

# Vliegenpoepjesziekte in lelies

Voortgezet diagnostisch onderzoek 2011

Peter Vink, Khanh Pham en Hans Kok

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van  
Wageningen UR  
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit  
PPO nr. 32 361304 00/ PT nr. 14263-02  
augustus 2011

© 2010 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving / Plant Research International, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

**De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw**

---

PT nummer: 14263-02

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.**

Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252-462121

Fax : 0252-462100

E-mail : [infobollen.ppo@wur.nl](mailto:infobollen.ppo@wur.nl)

Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING .....	5
1 INLEIDING.....	7
2 UITVOERING VAN HET ONDERZOEK.....	9
2.1 Beknopte literatuurstudie .....	9
2.2 Ontwikkeling van een PCR-toets.....	10
3 RESULTATEN.....	15
3.1 Karakterisatie van Zygothiala en ontwikkeling van een PCR-toets .....	15
3.2 In vitro analyse van de gevoeligheid van vliegenpoepjesziekte voor fungiciden.....	16
4 DISCUSSIE .....	19
5 CONCLUSIES .....	21
6 BIJLAGE .....	23
7 REFERENTIES .....	25



# Samenvatting

Bij de bloemeteelt van lelies is in de herfst en wintermaanden soms sprake van veel economische schade doordat de waslaag van lelieplanten wordt aangetast door de schimmel *Zygophiala*. Daardoor ontstaan ongewenste stengelvlekken en een afwijkende bloemknopafrijping.

In een consultancyproject is een beknopte literatuurstudie uitgevoerd over genoemde schimmel. Daarbij is vastgesteld dat de schimmel *Zygophiala* metname bij de teelt van appels in de USA en China het zogenaamde “flyspeek” kan veroorzaken. Ook andere gewassen met een duidelijke waslaag zoals anjers kunnen last hebben van een aantasting door deze schimmel.

Uit zieke lelieplanten afkomstig uit Nederland zijn isolaties gemaakt en is met een geïsoleerde *Zygophiala*-schimmel een DNA-toets ontwikkeld. Daarmee is vanaf nu een snelle PCR-toets mogelijk om deze schimmel op en in lelieplanten aan te tonen.

Ook is nagegaan wat de remmende werking is van een groot aantal, in Nederland gebruikte fungiciden op de schimmel *Zygophiala*. Het is gebleken dat een groot aantal van deze fungiciden zoals Allure, Ortiva, Mirage Plus, Kenbyo fl., Collis en Flint in vitro een goede remmende werking hebben tegen genoemde schimmel. Telers van lelies moeten daarmee in staat zijn om een aantasting door *Zygophiala* effectief te kunnen onderdrukken. Uit eerdere studies is gebleken dat het kasklimaat meestal een allesbepalende rol speelt bij problemen met *Zygophiala*. Daarom is het tevens van belang dat telers van lelies ook door middel van sturing van het kasklimaat proberen om een aantasting door deze schimmel te voorkomen.



# 1 Inleiding

Bij het korter worden van de dagen kan de luchtvochtigheid bij de teelt van lelies in de kas soms tot hoge waarden stijgen. Metname in de huidige bedrijfsvoering waarbij vanwege de hoge energieprijzen niet onnodig wordt gestookt en in een kasruimte minder wordt gelucht blijft het gewas door condens dan ook vaak langer nat. Onder deze omstandigheden kan een uitermate curieuze ziekte in lelies zich gaan ontwikkelen die in het afgelopen jaar op een aantal bedrijven zeer veel economische schade heeft veroorzaakt. Diagnostisch onderzoek heeft aangetoond dat de schimmel *Zygothiala jamaicensis* daarbij een rol speelt. De schimmel kan groeien bij temperaturen tussen 6 en 28°C met een optimum van 20-25°C. Een hoge luchtvochtigheid of vochtige omstandigheden bevorderen een aantasting. Bij een geringe aantasting wordt over het algemeen geen schade zichtbaar. Bij een sterkere aantasting veroorzaakt de schimmel groene, vettige plekken op de stengels waar de waslaag plaatselijk verdwenen is. Soms zijn op deze plaatsen kleine zwarte microsclerotiën te vinden, de zogenaamde “fleyspecks” oftewel “vliegenpoepjes”. Een andere opmerkelijke symptoom is dat de waslaag op de bloemknoppen kan worden aangetast waardoor de bloemknoppen plaatselijk eerder op kleur komen. Lelieplanten met dergelijke bloemen hebben geen of minder handelswaarde. Tot nu toe is vrijwel niets bekend over deze schimmel als veroorzaker van een ziekte in lelies. Daarom is binnen dit onderzoek een korte literatuurstudie uitgevoerd naar deze schimmelziekte, is een PCR-toets ontwikkeld om de schimmel in en op lelieplanten te kunnen aantonen en is van een groot aantal toe te passen fungiciden nagegaan wat de remmende werking is op genoemde schimmel.





## 2 Uitvoering van het onderzoek

### 2.1 Beknopte literatuurstudie

Om te beginnen is een beknopte literatuurstudie uitgevoerd waarbij is nagegaan in welke teelten op de wereld de schimmel *Zygothia jamaicensis* een rol speelt en voor economische schades kan zorgen. De schimmel is als eerste beschreven als veroorzaker van een ziekte in bananen op Jamaica (Martyn 1945) en later beschreven als de anamorph van de schimmel *Schizothyrium pomi* (Durbin et al. 1953). Baker et al. heeft in 1976 in een uitgebreide studie beschreven wat de rol van *Zygothia jamaicensis* is bij een ziekte in anjers en appels. Batzer et al. heeft in 2008 echter vier species beschreven van het geslacht *Zygothia* die in verband konden worden gebracht met de ziekte in appels. De schimmel is verder in vele studies beschreven als veroorzaker van het zogenaamde “fleyspeck” bij de teelt van appels in o.a. de USA en China. Ook bij de snijbloemteelt van anjers wordt de schimmel in oude gewasbeschermingsgidsen genoemd als veroorzaker van een ziekte. Daarbij wordt met name het kas-klimaat genoemd als belangrijkste gegeven om de ziekte te beheersen.

De beknopte literatuurstudie heeft duidelijk gemaakt dat de schimmel *Zygothia jamaicensis* een wereldwijd voorkomende schimmel is die in verschillende gewassen met een duidelijke waslaag voor problemen kan zorgen. Met name in het gewas appel en anjer is onderzoek gedaan. Daarbij is gebleken dat het (kas-) klimaat een allesbepalende rol speelt bij de groei en aantasting van de schimmel. Er is weinig tot geen informatie over de bestrijding van de schimmel met gewasbeschermingsmiddelen omdat de studies veelal betrekking hebben op appels als consumptiegewas. Daarbij speelt het gebruik van fungiciden niet of nauwelijks. De bestrijding van de schimmel is in alle doorgenomen studies meest gerelateerd aan teeltmaatregelen. In studies van recentere datum is de systematiek van de schimmel middels DNA-analyses uitgebreid beschreven en ziet men een voortdurende uitsplitsing en verfijning van soorten en species.

## 2.2 Ontwikkeling van een PCR-toets

Van een aantal bloementelers zijn in 2000 al lelieplanten ontvangen met symptomen van een aantasting van de waslaag op de stengels. Uit deze symptomen zijn destijds isolaties gemaakt op een voedingsbodem van aardappel glucose agar + antibiotica om ongewenste bacteriegroei te voorkomen. De schimmels die uit de stengelvlekken groeiden zijn daarna microscopisch beoordeeld en gedetermineerd, waarbij werd vastgesteld dat uit de symptomen op de leliestengels de schimmel *Zygothia* was geïsoleerd. Een isolaat van deze schimmel is destijds aangehouden in de collectie van PPO om te kunnen gebruiken voor proefdoeleinden. Bij de uitvoering van het onderzoek in 2011 is dit isolaat van de schimmel *Zygothia* gebruikt om een PCR-toets te ontwikkelen ten behoeve van de moleculaire identificatie van *Zygothia*-soorten.

Het isolaat uit 2000, geïsoleerd uit lelies, is gekarakteriseerd door de sequentie van de ITS-fragmenten te analyseren. Een fragment is geamplificeerd met algemene schimmel-primers ITS1: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3' en ITS4: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' (White et.al, 1990).

De sequentie is daarna vergeleken met sequenties van diverse *Zygothia*-isolaten uit de databestanden van GenBank.

Leliemonsters met symptomen van "fleyspeck" zijn ook in 2010 en 2011 verzameld.

Uit dit monstermateriaal kon helaas geen zuivere kweek van *Zygothia* worden geïsoleerd. Daarom is geprobeerd om rechtstreeks genoemde schimmel op de lelieplanten aan te tonen middels PCR. Op grond van de beschikbare ITS (Internal Transcribed Spacer) sequenties van *Zygothia* soorten uit GenBank werden generieke primers voor *Zygothia* ontworpen:

- Zygop-For: 5'- CCG ACC TCC AAC CCC CTG TGA T - 3'
- Zygop-Rev: 5'-CTA CGA CGC TCC GAG ACG GGT -3'

De sequentie van het verkregen PCR product (uit lelie materiaal met symptomen) werd bepaald en met de andere sequenties in GenBank vergeleken.

## 2.3 In vitro-toets

Een isolaat van *Zygothia* uit lelie is gebruikt om een in vitro-proef te doen voor het testen van verschillende fungiciden. Daartoe zijn petrischalen met aardappel glucose agar vermengd met respectievelijk 0, 10 en 100 ppm van verschillende fungiciden. Na stolling van de agar zijn in het centrum van de petrischalen ponsstukjes van een reïncultuur van de schimmel *Zygothia* afgeënt. Alle beënte petrischalen zijn geïncubeerd in een donkere broedstovf bij 24°C. Na 21 dagen incubatie is de uitgroei van de schimmel *Zygothia* gemeten.



Foto 1: Leliestengels met door vliegenpoepjesziekte aangetaste waslaag rond bladvoeten



Foto 2: Leliestengels met “fleyspeck” oftewel de microsclerotiën van *Zygophiala*



Foto 3: Bloemknoppen van lelie die deels eerder afrijpen a.g.v. aantasting door *Zygophiala*



## 3 Resultaten

### 3.1 Karakterisatie van *Zygothiala* en ontwikkeling van een PCR-toets

#### Karakterisatie van het *Zygothiala*-isolaat uit 2000

De ITS sequentie van het *Zygothiala*-isolaat uit 2000 had een homologie percentage van resp. 95, 96, 98 en 99 % t.o.v. die van *Zygothiala cylindrica*, *Z. wisconsinensis*, *Z. cryptogama* en *Z. jamaicensis* (*Schizothyrium pomi*).

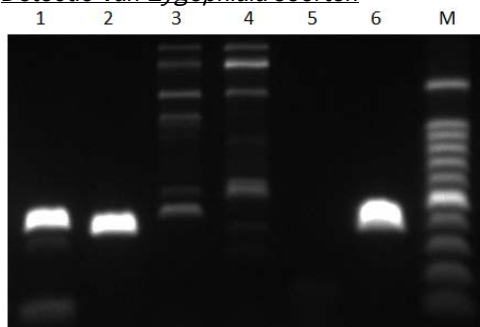
Daarmee is voldoende duidelijk geworden dat de lelieplanten in 2000 waren aangetast door de schimmel *Zygothiala*. Dit isolaat zit in de cluster *Zygothiala jamaicensis* (*Schizothyrium pomi*).

#### Karakterisatie van *Zygothiala* op en in aangetast plantmateriaal verzameld in 2010/2011

De ITS sequentie van aangetast plantmateriaal 2010/2011 vertoonde een homologie percentage tussen de 95 en 96 % t.o.v. die van *Zygothiala wisconsinensis*, *Z. jamaicensis* (*Schizothyrium pomi*) *Z. cryptogama* and *Z. cylindrica* isolaten. De *Zygothiala* in aangetast plantmateriaal uit 2010 en 2011 zit in de cluster *Zygothiala cylindrica*. Zie ook Bijlage 1 voor de verwantschap tussen deze soorten, uitgezet in een zg. fylogenetische dendrogram.

Uit de uitgevoerde sequentieanalyses is gebleken dat er een duidelijk verschil in ITS-sequentie was te vinden tussen een *Zygothiala*-isolaat uit 2000 en *Zygothiala*-aantastingen van lelieplanten in 2010 en 2011. Het gaat zeer waarschijnlijk om 2 verschillende *Zygothiala*-soorten. Dit is ook te zien in Fig.1 waarbij te zien is dat er verschillen in ITS fragmentgrootte zijn (laan 1,2 en 6). Het isolaat uit 2000 hoort bij de cluster *Z. jamaicensis* (*Schizothyrium pomi*), terwijl het *Zygothiala*-isolaat op lelieplanten in 2010 en 2011 meer homologie vertoonde met *Z. cylindrica*. Dit gegeven kan mogelijk verband houden met het minder gemakkelijk kunnen kweken en bestrijden van *Zygothiala* in de laatste jaren.

#### Detectie van *Zygothiala*-soorten



Figuur 1. PCR fragmenten verkregen met *Zygothiala* primers Zygo-For/ Zygo-Rev. Laan 1 en 2: Lelie stengelmonsters uit 2010/2011 met 'fleyspeck' symptomen. Laan 3 en 4: lelie bolmonsters met 'gebrekziekte' (negatieve controles), laan 5: water (negatieve controle), laan 6: *Zygothiala* isolaat 2000 uit lelie, M: 100bp ladder (Promega)

De ontworpen primers Zygo-For/ Zygo-Rev zijn dus in principe geschikt om alle *Zygothiala* spp. aan te tonen. Een fylogenetische analyse staat vermeld in Bijlage 1.

### 3.2 In vitro analyse van de gevoeligheid van vliegenpoepjesziekte voor fungiciden

Het is gebleken dat verschillende fungiciden een remmende werking hebben op de uitgroei van de schimmel *Zygothiala*. In tabel 1 is een overzicht gegeven van de uitgroei in millimeters na 21 dagen incubatie.

In grafiek 1 is duidelijk het verschil tussen de diverse fungiciden te zien.

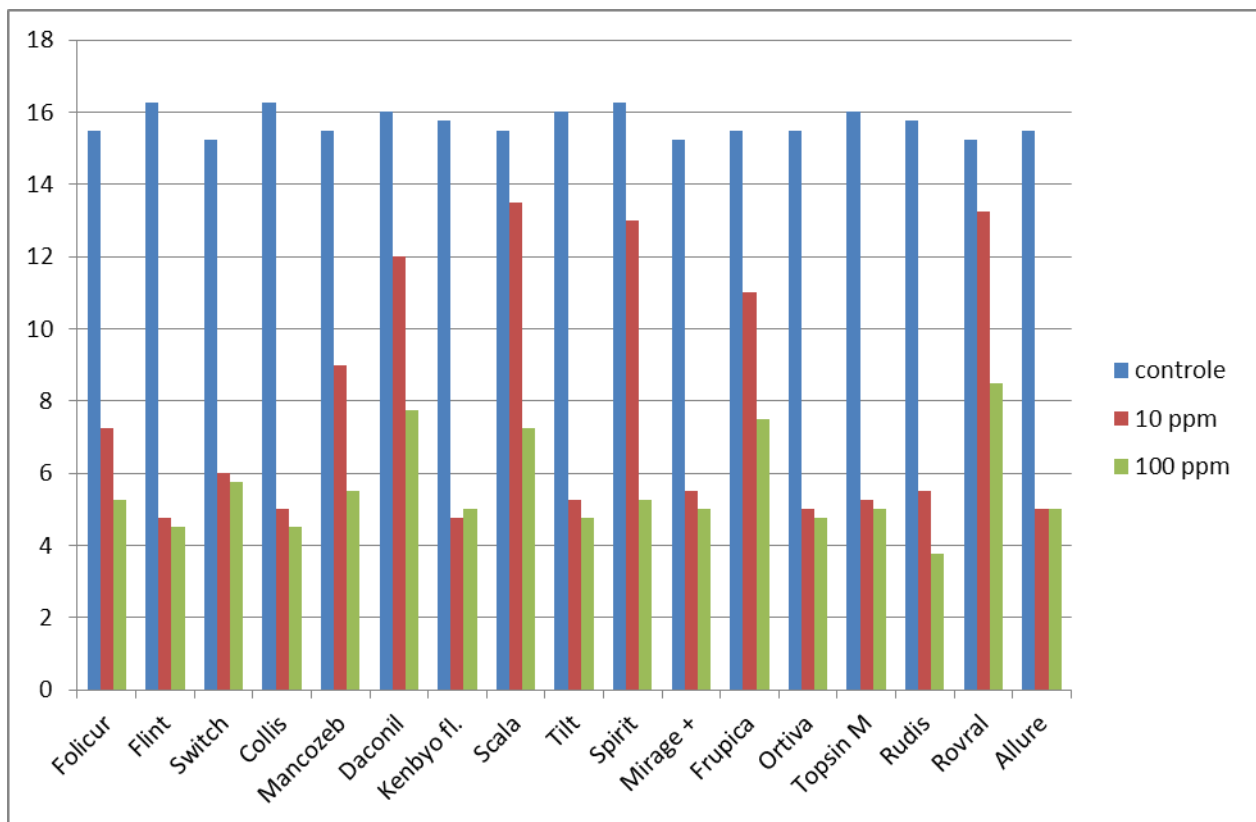
In de controle-petrischalen bleek dat de schimmel gemiddeld 15,7 mm was gegroeid. De groei werd bij 10 ppm bij een aantal fungiciden al geremd tot een uitgroei van rond de 5 mm. Bij 100 ppm was de remming van deze fungiciden nog duidelijker en bleek dat de groei bij een aantal fungiciden was beperkt tot rond 4 mm. Deze geringe groei is te verklaren uit de groei vanuit het ponsstukje zonder fungicide.

Tabel 1: Gemiddelde uitgroei van *Zygothiala* in millimeters op agar met fungiciden

Middel:	controle	10 ppm	100 ppm
Folicur	15,5	7,25	5,25
Flint	16,25	4,75	4,5
Switch	15,25	6	5,75
Collis	16,25	5	4,5
Mancozeb	15,5	9	5,5
Daconil	16,0	12	7,75
Kenbyo fl.	15,75	4,75	5
Scala	15,5	13,5	7,25
Tilt	16,0	5,25	4,75
Spirit	16,25	13	5,25
Mirage +	15,25	5,5	5
Frupica	15,5	11	7,5
Ortiva	15,5	5	4,75
Topsin M	16,0	5,25	5
Rudis	15,75	5,5	3,75
Rovral	15,25	13,25	8,5
Allure	15,5	5	5



Grafiek 1: Remmende werking van verschillende fungiciden op *Zygothiala*, bepaald via remming van de groei op agar (zie tabel 1)





## 4 Discussie

De beknopte literatuurstudie heeft duidelijk gemaakt dat de schimmel *Zygophiala* een wereldwijd voorkomende schimmel is die in verschillende gewassen met een duidelijke waslaag voor problemen kan zorgen. Ook is uit oude literatuur gebleken dat het (kas-) klimaat een allesbepalende rol speelt bij de groei en ontwikkeling van de schimmel. Met name vocht en een koele temperatuur zijn bevorderend voor aantasting van planten. Daarom werd in het verleden een droger kasklimaat gerealiseerd door extra te stoken met de ramen op een kier. Echter, met het stijgen van de stookkosten is de laatste jaren een totaal andere stook- en luchttingsregime ontstaan waardoor de omstandigheden in de kas voor de schimmel *Zygophiala* erg gunstig zijn geworden. Dit is ook de verklaring dat in de afgelopen twee seizoenen zoveel aantasting en schade door *Zygophiala* kon ontstaan. Uit informatie van gewasbeschermingsadviseurs en een aantal bloementelers is echter gebleken dat sturing van de aantasting met uitsluitend kasklimaat niet de oplossing meer kan geven en dat gebruik van gewasbeschermingsmiddelen soms gewenst is. Daarom zijn ook een groot aantal fungiciden getest op hun remmende werking tegen *Zygophiala*. Het is gebleken dat een groot aantal fungiciden genoemde schimmel goed kan onderdrukken zodat de risico's op een aantasting van lelieplanten beperkt kan worden door toepassing van een aantal gerichte behandelingen met een daartoe toegelaten middel. Dit zijn o.a. Allure, Ortiva, Mirage Plus, Kenbyo fl., Collis en Flint. Om in een vroeg stadium duidelijkheid te kunnen verkrijgen over de identiteit en aanwezigheid van de schimmel in lelies en andere planten is een PCR-toets ontwikkeld waarmee *Zygophiala* snel en betrouwbaar is aan te tonen. Voor een analyse van de specificiteit en betrouwbaarheid moet in principe nog een uitgebreide validatie worden uitgevoerd; dit viel echter buiten de scope van dit beperkte onderzoek. Mogelijk is deze toets ook bruikbaar binnen de fruitteelt, omdat deze schimmel ook op appel voorkomt.



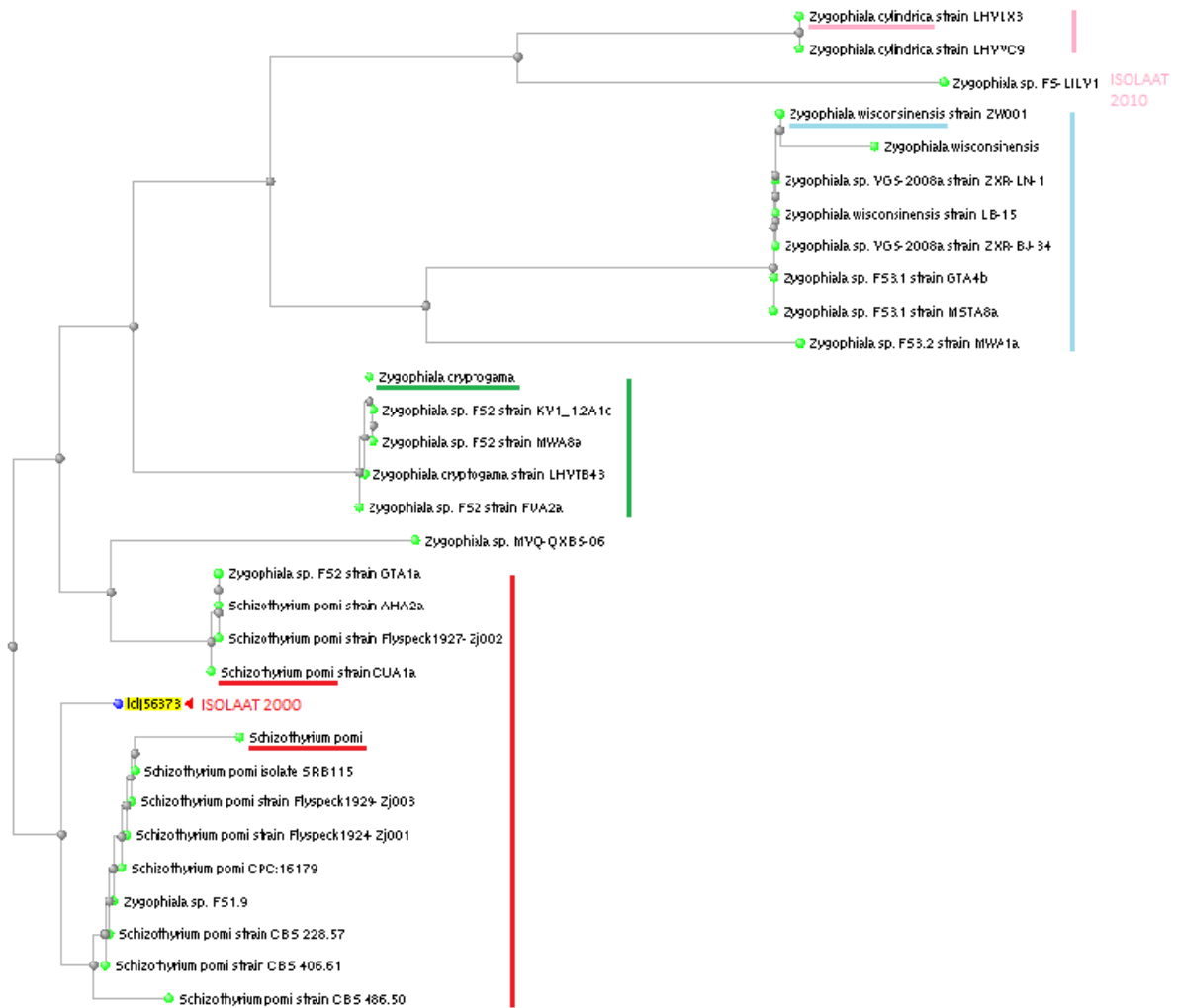
## 5 Conclusies

- Op basis van dit onderzoek is duidelijk geworden dat de schimmel *Zygothiala* lelieplanten kan aantasten en het zogenaamde “fleyspeck” kan veroorzaken.
- Met een uit lelie geïsoleerde *Zygothiala*-isolaat is een primerset ontworpen waarmee in een PCR-toets genoemde schimmel snel en betrouwbaar kan worden aangetoond.
- Middels een in vitro-proef is duidelijk geworden dat een scala aan fungiciden de schimmel *Zygothiala* effectief kan onderdrukken.



## 6 Bijlage

Figuur 2: Fylogenetische analyse van *Zygophiala*-isolaten uit lelie met andere *Zygophiala*-soorten.







## 7 Referenties

1. Baker et al: Greasy Blotch of Carnation and Flyspeck of Apple: Diseases Caused by *Zygophiala jamaicensis*. *Phytopathology* 67: 580-588, 1977.
2. University of Illinois at Urbana, Department of Crop Sciences, Report on Plant Disease, RPD No. 815, 2005.
3. Batzer JC, Mercedes Diaz Arias M, Harrington TC, Gleason ML, Groenewald JZ, Crous PW. Four species of *Zygophiala* (Schizothyriaceae, Capnodiales) are associated with the sooty blotch and flyspeck complex on apple. *Mycologia* 100: 232 – 244, 2008.
4. Li,H., Zhang,R., Sun,G., Batzer,J.C. and Gleason,M.L. New species and record of *Zygophiala* on apple fruits from China. *Mycol. Prog.* 9 (2): 245-251, 2010.
5. Plantenziektenkundige Dienst: Gewasbeschermingsgids 1999: 456