

Bestrijding Black Mold in geoculeerde rozenteelt

2008-2009

Auteur(s): Roselinde Duyvesteijn, Arjan Smits, Rik de Werd, Suzanne Breeuwsma, Jan van der Bent, Bertus Meijer Edwin Kohrman, Dirand van Wijk en Marjan de Boer

Praktijkonderzoek Plant en Omgeving, Sector
Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
PPO-projectnummer 32 340 703 00
Lisse, maart 2010

© 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 en Fruit.

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



PT-nummer: 13086.02

PPO-Projectnummer: 32 340703 00

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 – 46 21 21

Fax : 0252 – 46 21 00

E-mail : info.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

| | |
|---|----|
| SAMENVATTING..... | 5 |
| INLEIDING | 7 |
| 1 BESTRIJDING BLACK MOLD..... | 9 |
| 1.1 Materiaal en Methode..... | 10 |
| 1.1.1 Praktijktoetsen..... | 10 |
| 1.1.2 Kunstmatige besmetting | 10 |
| 1.1.3 Biotoets met rozenhout..... | 11 |
| 1.1.4 Invloed van middelen op myceliumgroei en kiemkracht van Black Mold..... | 11 |
| 1.2 Resultaten bestrijding Black Mold..... | 14 |
| 1.2.1 Praktijkproeven 2008..... | 14 |
| 1.2.2 Containerveldproef 2008 met kunstmatige besmetting | 15 |
| 1.2.3 Screening middelen <i>in vitro</i> | 16 |
| 1.2.4 Invloed van middelen op myceliumgroei en sporenkieming | 18 |
| 1.2.5 Screening middelen: onder kasomstandigheden..... | 19 |
| 1.2.6 Screening middelen: onder veldomstandigheden | 20 |
| 1.2.7 Bestrijdingsmiddelen tegen Black Mold..... | 20 |
| 1.3 Discussie en conclusie | 22 |
| 1.3.1 Praktijkproeven 2008..... | 22 |
| 1.3.2 Selectie van potentieel effectieve middelen 2009..... | 22 |
| 2 <i>MULTIFLORA</i> EN <i>SCHMID'S IDEAL</i> VATBAAR VOOR BLACK MOLD | 25 |
| 2.1 Methode, Resultaten en conclusie | 25 |
| 3 EPIDEMIOLOGIE..... | 27 |
| 3.1 Inleiding | 27 |
| 3.2 Optimale weersomstandigheden voor infectie | 27 |
| 3.2.1 Invloed van water tijdens oculatie | 30 |
| 3.3 Optimale groeiomstandigheden <i>in vitro</i> | 31 |
| 3.3.1 Materiaal en methode..... | 31 |
| 3.3.2 Resultaten..... | 33 |
| 3.3.3 Conclusie | 37 |
| 3.4 Waar zit Black Mold? | 38 |
| 3.4.1 Grond..... | 38 |
| 3.4.1.1 Materiaal en methode..... | 38 |
| 3.4.1.2 Resultaten en conclusies | 39 |
| 3.4.2 Plantmateriaal | 41 |
| 3.4.2.1 Materiaal en methode..... | 41 |
| 3.4.2.2 Resultaat en conclusie..... | 41 |
| 3.4.3 Mes..... | 42 |
| 3.4.3.1 Materiaal en methode..... | 42 |
| 3.4.3.2 Resultaten en discussie..... | 43 |
| 4 ENQUÊTE MAATREGELEN 2007 | 45 |
| 5 ALGEMENE CONCLUSIES..... | 47 |
| 6 TEELTADVIEZEN..... | 49 |
| 7 VERVOLGONDERZOEK | 51 |

| | | |
|---|---|----|
| 8 | COMMUNICATIE..... | 53 |
| | BIJLAGE 1 RESULTATEN TWEEDE ROZENHOUTASSAY | 55 |
| | BIJLAGE 2 EFFECT MIDDELEN IN VOEDINGSBODEM OP BLACK MOLD..... | 56 |
| | BIJLAGE 3 OVERZICHT WEERGEGEVENS | 57 |
| | BIJLAGE 4 DNA SEQUENTIES BLACK MOLD..... | 58 |

Samenvatting

Black Mold (*Chalaropsis thielavioides*) is een schimmel die in 2007 veel schade heeft veroorzaakt in de struikrozen. De schimmel infecteert de oculatiewond met als gevolg dat het oculatieoog niet aanslaat. Op sommige percelen ging tot wel 70% van de enten verloren. In een tweejarig PT project is onderzocht wat een goede beheersingsstrategie voor Black Mold is. Er is gekeken naar de volgende punten:

Bestrijding van Black Mold met chemische middelen.

In het kader van het ontwikkelen van een bestrijdingsstrategie van Black Mold zijn verschillende middelen getest. Het druppelen van middel T in de T-sede bleek goed te werken tegen Black Mold. Het was echter niet mogelijk Black Mold te bestrijden via de traditionele manier zoals het bespuiten van de stam of de plant in zijn geheel. Ook het bespuiten van de T-sede werkte niet. Het bleek dat Black Mold alleen bestreden kon worden wanneer het bestrijdingsmiddel in de T-sede werd gedruppeld.

Resistente onderstammen.

In de literatuur waren aanwijzingen gevonden dat er rozenonderstam varianten zouden bestaan die resistent zijn tegen Black Mold. Smid's Ideal en Multiflora zijn beide in een kas- en veldproef getest en bleken vatbaar voor Black Mold te zijn.

Epidemiologie van Black Mold.

Verschiede facetten van de epidemiologie van Black Mold zijn onderzocht. Het was niet mogelijk een relatie tussen de weersomstandigheden in 2007 en de grootschalige uitbraak van Black Mold vast te stellen. Onder laboratorium condities is uitgezocht dat Black Mold verschillende optimum temperaturen heeft. Zo is de optimum temperatuur voor myceliumgroei 24°C, voor kieming 15°C en voor sporulatie 30°C. Het is echter nog niet duidelijk wat de optimale infectie temperatuur van Black Mold is. Verder is er gekeken of Black Mold in de grond een infectiebron kan zijn. Stukjes peen zijn gebruikt in een lokaastoets omdat Black Mold ook peen infecteert. Met behulp van deze toets kon echter niet worden vastgesteld dat percelen met grootschalige Black Mold uitbraken ook meer stukjes peen aantastten. . Klaarblijkelijk is de hoeveelheid van Black Mold in de grond niet van belang. Verder is gekeken of besmette grond Black Mold infecties kon veroorzaken door de grond op te laten spatten of aan te aarden. Dit bleek niet het geval. Plant materiaal en het oculatiemes zijn waarschijnlijk geen grote infectiebronnen van Black Mold. Het is echter wel gebleken dat Black Mold via het mes verspreid kan worden. Daarom is het effect van mesontsmetting ook onderzocht. Het is aan te raden het mes regelmatig te ontsmetten met spiritus of alcohol.

Teeltadviezen

Er zijn naar aanleiding van de bevindingen teeltadviezen opgesteld waarmee telers het risico op Black Mold aantasting kunnen verkleinen.

Inleiding

De schimmel Black Mold veroorzaakte in het jaar 2007 grote problemen bij het oculeren van struik- en stamrozen. In sommige gevallen liep dit op tot wel 70%. De veroorzaker van de mislukte oculaties is de schimmel Black Mold. Zijn Latijnse naam is *Chalaropsis thielavioides*. De naam Black Mold heeft de schimmel te danken aan het feit dat de sporen zwart zijn. Het mislukken van de oculaties is te wijten aan de schimmel die op het wondvlak groeit waardoor waarschijnlijk het oculatieoog niet de kans krijgt om te hechten. De schimmel is wijdverspreid en komt voor in onder andere Europa, USA en Australië. Typerend voor de schimmelinfectie is dat deze niet elk jaar in grote getale voor uitval zorgt. Hierdoor is het dus moeilijk te voorspellen wanneer er opnieuw een uitbraak van Black Mold plaats zal vinden. In het kader van het ontwikkelen van een beheersingsstrategie zijn verschillende aspecten van de schimmel infectie en het voorkomen daarvan belicht.

Bestrijding van Black Mold

Momenteel is er nog geen effectieve bestrijdingsmethode voor het beheersen van Black Mold beschikbaar. Het ontwikkelen van een effectieve beheersingsmethode is een onderdeel van dit project. Vanuit de sector zelf was een grote vraag naar direct toetsen van potentiële bestrijdingsmethoden in veldproeven. Echter in 2008 bleef een grootschalige uitbraak van Black Mold uit. Hierdoor werd maar incidenteel een Black Mold infectie gerapporteerd en bleven de resultaten uit.

Een biotoets werd ontwikkeld om zo een eerste screening van werkende gewasbeschermingsmiddelen te kunnen uitvoeren. Daarnaast werden rozenonderstammen kunstmatig besmet met Black Mold sporen. Op deze manier konden de middelen ook onder kasomstandigheden getest worden. Uiteindelijk zijn een klein aantal middelen ook getest onder veldomstandigheden. Hierbij werden ook de onderstammen kunstmatig besmet zodat het effect van de middelen op de ontwikkeling van Black Mold gemeten kon worden.

Resistente onderstammen

Laxa is een veel gebruikte onderstam die gevoelig blijkt te zijn voor Black Mold. In de literatuur staat echter beschreven dat er rozensoorten zijn die resistent zijn tegen de schimmel infectie. Twee minder gebruikte onderstamsorten *Schmid's Ideal* en *Multiflora* zijn daarom getest op resistentie tegen Black Mold.

Epidemiologie van Black Mold

In het onderdeel epidemiologie van dit project is gekeken naar tal van facetten die betrekking hebben op de epidemiologie van Black Mold . Allereerst is er de vraag of bepaalde specifieke weeromstandigheden nodig zijn voor een grootschalige uitbraak van Black Mold. In het verlengde hiervan zijn de optimale groei en kiemingsomstandigheden van de schimmel onderzocht. Het effect van vocht tijdens het oculeren is tevens onderzocht. Daarnaast is er gekeken naar wat de infectiebron van Black Mold zou kunnen zijn. De grond en de plant zijn beide onderzocht op aanwezigheid van de schimmel. Of de schimmel ook aanwezig is op de oculeermessen is tevens onderzocht nadat was gebleken dat verspreiding via het mes mogelijk was. Aanvullend hierop zijn de effecten van mesontsmetting onderzocht.

Beheersing van Black Mold

Tot slot staan er in dit rapport adviezen ter bestrijding van Black Mold. Hoe de adviezen van 2007 door de praktijk zijn overgenomen is in een beperkt uitgevoerde enquête onderzocht.

Samenwerking

Gedurende dit onderzoek heeft PPO samengewerkt met verschillende adviesbureaus. Alle veldproeven zijn uitgevoerd i.s.m. Cultus Agro Advies. De enquête waarin in beeld werd gebracht hoe de adviezen door de praktijk over zijn genomen is uitgevoerd in samenwerking met Cultus Agro Advies, DLV-Plant en Van Nederkassel.

1 Bestrijding Black Mold

Gewasbeschermingsmiddelen

Er is in het begin van dit project een inventarisatie uitgevoerd bij de gewasbeschermingsmiddelen producenten naar middelen met een mogelijke werking tegen Black Mold. Vervolgens zijn er met die middelen vier praktijkproeven ingezet waarbij de middelen in de T-snedes werden gespoten of waarbij de rozenonderstam werd bespoten. Daarnaast werd in deze praktijkproef onderzocht of een Fleischhauer elastiek dat geïmpregneerd is met middel de aantasting kan voorkomen. Deze praktijkproeven zijn uitgevoerd zonder kunstmatige besmetting. Het aantal mislukte oculaties veroorzaakt door Black Mold was zeer laag. Verder bleek dat een proef waarbij de stammen kunstmatig besmet werden door middel van een bespuiting met sporen van de Black Mold schimmel ook niet voldoende uitval door Black Mold op te leveren om conclusies te kunnen trekken. Klaarblijkelijk komen Black Mold infecties alleen voor onder zeer specifieke omstandigheden.

Voor het zoeken van middelen met een potentieel positief effect tegen Black Mold is een laboratorium biotoets ontwikkeld waarbij gebruik gemaakt werd van snijrozenhout. In totaal zijn twee biotoetsen uitgevoerd. Daarnaast is middels *in vitro proeven* gekeken naar het effect van de middelen als het in direct contact komt met de schimmel. De groei van het mycelium en het kiemingspercentage waren een maat voor de effectiviteit van het middel. Potentiële middelen uit deze screening zijn vervolgens getest in een proef waarbij de onderstammen in potten stonden. De onderstammen werden succesvol kunstmatig besmet door een sporenconcentratie in de T-snedes te druppelen. De middelen zijn of in de T-snedes of op de onderstam gespoten. Doordat de potten in de kas stonden werden de optimale omstandigheden voor het ontwikkelen van Black Mold infecties gecreëerd. De gewasbeschermingsmiddelen die in deze laatste proef Black Mold goed konden bestrijden zijn nogmaals onder praktijkomstandigheden in een veldproef getest. In deze veldproef zijn de onderstammen besmet door het oculatiemes voor het maken van de T-snedes in een sporensuspensie van Black Mold te dopen. Er bleek voldoende uitval veroorzaakt door Black Mold te zijn om goede conclusies te kunnen trekken.

Afbindmiddelen

Uit de proeven is gebleken dat het direct aanbrengen van de middelen door middel van pipetteren in de wond het beste werkt. Dit heeft echter als gevolg dat de kans op blootstelling aan het gewasbeschermingsmiddel hoog is wanneer de wond na het aanbrengen van het middel in de wond en de wond wordt afgebonden met Fleischhauer. Er is in dit kader gekeken naar een knijper die als alternatief zou kunnen dienen van de Fleischhauer zodat de kans op blootstelling verkleind wordt.

1.1 Materiaal en Methode

1.1.1 Praktijktoetsen

2008

De praktijkproeven in 2008 zijn uitgevoerd op 4 verschillende locaties. Op locatie 1, 2 en 3 is de T snede vóór het afbinden met het Fleischhauer elastiek bespoten met de diverse middelen. Op locatie 4 heeft men het onderste deel van de stam bespoten voordat de oculatie werd gemaakt. Daarnaast is de Fleischhauer geïmpregneerd door het elastiek minimaal 10 minuten onder te dompelen in een bestrijdingsmiddel oplossing. Het nog vochtige elastiek werd vervolgens met handschoenen aan gelijk om de T-snede gebonden. Dit is ingezet op locatie 1.

Voor elke praktijkproef zijn van elke behandeling 45 of 50 planten in drievoud behandeld. De oculaties zijn beoordeeld na 3 of 6 weken op uitval door Black Mold of op uitval door onbekende redenen. In tabel 1 staat weergegeven welke behandelingen op de verschillende locaties zijn uitgevoerd en welke middelen per behandeling zijn toegepast.

2009

De praktijktoetsen van 2009 zijn uitgevoerd op 2 verschillende locaties (locatie 5 en 6). De besmetting vond plaats door het oculeermes vlak voor aansnijden van de onderstam te dopen in een suspensie met Black Mold sporen (ca. $5 \cdot 10^5$ sp/ml). Voor elke behandeling zijn 300 *Laxa* onderstammen gebruikt (per locatie 150 stuks, in 3 blokken van 50 planten). Behalve voor de behandelingen waarbij *Mutliflora* en *Schmid's Ideal* zijn gebruikt. Hiervan zijn in totaal 60 planten gebruikt.

Na het maken van de T-snede zijn de gewasbeschermingsmiddelen aangebracht met behulp van een pipet. Daarnaast zijn er een aantal middelen op het blad gespoten voorafgaande aan het de oculatie. Er zijn ook onderstammen bespoten met gewasbeschermingsmiddelen na het aanbrengen van de Fleischhauer, waarbij een gat ter grootte van 1 cm in de Fleischhauer was gemaakt.

De proef werd 11 dagen nadat de T-snedes werden gemaakt beoordeeld. De mate van aantasting is weergegeven door een symptoom index: 0 is geen aantasting, 1 is lichte aantasting, 2 is matige aantasting en 3 is zware aantasting. In tabel 1 staat weergegeven welke behandelingen op de verschillende locaties zijn uitgevoerd en welke middelen per behandeling zijn toegepast.

1.1.2 Kunstmatige besmetting in potten

Containerveld proef (2008)

Op het containerveld van locatie 4 zijn *Laxa* onderstammen opgeplant in een pot. Vervolgens is het gewas bespoten met diverse systemisch werkende middelen (3 verschillende tijdstippen gespoten telkens met een interval van 4 dagen). De planten werden één uur voor de oculatie besmet door rond om de plek waar de oculatie komt een sporensuspensie te spuiten ($1 \cdot 10^5$ sp/ml). De planten zijn, na het aanbrengen van het Fleischhauer elastiek gedurende 13 dagen op een containerveld weggezet. De gebruikte concentraties van de middelen staan weergegeven in tabel 1.

Kasproef (2009)

Een tweede pottenproef is uitgevoerd in de kassen. Hierin is een groot scala aan middelen getest (zie tabel 1). Voor elke behandeling zijn 25 *Laxa* onderstammen besmet. De besmetting vond plaats door het oculeermes vlak voor aansnijden van de onderstam te dopen in een suspensie met Black Mold sporen ($5 \cdot 10^5$ sp/ml). Vervolgens zijn de T-snedes behandeld door met een pipet 50 μ l middel in de wond te pipetteren. Daarnaast zijn 25 planten per behandeling in z'n geheel bespoten met middelen. Bij één behandeling is met een wattenstaafje een pasta van een middel aangebracht aan de binnenkant van de bast van de T-snede. De potten zijn weggezet in de kas bij 18°C. Negen dagen na inzet is de aantasting in de T-snedes veroorzaakt door Black Mold beoordeeld door een symptoom index toe te kennen (zie 1.1.1 Praktijkproeven 2009).

1.1.3 Biotoets met rozenhout

Er zijn twee biotoetsen op snijrozen uitgevoerd om het effect van gewasbeschermingsmiddelen te testen. In de eerste biotoets werd de stengel in gelijke stukjes van 12 cm lang geknipt. Dit zogenaamde "rozenhout" werd vervolgens met een mes verwond. Daarna zijn de stukjes rozenhout 30 seconden gedompeld in een fungicide of ontsmettingsmiddel om vervolgens het wondvlak kunstmatig te besmetten met een watie dat gedoopt is in een Black Mold sporensuspensie van $5.4 \cdot 10^5$ sp/ml. Dezelfde middelen zijn gebruikt voor een behandeling waarbij eerst de wond besmet werd met de Black Mold schimmel en vervolgens het rozenhout gedompeld werd in de te testen middelen. Per behandeling zijn 10 herhalingen ingezet. Het rozenhout is in een reageerbuis met 2.5 ml steriel water geplaatst en geïncubeerd in een stoof bij 24°C voor maximaal 11 dagen.

De ziekteontwikkeling in de biotoets is op verschillende tijdstippen na besmetting gescoord (dag 4, 7 en 11). Hierbij werd een symptoom index gehanteerd om een indicatie te geven van de ontwikkeling van Black Mold in de wond. Op deze manier was het mogelijk om een gradatie van infectie weer te geven. De symptoom index werd als volgt opgebouwd (van links naar rechts op foto 1): 0 = geen aantasting; 1= wondvlak alleen lichtjes aan de rand aangetast; 2= wondvlak gedeeltelijk aangetast; 3= wondvlak geheel aangetast.



Foto 1. Verschillende stadia van ontwikkeling Black Mold op rozenhout

Van links naar rechts symptoom index: 0 t/m 3

De proefopzet van de tweede biotoets is gelijk aan de eerste biotoets op de volgende punten na: het rozenhout is eerst besmet door met een wattenstaafje dat gedompeld is in een Black Mold sporenconcentratie ($6.7 \cdot 10^5$ sp/ml) over de wond te strijken. Vervolgens is het rozenhout behandeld met gewasbeschermingsmiddel. Er zijn voor elke behandeling 10 rozenhout stukjes gebruikt. De stukjes rozenhout werden beoordeeld op dag 4, 7 en 11. De gebruikte concentraties van de middelen staan weergegeven in tabel 1.

1.1.4 Invloed van middelen op myceliumgroei en kiemkracht van Black Mold

De middelen werden gemengd door een toplaag Low Meltingpoint Agarose (0.7%). Deze toplaag werd bovenop een Aardappel Glucose Agar (AGA) voedingsbodem aangebracht (duplo). De voedingsbodems werden bewaard bij 24°C. Myceliumgroei werd bepaald door in het midden van een voedingsbodem 10 µl onverdunde sporen suspensie ($1 \cdot 10^6$ sporen/ml) aan te brengen. Vervolgens werd op dag 3, 7, 11, 14 en 22 de diameter van de kolonie gemeten. Kiemkracht werd bepaald door 50 en 100 sporen per voedingsbodem uit te platen met glasparsels (duplo). Het aantal kolonies werd geteld na 7 dagen .

Tabel 1. Gewasbeschermingsmiddelen met gebruikte dosis per proef.

Gebruikte middelen per proef (PP=praktijkproef)

| Naam middelen | PP T-sneede Locatie 1 (%) | PP T-sneede Locatie 2 (%) | PP T-sneede Locatie 3 | PP Bespuiting stam Locatie 4 | Kunstmatic besmet in pot Locatie 4 | Rozenhout biotoets middelen (%) | Rozenhout biotoets middelen (%) | Kunstmatic besmet in pot in kas (%) | Effect van direct contact (voedingsbodem) (%) | PP Kunstmatic besmet Druppel in T-Sneede (%) | PP Spuiten voor Fleischhauer (%) | PP spuiten na fleischhauer (%) |
|---------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|--|----------------------------------|--------------------------------|
| A | | | 6L/ha | 6L/ha | | 0.08 | | | 0.2 | | | |
| B | 0.08 | 0.08 | 1kg/ha | 1kg/ha | 1kg/ha | 0.08 | | | 0.2 | | | |
| C | | | | | 1,5 kg/ha | 0.1 | | | | | | |
| D | 1 | 1 | X ¹ | 1,5 L/ha | 1,5 L/ha | 0.55 | 0.55 | 0.55 ² | 0.55 | 0.55 | | |
| E | | | | | 1 L/ha | | | 0.1 | | | | |
| F | | | | | | 100 | | | 100 | | | |
| G | 4 | 4 | | | | 4 | | | 4 | | | |
| H | | | | | | | 1 + 0.2 | | 1 + 0.2 | | | |
| K | | | | | | | 0.2 | | 0.2 | | | |
| L | | | | | | | 1 | 0.25 | 1.0 | | | |
| M | | | | | | | 0.25 | | 0.25 | | | |
| N | | | | | | | 0.3 | 0.4 | 0.3 | 0.4 | | |
| O | | | | | | | 1.5 | 1.5 | 1.5 | | | |
| P | | | | | | | 0.5 | | 0.5 | 0.4 | | |
| Q | | | | | | | 1.0 | | 1.0 | | | |
| R | | | | | | | 1.25 | 0.35 | 1.25 | 0.35 | | |
| S | | | | | | | 0.2 | | 0.2 | | | |
| T | | | | | | | | 0.1 ³ | | 0.1 | | 0.1 |
| V | | | | | | | | 0.06 | | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| W | | | | | | | | 0.15 ⁴ | | | | |

¹ Twee verschillende behandelingen Middel D: driemaal spuiten met 1.5 L/ha of eenmalig met 4 L/ha.

² Vloeibaar (0.55%) en in pasta (3%) vorm meegenomen en tevens op stam bespoten (0.55%)

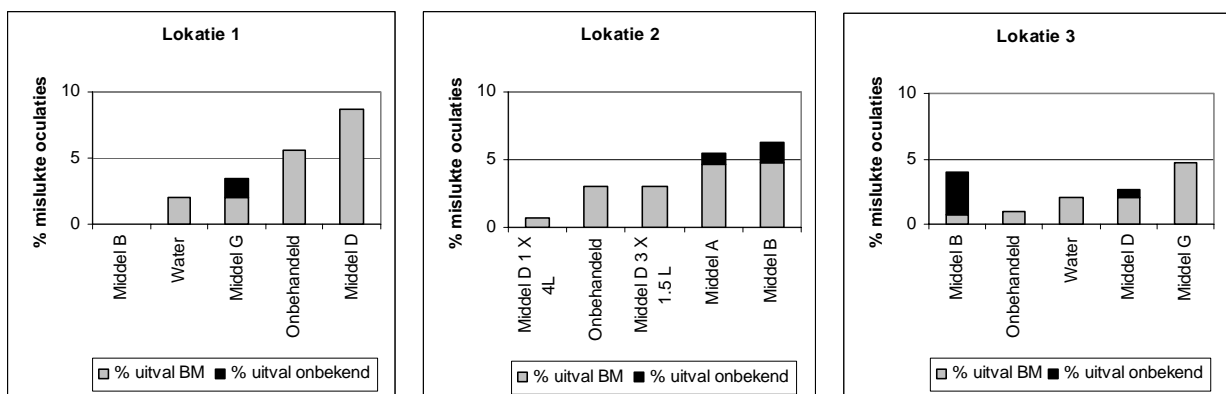
³ en ⁴ Tevens meegenomen als stambespuiting met respectievelijk de volgende concentraties 0.1% en 0.15%

1.2 Resultaten bestrijding Black Mold

1.2.1 Praktijkproeven 2008

Besputting T-snedes

Op drie lokaties zijn in praktijkproeven T-snedes bespoten met de gewasbeschermingsmiddelen (Figuur 1). Het gemiddelde percentage uitval veroorzaakt door een natuurlijke Black Mold infectie was zeer laag. Het bleek dat in het jaar 2008 Black Mold niet grootschalig had toegeslagen. Dit heeft als gevolg dat de resultaten niet betrouwbaar genoeg zijn om het effect van de behandelingen op Black Mold vast te stellen.

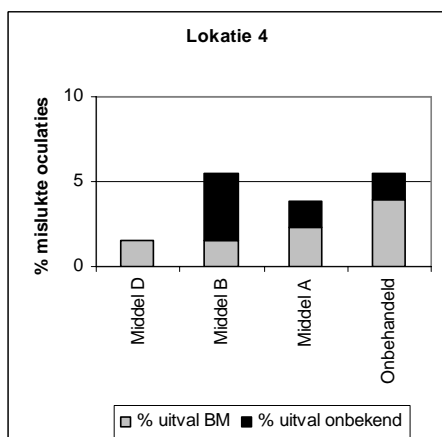


Figuur 1. Besputten van de T-snede in de praktijk

Resultaat van 3 onafhankelijke praktijkproeven waarin de T-snede bespoten is met een fungicide of ontmettingsmiddel op lokaties 1, 2 en 3. Weergegeven staat het percentage mislukte oclaties veroorzaakt door Black Mold (grijs) en door onbekende oorzaak (zwart).

Besputting onderstam

Naast het besputten van de T-snede is er ook gekeken naar de werking van middelen die lokaal op de onderstammen werden gespoten (lokatie 4). Echter ook hier zijn door het uitblijven van Black Mold infectie geen bruikbare resultaten verkregen (Figuur 2).

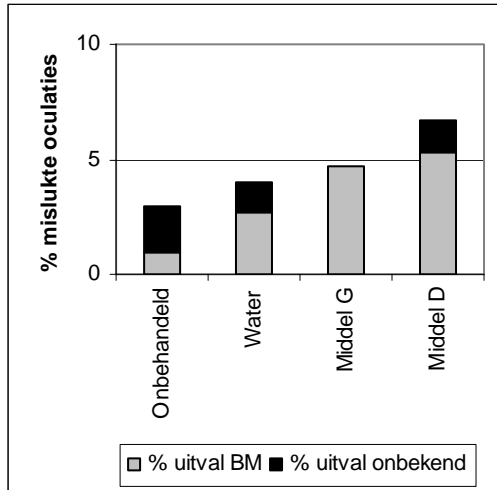


Figuur 2. Besputting van de stam voor het maken van de T-snede

Weergegeven staat het percentage mislukte oclaties veroorzaakt door Black Mold (grijs) en door onbekende oorzaak (zwart). De veldproef is uitgevoerd op lokatie 4.

Geïmpregneerde Fleischhauer

Een met bestrijdingsmiddel geïmpregneerde Fleischhauer zou een oplossing kunnen bieden voor het beheersen van het wondpathogeen Black Mold. Daarom zijn in een veldproef de Fleischhauers gedompeld in de middelen G en D (Figuur 3). Onvoldoende Black Mold aantasting in de onbehandelde controle zorgde er voor dat er geen conclusies aan de resultaten verbonden konden worden.



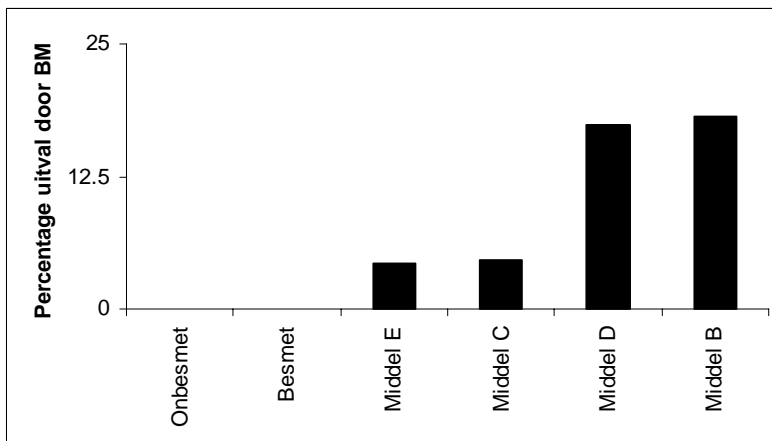
Figuur 3. Geïmpregneerde Fleischhauer

Weergegeven staat het percentage mislukte oculaties veroorzaakt door Black Mold (grijs) en door onbekende oorzaak (zwart). De proef is uitgevoerd op lokatie 1.

1.2.2 Containerveldproef 2008 met kunstmatige besmetting

De middelen die in samenspraak met de fabrikanten geselecteerd waren zijn ook getest onder containerveld omstandigheden. Hiervoor werden de onderstammen in potten gezet en rondom de stam bespoten met een sporensuspensie van Black Mold. Echter, er was geen uitval in de besmette controle (Figuur 4).

Waarschijnlijk heeft Black Mold zeer specifieke omstandigheden nodig om te kunnen infecteren. Deze waren duidelijk niet aanwezig in deze proef en het was daarom niet mogelijk om conclusies aan deze resultaten te verbinden.



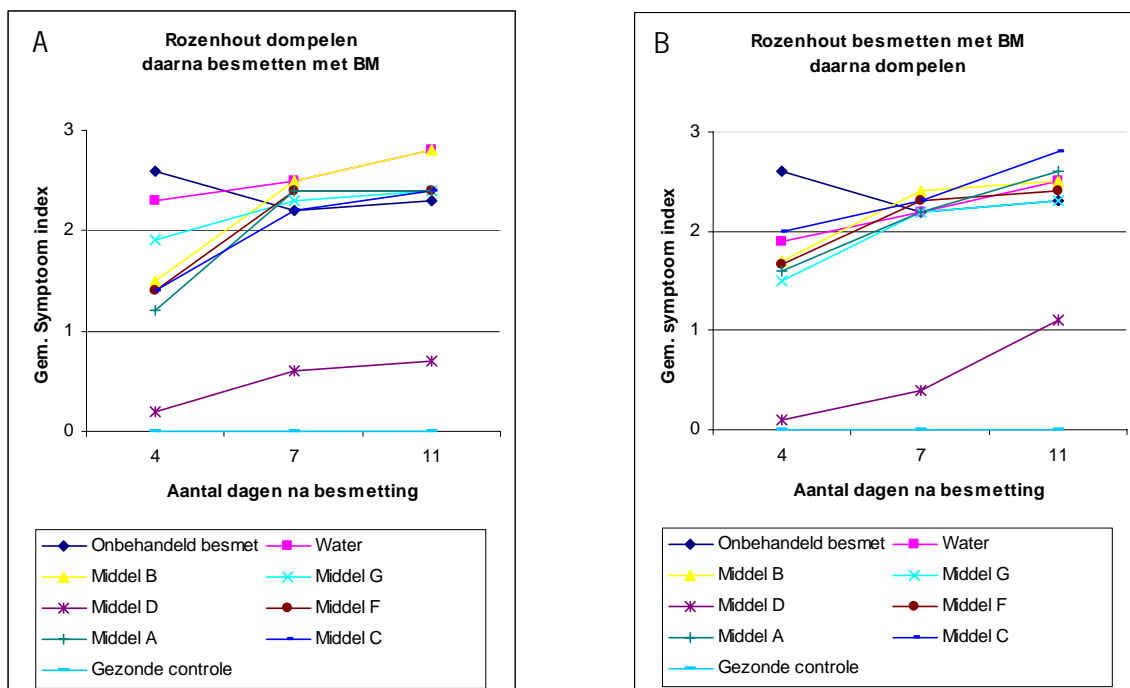
Figuur 4. Bestrijding van kunstmatig besmette onderstammen in pot

Weergegeven staat het percentage door Black Mold geïnfecteerde T-snedes die behandeld zijn met respectievelijk middel E, C, D en B.

1.2.3 Screening middelen *in vitro*

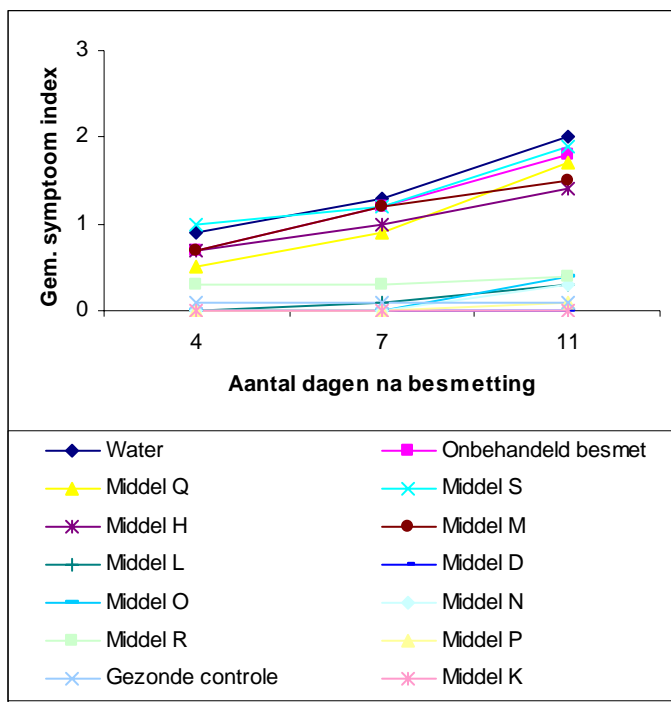
Uit voorgaande proeven is gebleken dat het onderzoek naar middelen ter bestrijding van Black Mold beter eerst op kleine schaal uitgevoerd kan worden. Daarom is er een biotoets ontwikkeld om het effect van de bestrijdings- en ontsmettingsmiddelen te onderzoeken. In deze biotoets wordt rozenhout van snijrozen eerst verwond en vervolgens gedompeld in een middel of water. Daarna wordt de wond besmet met een sporensuspensie van Black Mold (Figuur 5A). Rozenhout eerst besmetten na verwonding en daarna gedompeld is ook uitgevoerd (Figuur 5B). Gedurende 11 dagen werd de infectie gevolgd door de mate van infectie te scoren volgens de zogenaamde symptoom index (zie 1.1.3. materiaal en methode). Er is geen verschil gevonden of het rozenhout eerst behandeld werd met de middelen en daarna pas besmet of andersom dus eerst besmet en dan pas gedompeld werd in de middelen. Alle geteste middelen zijn niet in staat om de infectie van Black Mold in deze proefopzet, goed te bestrijden behalve Middel D (figuur 5A en B).

Voor een uitgebreidere screening van potentiële middelen is nogmaals een biotoets met rozenhout ingezet. In totaal werden tien potentiële bestrijdingsmiddelen getest. Het resultaat is te zien in Figuur 6. Hieruit blijkt dat middel K net zo effectief tegen Black Mold werkt als middel D. Daarnaast is er ook goede bestrijding van Black Mold waargenomen bij de middelen L, N, O, P en R.



Figuur 5. Effect van middelen op ontwikkeling BM in een rozenhout biotoets

Resultaten van de rozenhout biotoets 4, 7 en 11 dagen na infectie waarbij er na het aanbrengen van de wond al dan niet eerst gedompeld werd in een middel of water en daarna besmet met een sporensuspensie van Black Mold (A) of visa versa (B). Symptoom index: 0=gezond. 1=alleen aantasting langs de rand van de wond. 2= wond is nog niet geheel aangetast. 3= wond geheel aangetast door Black Mold.



Figuur 6. Effect van middelen op ontwikkeling BM in een rozenhout biotoets

Resultaten van de rozenhout biotoets 4, 7 en 11 dagen na infectie waarbij na het aanbrengen van de sporensuspensie van Black Mold de rozenhoutstukjes in de bestrijdingsmiddelen werden gedompeld. Symptoom index: 0=gezond. 1=alleen aantasting langs de rand van de wond. 2= wond is nog niet geheel aangetast. 3= wond geheel aangetast door Black Mold. Gegevens van de grafiek staan in tabel 6 Bijlage 1.

1.2.4 Invloed van middelen op myceliumgroei en sporenkieming

De werking van een middel op de groei en kieming kan worden getest door de schimmel en het bestrijdingsmiddel samen op een voedingsbodem aan te brengen. Met behulp van een agarose toplaag werden de middelen in contact gebracht met schimmelsporen die over de toplaag werden verspreid. Myceliumgroei werd bepaald aan de hand van de doorsnede van een kolonie die midden op de voedingsbodem met gewasbeschermingsmiddel groeit. Gedurende 22 dagen is op deze manier de groei van de schimmel gevolgd (Tabel 2 en Bijlage 2). Op de voedingsbodems met de middelen D, F, G, N, O, P, Q en R was Black Mold niet in staat schimmeldraden te vormen. De kiemkracht is bepaald door sporen uit te platen op een voedingsbodem met een topagarose laag van bestrijdingsmiddelen. Na zeven dagen werd het kiemingspercentage bepaald door het aantal kolonies op de voedingsbodem te tellen. Wanneer er geen bestrijdingsmiddel aan de voedingsbodem wordt toegevoegd kiemt 48% van de sporen. Verder zijn de middelen in drie groepen op te delen (zie Tabel 2 en Bijlage 2). Middelen waar Black Mold sporen volledig geremd worden in kieming. Dit zijn de middelen B, D, F, G, N, O, P, Q en R. Verder zijn er nog middelen met een lichte remming op sporenkieming. Dit zijn de middelen A, H, K, L, M. Middel S valt in de derde groep. Dit middel heeft grote kiemremming op de sporen van Black Mold maar niet volledig (4%).

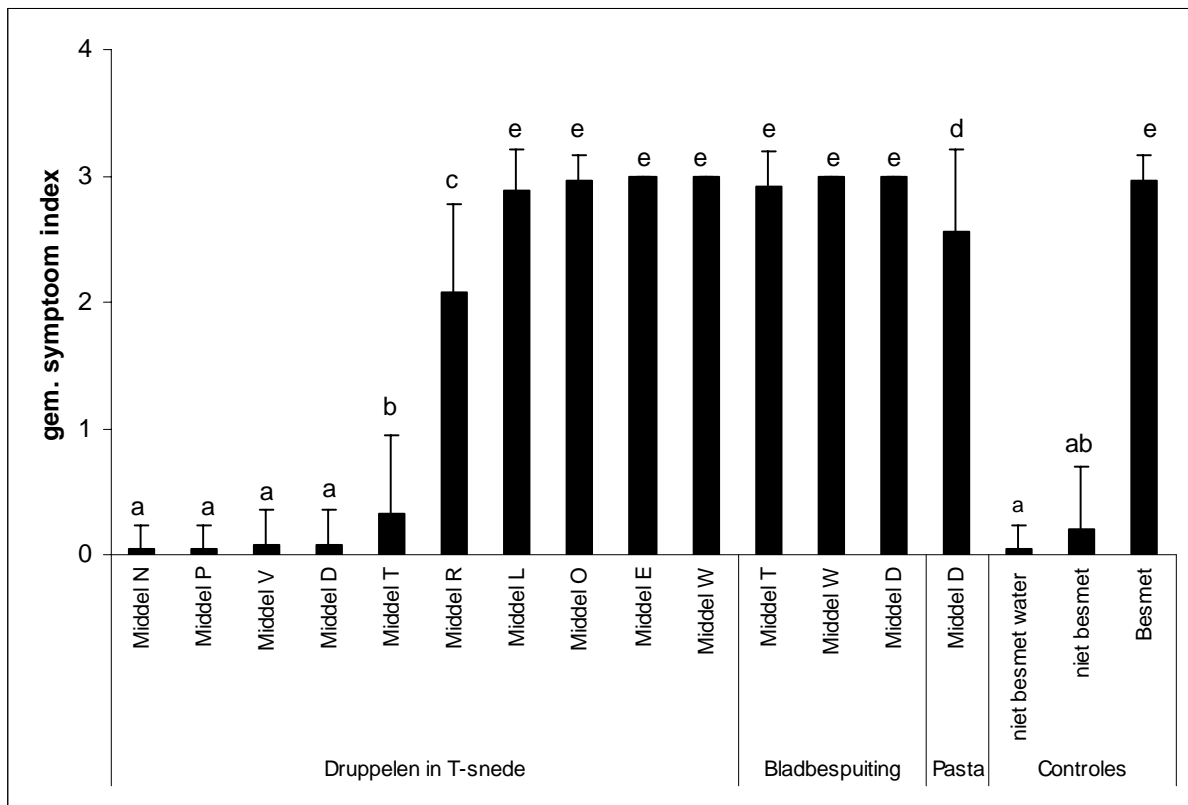
Tabel 2 Effect van direct contact met gewasbeschermingsmiddelen op de groei (na 22 dagen) en kieming van Black Mold.

Middelen waarbij Black Mold niet groeit en kiemt zijn aangegeven met een asterisk (*). Significante verschillen zijn aangegeven met letters (ANOVA, $P < 0,05\%$).

| Middel | Mycelium groei (Øcm) | ANOVA (P<0.05%) | Kieming (%) | ANOVA (P<0.05%) |
|-----------------|----------------------|-----------------|-------------|-----------------|
| Geen toevoeging | 54 | h | 48 | c |
| Middel A | 35,5 | e | 31 | b |
| Middel B | 12,5 | b | 0 | a |
| Middel D* | 0 | a | 0 | a |
| Middel F* | 0 | a | 0 | a |
| Middel G* | 0 | a | 0 | a |
| Middel H | 41 | f | 28 | b |
| Middel K | 48 | g | 32 | b |
| Middel L | 21 | d | 30 | b |
| Middel M | 19 | c | 32 | b |
| Middel N* | 0 | a | 0 | a |
| Middel O* | 0 | a | 0 | a |
| Middel P* | 0 | a | 0 | a |
| Middel Q* | 0 | a | 0 | a |
| Middel R* | 0 | a | 0 | a |
| Middel S | - | - | 4 | a |

1.2.5 Screening middelen: onder kasomstandigheden

Potentiële middelen uit de rozenhout assay en *in vitro* proef, aangevuld met enkele nog niet geteste middelen zijn in een kasproef getoetst. De onderstammen werden kunstmatig besmet door het oculatiemes voor het maken van de T-snedede in een sporensuspensie van Black Mold te dopen. Hierna zijn de middelen in de T-snedede gedruppeld. Enkele middelen met een systemische werking zijn tevens getest via een bladbespuiting. Middel D is tevens in pastavorm gebruikt en op de T-snedede aangebracht. Negen dagen na het inzetten, zijn de stammen beoordeeld met een symptoom index (zie materiaal en methode). De middel N, P, V, D en T die in de T-snedede zijn gedruppeld, zijn goed in staat Black Mold infecties te remmen. Daarnaast lijkt ook middel R een effect te bewerkstelligen. De behandelingen waarbij de gehele plant werd bespoten met middel T, W of D zijn allemaal aangetast door Black Mold. Middel D in pastavorm heeft ook geen remmend effect op de groei van Black Mold in de T-snedede. Hieruit blijkt wederom dat Black Mold met de huidige middelen alleen beheerst kan worden indien het middel in de T-snedede wordt gedruppeld waar het in direct contact kan komen met de schimmel.



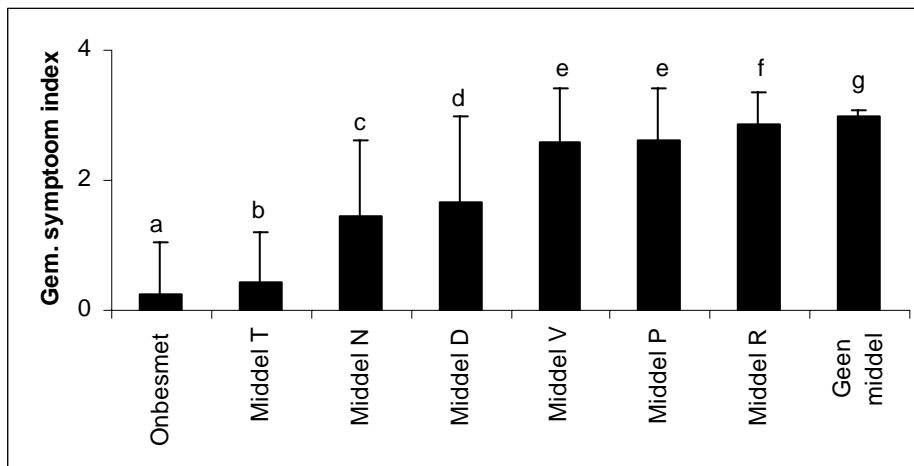
Figuur 7. Bestrijdingsmiddelen getest onder kascondities op kunstmatig besmette onderstam.

Weergegeven staat de gemiddelde symptoom index (zie 1.1.1 Materiaal en Methode 2009). De middelen zijn in de T-snedede gedruppeld of via een bladbespuiting toegepast. Van middel D is zowel de vloeibare als de pastavorm getest. De pasta is op de T-snedede gesmeerd. Behandelingen met verschillende letters verschillen significant van elkaar (ANOVA; $P < 0.05$).

1.2.6 Screening middelen: onder veldomstandigheden

De potentiële middelen N, P, V, D, T en R zijn vervolgens getest in een grootschalige veldproef (Figuur 8). Voor de veldproef zijn de onderstammen wederom kunstmatig besmet door het oculatiemes voor het maken van de T-snede in een sporensuspensie van Black Mold te dopen. Hierna zijn de middelen in de T-snede aangebracht. Na 11 dagen zijn de T-snedes beoordeeld volgens de eerder aangegeven symptoomindex (zie 1.1.1 Materiaal en Methode 2009)

Uit de resultaten van deze proef blijkt dat middel T redelijk effectief is in het bestrijden van Black Mold. Zo blijkt dat 70% van de T-snedes geen Black Mold symptomen hebben terwijl 100% van de T-snedes geïnfecteerd is met Black Mold als er geen middel werd toegevoegd. Middel N en D hebben ook een effect maar dat is niet zo groot als dat van middel T.



Figuur 8. Onder veldomstandigheden geteste gewasbeschermingsmiddelen gedruppeld in T-snede. Weergegeven staat de gemiddelde symptoom index. De onderstammen zijn kunstmatig besmet door het oculatiemes voor het maken van de T-snede in een sporensuspensie van Black Mold te dopen

1.2.7 Bestrijdingsmiddelen tegen Black Mold

Tijdens de bestrijdingsproeven in de kas en op het veld is gebleken dat Black Mold niet te bestrijden is door de middelen op de plant (systemisch) of stam te spuiten. De geselecteerde middelen uit de screening waren alleen werkzaam indien ze in kleine hoeveelheden (50µL) in de T-snede werden aangebracht. Deze zogenaamde druppel techniek heeft echter twee nadelen. Allereerst is hij arbeidsintensief en daardoor kostbaar. Het zou echter een goede optie zijn om alleen de techniek toe te passen als noodoplossing. In jaren waarin de schimmel grootschalige uitval veroorzaakt door aantastingen kan een tweede oculatie van de onderstam in combinatie met de druppel methode groter verlies voorkomen. Ten tweede is deze druppel techniek een nieuwe toepassing van een bestrijdingsmiddel waarvoor geen toelating is als bestrijdingsmethode bij het College voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen en biociden (CTGB). Als een dergelijke druppelmethode toegelaten zou worden is het noodzakelijk nieuwe afbindmiddelen te onderzoeken. Dit is nodig omdat met de huidige methode waarbij de Fleischhauer wordt gebruikt als afbindmiddel de gebruiker in direct contact komt met de T-snede en dus met het eventueel in de T-snede gedruppelde middel. Om blootstelling te voorkomen voor de personen die de oculatie uitvoeren moet een alternatief afbindmiddel worden ontwikkeld waarbij de gebruiker niet in direct contact komt met de T-snede.

Wasknijper als afbindmiddel

Uit bovenstaande resultaten blijkt dat het zeer effectief kan zijn om de gewasbeschermingsmiddelen in de wond te pipetteren. Echter door het naderhand plaatsen van de Fleischhauer over de oculatiewond, levert deze methode een verhoogde kans op blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelen voor de gebruiker op. Een nieuw afbindmiddel waarbij de onderstam niet meer hoeft te worden aangeraakt zou dan een uitkomst kunnen bieden. Het toepassen van wasknijpers zou een alternatief kunnen bieden. Het is echter de vraag of deze net zo effectief zullen werken, als de Fleischhauer. Het slagen van een oculatie verbonden met een knijper in plaats van een Fleischhauer is getest in een praktijktoets. In totaal werden 34 onderstammen geoculeerd en verbonden met de Fleischhauer en 34 onderstammen werden na oculatie verbonden met een knijper. Drieëntwintig dagen later werd beoordeeld of de oculatie was aangeslagen of niet (Tabel 4). Het aantal geslaagde oculaties afgebonden met een wasknijper ligt 9% lager dan de oculaties afgebonden op de traditionele manier. Waarschijnlijk kan met het optimaliseren van de knijper het uitvalpercentage verkleint worden tot een acceptabel niveau.

Tabel 4. Vergelijk tussen Fleischhauer en wasknijper als afbindmiddel.

| | Fleischhauer | Wasknijper |
|--------------------------------|--------------|------------|
| Totaal aantal onderstammen | 34 | 34 |
| Geslaagde oculaties | 33 | 30 |
| Percentage geslaagde oculaties | 97% | 88% |

1.3 Discussie en conclusie

1.3.1 Praktijkproeven 2008

Black Mold is een zeer agressieve schimmel die grote schade veroorzaakt in de geoculeerde rozenteelt. Het is tot nu toe onduidelijk wanneer Black Mold de kans krijgt om te infecteren. Echter, indien de omstandigheden juist zijn, worden grote delen van percelen aangetast met grote schadeposten als gevolg. Dat Black Mold niet ieder jaar toeslaat is duidelijk te zien in het jaar 2008. Meerdere veldproeven zijn in dat jaar ingezet om middelen met een potentiële werking tegen Black Mold infecties te testen. Er kon echter door het uitblijven van grootschalige infecties geen conclusies worden verbonden aan deze proeven en dus niets worden gezegd over de effectiviteit van de middelen.

1.3.2 Selectie van potentieel effectieve middelen 2009

De biotoets waarbij rozenhout besmet wordt met Black Mold is ontwikkeld om een snelle en goedkope screening van middelen te bewerkstelligen. Samen met deze biotoetsen zijn proeven uitgevoerd waarbij het middel direct in contact komt met de schimmel. Een combinatie van de resultaten van beide proeven leverde een zestal middelen op met een potentiële werking tegen Black Mold infecties. De kasproef is gedaan om de werking van de middelen tegen Black Mold infecties vast te stellen onder meer natuurlijkere omstandigheden. Echter om definitief de werking van een middel tegen Black Mold vast te stellen werden veldproeven gedaan. De meeste efficiënte manier om grootschalig middelen te testen is ze eerst in een biotoets te testen. De geselecteerde middelen worden vervolgens getest onder kasomstandigheden. De uiteindelijke definitieve werking van de middelen wordt vastgesteld in veldproeven. Deze laatste zijn zeer arbeidsintensief en daarom is een voorselectie doormiddel van biotoetsen en kasproeven noodzakelijk. Een overzicht van de resultaten van de geteste middelen staat per proef weergegeven in tabel 3.

Tabel 3. Overzicht van gewasbeschermingsmiddelen getest in biotoets, kasproef en veldproef.

Middel met een remmend effect heeft op de ontwikkeling van Black Mold infecties dan wel de groei en sporenkieming van de schimmel zijn aangegeven met een plus (+). Niet of gedeeltelijk remmende effecten zijn aangegeven met een min (-).

| | Biotoetsen | Groei –en kiemings effect | Kasproef | Veldproef |
|----------|------------|------------------------------|----------|-----------|
| Middel A | - | - | | |
| Middel B | - | - | | |
| Middel C | - | - | | |
| Middel D | + | + | + | + |
| Middel E | | | - | |
| Middel F | - | + | | |
| Middel G | - | + | | |
| Middel H | - | - | | |
| Middel K | - | - | | |
| Middel L | + | - | - | |
| Middel M | - | - | | |
| Middel N | + | + | + | + |
| Middel O | + | + | - | |
| Middel P | + | + | + | - |
| Middel Q | - | + | | |
| Middel R | + | + | - | - |
| Middel S | - | - | | |
| Middel T | | | + | + |
| Middel V | | | + | - |
| Middel W | | | - | |

Middelen P en R

Middel P en R waren beide geselecteerd op basis van de resultaten van de biotoets en de effecten die de middelen hadden op de groei en kieming. Echter in de kas- en veldproef bleek middel R op de ontwikkeling van Black Mold een gedeeltelijk remmend effect te geven. Middel P bewerkstelligde alleen in de kasproef een remmend effect op de ontwikkeling van Black Mold en niet in de veldproef. Hierdoor is dit middel niet geselecteerd voor de bestrijding van Black Mold

Middel N en D

Middel N en D blijken *in vitro* (biotoets en de toets op voedingsbodems) een goede remmer van Black Mold infecties te zijn. *In vivo* (kas- en veldomstandigheden) werd ook een groeiremmend resultaat geboekt. Echter in de veldproef werd een kleiner remmend effect geconstateerd in vergelijking met middel T. Geen van deze middelen wordt geselecteerd voor de beheersingstrategie van Black Mold. Middel N niet omdat het geen toelating heeft als bestrijdingsmiddel in de in de boomkwekerij. Een toelating is onwaarschijnlijk gezien er alternatieven voorhanden zijn. Middel D wordt niet geselecteerd omdat de toelating van het middel voor de boomkwekerij waarschijnlijk opgeheven zal worden.

Middel T

Uit de veldproeven is gebleken dat Middel T Black Mold goed kan bestrijden. Het middel is toegelaten voor veldbespuiting in de boomkwekerij en daarom geselecteerd als middel waarmee Black Mold uitval voorkomen kan worden.

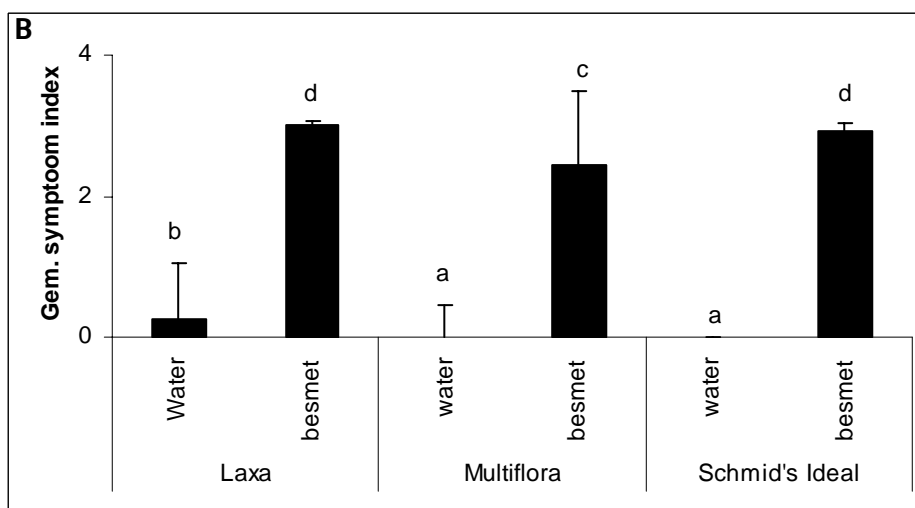
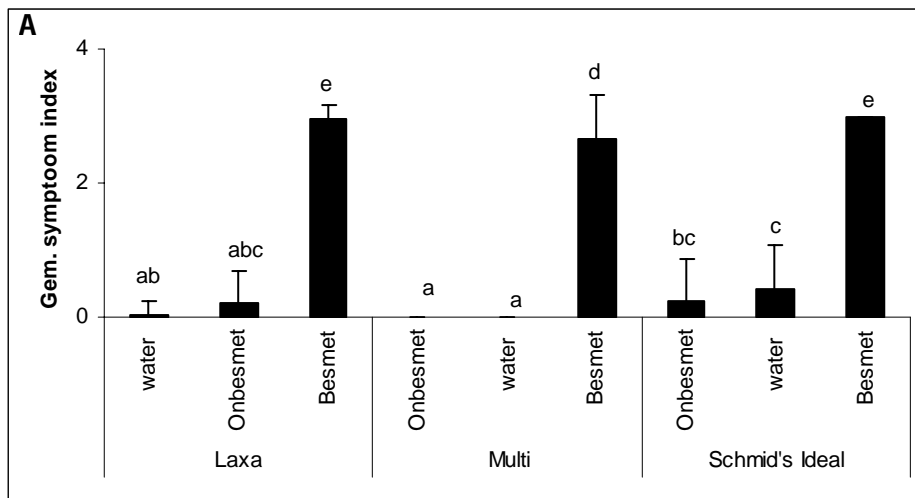
Van middel T is bekend dat het mogelijke fytoxische werking heeft (groeiremming) bij bladbespuitingen. Om dit te onderzoeken zijn vijftig oculaties met middel T (1%) behandeld en 50 oculaties zonder. Elf dagen later zijn de oculaties beoordeeld op vergroeiingen. Bij geen van de oculaties kon vastgesteld worden dat middel T een negatief effect heeft op de groei gaf indien het in de oculatie wond gepipetteerd wordt. De fytoxische werking van middel T lijkt dus niet relevant te zijn voor de oculaties van struikrozen. Het is echter wel noodzakelijk dit nogmaals vast te stellen in een grotere proef.

2 *Multiflora* en *Schmid's ideal* vatbaar voor Black Mold

Rosa corymbifera Laxa is de meest gebruikte onderstam voor struikrozen in Nederland. Deze *Laxa* onderstam bleek in de jaren van de uitbraak van Black Mold erg gevoelig te zijn. Westcott's plant disease handbook (Springer NY) geeft in zijn beschrijving van Black Mold ook aan dat *Ragged Robin* een resistente onderstam is. Navraag leerde dat dit geen onderstam betreft maar een struikrozensoort. Mogelijk zijn er wel andere rozenonderstammen met een resistentie tegen Black Mold. Een tweetal relatief veel gebruikte onderstamssoorten *Multiflora* (*Rosa multiflora*) en *Schmid's Ideal* (*Rosa canina Schmid's Ideal*) zijn daarom getest op hun resistentie tegen Black Mold.

2.1 Methode, Resultaten en conclusie

In combinatie met de standaard *Laxa* onderstam zijn de andere cultivars getest in proeven met kas- en veldomstandigheden. In beide proeven zijn de onderstammen besmet door het oculatiemes voor het maken van de T-snedes in een sporensuspensie van Black Mold te dopen. Na afloop van de proeven werden de T-snedes beoordeeld met behulp van een ziekte-index. Verdere details van de proeven staan beschreven bij de materiaal en methode van hoofdstuk 1 (kasproef 1.2.5 en veldproef 1.2.1. 2009). De resultaten uit de kas- en veldproef waren eenduidig (Figuur 9A en B). In geen van beide proeven was *Multiflora* of *Schmid's ideal* resistent tegen Black Mold.



Figuur 9. Verschillende rassen onderstammen getest op resistentie Black Mold.

Weergegeven staat de gemiddelde symptoom-index van de T-snedes van de proeven uitgevoerd onder kas- en veld omstandigheden (respectievelijk A en B).

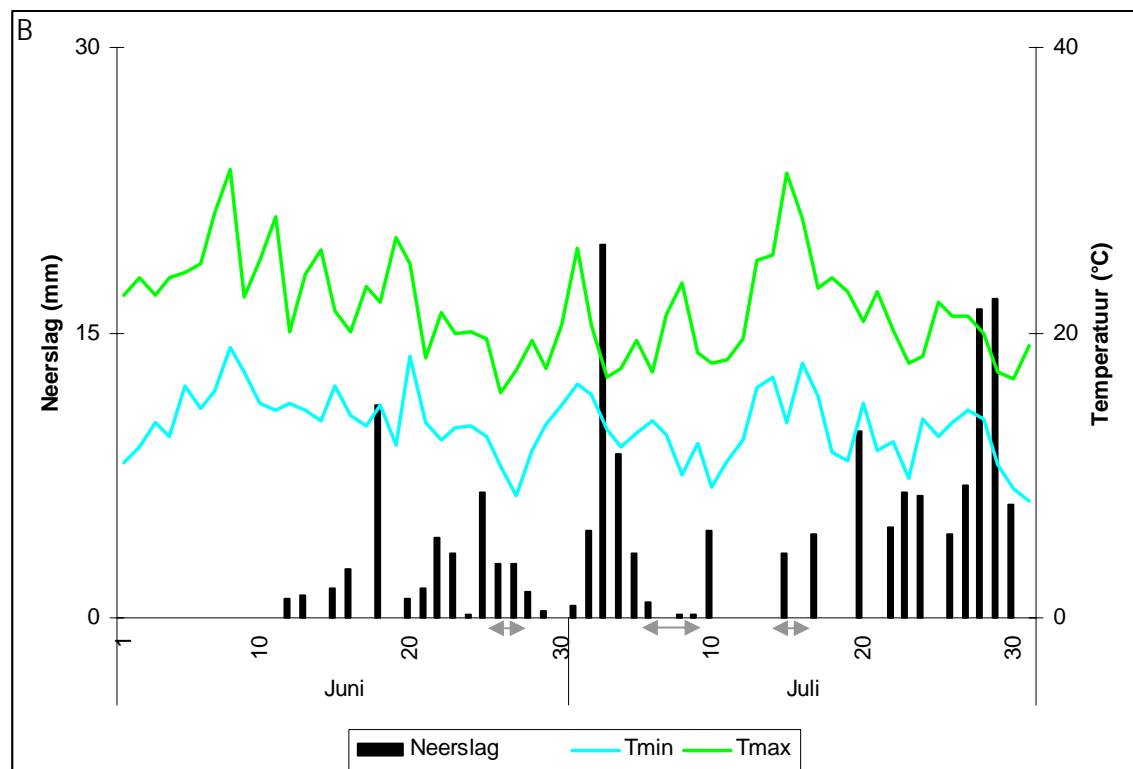
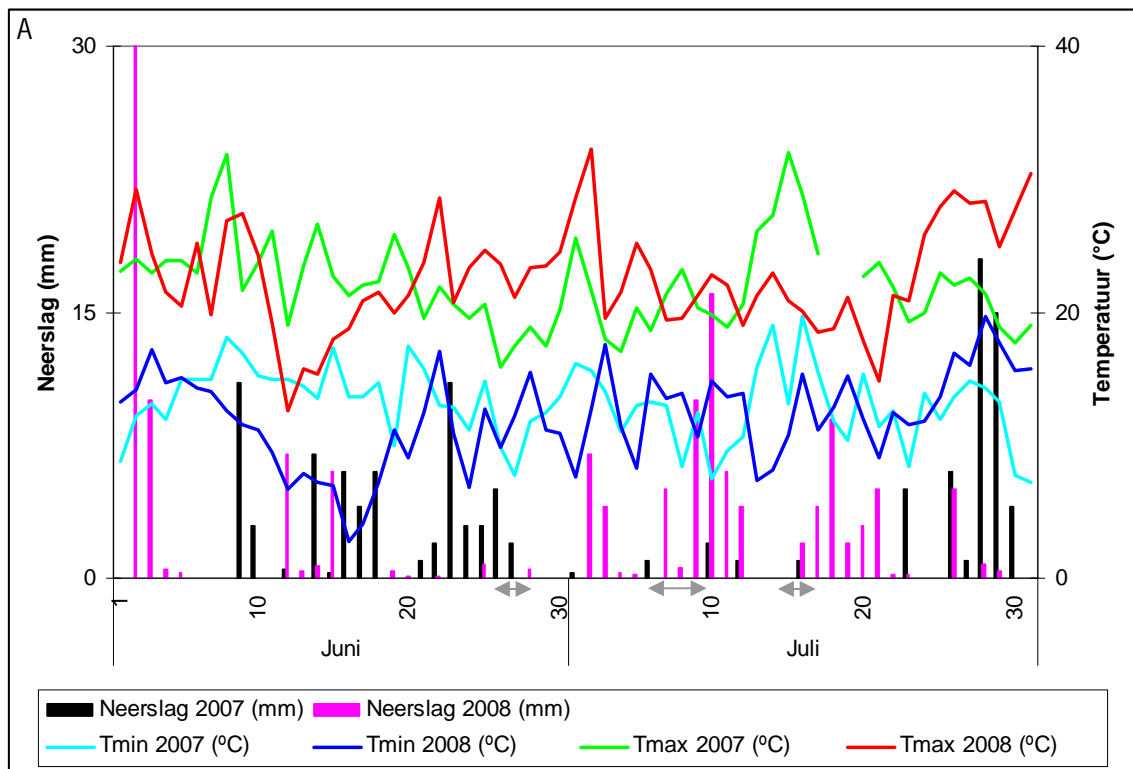
3 Epidemiologie

3.1 Inleiding

Weten wanneer en hoe Black Mold infecteert kan leiden tot preventieve maatregelen ter voorkoming van Black Mold infecties. Naar aanleiding van de enquête die gehouden is in het Black Mold jaar 2007 is gebleken dat de telers de indruk hebben dat natte en koude nachten Black Mold infecties stimuleert. Voor het bepalen van de precieze weeromstandigheden die nodig zijn voor het ontstaan van Black Mold infecties, is er gekeken naar de weeromstandigheden van juni en juli 2007 en 2008 (Hfd 3.2). Daarnaast is gekeken naar de optimale groeiomstandigheden *in vitro* op voedingsbodems onder gecontroleerde omstandigheden (Hfd. 3.3). Het bepalen van de optimale kiemingsomstandigheden voor de sporen van de Black Mold schimmel en de optimale groeiomstandigheden voor de schimmeldradenzou namelijk kunnen helpen meer inzicht te krijgen in de levenswijze van Black Mold. Tevens is er gedurende dit project gekeken naar mogelijke infectiebronnen van Black Mold (Hfd 3.4). Zit Black Mold in de grond (Hfd. 3.4.1) of op de planten (Hfd. 3.4.2)? Black Mold kan overgedragen worden door het oculeermes maar zit de schimmel wel op het oculeermes (Hfd 3.4.3)?

3.2 Optimale weersomstandigheden voor infectie

Uit de enquête die eind 2007 is gehouden bleek het niet mogelijk vast te stellen welke weersomstandigheden precies de oorzaak waren voor de grootschalige uitbraak in 2007. De indruk van de kwekers is dat het om een zeer natte en koude periode gaat. Om een beeld te krijgen van de weersomstandigheden in 2007 tijdens de oculatieperiode zijn gegevens zoals temperatuur en neerslag van de maanden juni en juli opgevraagd bij weeronline.nl van het weerstation Volkel. Ter vergelijking zijn ook de weersomstandigheden van 2008 meegenomen (Figuur 10). De gemiddelde van de minimum, maximum temperatuur, neerslag en luchtvochtigheid staan weergegeven in Tabel 5. Een duidelijke koude en natte periode in 2007 is in juni en juli niet goed aan te geven. Wel is er in juni 2008 (12-14 juni) een koudere periode geweest. Dit maakt dat de gemiddelde nachttemperatuur in juni 2008 lager is dan die in 2007. Verder blijkt dat de relatieve luchtvochtigheid in juni 2007 (80.9%) 5% hoger is in vergelijking met juni 2008 (75.9%). Tevens is in juni 2007 meer neerslag (64.8mm) gevallen dan in juni 2008 (54.8mm). Neerslag en hoge luchtvochtigheid zou een indicatie kunnen zijn voor de optimale infectie omstandigheden van Black Mold. Echter, de maand juli 2008 is ten opzichte van de andere maanden in deze vergelijking heel veel regen gevallen (84.7mm) en er waren geen meldingen van grootschalige Black Mold infectie. Op aangeven van twee telers is er ook gekeken naar de weersomstandigheden van een weerstation in Lottum. De gegevens zijn verstrekt door Cultus Agro Advies (Figuur 10B). De telers hebben tevens aangegeven dat in 2007 rond 25-26 juni, 5 - 10 juli en 15 - 17 juli de Black Mold uitbraken plaats hebben gevonden. Ook hier bleek het niet mogelijk om specifieke weersomstandigheden te benoemen die verantwoordelijk kunnen zijn voor de door telers aangegeven Black Mold uitbraken. Het is echter wel duidelijk dat er in Lottum in juli 2007 veel meer regen is gevallen dan in de rest van de onderzochte maanden (Tabel 5). Echter de meeste regen is eind juli gevallen en dus niet in de aangewezen periodes waarin Black Mold zou hebben toegeslagen. De conclusie van deze analyse is dat de exacte weeromstandigheden optimaal voor Black Mold infecties niet gemakkelijk vast te stellen zijn met behulp van de algemene gegevens van weerstations. Het is bijvoorbeeld ook mogelijk dat bladnatperiode, microklimaat of straling een rol spelen. Deze gegevens, die eigenlijk in het gewas gemeten moeten worden, zijn niet beschikbaar. Het is natuurlijk ook mogelijk dat een combinatie van meerdere van deze factoren een rol spelen bij grootschalige Black Mold infecties. Meer onderzoek naar onder welke omstandigheden Black Mold het beste infecteert kan leiden tot bruikbare teeltadviezen waarmee infecties kunnen worden voorkomen.



Figuur 10. Weersomstandigheden van Juni en Juli 2007 en 2008.

Weergegeven staan de weersgegevens van meetstations Volkel (A) en Lottum (B). Minimale (lichtblauwe lijn 2007/ donkerblauwe lijn 2008) en maximale temperatuur (groene lijn 2007/ rode lijn 2008) in combinatie met de neerslag (zwarte balk 2007/ roze balk 2008). De door de kwekers benoemde periode waarin Black Mold ontstaan is in 2007 aangegeven met dubbel grijzen pijlen.

Tabel 5. Overzicht weersomstandigheden van maanden juni en juli van het weerstation Volkel (2007-2008) en Lottum (2007).

| Weerstation | Volkel | | | | Lottum | |
|---------------------------------------|--------|------|------|------|--------|-------|
| | Juni | | Juli | | juni | juli |
| | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 | 2007 | 2007 |
| Temperatuur | | | | | | |
| Gem. Tmin (°C) | 13.6 | 11.0 | 12.7 | 13.1 | 14,0 | 12,9 |
| Gem. Tmax (°C) | 22.4 | 22.1 | 21.9 | 23.1 | 22,5 | 21,1 |
| Neerslag& luchtvochtigheid | | | | | | |
| Totale neerslag (mm) | 64.8 | 56.8 | 54.3 | 84.7 | 42 | 128,4 |
| Aantal neerslag dagen | 16 | 11 | 11 | 21 | 15 | 20 |
| Gem. Neerslag per dag | 4.1 | 5.2 | 4.9 | 4.0 | 2,8 | 6,4 |
| Gem. Relatieve luchtvochtigheid (%) | 80.9 | 75.9 | 79.8 | 79.7 | 82,5 | 81,1 |

3.2.1 Invloed van water tijdens oculatie

Aansluitend op de vorige paragraaf is gekeken of vocht tijdens het oculeren (door weersomstandigheden of watergift in perioden van droogte) een effect heeft op Black Mold infecties. Er is een veldproef ingezet waarbij de oculatie ogen gedompeld zijn in water voordat ze in de T-snedes geplaatst werden.

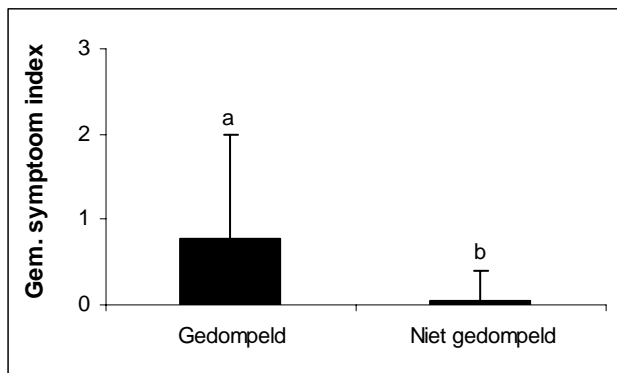
Materiaal en methode

De uitvoering van deze veldproef staat beschreven bij 1.1.1. 2009. De in water gedompelde oculatieogen zijn geplaatst in de T-snedes op locatie 5. Ter controle zijn er oculatieogen niet gedompeld in water op locatie 6. Voor elke behandeling zijn 150 planten gebruikt. Na 11 dagen is het aantal oculaties gescoord met behulp van de symptoom index (0 is geen aantasting, 1 is lichte aantasting, 2 is matige aantasting en 3 is zware aantasting).

Resultaat en conclusie

Tijdens het analyseren van de data is gebleken dat er een significant verschil in Black Mold aantasting is tussen de oculatieogen gedompeld in water en zonder dompel behandeling. Meer Black Mold aantasting werd gevonden in de oculaties waarbij de ogen gedompeld werden. Echter het verschil is niet erg groot als er gekeken wordt naar de gemiddelde symptoom index (Figuur 11). Maar het blijkt dat bijna 30% van de oculaties mislukt zijn (symptoom index 1 tot 3) als de ogen gedompeld in water zijn. Er is bij de onbehandelde ogen maar 1% van de oculaties die een symptoom index van 1 tot 3 heeft.

Vocht tijdens de oculatie werkt dus inderdaad negatief. Een kanttekening hierbij is dat het nat worden van de stam door weersomstandigheden of watergift in de praktijk niet resulteert in zo'n hoog vochtgehalte als het dompelen van de oculatieogen in water zoals in deze proef. Vocht kan dus wel degelijk van invloed zijn op de ontwikkeling van Black Mold infecties maar of dit in de praktijk een belangrijke rol speelt kan niet worden geconcludeerd uit deze proef.



Figuur 11. Effect van vocht tijdens oculeren.

Weergegeven staat de gemiddelde symptoom index van oculaties waarvan het oog gedompeld is in water en van ogen die niet gedompeld zijn in water. Verschillende letters betekenen significante verschillen (ANOVA; $P < 0.05$).

3.3 Optimale groeiomstandigheden *in vitro*

Onder welke omstandigheden groeit Black Mold optimaal? Vanuit de praktijk komt de indruk dat de optimale weersomstandigheden voor Black Mold nat en koud weer is. In het veld zelf zijn de optimale groeiomstandigheden moeilijk te meten omdat de parameters nu eenmaal niet stabiel zijn. Daarom is gekozen voor *in vitro* experimenten waarbij gekeken wordt onder welke omstandigheden myceliumgroei, sporenkieming en sporenproductie optimaal is. Er is onder andere gekeken naar de invloed van temperatuur, licht, luchtvochtigheid op de mycelium groei (schimmeldraden), sporen productie en sporen kieming. In het kader van het zoeken naar de infectiebron is er tevens gekeken naar de overleving van Black Mold sporen in de grond gedurende vrieskou.

3.3.1 Materiaal en methode

Optimale temperatuur voor myceliumgroei en sporenkieming

De optimale temperatuur voor de groei van mycelium (schimmeldraden) is bepaald door een druppel sporensuspensie ($1.2 \cdot 10^3$ sporen in $10\mu\text{l}$) in het midden van een voedingsbodem (AGA medium) aan te brengen. Vervolgens is na 3, 7, 10 en 14 dagen de uitgroei van mycelium bepaald door de diameter te meten.

Het percentage sporenkieming is bepaald door 100 sporen op een voedingsbodem uit te platen en op dag 14 het aantal uitgroeïende sporen (kolonievormende eenheden) te bepalen.

Optimale temperatuur voor sporenproductie

In het midden van een voedingsbodem (AGA medium) werd $10\mu\text{l}$ sporensuspensie ($1 \cdot 10^3$ sp/ml) aangebracht. De platen werden geïncubeerd bij 9, 13, 24 en 30°C . Per temperatuur en tijdstip zijn 3 platen ingezet. Op 3 verschillende tijdstippen, 3, 7 en 10 dagen na inzet, werd de diameter van de mycelium uitgroei opgemeten. De hoeveelheid vitale sporen werd bepaald door afhankelijk van diameter van het mycelium 1, 2 of 5ml water op de voedingsbodem aan te brengen. Vervolgens is met een Trigalski spatel over het mycelium 'geschraapt' zodat de sporen in het water werden opgenomen. Vervolgens werden de sporen over een AGA voedingsbodem verspreid en geïncubeerd (24°C). De hoeveelheid uitgroeïende sporen (kolonievormende eenheden) zijn een maat voor het kiemingspercentage van vitale sporen.

Invloed van luchtvochtigheid en licht in combinatie met verschillende temperaturen .

Myceliumgroei werd bepaald door in het midden van de voedingsbodemplaat (AGA) een druppel van $10\mu\text{l}$ à $1 \cdot 10^3$ sporen/ml aan te brengen.

Sporenkieming werd bepaald door 100 sporen per plaat uit te platen.

Elke behandeling werd in drievoud ingezet.

Een dag en nacht ritme van licht en temperatuur werd gecreëerd door de schimmel in een klimaatkast te zetten. Eén klimaatkast had een dag en nacht ritme van 16 uur licht/ 24°C en 8 uur donker/ 9°C . Een tweede klimaatkast was ingesteld op 24°C met een dag en nacht ritme van 16 uur licht en 8 uur donker. Voor het creëren van 100% donkere omstandigheden werden de voedingsbodems in aluminiumfolie verpakt.

De luchtvochtigheid werd gevarieerd door platen in afgesloten bakjes met een laag water te zetten (100% RV) of niet (normale RV).

Op dag 3, 7, 10 en 14 na inzet werd de mycelium groei opgemeten door de diameter van een kolonie te meten. De hoeveelheid uitgroeïende sporen (kolonievormende eenheden) zijn een maat voor het kiemingspercentage van de sporen.

Invloed van vrieskou op sporen

In totaal werd 500 ml grond besmet met Black Mold sporen ($1.7 \cdot 10^6$ sporen/ml). Per behandeling werden 3 buizen van 10 ml besmette grond gebruikt. De buizen werden bij 24, -1° of -20°C gezet voor 24, 48 of 72h.

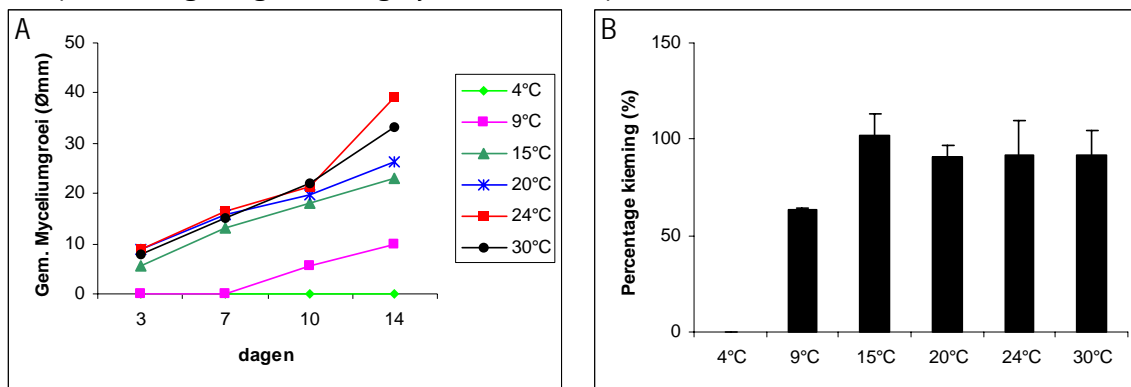
Na ontdooien van de grond werd per buis 20 ml steriel water toegevoegd en flink geschud (30 sec.) De suspensie werd gefiltreerd over kaasdoek en van het filtraat werd 50 µl uitgeplaat op AGA voedingsbodem (duplo). Vijf dagen na incubatie (24°C) werd de hoeveelheid sporen per plaat geteld en het kiemingspercentage vastgesteld.

3.3.2 Resultaten

Optimale temperatuur voor groei en sporenkieming

De optimale temperatuur van Black Mold voor myceliumgroei is 24°C (Figuur 12A) en voor sporenkieming is dit 15°C (Figuur 12B). Dit blijkt uit een proef waarbij voedingsbodems met sporen bij 4, 9, 15, 20, 24 en 30°C zijn gezet.

Bij een temperatuur van 4 graden produceert Black Mold geen mycelium (Figuur 12A). Waarschijnlijk doordat bij 4 graden er geen kieming plaats vindt (Figuur 12 B). Black Mold groeit bij een temperatuur van 9°C zeer langzaam. Pas na zeven dagen kon de eerste groei waargenomen worden. Tevens bleek maar 64% van de sporen te kiemen bij deze temperatuur terwijl bij 15°C rond de 100% van de sporen kiemt. Opvallend is dat bij 20 en 30°C het mycelium minder hard groeit dan bij 24°C maar het percentage kieming van sporen is nagenoeg even hoog bij alle drie de temperaturen. (91-92%).



Figuur 12. Optimale Temperatuur van Black Mold voor myceliumgroei en sporenkieming

Weergegeven staan de verschillende temperaturen (4, 9, 15, 20, 24 en 30°C) en bijbehorende myceliumgroei (A) en kiemingspercentages van de sporen (B). Myceliumgroei is uitgezet tegen de tijd (3, 7, 10 en 14 dagen). Kiemingspercentage is bepaald op dag 14.

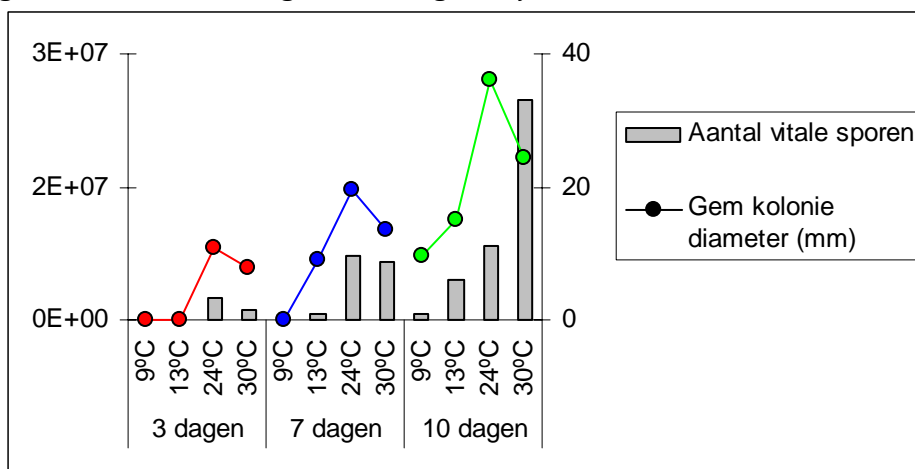
Optimale temperatuur voor sporenproductie

De optimale temperatuur voor sporenproductie is vastgesteld door sporen uit te platen op voedingsbodems en deze te incuberen bij verschillende temperaturen (Figuur 13). Vervolgens zijn het aantal vitale sporen bepaald door de sporen van de voedingsbodems te oogsten en uit te platen op een voedingsbodem.

Tegelijkertijd is er met deze proef gekeken naar de optimale myceliumgroei van Black Mold (Figuur 13) door de diameter van een kolonie gedurende de proef te meten.

De optimale temperatuur voor sporenproductie en myceliumgroei liggen na 3 en 7 dagen bij 24°C. Na 10 dagen ligt echter de hoogste sporenproductie bij 30°C terwijl de optimale temperatuur voor groei bij 24°C ligt. Black Mold investeert dus bij hoge temperaturen (30°C) in het maken van sporen in plaats van myceliumgroei.

Uit dit experiment is duidelijk te zien dat de temperatuur invloed heeft op het uitblijven van myceliumgroei en sporenproductie. Bij de lage temperaturen (9 en 13°C) is na 3 dagen incubatie geen myceliumgroei of kieming van sporen geconstateerd. Pas na 7 dagen wordt bij 13°C de eerste groei en sporen productie geconstateerd. Na 10 dagen is dit het geval bij 9°C.



Figuur 13. Optimale temperatuur van Black Mold voor sporenproductie en mycelium groei.

Weergegeven staan myceliumgroei en aantal vitale sporen bij de verschillende temperaturen (9, 13, 24 en 30°C) gedurende 3, 7 en 10 dagen. De gemiddelde diameter van de kolonie is in het rood (3 dagen), blauw, (7 dagen) en groen (10 dagen) per temperatuur weergegeven. Lijnen geven de trend in myceliumgroei aan.

Invloed van luchtvochtigheid, licht en temperatuur op sporenkieming en myceliumgroei

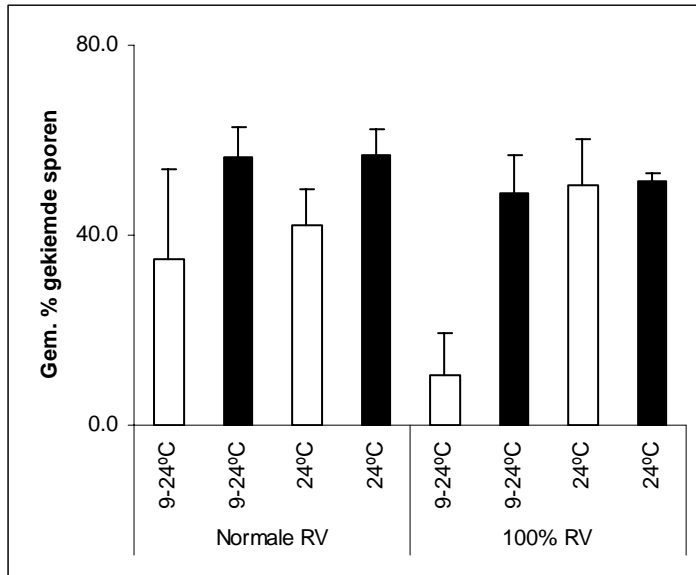
Voor het vaststellen van optimale omstandigheden voor Black Mold infecties is er gekeken naar de invloed van de relatieve luchtvochtigheid (RV), licht en temperatuur op sporenkieming en myceliumgroei. Door de schimmel constant bij zijn optimale groeitemperatuur te plaatsen (24°C) kan de invloed van licht en luchtvochtigheid op de ontwikkeling van de schimmel bepaald worden. Om te onderzoeken of licht een effect heeft op de schimmel zijn de voedingsbodems in een klimaatkast met een dag en nacht ritme geplaatst of geheel in het donker. Temperatuur wisselingen die gepaard gaan met een normaal dag en nachtritme zijn ook nagebootst. Zo is er een nachttemperatuur van 9°C aangehouden omdat dit de minimale groei temperatuur van de schimmel is.

Sporenkieming

Opmerkelijk is dat het laagste kiemingspercentage werd geconstateerd bij de behandeling die de veldomstandigheden van een koude natte nacht het meeste nabootst. Dit is namelijk een dag- en nachtritme in temperatuur en licht bij 100% RV (Figuur 14). Het hoogste sporenkiemingspercentage werd behaald wanneer er een normale RV en geen licht is. Het zou dus mogelijk kunnen zijn dat de schimmel in het veld op een zodanige plek zit was geen licht is en weinig wisseling van RV. Het blijkt dat het merendeel van deze sporen al na drie dagen gekiemd is (Figuur 15). Opvallend is dat er bijna geen verschil is tussen de sporen die 's-nachts bij 9°C in het donker hebben gestaan en de sporen die constant bij 24°C in het donker hebben gestaan. Er is echter wel een verschil in snelheid van kieming te zien (Figuur 15). Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat bij 9°C er geen kieming plaatsvindt maar wel bij 24°C en hierdoor werd pas later het

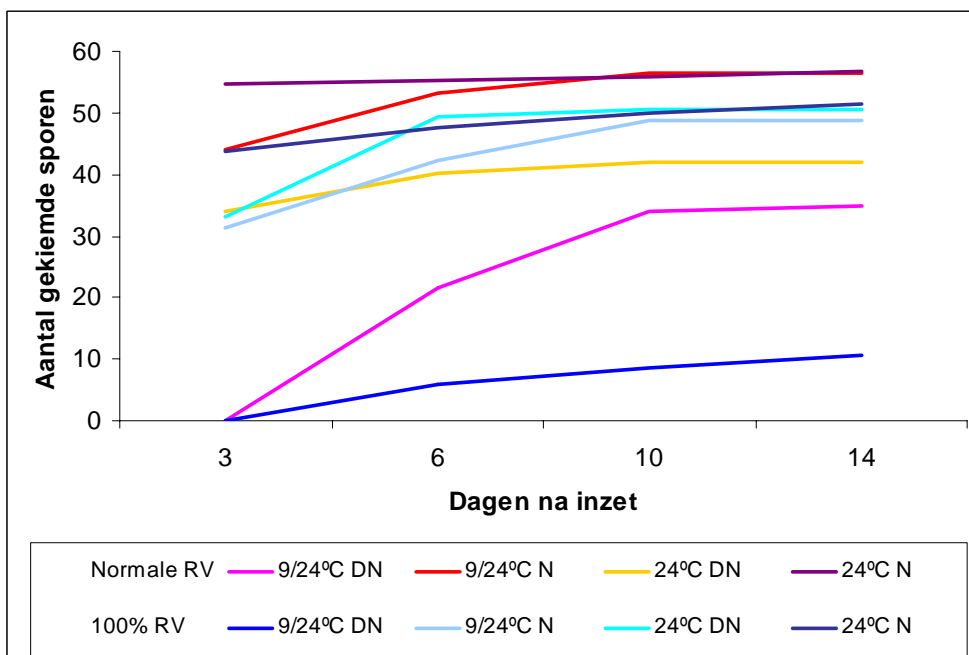
maximale aantal gekiemde sporen bereikt.

Veder kan er geconcludeerd worden dat een hoge luchtvochtigheid een licht remmend effect heeft op de sporenkieming. Daarnaast is een hoger sporenkiemingspercentage over het algemeen gevonden bij de voedingsbodems die in het donker waren weggezet. Uitzondering hierop is de behandeling waarbij de sporen bij 24°C met een dag en nacht lichtritme en 100% RV, hebben kunnen kiemen.



Figuur 14. Invloed van Temperatuur, RV en Licht (normaal dag en nacht ritme en totale duisternis) op sporenkieming.

Weergegeven staat het percentage gekiemde sporen na 14 dagen. Witte balken betekenen sporenkiemingspercentages met een dag (16h) en nachtritme(8h). Zwarte balken geven het percentage sporenkieming weer waarbij de voedingsbodems in het donker werden gehouden.



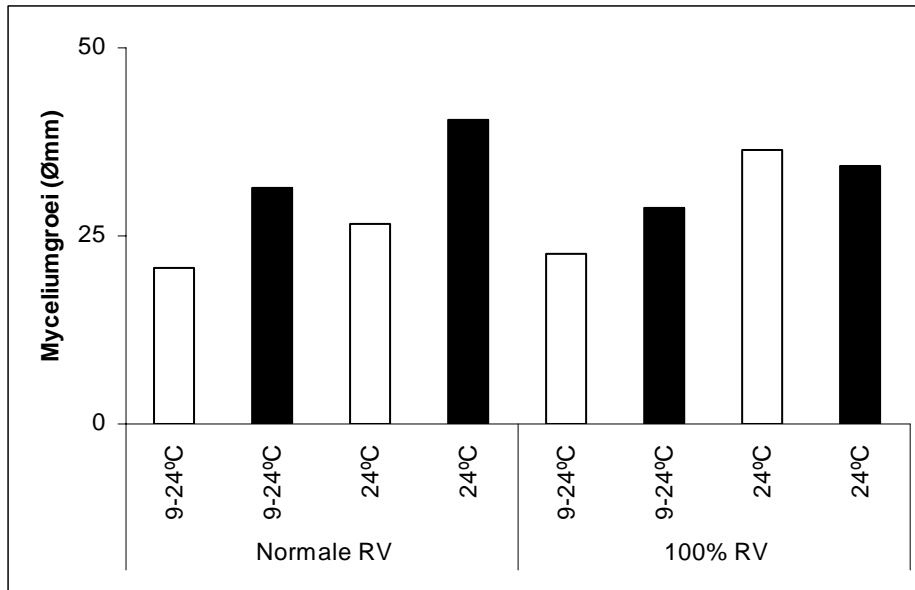
Figuur 15. Invloed van Temperatuur, RV en Licht op sporenkieming

Weergegeven is dag- en nacht lichtritme (DN; 16hD/8hN) en totale duisternis (N), een dag en nacht temperatuurritme (8h/ 9°C en 16h/24°C) en een normale of verzadigende (100%) relatieve luchtvochtigheid in de tijd (3, 6, 10 en 14 dagen).

Myceliumgroei

Net als de sporenkieming zijn de optimale groeicondities bij 24°C onder een normale RV en geen licht. (Figuur 16). In het algemeen kan gezegd worden dat myceliumgroei sneller gaat in volledige duisternis. Hierbij kan nog worden opgemerkt dat de schimmel harder groeit bij een normale luchtvochtigheid. Uitzondering hierop zijn de kolonies die constant bij 24°C met een dag en nacht lichtritme en een hoge RV hebben gestaan.

Uit deze proef kan geconcludeerd worden dat 24°C, volledige duisternis en een normale RV de optimale groei omstandigheden voor mycelium groei is. Het is echter niet duidelijk geworden of en welke van de geteste parameters afzonderlijk de grootste invloed heeft op het stimuleren van de groei.



Figuur 16. Invloed van Temperatuur, luchtvochtigheid en Licht (normaal dag en nacht ritme (witte balk) en totale duisternis (zwarte balk)) op mycelium uitgroei op dag 14.

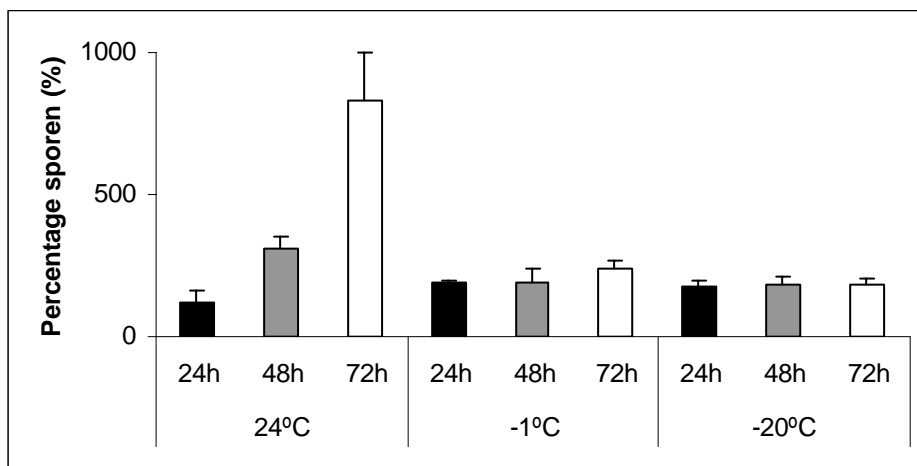
Weergegeven staat de gemiddelde diameter van een Black Mold kolonie na 14 dagen. Witte balken betekenen de groei van een kolonie met een dag (16h) en nacht (8h) ritme. Zwarte balken geven de groei van een kolonie weer waarbij de voedingsbodems constant in het donker werden gehouden.

Effect van invriezen op Black Mold sporen in grond

Een van de vragen die tijdens dit onderzoek naar voren kwam was of Black Mold sporen vorstperiodes kunnen overleven en op deze manier een bedreiging voor het volgende groeiseizoen vormen? Om deze vraag te beantwoorden zijn buizen met kunstmatig besmette grond ingevroren bij -1°C en -20°C.

Tijdens het analyseren van de resultaten bleken twee effecten duidelijk naar voren te komen (Figuur 17). Allereerst blijkt dat de sporen aantallen in buizen die bij 24°C weggezet waren na drie dagen verzevenvoudigd waren. Dit is opmerkelijk veel omdat in de proef waarbij de sporenproductie is gemeten het aantal sporen zelfs bij 30°C slechts verdrievoudigd in tien dagen (Figuur 13). Klaarblijkelijk produceert Black Mold in grond efficiënter sporen dan op een voedingsbodem.

Ten tweede blijkt dat de sporen van Black Mold goed tegen lage temperaturen kunnen. Het sporen aantal blijft min of meer stabiel gedurende tijd dat de buizen ingevroren waren. Black Mold sporen kunnen dus prima vrieskou verdragen.



Figuur 17. Invloed van 24, -1 en -20°C op Black Mold sporen in grond

Weergegeven staat het gemiddelde aantal kolonievormende eenheden die gevormd zijn nadat de grond waarin de sporen zich bevonden bewaard was bij 24, -1 en -20°C voor gedurende 24 (zwarte balk), 48 (grijze balk) en 72 (witte balk) uur.

3.3.3 Conclusie

De parameters voor optimale omstandigheden voor groei, kieming en sporenproductie van Black Mold zijn:

- Optimale temperatuur voor myceliumgroei is 24°C
- Optimale temperatuur voor sporenkieming is 15°C
- Optimale temperatuur voor sporenproductie is 30°C
- Optimale groei en kiemingsomstandigheden zijn bij 24°C bij een normale luchtvochtigheid in totale duisternis
- Sporen in de grond kunnen tegen invriezen

Lage temperaturen

Er is in deze proeven gekozen voor een brede temperatuurreeks vanwege de discrepantie tussen de literatuur en de praktijk. Uit de inventarisatie die uitgevoerd is in 2007 kwam naar voren dat de kwekers de indruk hadden dat oculaties door Black Mold aangetast werden als ze werden gezet na koude natte nachten. De literatuur spreekt van een optimale groei temperatuur van 24°C. uit de proeven is duidelijk geworden dat Black Mold bij lage temperaturen niet goed groeit en kiemt. Bij 9°C gaat de ontwikkeling zeer langzaam en bij 4°C is er geen groei of kieming aangetoond. Er is echter geen aanwijzing dat de optimale infectie omstandigheden niet bij lage temperaturen zou kunnen zijn. Misschien zorgt juist een lage temperatuur voor een langzaam groeiende onderstam waardoor het oculatie oog minder snel hecht met als gevolg dat Black Mold toeslaat. Zo is er ook bekend dat Black Mold juist in de bewaring (4°C) van een een probleem is en er zijn ook voorbeelden van andere schimmels die de plant juist infecteren bij lage temperaturen (Rhizoctonia). Aanvullend onderzoek waarin gekeken wordt wat de optimale infectie omstandigheden van Black Mold zijn is gewenst. Met deze gegevens zou een waarschuwingssysteem gemaakt kunnen worden waarmee de kwekers worden gewaarschuwd op basis van weersvoorspellingen of er optimale omstandigheden voorspeld worden voor de Black Mold infectie. Met behulp van een dergelijk systeem kan een kweker besluiten om het oculeren uit te stellen of juist wel uit te voeren.

3.4 Waar zit Black Mold?

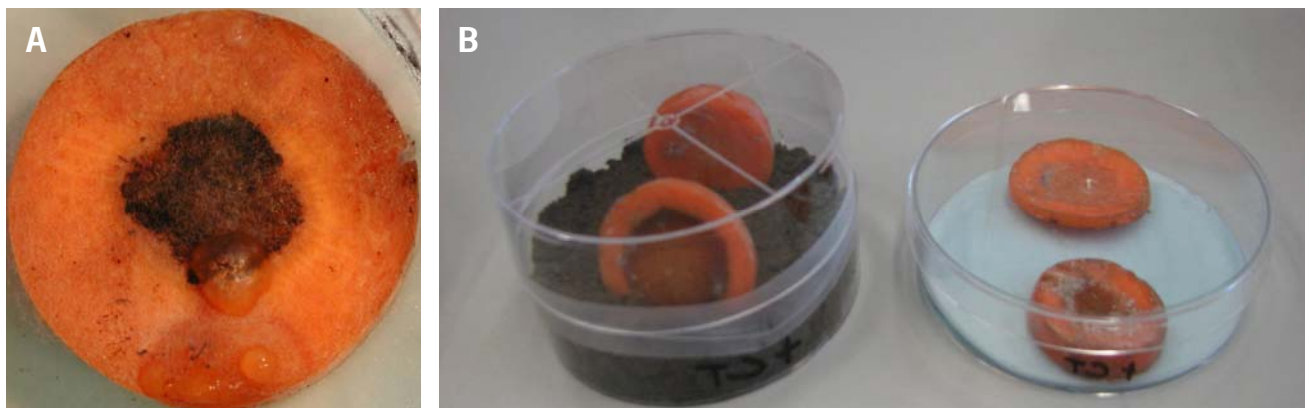
Uit de literatuur is bekend dat *Chalaropsis thiaviolides* een schimmel is die algemeen voorkomt. Het is onbekend wat de grootste infectiebron van de schimmel is. In dit hoofdstuk is gekeken naar de grond als infectiebron (3.4.1). Allereerst is er vastgesteld of er een relatie is tussen de grond waarop grootschalige Black Mold uitbraken plaats hebben gevonden en de aanwezigheid van de schimmel. Daarnaast is er met proeven gesimuleerd wat de invloed is van opspattend water en aanaarden op het ontstaan van Black Mold infecties.

De mogelijkheid of Black Mold op de plant zit, is ook onderzocht (3.4.2). Als laatste is er gekeken naar het oculatiemes (3.4.3). Uit eerder onderzoek is bekend dat Black Mold kan worden overgedragen via het mes maar of Black Mold in de praktijk op de messen aanwezig is, is niet bekend. Daarnaast is er een proef uitgevoerd waarbij het mes behandeld werd ter voorkoming van het overdragen van Black Mold.

3.4.1 Grond

Het is bekend dat Black Mold in de grond zit maar of dit een belangrijke infectiebron is, is niet bekend. Allereerst is er gekeken of er een relatie is tussen grote hoeveelheden Black Mold in de grond en de grootschalige uitbraak van 2007. Er is hiervoor een lokaastoets ontwikkeld. De lokaas toets is gebaseerd op het feit dat Black Mold goed in staat is om peen te infecteren (Figuur 18A). De peen wordt aangetast door de schimmel wanneer deze in de grond wordt gestoken (Figuur 18B). Na enige tijd werden de stukjes peen beoordeeld op aanwezigheid van Black Mold.

Verder is er gekeken of het opspatten van of het aanaarden met besmette grond leidt tot Black Mold infecties in de T-snedes. Onderstammen zijn op besmette grond geplaatst en door middel van beregening van bovenaf is het opspatten van grond gesimuleerd. Daarnaast zijn ook onderstammen aangeaard met besmette grond.



Figuur 18. Besmetting van Black Mold op peen in de lokaastoets.

De kern van een stukje peen dat aangetast is door Black Mold (A) en de uitvoering van de lokaasproef waarin stukjes peen in de grond zijn gestoken en op het filterpapier zijn gelegd (B).

3.4.1.1 Materiaal en methode

Lokaastoets

Er zijn 16 grondmonsters genomen verspreid over percelen van verschillende telers. De aantasting op deze percelen varieerde van grootschalige aantasting (2007) tot geen aantasting (2007 en 2008). De peen gebruikt in deze proef is biologische peen omdat deze niet bespoten is met bestrijdingsmiddel welke de resultaten kan beïnvloeden. Op elk grondmonster zijn 20 stukjes peen gezet. Na 5 dagen zijn de stukjes peen afgespoeld met kraanwater, op filterpapier gelegd en geïncubeerd bij kamertemperatuur. Ter controle werden steriele grond en steriele grond met $6.4 \cdot 10^3$ sporen/ml gebruikt. Vijf dagen later zijn de stukjes peen beoordeeld op aantasting van Black Mold. De aantastingindex ziet er als volgt uit 0=gezond, 1=25% zwarte aantasting, 2= 25-100% zwarte aantasting.

Aanaarden en beregenen

Per behandeling zijn 20 stammen gebruikt die waren ontsmet op de oculatieplaats met 5% bleekoplossing. De onderstammen werden in potten geplaatst met gezonde potgrond (tweederde van de pot). Hier bovenop is niet besmette zandgrond, natuurlijk besmette grond of kunstmatig besmette grond aangebracht (één derde van de pot). Niet besmette grond is zand uit de proeftuin van PPO. Natuurlijk besmette grond werd geselecteerd uit de lokaastoets (grondmonster 8). Om kunstmatig besmette grond te verkrijgen zijn haverkorrels besmet met Black Mold en vervolgens geïncubeerd bij 24°C voor 4 weken. Per pot is 60 ml besmette haverkorrels gemengd met 750 ml tuinzandgrond. Extra Black Mold sporen zijn voor het maken van de T-snedes toegevoegd ($1 \cdot 10^4$ sporen/ml grond).

Na 2 !! moet nog even worden toegevoegd !!weken werden in de onderstammen T-snedes gemaakt. Tussen de verschillende behandelingen door werd het mes ontsmet met alcohol (70%). Voor de besmette controle is het oculeermes vlak voor het maken van de T-snedes gedoopt in een sporensuspensie ($2.2 \cdot 10^5$ sp/ml) en voor niet besmette controle werd het mes gedoopt in water.

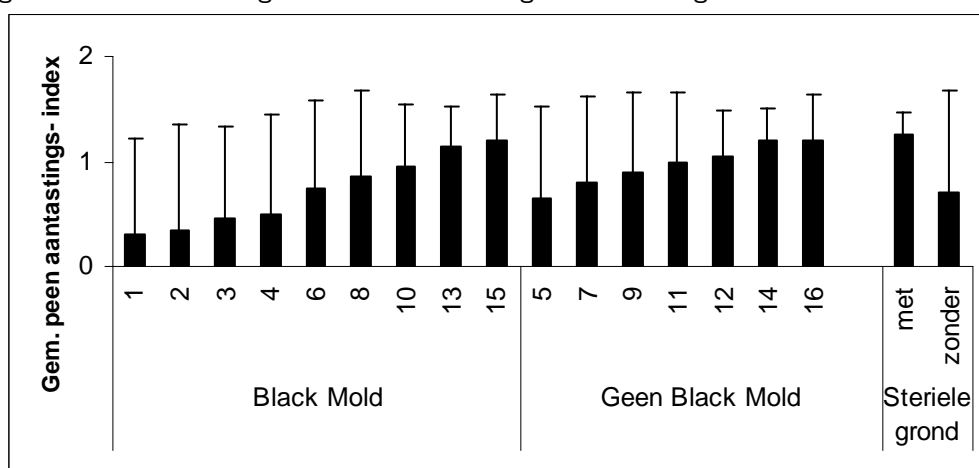
Alle potten zijn in de kas geplaatst van 20°C. Beregenen van de potten werd bovenlangs via de sproeier uitgevoerd om opspattend water te simuleren of onderlangs via een eb/vloed systeem. De planten voor deze behandelingen werden niet aangeaard.

De behandelingen waarbij de invloed van anaarden werd bepaald zijn de stammen na ontsmetten en drogen wel of niet aangeaard. Deze planten kregen onderlangs via een eb/vloed systeem water toegediend. Twee weken na het maken van de T-snedes in de onderstammen zijn de potten buiten op een containerveld geplaatst. Na 3 weken werden de T-snedes gescoord op aanwezigheid van Black Mold (0= geen infectie, 1=kleine aantasting, 2= T-snedes geïnfecteerd).

3.4.1.2 Resultaten en conclusies

Geen relatie grootschalige uitbraak van Black Mold en de hoeveelheid Black Mold

In deze proef is met behulp van een peen geprobeerd vast te stellen of er een relatie was tussen grond van percelen die in 2007 zware aantasting van Black Mold hadden en welke niet (Figuur 19). Er is in de lokaasproef gewerkt met het gegeven dat een peen ook wordt aangetast door Black Mold. De mate van aantasting kan een indicatie zijn van de mate waarin de grond besmet is met Black Mold. Er is geen duidelijke relatie tussen de mate van een peen aantasting en grootschalige Black Mold infectie in 2007. Er was echter op de stukjes peen die in de steriele grond werden gezet ook Black Mold aantasting van stukjes te zien (Figuur 19 steriele grond zonder Black Mold sporen). Dit zou kunnen betekenen dat de peen al besmet was met Black Mold. Het was echter wel duidelijk dat de peen veel minder was aangetast dan de stukjes peen die op in de grondmonsters zijn gestoken. Hierdoor is besloten dat de gemiddelde aantasting van de grondmonsters te corrigeren voor deze achtergrond aantasting.



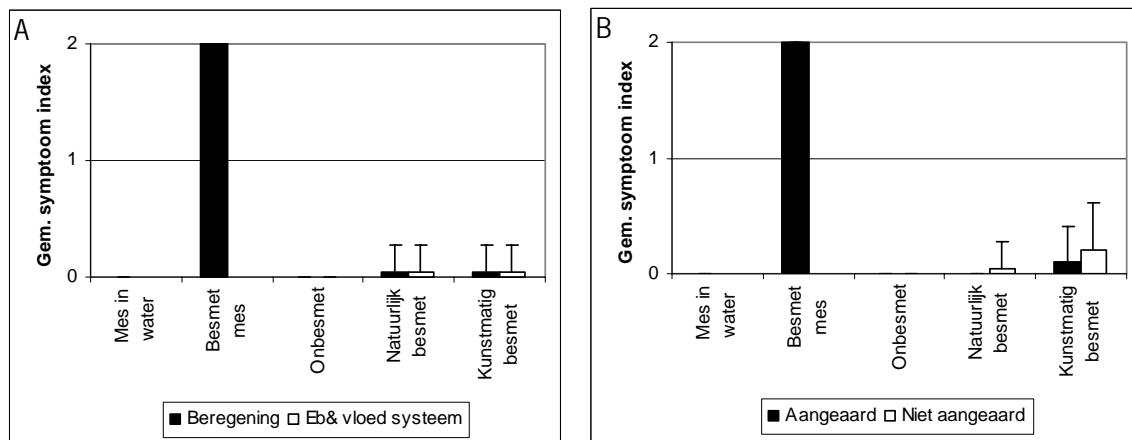
Figuur 19. Resultaten van de lokaastoets.

Weergegeven is de gemiddelde aantasting van de stukjes peen die op de verschillende grondsoorten (1-16) hebben gestaan. De individuele grondmonsters zijn aangegeven met een nummer en onderverdeeld in monsters genomen van percelen met grootschalige Black Mold infecties en zonder. De controles zijn steriele grond met of zonder Black Mold sporen toegevoegd. De gemiddelde aantastingen van de grondmonsters zijn gecorrigeerd voor de aantasting van de stukjes peen op steriele grond.

De rol van grondbesmetting via beregening of aanaarden

Om de rol van grondbesmetting te onderzoeken zijn onderstammen in potten met besmette grond gezet. Door van bovenaf te beregenen is de infectieroute van opspattend grond onderzocht (Figuur 20A). Door aan te aarden met de besmette grond is gekeken of dit ook een mogelijke infectieroute van Black Mold is (Figuur 20B).

In beide proeven is gebleken dat het aantal geïnfecteerde T-snedes zeer laag was. Zelfs met microscopische analyse was het niet mogelijk meer Black Mold infecties vast te stellen. De controle waarbij het mes voor het maken van de T-snedes in een sporensuspensie was gedoopt, bleek echter 100% aantasting te geven. Hieruit kan geconcludeerd worden dat Black Mold tijdens de proef in staat was T-snedes te infecteren. De rol van opspattend grond of aanaarden is dus kennelijk minimaal voor Black Mold infecties. Grond als infectiebron van Black Mold is onder deze proefcondities bijna uitgesloten.



Figuur 20. Rol van opspattende grond en aanaarden als infectieroute van Black Mold.

Weergegeven is de symptoom index van T-snedes waarbij besmette grond opspatte tegen de onderstam door beregening (A) of door aanaarden (B). Ter controle zijn T-snedes gemaakt met een mes dat gedompeld was in een sporensuspensie van Black Mold.

3.4.2 Plantmateriaal

Plantmateriaal is onderzocht op aanwezigheid van Black Mold in het kader van het vaststellen van de infectiebron.

3.4.2.1 Materiaal en methode

Gezond ogende stukjes stam en entogen van planten uit percelen waar wel of geen grootschalige uitbraak van Black Mold was geweest zijn verzameld. Van 4 bedrijven zijn 5 entogen en 5 stammetjes bemonsterd en bij 2 bedrijven alleen 5 stammetjes. Ter controle zijn 5 stammen kunstmatig besmet door een suspensie met sporen van Black Mold op de stammen te spuiten en 5 stammen bespoten met water. De plantmonsters zijn afgespoeld met water. Afhankelijk van de dikte werden de stukjes gespoeld in 6 ml (2-6 mm) of in 20 ml (6-10mm). Om eventuele sporen en/of schimmeldraden te verzamelen die aanwezig zijn in het water waarmee de stammen zijn afgespoeld is het 'afspoelwater' in een centrifuge afgedraaid. Na afdraaien (10 minuten, 4500 rpm) werd het pellet opgelost in 250µL en uitgeplaat op een voedingsbodem. Ter controle was een sporensuspensie van Black Mold uitgeplaat op een AGA voedingsbodem (100 sporen/plaat). Na 5 dagen incubatie bij 24°C konden de Black Mold kolonies niet geteld worden omdat de voedingsbodems overgroeit waren door ander schimmels.

Er is daarom besloten om op een andere manier vast te stellen of de Black Mold schimmel aanwezig was door het gebruik van een moleculaire methode (detectie m.b.v PCR). Van elk perceel werden de monsters van de afgespoelde stammen gepoeld (in totaal 6 gepoolde monsters) en gebruikt voor PCR. Ter controle zijn de afspoelmonsters van de kunstmatig besmette stammen en de met water behandelde stammen gebruikt. Eerst is er een PCR uitgevoerd met standaard ITS primer (1 en 4) en daarna met primers specifiek voor ITS van Black Mold (zie Bijlage 4). PCR condities waren: 92°C/ 45"; 58°C/45"; 72°C/45"; 40 cycli). Positieve monsters zijn nageknippt met restrictie enzym *TagI* omdat hiermee onderscheidt gemaakt kan worden tussen de peen en roos variant van Black Mold (Zie Bijlage 4).

3.4.2.2 Resultaat en conclusie

Het bleek niet mogelijk Black Mold te onderscheiden op de voedingsbodems waarop het afspoel water van het plantmateriaal was uitgeplaat. De platen waren volledig overgroeit met andere schimmels. Op de controle plaat met Black Mold sporen bleken kolonies van ongeveer 5 mm groot te zitten. Het is de verwachting dat op de platen met het spoelwater de Black Mold kolonies ook zo groot zijn. Hierdoor bleek het onmogelijk om de kolonies te onderscheiden. Ook met microscopische analyses bleek de aanwezigheid van Black Mold niet vast gesteld te kunnen worden.

Met moleculaire technieken kon wel Black Mold aangetoond worden in het spoelwater van het plantmateriaal. Er is na de PCR onderscheid gemaakt tussen de Black Mold variant van peen en roos (zie Bijlage 4) door het PCR product na te knippen met *TagI*. Het bleek dat in 2 van de gepoolde monsters Black Mold aangetoond kon worden. Het PCR product van de positieve monsters bleek na digestie de roos variant te bevatten. Black Mold komt dus voor op plantmateriaal maar niet op al het geanalyseerde materiaal. Door het lage aantal kon er geen relatie gelegd worden tussen een positieve PCR en plantmateriaal van kwekerijen waar Black Mold uitbraken hebben plaatsgevonden.

3.4.3 Mes

Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat Black Mold via het mes verspreid kan worden. Het is echter onbekend of de oculatiemessen uit de praktijk ook de schimmel bij zich dragen. Willekeurige oculatie messen van oculeerders zijn daarom onderzocht op aanwezigheid van Black Mold. Verder is er gekeken of het schoon houden van het mes kan voorkomen dat Black Mold van stam naar stam overgedragen wordt. Twee verschillende proeven namelijk een rozenhout biotoets en een veldproef zijn uitgevoerd om vast te stellen welke ontsmettingsbehandeling van het mes het meest effectief is.

3.4.3.1 Materiaal en methode

Onderzoek oculatiemessen

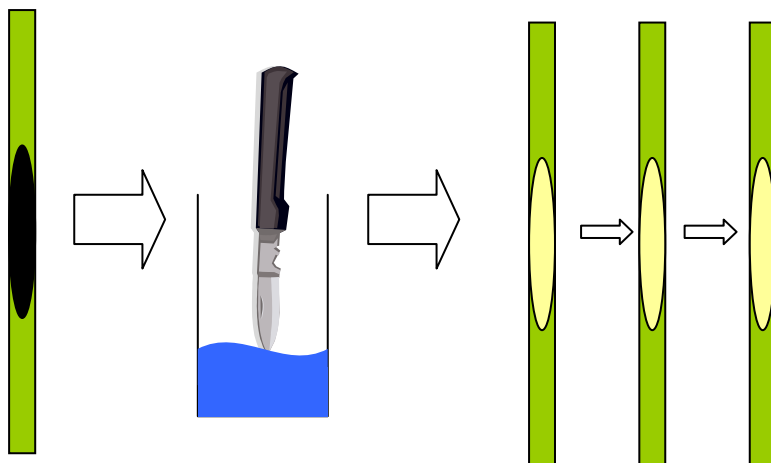
De messen van telers zijn willekeurig uit gekozen en voor 5 seconden gedompeld in 20 ml water. Vervolgens zijn de buizen met 20 ml water afgedraaid (10 minuten bij 4500 rpm) en is het pellet opgelost in 350 μ L water. Een deel daarvan (50 μ L) is uitgeplaat op een AGA voedingsbodem. Na 10 dagen zijn de platen geanalyseerd.

Effect van mes behandeling *in vitro*

Hiervoor is een biotoets met rozenhout uitgevoerd zoals beschreven bij 1.1.3. Een stukje rozenhout is besmet met Black Mold door met wattenstaafje gedoopt in een sporensuspensie ($1 \cdot 10^5$ sporen/ml) over de wond te gaan. Een schoon mes werd besmet door deze wond aan te snijden. Vervolgens is dit mes behandeld door het mes voor 30 seconden in de diverse middelen (middel D, F, G) te dopen. Of door het met een doek af te vegen. Hierna zijn achtereenvolgens 3 rozenhout stukjes aangesneden (Figuur 21). De stukjes hout zijn in een reageerbuisje geplaatst en na 5 dagen incubatie is de symptoom index bepaald.

Verspreiding via het mes *in vivo*

De uitvoering van de praktijktoets staat beschreven bij hoofdstuk 1.1.1 (praktijkproef 2008). Dit onderdeel is uitgevoerd op lokatie 3. De messen zijn om de tien planten met middel D of G bespoten. Na 30 seconden inwerktijd voor middel D is de T-snede gemaakt. Voor middel G werd na 5 en 30 seconden inwerktijd het mes met een schone doek afgeveegd. Daarna werden de T-snedes gemaakt. Per behandeling zijn 50 planten ingezet.



Figuur 21. Schematische weergaven van de biotoets voor het testen van mes behandelingen.

3.4.3.2 Resultaten en discussie

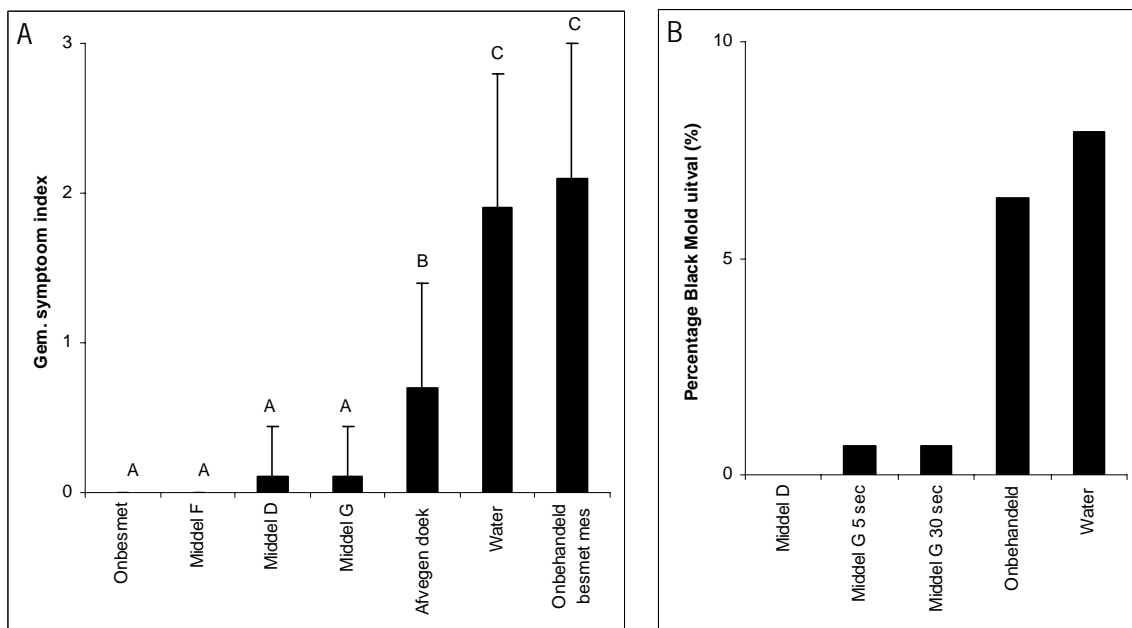
Praktijkmessen geanalyseerd

Messen van telers uit de praktijk zijn afgespoeld en geanalyseerd. Het spoelwater is uitgeplaat en de hoeveelheid uitgegroeide Black Mold kolonies zijn geteld. Er is een algemeen voedingsbodemp gebruikt waarop veel schimmels konden uitgroeien. Het bleek dat Black Mold veel langzamer groeit dan andere schimmels. De voedingsbodemplaten waren daardoor overgroeid met allerlei andere schimmels waardoor de Black Mold kolonies niet te tellen waren. Hiermee is niet uit te sluiten dat Black Mold toch op het oculeremes kan voorkomen en zo kan verspreiden.

Behandeling van het mes

Uit de *in vitro* proef blijkt wel degelijk dat een mes Black Mold kan verspreiden (Figuur 22A). Nadat met een besmet mes 3 maal achter elkaar een T-snede is gemaakt blijkt dat alle drie de stammen besmet zijn met Black Mold. Bij een besmet mes dat voor korte duur is gedompeld in de middelen D, F en G wordt de overdracht van de besmetting voorkomen (Figuur 22A). Het afvegen van een besmet mes aan een schone doek is niet voldoende om alle sporen van het mes te verwijderen.

Bij een praktijkproef is op locatie 3 het mes ontsmet vlak voor aanbrengen van de T-snede. Uit deze praktijkproef zijn geen conclusies te trekken doordat er te weinig oculaties door Black Mold aangetast zijn (Figuur 22B). Het lijkt echter wel of het dopen in middel G net als in de *in vitro* proef het mes goed ontsmet.



Figuur 22. Mes behandeling *in vitro* en *in vivo*

Weergegeven is het effect van mesbehandeling *in vitro* (A) en *in vivo* (B). Significante verschillen zijn aangegeven met een letter. (ANOVA; $P < 0.05$).

4 Enquête Maatregelen 2007

Het is tot nu toe onbekend waardoor er bepaalde jaren zijn waarin grote uitbraken van Black Mold voorkomen. Aan het einde van 2007 is er een enquête gehouden of de oorzaak voor deze grote uitbraak te herleiden was. Hieruit bleek dat de oorzaak moeilijk was vast te stellen. Een aantal adviezen zijn echter wel opgesteld (PT projectnummer 13086).

De volgende adviezen waren opgesteld:

- Oculeer niet na een koude natte nacht
- Gebruik geen perceel met peen als voorvrucht
- Onderstammen niet onder natte omstandigheden planten
- Maak oculeermes regelmatig schoon.

In het jaar 2008 is er een enquête uitgevoerd door drie verschillende adviesbureaus om meer inzicht te krijgen in hoe de adviezen door de praktijk zijn overgenomen. In totaal hebben 40 kwekers meegedaan aan de enquête. De advies bureaus waren: Cultus Agro Advies (24 kwekers), DLV Plant (8 kwekers) en van Van Nederkassel (8 kwekers).

Resultaten van de enquête

Peen als voorvrucht

Black Mold veroorzaakt zwarte aantastingen op peen die in de opslag gelegen heeft. De variant van de roos en peen zijn zeer verwant aan elkaar (Bijlage 4). In 2007 is er een PT project (nummer 13086) geweest dat heeft vastgesteld dat de peen variant van Black Mold ook roos kan infecteren. Van de telers bleek 71% een perceel te gebruiken waar geen peen op heeft gestaan.

Natte omstandigheden

Volgens de meeste kwekers ontstaan de problemen met Black Mold als de oculaties gezet worden na een natte nacht of bij regen. Uit de enquête van 2008 blijkt naar aanleiding van de adviezen die eind 2007 uitgebracht zijn dat maar liefst 93% van de ondervraagde niet oculeert onder deze omstandigheden. Ook het planten van de onderstammen wordt door de meeste telers (83%) niet bij nat weer gedaan.

Oculeermes schoonmaken

Een van de infectieroutes van Black Mold kan via het oculeermes zijn. Uit de enquête van 2008 blijkt dat 48% van de telers zijn oculeermes regelmatig schoon maakt waarvan 28% dat met een ontsmettingsmiddel doet.

Conclusie

De adviezen zijn overgenomen door de praktijk. Het is echter nog niet duidelijk of dit ook geleid heeft tot een verlaging van oculatie uitval door Black Mold aangezien er niet opnieuw een seizoen is geweest met grote uitbraak van BM.

5 Algemene conclusies

- Oorzaak grootschalige Black Mold uitbraken in 2007 tot nu toe onbekend
- Beheersen van Black Mold met een bestrijdingsmiddel is mogelijk maar werkt alleen via de niet toegelaten "druppel methode" waarbij het middel direct in de T-sede wordt gedruppeld
- Middel T is meest effectief en toegelaten middel echter alleen voor een spuittoepassing
- Tot nu toe zijn er geen resistente onderstammen gevonden
- Invloed van de weersomstandigheden op grootschalige Black Mold uitbraken nog onduidelijk.
- *In vitro* heeft Black Mold een:
 - Optimale temperatuur voor myceliumgroei van 24°C
 - Optimale temperatuur voor sporenkieming van 15°C
 - Optimale temperatuur voor sporenproductie van 30°C
 - Optimale groei en kiemingsomstandigheden bij 24°C bij een normale luchtvochtigheid in totale duisternis
- Black Mold sporen in de grond kunnen tegen invriezen
- Besmetting via de grond is waarschijnlijk minimaal.
- Black Mold komt voor op plantmateriaal maar in lage concentraties
- Black Mold kan via het mes verspreid worden. Het is echter niet duidelijk of de schimmel aanwezig is op het mes.

6 Teeltadviezen

Maak oculatiemes regelmatig schoon

Het is nog onduidelijk of een infectieroute van Black Mold via het oculatie mes verloopt. Het is echter wel duidelijk dat verspreiding via het mes mogelijk is. Regelmatig schoonmaken van de messen met Spiritus of alcohol (90%) is daarom aan te bevelen.

Oculeer niet onder vochtige omstandigheden

Vochtige omstandigheden kunnen Black Mold infecties induceren. Oculeer daarom alleen droge onderstammen.

Gebruik geen percelen waar peen als voorvrucht op heeft gestaan

Black Mold kan naast rozen ook peen infecteren. Dit advies is een voorzorgsmaatregel want tot nu toe is er geen relatie aangetoond tussen grootschalige Black Mold uitbraken in rozen en peen als voorvrucht.

7 Vervolgonderzoek

Onderzoek naar effectieve bestrijdingsmiddelen heeft laten zien dat middel T de schimmel zeer effectief kan bestrijden. Echter het middel werkt alleen indien het direct in de wond wordt gebracht. De kans is klein dat er een toelating komt voor deze toepassing. Het is hierdoor echter belangrijk om telers adviezen te bieden hoe ze de aantasting van Black Mold kunnen voorkomen. Zo zou er gedacht kunnen worden aan het ontwikkelen van een soort waarschuwingssysteem. Wanneer bijvoorbeeld de optimale infectie omstandigheden van Black Mold bekend zijn is het mogelijk om situaties met hoge infectiekans te vermijden. Hiermee kan de basis voor een Black mold waarschuwingssysteem op basis van weersvoorspellingen gelegd worden. Tevens zullen hieruit teelmaatregelen komen die Black Mold beheersbaar moeten maken.

Verder is het van belang de infectiebron te kennen zodat telers passende teelmaatregelen kunnen nemen om infecties te voorkomen. Er kunnen specifieke teelmaatregelen worden genomen om het ontstaan van een infectiebron te voorkomen of om bestaande infectiebronnen te bestrijden.

8 Communicatie

Begeleidingscommissie bijeenkomsten:

- De stand van zaken 25 september 2008 Rik de Werd
- Black Mold in Rozen 18 november 2008 Roselinde Duyvesteijn
- Black Mold in Rozen 6 jan 2009, Roselinde Duyvesteijn
- Black Mold in Rozen 19 mei 2009 Arjan Smits
- Black Mold in Rozen 2 maart 2010 Roselinde Duyvesteijn

Vakblad artikelen

- Eerste bevindingen onderzoek Black Mold; Rik de Werd in samenwerking met Cultus Agro Advies; De boomkwekerij januari 2008
- Meer bekend over Black Mold; Roselinde Duyvesteijn & Edwin Kohrman; De boomkwekerij december 2008
- Steeds meer bekend over Black Mold; Arjan Smits; De boomkwekerij september 2009

Presentaties

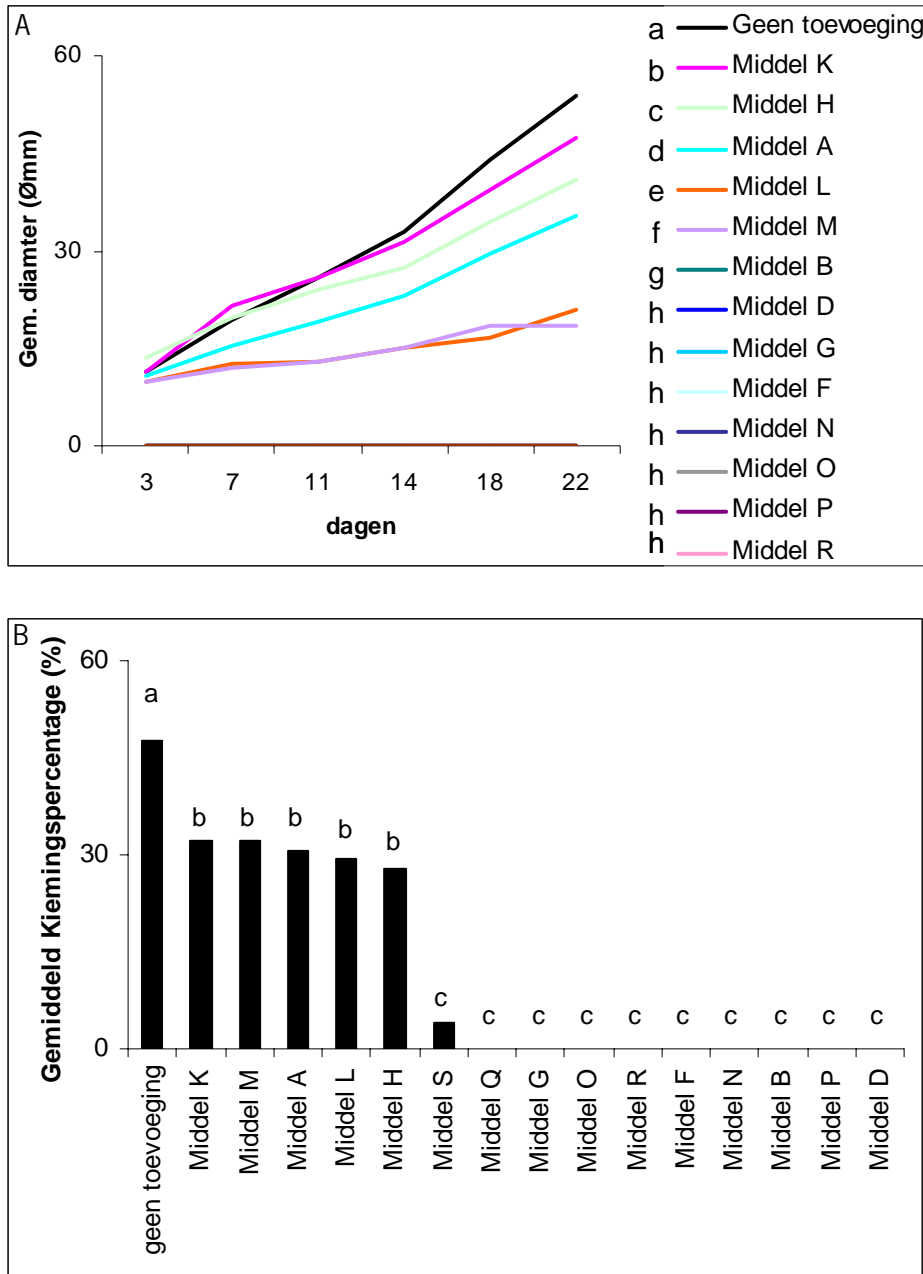
- Algemene ledenvergadering van de Nederlandse bond van boomkwekers 13 februari 2009: Black Mold in Rozen door Roselinde Duyvesteijn.
- Studieclub Horst aan de Maas 10 augustus 2009: Black Mold in Rozen door Arjan Smits

Bijlage 1 Resultaten tweede rozenhoutassay

Tabel 6. Resultaten tweede rozenhout assay. De gemiddelde symptoom index 11 dagen na inzet.

| Middel | Gemiddelde symptoom index | | |
|--------------------|---------------------------|-------|--------|
| | Dag 4 | Dag 7 | Dag 11 |
| Water | 0.9 | 1.3 | 2 |
| Onbehandeld besmet | 0.7 | 1.2 | 1.8 |
| Middel Q | 0.5 | 0.9 | 1.7 |
| Middel S | 1 | 1.2 | 1.9 |
| Middel H | 0.7 | 1 | 1.4 |
| Middel M | 0.7 | 1.2 | 1.5 |
| Middel L | 0 | 0.1 | 0.3 |
| Middel D | 0 | 0 | 0 |
| Middel O | 0 | 0 | 0.4 |
| Middel N | 0 | 0 | 0.3 |
| Middel R | 0.3 | 0.3 | 0.4 |
| Middel P | 0 | 0 | 0.1 |
| Gezonde controle | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Middel K | 0 | 0 | 0 |

Bijlage 2 Effect middelen in voedingsbodem op Black Mold



Figuur 23. Effect van bestrijdingsmiddelen op de groei (A) en kieming (B) van Black Mold. Weergegeven staat de gemiddelde kolonie diameter en het gemiddelde percentage gekiemde sporen. Significante verschillen zijn aangegeven met letters (ANOVA; $P > 0.05$).

Bijlage 3 Overzicht weergegevens

Tabel 7. Overzicht van weersgegevens per dag in juni/juli van 2007 en 2008 Volkel en van Lottum

| Weerstation | | Volkel | | | | | | | Lottum | | | |
|-------------|----|---------------|------|--------------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|--------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Neerslag (mm) | | Relatieve luchtvochtigheid (%) | | Minimum temperatuur (°C) | | Maximum Temperatuur (°C) | | Neerslag (mm) | Minimum Temperatuur (°C) | Maximum Temperatuur (°C) |
| | | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 | | | |
| Juni | 1 | | | 71 | 84 | 8.8 | 13.3 | 23.1 | 23.7 | | 10,9 | 22,6 |
| | 2 | | 30 | 69 | 74 | 12.2 | 14.1 | 24 | 29.2 | | 12 | 23,9 |
| | 3 | | 10 | 84 | 86 | 13.1 | 17.2 | 23 | 24.4 | | 13,7 | 22,6 |
| | 4 | | 0.5 | 72 | 89 | 11.9 | 14.7 | 23.9 | 21.5 | | 12,7 | 23,8 |
| | 5 | | 0.3 | 76 | 90 | 14.9 | 15.1 | 23.9 | 20.4 | | 16,3 | 24,2 |
| | 6 | | | 79 | 76 | 15 | 14.3 | 23 | 25.2 | | 14,7 | 24,8 |
| | 7 | | | 75 | 87 | 15 | 14 | 28.6 | 19.8 | | 15,9 | 28,4 |
| | 8 | | | 71 | 80 | 18.1 | 12.6 | 31.9 | 26.9 | | 19 | 31,4 |
| | 9 | 11 | | 92 | 64 | 16.9 | 11.5 | 21.6 | 27.4 | | 17,2 | 22,5 |
| | 10 | 3 | | 88 | 72 | 15.2 | 11.1 | 23.7 | 24.3 | | 15,1 | 25,1 |
| | 11 | | | 85 | 73 | 15 | 9.5 | 26.1 | 19.1 | | 14,6 | 28,1 |
| | 12 | 0.5 | 7 | 93 | 91 | 15 | 6.7 | 19 | 12.6 | 1 | 15,1 | 20,1 |
| | 13 | | 0.4 | 83 | 76 | 14.4 | 7.9 | 23.5 | 15.7 | 1,2 | 14,5 | 24,1 |
| | 14 | 7 | 0.7 | 81 | 83 | 13.5 | 7.2 | 26.6 | 15.3 | 0 | 13,8 | 25,8 |
| | 15 | 0.3 | 6 | 81 | 85 | 17.3 | 6.9 | 22.7 | 18 | 1,6 | 16,3 | 21,5 |
| | 16 | 6 | | 82 | 74 | 13.7 | 2.7 | 21.3 | 18.8 | 2,6 | 14,2 | 20,1 |
| | 17 | 4 | | 76 | 70 | 13.6 | 4.1 | 22 | 20.9 | | 13,5 | 23,2 |
| | 18 | 6 | | 89 | 70 | 14.7 | 7.2 | 22.3 | 21.5 | 11,2 | 14,9 | 22,2 |
| | 19 | | 0.4 | 77 | 78 | 10 | 11.2 | 25.8 | 20 | | 12,1 | 26,7 |
| | 20 | | 0.1 | 78 | 73 | 17.4 | 9 | 23.4 | 21.2 | 1 | 18,4 | 24,8 |
| | 21 | 1 | | 83 | 71 | 15.7 | 12.4 | 19.5 | 23.7 | 1,6 | 13,7 | 18,2 |
| | 22 | 2 | 0.1 | 83 | 71 | 13 | 17.1 | 21.9 | 28.6 | 4,2 | 12,5 | 21,4 |
| | 23 | 11 | | 90 | 66 | 12.9 | 10.9 | 20.6 | 20.7 | 3,4 | 13,3 | 19,9 |
| | 24 | 3 | | 86 | 67 | 11.2 | 6.8 | 19.6 | 23.4 | 0,2 | 13,5 | 20,1 |
| | 25 | 3 | 0.8 | 86 | 69 | 14.8 | 12.7 | 20.6 | 24.7 | 6,6 | 12,7 | 19,6 |
| | 26 | 5 | 0 | 86 | 68 | 9.9 | 9.9 | 15.9 | 23.6 | 2,8 | 10,6 | 15,8 |
| | 27 | 2 | | 76 | 68 | 7.8 | 12.2 | 17.4 | 21.1 | 2,8 | 8,6 | 17,4 |
| | 28 | | 0.5 | 71 | 79 | 11.8 | 15.5 | 18.9 | 23.3 | 1,4 | 11,8 | 19,4 |
| | 29 | | | 82 | 72 | 12.4 | 11.1 | 17.4 | 23.5 | 0,4 | 13,6 | 17,5 |
| | 30 | | | 82 | 71 | 13.7 | 10.9 | 20.2 | 24.5 | | 14,9 | 20,6 |
| Juli | 1 | 0.3 | | 79 | 65 | 16.1 | 7.6 | 25.6 | 28.6 | 0,6 | 16,4 | 25,9 |
| | 2 | | 7 | 82 | 72 | 15.6 | 12.7 | 21.6 | 32.3 | 4,6 | 15,6 | 20,5 |
| | 3 | | 4 | 89 | 92 | 14 | 17.6 | 18 | 19.6 | 19,6 | 13,2 | 16,9 |
| | 4 | | 0.3 | 91 | 78 | 11 | 11.4 | 17 | 21.5 | 8,6 | 12 | 17,5 |
| | 5 | | 0.2 | 83 | 76 | 13 | 8.2 | 20.3 | 25.2 | 3,4 | 13 | 19,4 |
| | 6 | 1 | | 78 | 68 | 13.3 | 15.4 | 18.6 | 23.2 | 0,8 | 13,8 | 17,3 |
| | 7 | | 5 | 73 | 78 | 13 | 13.5 | 21.4 | 19.4 | | 12,8 | 21,3 |
| | 8 | | 0.6 | 76 | 77 | 8.4 | 13.9 | 23.2 | 19.6 | 0,2 | 10 | 23,5 |
| | 9 | | 10 | 76 | 84 | 12.4 | 10.6 | 20.3 | 21.2 | 0,2 | 12,2 | 18,6 |
| | 10 | 2 | 16 | 85 | 91 | 7.5 | 14.8 | 19.8 | 22.8 | 4,6 | 9,2 | 17,8 |
| | 11 | | 6 | 86 | 85 | 9.6 | 13.7 | 18.9 | 22 | | 11 | 18,1 |
| | 12 | 1 | 4 | 88 | 79 | 10.6 | 13.9 | 20.6 | 19 | | 12,5 | 19,6 |
| | 13 | | | 82 | 76 | 15.9 | 7.4 | 26.1 | 21.2 | | 16,1 | 25,1 |
| | 14 | | | 70 | 72 | 19 | 8.1 | 27.3 | 23 | | 16,9 | 25,5 |
| | 15 | | | 72 | 84 | 13.1 | 10.7 | 32 | 20.8 | 3,4 | 13,7 | 31,2 |
| | 16 | 1 | 2 | 75 | 78 | 19.7 | 15.3 | 28.8 | 20.1 | | 17,8 | 28 |
| | 17 | | 4 | 72 | 88 | 15.5 | 11.2 | 24.4 | 18.5 | 4,4 | 15,5 | 23,1 |
| | 18 | | 9 | 74 | 91 | 11.8 | 12.8 | | 18.7 | | 11,6 | 23,9 |
| | 19 | | 2 | 77 | 83 | 10.4 | 15.2 | | 21.1 | | 11 | 22,9 |
| | 20 | | 3 | 88 | 82 | 15.3 | 11.9 | 22.7 | 17.8 | 9,8 | 15,1 | 20,8 |
| | 21 | | 5 | 71 | 91 | 11.4 | 9.1 | 23.8 | 14.8 | 0 | 11,8 | 22,9 |
| | 22 | | 0.2 | 83 | 79 | 12.6 | 12.4 | 21.9 | 21.3 | 4,8 | 12,4 | 20,2 |
| | 23 | 5 | 0.2 | 89 | 86 | 8.4 | 11.5 | 19.3 | 20.8 | 6,6 | 9,8 | 17,8 |
| | 24 | | | 81 | 72 | 13.9 | 11.8 | 20 | 25.8 | 6,4 | 13,9 | 18,4 |
| | 25 | | | 78 | 70 | 12 | 13.7 | 23 | 28 | | 12,7 | 22,2 |
| | 26 | 6 | 5 | 80 | 80 | 13.7 | 16.9 | 22 | 29.1 | 4,4 | 13,7 | 21,2 |
| | 27 | 1 | | 75 | 81 | 14.8 | 16 | 22.5 | 28.2 | 7 | 14,5 | 21,2 |
| | 28 | 18 | 0.8 | 81 | 81 | 14.3 | 19.7 | 21.4 | 28.3 | 16,2 | 13,9 | 20 |
| | 29 | 15 | 0.4 | 86 | 85 | 13.2 | 17.7 | 18.9 | 24.9 | 16,8 | 10,8 | 17,3 |
| | 30 | 4 | | 78 | 75 | 7.7 | 15.6 | 17.7 | 27.7 | 6 | 9 | 16,7 |
| | 31 | | | 77 | 71 | 7.2 | 15.8 | 19 | 30.4 | | 8,2 | 19,1 |

Bijlage 4 DNA sequenties Black Mold

A)

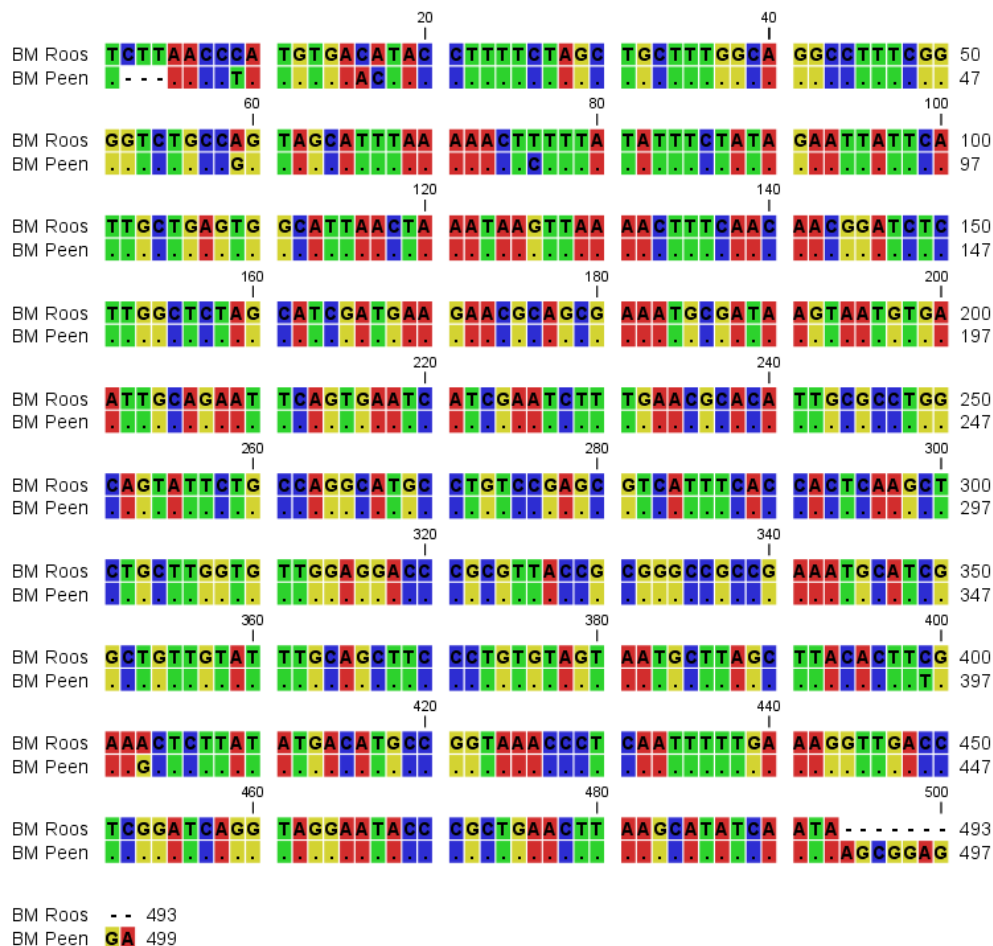
Roos

TCTTAACCCATGTGACATACCTTTTCTAGCTGCTTTGGCAGGCC**CTTTCGGGGTCTGCCAGTAG**CATTTAAAAACTTTTATATTTCT
 ATAGAATTATTCATTGCTGAGTGGCATTAACTAAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTAG**CATCGAT**GAAGAA
 CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT**CATCGA**ATCTTTGAACGCACATTGCGCCTGGCAGTATTC
 TGCCAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGAGGACCCGCGTTACCGCGGGCCGCCGAA
 ATGCATCGGCTGTTGATTTGCAGCTCCCTGTGTAGTAATGCTTAGCTTACACT**CTTCGA**AACCTTTA**TATGACATGCCGGTAAACC**
CTCAATTTTGAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

Peen

TAACCTATGTGAACTACCTTTTCTAGCTGCTTTGGCAGGCC**CTTTCGGGGTCTGCCGGTAG**CATTTAAAACTTTTATATTTCTATA
 GAATTATTCATTGCTGAGTGGCATTAACTAAATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTAG**CATCGA**TGAAGAACGC
 AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT**CATCGA**ATCTTTGAACGCACATTGCGCCTGGCAGTATTCTGC
 CAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGAGGACCCGCGTTACCGCGGGCCGCCGAAATG
 CATCGGCTGTTGATTTGCAGCTCCCTGTGTAGTAATGCTTAGCTTACACTTTGAAGCTTTA**TATGACATGCCGGTAAACCC**TC
 AATTTTGAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

B)



Figuur 24. ITS DNA sequenties van *Chalaropsis thielavioides*.

Weergegeven staat de Black Mold ITS (internal transcribed spacer) sequentie van de roos en peen variant (A). Forward en reversed primer zijn respectievelijk blauwe en rode onderstreepte nucleotide. Restrictiesite van *TagI* is dikgedrukt. Daaronder staat een alignment van beide varianten (B). Overeenkomstige nucleotide zijn aangegeven met *.