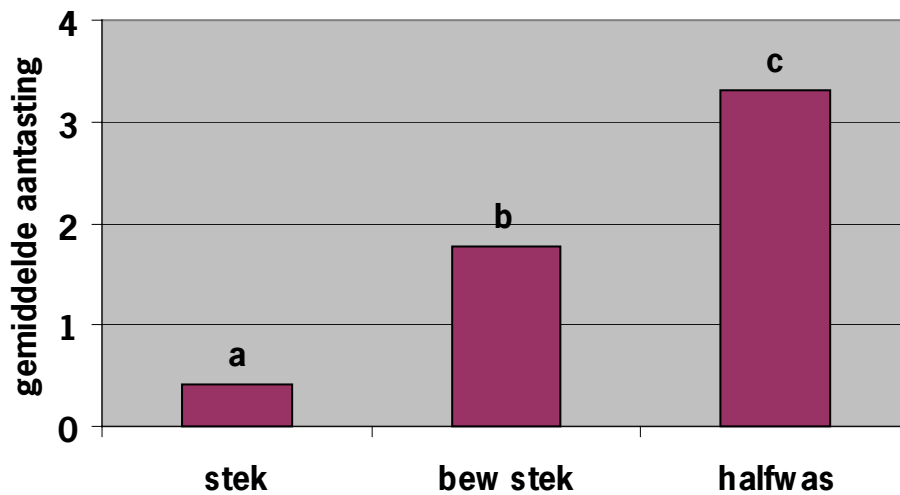
3.2 Effect van uitgangsmateriaal

In hoofdstuk 3.1 is al kort iets gezegd over de snelheid waarmee de aantasting optrad bij de verschillende stadia van het uitgangsmateriaal. Behalve de snelheid is met name gekeken naar de mate van aantasting in de verschillende plantstadia. Zowel in proef 2_1 (Fig. 1) als proef 2_2 (Fig. 2) werd betrouwbaar meer aantasting gevonden in het halfwas materiaal gevolgd door het bewortelde stek, bloeiende gewas (uitsluitend proef 2_1), en onbewortelde stek. Voor de onbewortelde stek werd in de eerste proef geen aantasting geconstateerd terwijl in de tweede proef pas aan het einde van de proefperiode enige aantasting in deze partij geconstateerd werd. Het oudere materiaal lijkt gevoeliger en er treedt eerder aantasting in deze partij op (zie Tabel 1). Met name de waarneming dat het zeer lang duurt voordat de eerste aantasting in de onbewortelde stek gevonden wordt is opvallend. Een mogelijk verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat (beschadigde) wortels een belangrijke rol spelen als invalspoort en deze ontbreken in eerste instantie nog bij de niet bewortelde stek. Pas wanneer voldoende wortels gevormd zijn kunnen de aanwezige sporen in de

pot de plant aantasten. De eerste aantasting werd geconstateerd in het halfwas materiaal. Dit is een actief groeiend gewas met een bijna volgroeid wortelgestel. Bij de bloeiende planten zien we na een eerste snelle toename van uitval, dat de toename van uitval stagneert en uiteindelijk werd bij de bewortelde stek meer aantasting gevonden.



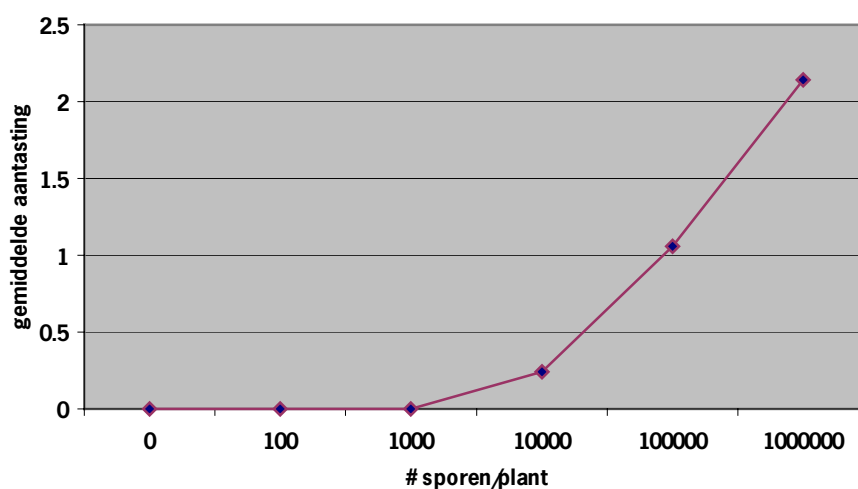
Figuur 1. Effect uitgangsmateriaal op aantasting proef 2_1. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode. Hierbij is 0 gezond en 5 dood. De letters boven de kolom geven aan of een waarneming significant verschillend is.



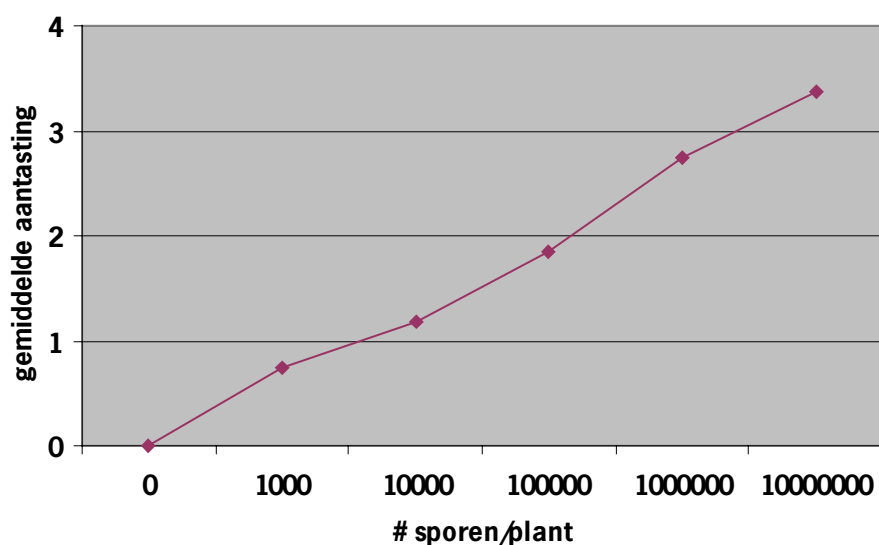
Figuur 2. Effect uitgangsmateriaal op aantasting proef 2_2. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode. Hierbij is 0 gezond en 5 dood. De letters boven de kolom geven aan of een waarneming significant verschillend is.

3.3 Effect van inoculum concentratie

Voor de eerste proef werd een minimale sporehoeveelheid van 100 sporen per plant gehouden. Bij de laagste twee sporenaantallen (100 en 1000 sporen per plant) werd geen zichtbare aantasting geconstateerd gedurende de proefperiode (Fig. 3). Vanaf 10.000 sporen per plant werden de planten ziek. De tweede proef werd ingezet met een beginaantal van 1000 sporen per plant. Hierbij werd de aantasting in een aantal gevallen reeds bij deze lage aanvanghoeveelheid gevonden (Fig. 4). Dit geeft aan dat onder de omstandigheden zoals gedurende de proef uitgevoerd de aantasting kan optreden vanaf 1000 sporen per plant.



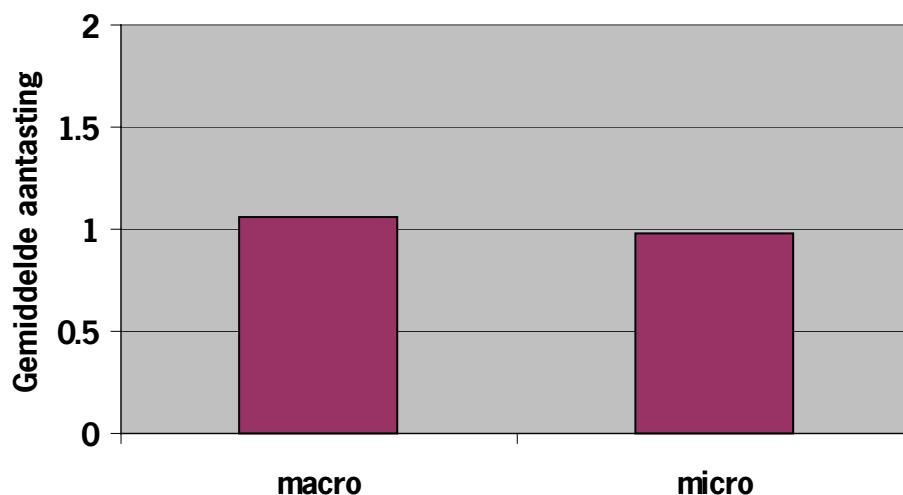
Figuur 3. Effect inoculum hoeveelheid op aantasting proef 2_1. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode (plantstadium, cultivar, bovendoor/onderdoor) bij deze inoculum hoeveelheid. Hierbij is 0 gezond en 5 dood.



Figuur 4. Effect inoculum hoeveelheid op aantasting proef 2_2. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode (plantstadium, cultivar, bovendoor/onderdoor) bij deze inoculum hoeveelheid. Hierbij is 0 gezond en 5 dood.

3.4 Effect van macro- of microsporen besmetting.

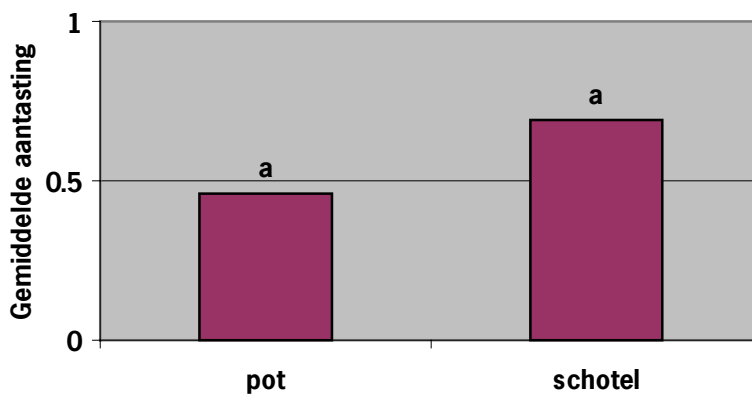
In een aanvullend experiment als onderdeel van proef 2_2 is onderzocht in hoeverre macro- of microsporen van de schimmel verschillen geven in de mate van aantasting van begonia. Macro en microsporen zijn geproduceerd zoals beschreven in hoofdstuk 2. Opgemerkt moet worden dat de partij microsporen voor meer dan 95 % uit microsporen bestaat terwijl bij de macrosporen ongeveer 50 % van de sporen microsporen zijn. Echter, indien duidelijke verschillen zouden bestaan tussen infecterend vermogen van beide sporentypen dan zou dit in de resultaten naar voren moeten komen. In Fig. 5 zien we echter dat er geen betrouwbare verschillen in aantasting gevonden zijn na besmetting met macro- of microsporen. Dit geldt zowel voor de eindwaarneming als voor de tussentijdse waarnemingen waarbij de snelheid van optreden van aantasting als maat genomen wordt. De conclusie van dit aanvullende onderdeel was dat voor de infectieproeven goed gebruik gemaakt kan worden van microsporen als inoculumbron.



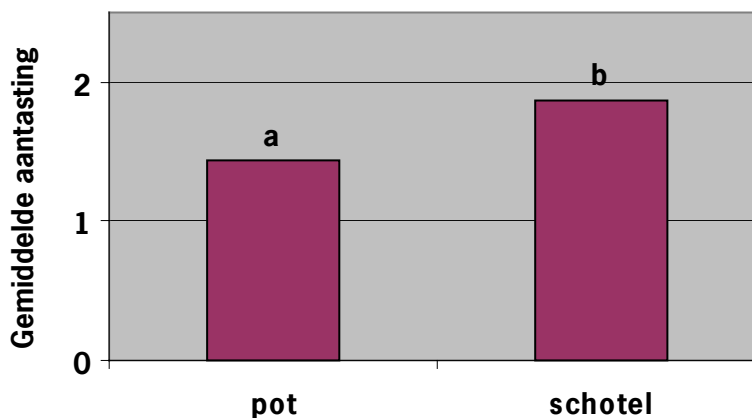
Figuur 5. Effect macro- of microsporen op aantasting proef 2_2. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode. Hierbij is 0 gezond en 5 dood.

3.5 Inoculatie op de schotel of in de pot

Zowel bij de eerste als bij de tweede proef werd een zwaardere aantasting gevonden wanneer de planten in de schotel besmet werden in plaats van op de potgrond (Fig. 6 en 7). In de eerste proef was het verschil nauwelijks significant maar in de tweede proef was er wel een betrouwbaar verschil. Omdat de planten na de besmetting allemaal onderdoor voedingsoplossing op de schotel toegediend kregen ligt een mogelijke oorzaak van de verschillen in een directe verspreiding van de sporen in de potkluit direct na de besmetting. Bij besmetting op de schotel zullen alle sporen bij iedere watergift via de voedingsoplossing door de pot verspreid worden. Mogelijk dat bij besmetting bovendoor de herhaalde verspreiding van de sporen door de kluit minder is met daarbij een verminderde kans op het optreden van aantasting.



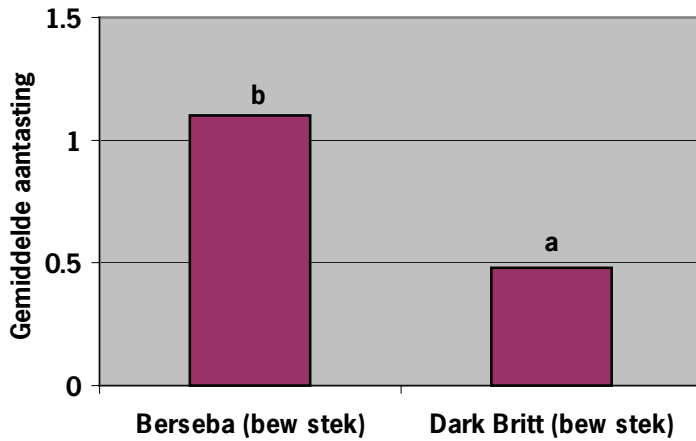
Figuur 6. Effect van besmetting op de pot of in de schotel op aantasting in proef 2_1. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode. Hierbij is 0 gezond en 5 dood.



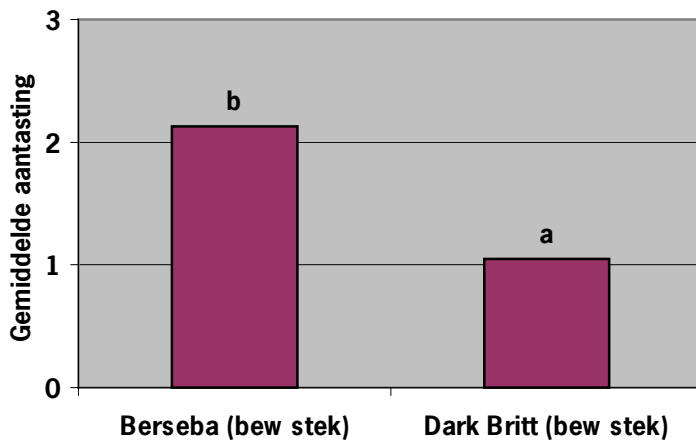
Figuur 7. Effect van besmetting op de pot of in de schotel op aantasting in proef 2_2. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode. Hierbij is 0 gezond en 5 dood.

3.6 Cultivar gevoeligheid

De aantasting bij Berseba was in beide proeven gemiddeld twee maal zo zwaar als de aantasting bij Dark Britt (Fig. 8 en 9). Dit is geheel overeenkomstig de ervaringen in de praktijk waarbij bepaalde rassen als duidelijk meer gevoelig aangemerkt worden als andere rassen. Het is niet bekend waar de oorzaken voor deze verminderde gevoeligheid liggen.



Figuur 8. Effect van cultivar op aantasting in proef 2_1. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode voor de behandeling met beworteld stek. Hierbij is 0 gezond en 5 dood.



Figuur 9. Effect van cultivar op aantasting in proef 2_2. Op de Y-as staat de gemiddelde aantasting waargenomen aan het einde van de proefperiode voor de behandeling met beworteld stek. Hierbij is 0 gezond en 5 dood.

4 Conclusie

Samenvattend naar aanleiding van hoofdstuk 3 kan het volgende opgemerkt worden.

- Een latentieperiode van iets meer dan 4 weken wordt bij een hoge infectiedruk gevonden
- De snelheid en het niveau van de aantasting verschilt al naar gelang het stadium waarin de plant zich bevindt. Bij een halfwas plant zal de aantasting eerder tot uiting komen dan bij onbewortelde stek.
- Zichtbare aantasting is waargenomen vanaf 1000 sporen per plant
- Er is geen verschil in aantasting gevonden tussen macro- en microsporen
- Bij besmetting op de schotel vinden we meer aantasting dan bij besmetting op de potkluit
- Het voorspelde verschil in gevoeligheid tussen Berseba en Dark Britt is bevestigd.

De relevantie van deze conclusies moet afgezet worden tegenover waarnemingen die uit de praktijk naar voren komen. Wanneer zien we in een partij de meeste uitval en op welk moment moet de besmetting dan opgetreden zijn. Een complicatie hierbij is wel het verschil dat gevonden is bij de verschillende plantstadia die getoetst zijn een zichtbare aantasting in halfwas planten kan later opgetreden zijn dan een zichtbare besmetting in beworteld stek. De hoeveelheden sporen die noodzakelijk zijn voor besmetting zullen in de praktijk in het voedingswater aangetoond moeten worden. Vraag blijft dan natuurlijk wel staan waar deze besmetting in de praktijk vandaan komt. Het resultaat dat een effectieve besmetting van de planten gerealiseerd wordt wanneer de sporen via de schotel aangeboden worden laat zien dat besmetting in de praktijk via besmet voedingswater (bijvoorbeeld op een eb en vloed) teeltsysteem goed mogelijk is. Als laatste bevestigen de verschillen in gevoeligheid tussen de twee getoetste cultivars de waarnemingen uit de praktijk. Dit geeft aan dat in de praktijk winst gehaald kan worden door minder gevoelige cultivars te telen. Hierover moet dan wel informatie beschikbaar zijn. Hier liggen mogelijkheden voor de veredelaars.

Literatuur

Engel, B., 1997. Extending Generalized Linear Models with Random Effects and Components of Dispersion. Ph.D. thesis. Agricultural University Wageningen.

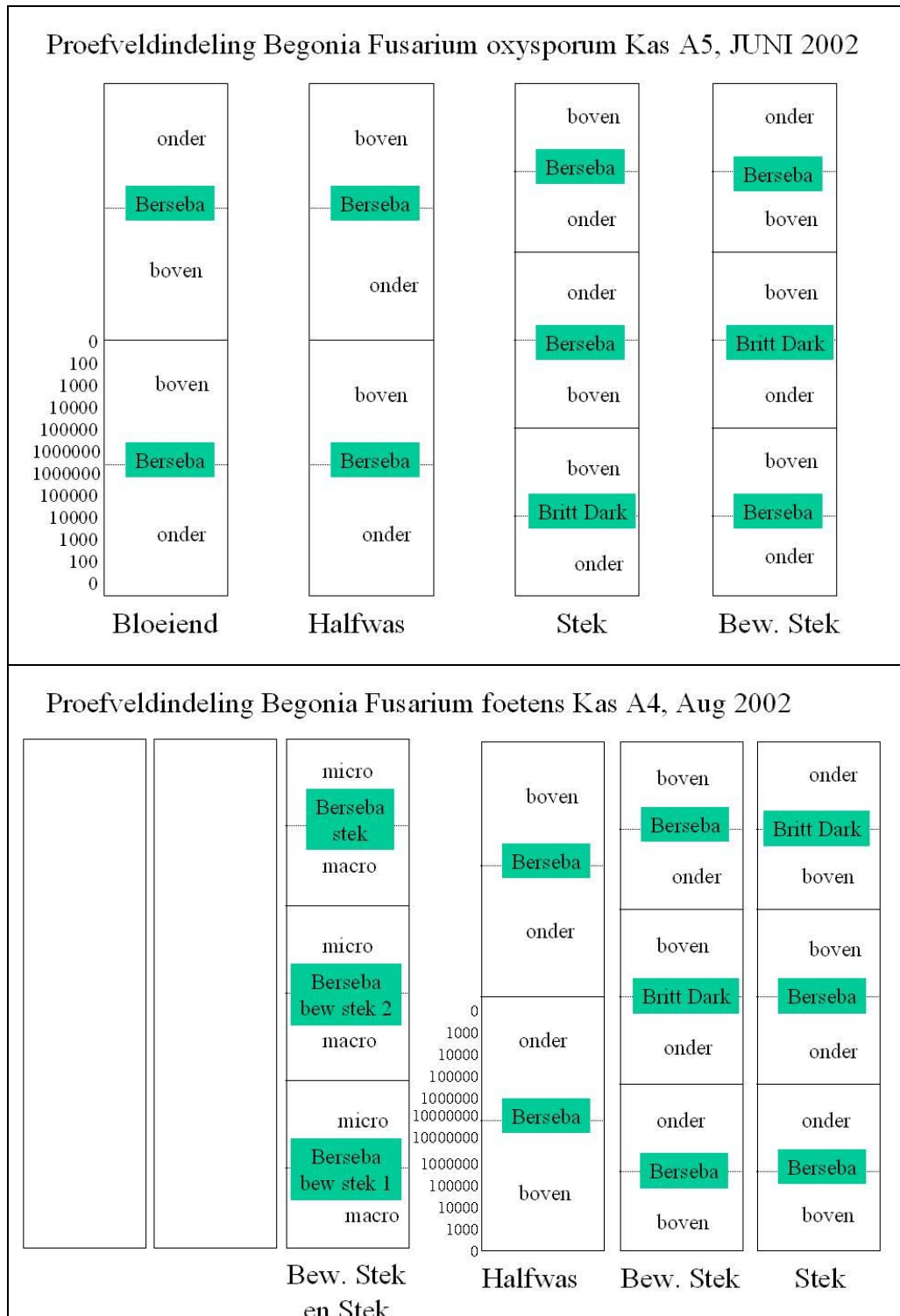
Fisher, N.L., Burgess, L.W., Tousoun, T.A., & Nelson, P.E. (1982) Carnation leaves used as a substrate and for the preservation of cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* 72, 151-153

GenStat, 2002. GenStat © 6th Edition + Biomtris procedure library. VSN International Ltd & Biometris. Oxford, Wageningen.

Keen, A. & B. Engel, 1997. Analysis of a mixed model for ordinal data by iterative re-weighted REML. *Statistica Neerlandica*, 51, 129-144.

Schall, R., 1991. Estimation in generalized linear models with random effects. *Biometrika*, 78, 719-728.

Bijlage 1: Proefveldindeling proef 2_1 (A5) en 2_2 (A4)



Bijlage 2: Gemiddelde dagtemperatuur proefkas

