

P13

STICHTING LABORATORIUM VOOR
BLOEMBOLLENONDERZOEK
POSTBUS 85 - 2160 AB LISSE



LABORATORIUM VOOR
BLOEMBOLLENONDERZOEK
BULB RESEARCH CENTRE

**Biologische bestrijding van Botrytis cinerea
in de bloementeel van tulp**
Intern LBO-Rapport nr: 055
december 1995

M.G. Pennock-Vos en A.S. van Bruggen

**Biologische bestrijding van Botrytis cinerea
in de bloementeel van tulp**
Intern LBO-Rapport nr: 055
december 1995

M.G. Pennock-Vos en A.S. van Bruggen

© 1995 **Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Lisse**

Niets uit dit intern rapport mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze ook zonder voorafgaande toestemming van de samensteller.

Het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij stelt zich niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij het gebruik van de gegevens die in dit intern rapport zijn gepubliceerd.

2281347

Biologische bestrijding van *Botrytis cinerea* in de bloementeelt van tulp.

project 314

Ineke Pennock en A.S. van Bruggen
Oktober 1994

INHOUDSOPGAVE

HOOFDSTUK 1	ALGEMENE INLEIDING	1
	<i>Biologische bestrijding van Botrytis cinerea in de bloementeel van tulp</i>	1
HOOFDSTUK 2	IN VITRO PROEVEN 1988-1991	2
2.1	<i>Methodiek in vitro proeven</i>	2
2.1.1	<i>Isolaten van pathogeen en antagonisten</i>	2
2.1.2	<i>Inoculumproduktie Botrytis cinerea</i>	2
2.2	<i>Experimenten</i>	4
2.2.1	<i>Aantasting niet-verwonde bollen door B.cinerea</i>	4
2.2.2	<i>Kieming sporen B. cinerea op millipore filters op petrischalen met grond</i>	4
2.2.3	<i>Streptomyces als mogelijke antagonist</i>	5
2.2.4	<i>Effect toxische stoffen gevormd door Penicillium sp. op groei B. cinerea</i>	7
2.2.5	<i>Herisolaties antagonisten uit steriele potgrond</i>	8
2.2.6	<i>Herisolaties antagonisten en B. cinerea uit wel/niet steriele grond</i>	9
2.2.7	<i>Doding van B. cinerea mycelium door antagonisten</i>	10
2.2.8	<i>Effect van antagonisten op vitaliteit van B. cinerea sclerotiën</i>	11
HOOFDSTUK 3	IN VITRO PROEVEN 1992-1994	13
3.1	<i>Methodiek in vitro proeven</i>	13
3.2	<i>Herisolaties antagonisten en Botrytis cinerea uit grond</i>	13
3.2.1	<i>Vergelijking aardemeel (a.m) en zand/zemelen (z.z.)</i>	14
3.2.2	<i>Groei antagonisten in niet-steriele grond</i>	15
3.2.3	<i>Groei antagonisten en Botrytis in niet-steriele grond</i>	16
3.3	<i>Effect vluchtige stoffen van antagonisten op groei B. cinerea</i>	17
3.4	<i>Effect van antagonisten op kieming van sclerotiën van B. cinerea, in zand</i>	17
HOOFDSTUK 4	IN VIVO PROEVEN (BROEIPROEVEN) 1988-1994	20
4.1	<i>Proeven met vriestulpen</i>	20
4.2	<i>Bepalen inoculumconcentratie B. cinerea voor broeiproeven</i>	20
4.2.1	<i>Effect van verwonding</i>	20
4.2.2	<i>Vergelijking grondbesmetting en bolbesmetting</i>	22
4.2.3	<i>Bolbesmetting</i>	23
4.3	<i>Effect van oude potgrond op aantasting van tulpen door Botrytis cinerea</i>	24
4.4	<i>Proeven met mogelijke antagonisten tegen Botrytis cinerea</i>	25
4.4.1	<i>Proeven I en II (1988 en 1989)</i>	26
4.4.2	<i>Proef III. (1989/1990)</i>	27
4.4.3	<i>Methode voor overige proeven</i>	29
4.4.4	<i>Proef IV (1990/1991)</i>	30
4.4.5	<i>Proef V (1990-1991)</i>	31
4.4.6	<i>Proef VI (1991/1992)</i>	32
4.4.7	<i>Proef VII en VIII. (1992/1993)</i>	34
4.4.8	<i>Proeven IX, X en XI (1993/1994)</i>	38

HOOFDSTUK 5 EFFECT VAN OMSTANDIGHEDEN OP B. CINEREA

BOLAANTASTING 42

5.1 *Bolaantasting door B. cinerea wanneer de bollen gedurende*
 verschillende periodes zijn opgeplant 42

5.2 *Effect rooitijdstip op vatbaarheid van de bollen voor B. cinerea*
 (1994) 42

LITERATUURLIJST 44

HOOFDSTUK 1 ALGEMENE INLEIDING

Biologische bestrijding van Botrytis cinerea in de bloementeelt van tulp

Op het LBO is onderzoek gedaan naar de mogelijkheden van biologische bestrijding van *Botrytis cinerea* in de tulpenbroei. Daarbij werd ervan uitgegaan dat het in de praktijk bekend is, dat in potgrond waarin al eens tulpen gebroeid zijn, minder *B. cinerea* aantasting voorkomt dan in verse of gestoomde grond. Dit effect wordt toegeschreven aan antagonisten die zich in de gebruikte potgrond gevestigd hebben. Deze antagonisten zouden misschien als biologische bestrijders toegepast kunnen worden in verse potgrond om aantasting te voorkomen.

Uit gebruikte grond zijn schimmels geïsoleerd en vervolgens getoetst op hun antagonistisch vermogen. Tevens is onderzocht of schimmels die in andere gewassen een antagonistische werking hebben tegen *B. cinerea*, ook in staat zijn *B. cinerea* in de broeierij van tulpen te onderdrukken.

Om te bepalen of de antagonisten kunnen werken als biologische bestrijders zijn ze getoetst in een nagebootst kistenbroei-systeem. Voor toepassing in de broeierij moet de antagonist vooral actief zijn in de grond bij 9 °C, tijdens de koude bewaring na planten. In de proeven werden de antagonisten (vnl. *Trichoderma* isolaten) zes weken voor planten aan de potgrond toegediend en *B. cinerea* werd bij het planten op de bol aangebracht. Zes weken na planten werden de bollen beoordeeld op symptomen.

De antagonisten gaven in dit toetssysteem erg wisselende resultaten. Het is daardoor niet te voorspellen wat de effecten zullen zijn onder praktijkomstandigheden.

Het onderzoek is afgesloten omdat er te weinig perspectieven zijn voor toepassing van de antagonisten in de broeierij.

HOOFDSTUK 2 IN VITRO PROEVEN 1988-1991

Om in vitro antagonisten te kunnen selecteren, vooral in de periode dat er geen in vivo experimenten (broeiproeven) kunnen worden uitgevoerd, is een goede toetsmethode nodig. Een voorwaarde voor een dergelijke methode is dat er correlatie moet zijn met de in vivo experimenten, zowel voor de schimmels met als zonder antagonistisch effect. Daarnaast moeten de resultaten herhaalbaar zijn.

2.1 Methodiek in vitro proeven

2.1.1 Isolaten van pathogeen en antagonisten

Isolaten: -pathogeen:	<i>Botrytis cinerea</i> I3558-41; Ronilan en BCM resistent	
-antagonisten: (1988-1991)	<i>Streptomyces</i> sp. I21	
	<i>Gliocladium roseum</i> I3780	van Cz. Skrzypczak
	<i>Trichoderma hamatum</i> IIIB6	triple-agar-layer
	<i>Trichoderma viride</i> IVA2	method (pers. meded.)
	<i>Penicillium</i> sp. S28	proef P. Muller;
	<i>Streptomyces</i> sp. I2875	geïsol. uit oude pot
	<i>Trichoderma</i> sp. I2200	grond en boomschors
	<i>Acrophialophora levis</i> I2874	(Muller, 1990)
	<i>Trichoderma viride</i> T004	van J. Köhl; koude
	<i>Trichoderma viride</i> T226	tolerant; geïsol. uit
	<i>Trichoderma viride</i> T218	boomschors (Kohl, 1989)

Van *Botrytis cinerea* en de antagonisten die werden getest in het onderzoek werden de temperatuur-optima bepaald. De isolaten werden daarvoor geënt op voedingsbodem: in het algemeen was dit moutagar. *Streptomyces* sp. werd geënt op KW medium (zie blz 5) en *G. roseum* op Czapek dox agar (= cda). Vervolgens werd geïncubeerd bij de verschillende temperaturen en op een aantal tijdstippen werd de groei gemeten vanaf tijdstip $t=0$. Tenslotte werden de temperatuur optima berekend.

Temperatuur optima:	<i>Botrytis cinerea</i> :	20/25 °C
	<i>Acrophialophora levis</i> :	40
	<i>Streptomyces</i> sp.:	20
	<i>Gliocladium roseum</i> :	25
	<i>Trichoderma hamatum</i> :	27,5
	<i>Trichoderma viride</i> :	25
	<i>Penicillium</i> sp.:	20/25

2.1.2 Inoculumproductie *Botrytis cinerea*

B. cinerea werd gekweekt op moutagar (m.a.). Ponsstukjes met mycelium of sporensuspensies werden geënt op m.a. en geïncubeerd in de stoof bij 25°C, gedurende

ongeveer 5 dagen. Daarna werden de schalen onder UV licht gezet tot er volop sporulatie was. Schalen die niet onder UV licht waren geweest produceerden beduidend minder sporen. Voor inoculatie werden nooit schalen gebruikt die ouder waren dan 14 dagen, omdat uit literatuur bekend is (fig. 1) dat daarna de pathogeniteit snel kan teruglopen (niet de kiemkracht!). Deze schalen met een goede sporulatie werden gebruikt om sporensuspensies voor inoculum te maken. Om de culture in stand te houden werden schalen overgeënt die niet onder UV licht waren geweest (om eventuele mutaties van de schimmel door het U.V. licht te vermijden).

fig. 1: Kieming en infectie van sporen uit cultures van verschillende leeftijden.
(Blakeman, 1980)

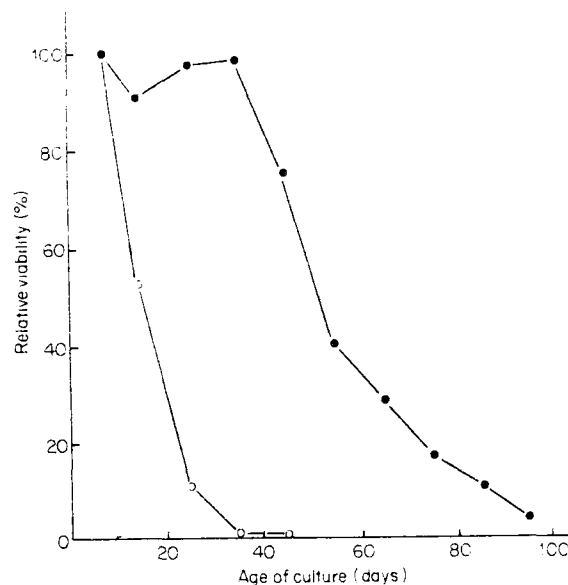


FIG. 1 Relative abilities of conidia of *Botrytis fabae* from cultures of different ages to germinate (●) and to infect (○) broad bean leaves at 20°C. From Last (1960)

2.2 Experimenten

2.2.1 Aantasting niet-verwonde bollen door *B. cinerea*

Skrzypczak had in 1988 bijna uitsluitend gewerkt met kunstmatig verwonde bollen. Deze zijn erg vatbaar voor *B. cinerea*. In deze proef wordt nagegaan of ook niet-verwonde bollen kunnen worden aangetast.

Methode

Kaalgemaakte bollen werden in plastic teiltjes met vochtig vermiculite gezet, half in de vermiculite, en afgedekt met plastic.

Inoculeren: PVC ringetjes werden gevuld met agar met of zonder sporen van *B. cinerea* ($1,25 \times 10^7$ sp/ml), en vastgezet op de bollen.

De bollen werden geïncubeerd bij 20°C.

Resultaten

Controles agar zonder sporen *B. cinerea*: geen lesies (totaal 25 bollen)

Agar met sporen *B. cinerea*: onder de inoculatieplaats bruine lesies, vaak groter dan doorsnede inoculumponsje, bij 14 van totaal 15 bollen (=93%)

Conclusie

Oók niet-verwonde bollen kunnen worden aangetast door *B. cinerea*

2.2.2 Kieming sporen *B. cinerea* op millipore filters op petrischalen met grond

Met behulp van de milliporefilter methode kunnen de effecten van antagonisten op de kieming van sporen van *B. cinerea* bepaald worden, indien de antagonisten toxische stoffen in de grond kunnen afscheiden.

De antagonist werd door grond gemengd in petrischalen, en een sporensuspensie van *B. cinerea* werd aangebracht op een millipore filter en bovenop de grond gelegd. De eventueel door de antagonist gevormde toxische stoffen diffunderen door het filter en kunnen de kiemkracht van de sporen beïnvloeden. Het aantal gekiemde sporen werd onder de microscoop geteld.

Uit proeven (zonder antagonist, om alleen de kieming van de sporen van *B. cinerea* te bestuderen) kwamen de volgende punten naar voren voor uitvoeren van de toets:

- de beste concentratie van de sporensuspensie om losse sporen te kunnen tellen onder de microscoop (vergroting 45x): 3×10^5 sp/ml.
- 50 µl sporensuspensie werd aangebracht op een millipore filter, dan even laten indrogen.
- steriele filters met sporen werden op steriele potgrond in petrischalen gelegd; na 24 uur incuberen bij 9 °C waren de sporen gekiemd.

- sporen werden op het filter gekleurd met katoenblauw + 0,1% fuchsine, gedurende 1 uur bij 50 °C.
- met een kurkboor werd het gedeelte met sporen uitgeponst en onder de microscoop beoordeeld. Gekiemde sporen waren goed te tellen.

2.2.3 *Streptomyces* als mogelijke antagonist

Naar aanleiding van het werk van Skrzypzak is veel aandacht besteed aan *Streptomyces* sp (isolaat I21) als mogelijke antagonist.

Productie van Streptomyces sp.

Streptomyces sp. bleek het snelste te groeien op het voedingsmedium dat Küster en Williams beschreven (1964), dat verder het KW medium genoemd zal worden:

glycerol	10	gram
caseïne (vitamin free)	0,3	
KNO ₃	2	
NaCl	2	
K ₂ HPO ₄	2	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05	
CaCO ₃	0,02	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	
Bacto-agar	18	
Aqua dest	1000	ml

pH: 7,0-7,2

Omdat tellen van het aantal sporen in een sporensuspensie niet mogelijk is met *Streptomyces* sp. (er worden geen losse sporen gevormd) werden de dichtheden van suspensies gemeten met de nephelometer. Eerst werd een ijklijn bepaald: een suspensie van *Streptomyces* sp. werd verdund en uitgeplaat op KW medium, en een verdunningsreeks werd gemeten in de nephelometer. De concentratie van de suspensie werd berekend aan de hand van het aantal uitgegroeide kolonies en vergeleken met de waarden van de nephelometer. Zo kon worden berekend, dat de standaardwaarde overeenkwam met $3,75 \times 10^7$ sporen/ml. Voor de proeven werden de dichtheden van de suspensies vergeleken met deze standaardwaarde. Suspensies werden altijd eerst gecentrifugeerd gedurende 20 min. bij 4000 rpm voordat de dichtheid gemeten werd.

Bepalen temperatuur optimum: schalen KW werden beënt met *Streptomyces* sp. en bij 25°C gezet. Na 5 dagen werden van 10 kolonies per schaal de diameters gemeten. De schalen werden daarna bij de verschillende temperaturen gezet, 5 schalen per temperatuur (=t=0). Na 13 dagen werden de diameters van dezelfde kolonies opnieuw gemeten. Het verschil in diameters tussen t=13 dagen en t=0 geeft een waarde voor de groei bij een bepaalde temperatuur.

	gemiddelde groei in 13 dagen:	per dag :
5°C	1,3 mm	0,1
9°C	3,7	0,29
13°C	4,6	0,35
20°C	7,6	0,59
25°C	6,0	0,46
30°C	6,1	0,47

Bij hogere temperatuur waren de schalen donkerder rondom de *Streptomyces* kolonies (meer produktie antibiotica?).

De optimum voor de temperatuur voor groei is 20°C.

Kieming van B. cinerea op millipore filters op grond met Streptomyces sp.

Streptomyces sp. werd door steriele potgrond gemengd in petrischalen: 1 ml sporensuspensie

3,75 x 10⁶

3,75 x 10⁴

3,75 x 10²

sporen per gram grond, 20 gram grond per petrischaal

Schalen werden 7; 4; of 0 dagen voorgeïncubeerd , voordat sporen van *B. cinerea* op filters op de grond werden aangebracht (50 ul, 3 x 10⁵ sp/ml). Controle: *B. cinerea* sporen op filter op steriele grond zonder *Streptomyces* sp.

De proef werd uitgevoerd in 2 herhalingen en later is de proef in zijn geheel nog eens herhaald.

Resultaten: percentages gekiemde sporen

voorinc.	sp/g grond	herh.	PROEF 1		PROEF 2	
			1	2	1	2
	0 (controle)		70	91	99	98
7 dagen	3,75 X 10 ⁶		99	99	88	88
	10 ⁴		97	99	96	93
	10 ²		1	47	98	94
4 d.	3,75 X 10 ⁶		87	99	99	98
	10 ⁴		99	100	97	98
	10 ²		90	96	95	99
0 d.	3,75 X 10 ⁶		92	93	97	98
	10 ⁴		92	95	95	94
	10 ²		95	99	93	99

Conclusie

Streptomyces had geen duidelijk effect op kieming van sporen van *Botrytis* in deze 2 proeven.

Herisolaties van Streptomyces uit steriele potgrond

Herisolaties uit steriele potgrond zijn met alle andere antagonisten goed gelukt, maar niet met *Streptomyces* sp. Het is niet duidelijk of *Streptomyces* sp. wel door grond kan groeien.

NB. Verder onderzoek naar dit isolaat van *Streptomyces* sp. als mogelijke antagonist is gestaakt, omdat uit een aantal proeven geen positieve resultaten kwamen: geen effect op de kieming van sporen van *B. cinerea* (op millipore filter); geen goede herisolaties uit potgrond mogelijk; geen antagonistisch effect in broeiproef (zie in vivo proeven).

2.2.4 Effect toxische stoffen gevormd door *Penicillium* sp. op groei *B. cinerea*

Op moutagar schalen werden millipore filters gelegd, en daarop werd *Penicillium* geënt. Na 6 dagen werd het filter verwijderd en werd op die plaats *B. cinerea* geënt, om na te gaan of deze nog kon uitgroeien, of geremd werd door eventuele toxische stoffen in de m.a. die gevormd waren door *Penicillium*.

Later bleek dat alleen *Penicillium* op de m.a. uitgroeide, dat van het filter op de agar was terechtgekomen.

Het proefje werd herhaald met dialysemembraan in plaats van milliporefilter. Dit bedekt de hele schaal. Het dialysemembraan was geautoclaveerd in petrishalen met water. *Penicillium* werd op het membraan geënt en na 6 dagen werd *B. cinerea* op de moutagar geënt, zowel ponsstukje agar met mycelium als sporensuspensie. *B. cinerea* groeide in beide gevallen uit

(mycelium > sporensuspensie) maar ook waren er weer kolonies van *Penicillium*. De methode moet dus nog worden bijgewerkt; *Penicillium* moet worden verwijderd voordat sporen zijn gevormd.

2.2.5 Herisolaties antagonisten uit steriele potgrond

Voor (in vivo) experimenten kan het nodig zijn antagonisten gedurende een bepaalde tijd te incuberen in potgrond. Om te weten of een antagonist zich kan handhaven in potgrond moet het verloop van de populatie gevolgd kunnen worden, bijv. door middel van herisolaties.

Methode

Bekerglazen met 1 liter steriele potgrond werden beënt met antagonist, 10^6 sporen/liter (2 herhalingen). Bekerglazen werden geïncubeerd bij de optimale temperatuur voor de groei van de antagonist. Wekelijks werden herisolaties gemaakt tot een periode van 8 weken.

- per bekglas werden monsters van 5 gram grond in een reageerbuis genomen
- 20 ml 0.02% Tween toevoegen
- 30 sec. mixen met de Vortex
- 5 min. laten uitzakken
- uitplaten, 5 herhalingen (voedingsbodem afh. van antagonist)

Het aantal uitgegroeide kolonies per schaal kan omgerekend worden tot het aantal kolonies per gram grond.

Resultaten

Het aantal kolonies per gram grond bleef toenemen tot 8 weken, het einde van de proef. Na 8 weken werden de volgende aantallen kolonies per gram potgrond van de antagonisten geïsoleerd:

<i>A. levis</i>	$2,15 \times 10^8$
<i>T. hamatum</i>	$1,25 \times 10^9$
<i>T. viride</i>	$3,90 \times 10^8$
<i>Penicillium</i> sp.	$2,85 \times 10^9$
<i>G. roseum</i>	$1,59 \times 10^9$
<i>Streptomyces</i> sp.	geen herisolaties mogelijk

Extra voeding voor de antagonist (havermost 1%) had geen noemenswaardig effect op de groei van de antagonist in steriele potgrond.

Herisolaties van antagonisten uit potgrond werden bij iedere in vivo proef uitgevoerd: na voorincubatie van de antagonist bij de optimum temperatuur werden eerst de aantallen kolonies per gram grond bepaald om te controleren of de antagonist de grond goed had gekoloniseerd, voordat de bollen werden geïnoculeerd en geplant.

2.2.6 Herisolaties antagonisten en *B. cinerea* uit wel/niet steriele grond

Het doel van deze proef was, te bepalen, of de antagonist zich in de grond kan handhaven in aanwezigheid van *B. cinerea* en of de antagonist invloed heeft op het aantal kolonies van *B. cinerea* in de grond.

De antagonisten (*Trichoderma viride*, isolaten T004; T218; T226 en *Penicillium sp.*) werden afzonderlijk geënt in steriele potgrond en 6 weken geïncubeerd bij 25°C. Daarna werd *B. cinerea* geënt in deze potgrond met antagonist, en geïncubeerd bij 9°C. Herisolaties werden gemaakt na 6 weken 25°C (aantal kolonies antagonist), en na 4 weken 9°C (aantallen kolonies antagonist en *B. cinerea*). Ook bij het begin van de proef, direct na enten van de antagonist, werden herisolaties gemaakt.

Deze proef werd uitgevoerd in gesteriliseerde potgrond. Daarnaast is ook bekeken, of de antagonist kon groeien in niet-steriele potgrond. T004 en T218 werden geënt in niet-steriele potgrond en na 6 weken 25°C werden herisolaties gemaakt.

Methode

- concentratie antagonisten: 10 ml. sporensuspensie geënt, uiteindelijk 10^6 sporen/liter grond
- op t=0 zijn ter controle de suspensies van antagonist uitgeplaat (uitgangssuspensie geteld: 10^5 sp/ml). Concentraties suspensies berekend aan de hand van uitgroei op agar (gem. 5 schalen):

T004: $4,8 \times 10^4$ sp/ml	T218: 6×10^4 sp/ml
T226: $4,6 \times 10^4$ sp/ml	Pen.: $3,1 \times 10^5$ sp/ml
- *B. cinerea*: 10 ml sporensuspensie, uiteindelijk 10^5 sporen/l grond
- behandeling met *Penicillium*: na 6 weken 25°C werd 1 bekerglas wel en 1 bekerglas niet geautoclaveerd (wel: alleen effect aanwezige toxische stoffen op *B. cinerea*)
- Herisolaties: per bekerglas werden 3 monsters genomen en uitgeplaat op moutagar + antibiotica. Herisolaties uit niet-steriele grond ook op een selectief medium voor *Trichoderma*.
Herisolaties *B. cinerea* uit grond met antagonist: op moutagar + benomyl, zodat antagonist niet kan uitgroeien.

Resultaten

Herisolaties uit gesteriliseerde potgrond:

- direct na enten van de antagonist: goede uitgroei van de *Trichoderma* isolaten: ongeveer 10^3 kolonies per gram grond.
Uitgroei van *Penicillium* was ongeveer 30 kolonies per gram grond.
- na 6 weken 25°C hadden alle antagonisten de grond goed gekoloniseerd (ongeveer 10^7 kolonies per gram grond).

- na 4 weken 9°C: veel verontreinigingen, nauwelijks uitgroei van zowel antagonisten als van *B. cinerea*.

Herisolaties uit niet steriele potgrond: op alle tijdstippen veel uitgroei van verontreiniging (niet bekend welke schimmel) en zeer weinig uitgroei van *Trichoderma*.

Conclusies

Potgrond is moeilijk te steriliseren en steriel te houden. In het vervolg is het beter in plaats van bekerglazen grote wijdhalserveniers te gebruiken. Deze zijn beter af te sluiten. Het lijkt ook zinvol om naast potgrond een ander substraat te gebruiken, bijv. zand. Dit is beter te autoclaveren.

Bij niet-steriele grond moet extra voeding voor antagonist worden toegevoegd (bijv. zemelen).

2.2.7 Doding van *B. cinerea* mycelium door antagonisten

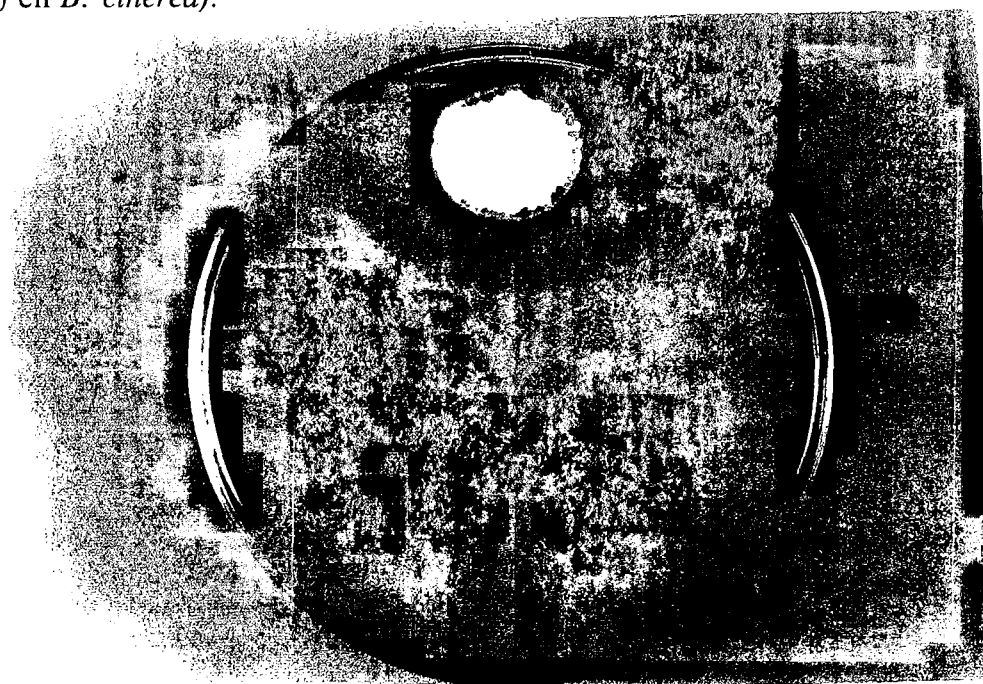
1. Antagonisten werden tegenover *B. cinerea* op moutagar geënt en geïncubeerd bij 9°C. Antagonisten die langzamer groeiden dan *B. cinerea* (vooral bij 9°C) werden eerst afzonderlijk geënt en voorgeïncubeerd bij 25°C.

Wanneer de antagonist *B. cinerea* overgroeid had werd microscopisch beoordeeld op mycoparasitisme.

Bij geen van de mogelijke antagonisten werd mycoparasitisme waargenomen. Soms waren er hyphen die langs of over elkaar heen groeiden (*T. viride* isolaten T004, T218, T226) maar er was nooit duidelijk contact met hyphen van *B. cinerea*.

De proef werd herhaald met P.D.A. Omdat dit medium minder voedingsstoffen bevat zouden de antagonisten eerder genoodzaakt kunnen zijn over te gaan op mycoparasitisme. Ook op deze voedingsbodem werd echter geen parasitisme van mycelium van *B. cinerea* waargenomen.

A. levis en *Penicillium* sp. vormden (grote) remmingszones om *B. cinerea* (zie foto: *A. levis* (boven) en *B. cinerea*).



Deze methode wordt ook in het algemeen te weinig betrouwbaar geacht voor vergelijking met in vivo situaties.

2. *B. cinerea* werd tegenover een antagonist geënt op moutagar. Wanneer de antagonist *B. cinerea* net had overgroeid, en ongeveer een week later (en soms op nog meer tijdstippen met steeds ongeveer een week ertussen) werden ponsstukjes m.a. met antagonist en *B. cinerea* overgeënt op moutagar + 25 ppm benomyl. De antagonist kan hierop niet uitgroeien, *B. cinerea* is resistent voor benomyl en kan wel uitgroeien. Op deze manier kan bepaald worden of *B. cinerea* uitgroeit of gedood is door de antagonist (methode Köhl, 1989).

Doding van mycelium van *B. cinerea* door antagonisten is op deze manier onderzocht met de antagonisten *T. viride* isolaten T226 en T004 en *G. roseum*.

T226 en T004 waren in de broeiproef 90/91 goede antagonisten en waren ook in deze in vitro proef in staat uitgroeien van mycelium van *B. cinerea* te verhinderen.

G. roseum had geen antagonistisch effect in de broeiproef. In deze in vitro proef was er geen uitgroeien van mycelium van *B. cinerea* bij de behandeling met *G. roseum*.

Tussen deze in vitro methode en het in vivo experiment is geen correlatie. De methode is daarom niet bruikbaar voor het selecteren van antagonisten.

2.2.8 Effect van antagonisten op vitaliteit van *B. cinerea* sclerotien

De kieming van sclerotien gekweekt op agar is vergeleken met de kieming van sclerotien gevormd op tulpebollen (beide bij 9°C, > 3 weken). Sclerotien gevormd op bolmateriaal zijn natuurlijk gevormde sclerotien en kunnen anders reageren dan kunstmatig gekweekte.

Sclerotien werden met pincet van agar of bol verwijderd. Daarna werden ze gespoeld in steriel water (s.w.), gedroogd en bewaard in de koelkast. Voor uitleggen werden ze 1 uur geweekt in s.w.; 2 min. ontsmet in 10% NaOCl; 3x gespoeld in s.w. en teruggedroogd. De sclerotien werden ontsmet om conidiën en mycelium van *B. cinerea* op de buitenkant van de sclerotien te doden, zodat later evt. kieming alleen vanuit de sclerotien zelf kan komen (methode Köhl, 1989).

In proeven bleek, dat sclerotien geïsoleerd van bollen bijna altijd zwaar vervuild zijn en nauwelijks kiemen. Sclerotien gevormd op agar kiemen voor vrijwel 100% en zonder vervuiling. Doorsnijden van de sclerotien had geen effect op de kieming. Voor de in vitro proeven met antagonisten zijn dus sclerotien gebruikt die gekweekt waren op moutagar of aardappel glucose agar.

Sclerotien (2x 10 per behandeling) werden aan de rand gelegd van kolonies van een antagonist. Na enkele dagen waren de sclerotien overgroeid door de antagonist en werden ze overgebracht in petrischalen met vochtig filtreerpapier, en dichtgeplakt met parafilm. Na 4 weken incuberen bij 9°C werden de sclerotien overgeënt op moutagar + benomyl om de kiemkracht te testen. Voor controles werden sclerotien op m.a. gelegd zonder antagonist en ook overgebracht in de zg. "vochtige kamers" (methode Köhl, 1989).

Sclerotien behandeld met *T. viride* T004 en T226 waren zacht en bedekt met sporen en mycelium van *Trichoderma*. Sclerotien van de controles waren stevig, vaak bedekt met mycelium van *Botrytis*.

Resultaten waren nog niet eenduidig; er moeten nog meer proeven gedaan worden om een

mogelijke correlatie aan te tonen met de in vivo proeven.

HOOFDSTUK 3 IN VITRO PROEVEN 1992-1994

3.1 *Methodiek in vitro proeven*

De produktie van het inoculum in de beschreven proeven is gelijk aan de wijze waarop het inoculum geproduceerd werd in de in vitro proeven van 1988-1991 (zie par. 2.1.2)
In de proeven tussen 1992 en 1994 zijn andere isolaten van de antagonisten gebruikt.

Nieuwe isolaten: antagonisten geïsoleerd uit oude potgrond ('90):
 Trichoderma hamatum isolaten A3b-3; A3b-10; B1-11; C1-6.
 Penicillium sp. A2-23.

3.2 *Herisolaties antagonisten en Botrytis cinerea uit grond*

Omdat potgrond moeilijk te steriliseren is, wordt geprobeerd om in de (in vivo) proeven met niet-steriele grond te werken. Om niet-steriele grond te koloniseren hebben antagonisten extra voeding nodig. Deze voeding moet niet alleen goed bruikbaar zijn voor de antagonist, maar ook goed verdeelbaar door de grond, en zo min mogelijk extra voeding geven voor *B. cinerea*.

In deze proef wordt gezocht naar een medium dat als voeding voor de antagonisten kan dienen.

1. Vergelijking zand/zemelen (z.z.) medium met aardemeel culture (a.m.): het beste medium en het optimum tijdstip van groei worden bepaald d.m.v. herisolaties.
 2. Het medium waar de antagonist het beste in groeit wordt op het tijdstip van optimale groei geënt in niet-steriele grond (1gewichts%). D.m.v. herisolaties wordt de kolonisatie van de grond door de antagonist gevolgd.
 3. Op het tijdstip van optimale kolonisatie door de antagonist wordt *B. cinerea* in de grond geënt, in de vorm van zowel sporen als sclerotiën. D.m.v. herisolaties wordt het effect van de antagonisten op de groei van *B. cinerea* gevolgd.
- de proeven werden uitgevoerd met de volgende antagonisten:
 I en II: *Trichoderma viride* T004 en *Trichoderma hamatum* B1-11
 III: *T. viride* T218 en *T. hamatum* B1-11
 - per antagonist werden steeds per behandeling 2 herhalingen in wijdhalsserlenmeyers ingezet.
 - herisolaties: op moutagar + antibiotica. 5 schalen per monster.

3.2.1 Vergelijking aardemeel (a.m) en zand/zemelen (z.z.)

- erlenmeyers met gautoclaveerde voedingsmedia beënt met 10 ml sporensuspensie van de antagonisten (ongeveer 5×10^5 sporen/ml).

Voedingsmedia: aardemeelculture: 6 gram aardemeel per liter zand

zand/zemelen: 100 gram zemelen; 100 gram zand; 200 ml water

- verdunningen monsters voor herisolaties:

na 1 week 10^{-6} en 10^{-7}

na 2 en 3 w.: - z.z. 10^{-6} en 10^{-7}

- a.m. 10^{-8} en 10^{-9}

Resultaten

Groei *T.viride* T004 en *T.hamatum* B1-11 uit aardemeel en zand/zemelen.
(aantallen kolonievormende eenheden per gram grond)

T004

	t=0	1week	2weken	3weken
z.z. 1	2.1×10^3	6.3×10^7	4.0×10^7	geen T004
z.z. 2	3.7×10^3	4.4×10^7	1.0×10^8	geen T004
a.m. 3	5.8×10^2	1.3×10^{11}	1.7×10^{10}	5.2×10^{10}
a.m. 4	4.7×10^3	6.2×10^9	1.7×10^{10}	1.4×10^{10}

B1-11

	t=0	1week	2weken	3weken
z.z. 1	*	2.9×10^8	7.3×10^8	1.3×10^8
z.z. 2	5.6×10^2	1.4×10^8	8.9×10^8	4.5×10^7
a.m. 3	*	9.4×10^{10}	4.2×10^{10}	1.6×10^{10}
a.m. 4	*	9.1×10^{10}	6.4×10^{10}	8.7×10^{10}

* = schalen teveel volgegroeid om te kunnen tellen.

Conclusies

- zowel in z.z. als in a.m. goede en snelle groei van T004 en B1-11. Na 3 weken werd uit z.z. geen T004 meer geïsoleerd door bacteriën verontreiniging.
- in a.m. worden meer sporen gevormd, in z.z. meer mycelium.

3.2.2 Groei antagonisten in niet-steriele grond

Antagonisten worden geënt in z.z. en a.m. (10 ml sporensuspensie per erlenmeyer, 5×10^5 sp/ml) en na 10 dagen overgeënt in erlenmeyers niet-steriele grond (1 gew% in 500 gram grond) = t=0

Verdunningen voor herisolaties: voor z.z. en a.m.:
na 1 w. 10^{-1} en 10^{-2} ; na 2 w. 10^{-6} en 10^{-7} ; na 3 t/m 7 w.: T004 10^{-3} en 10^{-4} , B 1-11 10^{-6} en 10^{-7} .

Resultaten

A.: uitgroei op t=0 uit a.m. en z.z.
(aantallen kolonievormende eenheden per gram)

	<u>T004</u>	<u>B1-11</u>
z.z. 1	1.2×10^7	5.0×10^8
z.z. 2	1.3×10^8	1.3×10^9
a.m. 3	4.5×10^9	2.9×10^9
a.m. 4	2.5×10^9	$> 10^9$

B.: uitgroei uit grond.
(aantallen kolonievormende eenheden per gram)

<u>T004</u>	<u>1 week</u>	<u>2 weken</u>	<u>3 weken</u>	<u>4 weken</u>	<u>5 weken</u>	<u>7 weken</u>
z.z.1	-	+/-	5.3×10^5	1.4×10^5	1.8×10^5	6.1×10^5
z.z.2	-	-	7.5×10^5	2.6×10^5	6.6×10^4	1.0×10^5
a.m.3	+	+/-	1.6×10^5	8.9×10^4	4.1×10^4	1.2×10^5
a.m.4	+	-	3.9×10^5	2.2×10^5	1.5×10^5	1.2×10^5

B1-11

	1 week	2 weken	3 weken	4 weken	5 weken	7 weken
z.z.1	*	4.2x10 ⁸	4.8x10 ⁶	4.1x10 ⁷	3.6x10 ⁶	5.7x10 ⁶
z.z.2	*	3.3x10 ⁸	1.3x10 ⁸	4.0x10 ⁸	1.4x10 ⁷	2.2x10 ⁷
a.m.3	*	1.4x10 ⁷	3.1x10 ⁷	2.2x10 ⁶	3.5x10 ⁶	0 ???
a.m.4	*	1.3x10 ⁷	1.8x10 ⁷	7.7x10 ⁶	7.2x10 ⁷	4.1x10 ⁶

* = schalen teveel volgegroeid om te kunnen tellen.

- = geen uitgroei *Trichoderma*.

+ of +/- = wel (weinig) uitgroeit *Trichoderma*, maar door verontreinigingen niet telbaar.

Conclusies

- antagonisten koloniseren goed niet-steriele grond, zowel vanuit z.z. als a.m.
- tussen 3 en 7 weken nemen de aantallen kolonies/gram grond iets af, dus langer incuberen dan 3 weken is niet nodig.

3.2.3 Groei antagonisten en *Botrytis* in niet-steriele grond

Antagonisten B1-11 en T218 werden geënt op z.z. (10 ml, 5×10^5 sp/ml) en na 10 dagen overgeënt in grond (1 gew.%). Na 2-3 weken incuberen bij 25°C werd de grond geïnoculeerd met *B. cinerea*-sporen (5×10^4 sporen/ml, 10 ml per erlenmeyer) of *B. cinerea* sclerotiën (60 sclerotien per erlenmeyer) en geïncubeerd bij 9°C.

Resultaten

- Inoculatie met *B. cinerea* sporen: bij herisolaties na 6 weken groeide geen *B. cinerea* uit, ook niet uit de controles alleen die geïnoculeerd waren met *B. cinerea*, zonder antagonist.

- Sclerotiën werden teruggezocht uit de grond en uitgelegd op ma + antibiotica (tegen uitgroei bacterien), na 3 weken en na 6 weken 9 °C.
 Kieming sclerotien:- na 3 w. 9 °C: - ant 47% - na 6 w. 9 °C: - ant 37%
 + ant 47% + ant 35%

Conclusies

Het is niet duidelijk waarom bij de herisolaties uit grond geïnoculeerd met sporen geen *B. cinerea* uitgroeiden, zelfs niet uit de controles.

Antagonisten hadden geen effect op de kieming van sclerotiën.

3.3 *Effect vluchtige stoffen van antagonist op groei B. cinerea*

In deze proef is *in vitro* nagegaan of antagonist vluchtige toxische stoffen produceren die een remmend effect hebben op de groei van *B. cinerea*.

De volgende antagonist zijn getest: *Penicillium* sp.

A. levis

G. roseum

T. viride isolaten T004 en T218

De proef is uitgevoerd volgens de methode van Dennis en Webster (1971):

Antagonist en *B. cinerea* werden elk apart op een petrischaal moutagar geënt. De 2 petrischalen werden op elkaar geplakt met plakband en in de stoof geïncubeerd bij 20°C met licht, gedurende 2 weken.

Resultaten

Bij alle combinaties *B. cinerea* en antagonist waren de schalen met *B. cinerea* helemaal volgroeid, dus geen enkel effect van antagonist op de groei.

3.4 *Effect van antagonist op kieming van sclerotiën van B. cinerea, in zand*

Deze proef is uitgevoerd in zand, omdat zand beter geautoclaveerd kan worden dan potgrond. Er is wel 2% potgrond toegevoegd, als extra voeding, omdat zand een erg voedingsarm medium is voor de antagonist.

Er werden 4 antagonist getest in deze proef: *Trichoderma* isolaten T004 en T 218 waar op basis van gegevens uit *in vivo* proeven een goed antagonistisch effect werd verwacht, en 2 schimmels waarvan geen effect werd verwacht, nl. *Gliocladium roseum* en *Acrophialophora levis*. Zo kon ook worden gecontroleerd of de resultaten uit deze proef zouden overeenkomen met die uit de *in vivo* proeven.

De antagonist werden geïnoculeerd in erlenmeyers met zand (5ml sporensuspensie per kolfje, 2×10^5 sp/ml), 2 erlenmeyers per antagonist. Na 6 weken incuberen bij 25°C werden per kolfje 50 sclerotiën door het zand gemengd. Na 3 en 6 weken incuberen bij 9°C werden herisolaties uitgevoerd naar de groei van de antagonist (2 monsters per kolfje) en werden de sclerotien uitgelegd op moutagar + benomyl om de kieming te beoordelen. Op elk tijdstip werd een erlenmeyer uitgespoeld om de sclerotien terug te vinden.

Resultaten

Aantallen kolonies/g grond antagonist

kieming sclerotiën (n=50) kieming t=0:100%

na 6 w. 25°C: G.r. 1-1: 1.4×10^6
 1-2: 7.9×10^6
 2-1: 2.4×10^7
 2-2: 1.2×10^7

A.l. 1-1: 2.1×10^6
 1-2: 6.1×10^7
 2-1: 7.0×10^7
 2-2: 6.0×10^7

T004 1-1: 3.6×10^6
 1-2: 2.9×10^6
 2-1: 3.5×10^6
 2-2: 9.0×10^6

T218 1-1: 2.4×10^6
 1-2: 1.0×10^7
 2-1: 3.5×10^7
 2-2: 2.2×10^7

na 3 w. 9°C G.r. 1-1: 6.0×10^5
 1-2: 1.0×10^6

96%

A.l. 1-1: 3.9×10^6
 1-2: 6.6×10^7

90%

T004 1-1: 1.8×10^6
 1-2: 1.9×10^6

98%

T218 1-1: 9.0×10^6
 1-2: 1.2×10^7

96%

na 6 w. 9°C G.r. 2-1: 3.9×10^6
 2-2: 4.3×10^5

98%

A.l. 2-1: 3.9×10^6
 2-2: 1.1×10^8

100%

T004 2-1: 7.4×10^6
 2-2: 1.2×10^6

96%

T226 2-1: 7.6×10^6
 2-2: 1.4×10^7

100%

Conclusie

In deze proef hebben (alle) antagonisten het zand goed gekoloniseerd, maar toonden geen effect op de kieming van sclerotiën van *B. cinerea*.

HOOFDSTUK 4 IN VIVO PROEVEN (BROEIPROEVEN) 1988-1994

4.1 *Proeven met vriestulpen*

Bij de start van het project zijn 2 proeven met vriestulpen uitgevoerd, omdat in die tijd van het jaar geen broeiproeven konden worden ingezet.

De vatbaarheid van vriestulpen voor *B. cinerea* is echter zo laag (bij inoculatie met sporensuspensie met 10^6 sp/ml werden slechts 1 resp. 2 van de 10 bollen aangetast door *B. cinerea*), dat er verder niet mee is gewerkt.

4.2 *Bepalen inoculumconcentratie B. cinerea voor broeiproeven*

Deze proeven hebben als doel het bepalen van de juiste inoculumconcentratie om een goede bolaantasting in de broeiproeven te krijgen, waarbij niet alle bollen aangetast worden.

- bollen werden geïnoculeerd met *B. cinerea* door ze te dompelen in een sporensuspensie; de controles werden gedompeld in water, alles vlak voor planten.
- de bollen werden bewaard bij 20°C tot ongeveer 1 januari, daarna bij 2°C.
- bollen werden geplant in plastic kweekzakken, elke bol apart.
- na planten werden de bollen in een cel bij 9°C gezet.

4.2.1 *Effect van verwonding*

Proef 1

- cultivar "Apeldoorn".
- 10 bollen per behandeling
- bollen geplant in gestoomde grond
- concentraties sporensuspensies voor inoculum: 0 - 10^4 - 10^5 - 10^6 sporen *B. cinerea*/ml.
- bollen werden niet (-) of wel (+) verwond door ze op de plaats van de groeischeur over schuurpapier te wrijven, waardoor een paar cellagen verwond worden. Hierdoor wordt de gevoeligheid voor *B. cinerea* mogelijk vergroot.
- 13-12-'88 proef geplant; 19-4-'89 planten naar de kas bij 18°C om in bloei te komen; 28-4-'89 beoordeeld op bol en bloemsymptomen.

Resultaten

Aantallen bollen en bloemen aangetast door *B. cinerea*.

<u><i>B. cinerea</i></u>	<u>bollen</u>	<u>bloemen</u>
0 -	0	0
0 +	0	0
10^4 -	6	2
10^4 +	10	1
10^5 -	8	0
10^5 +	10	0
10^6 -	7	0
10^6 +	10	0

Conclusies

Wanneer de bollen verwond worden, zijn ze inderdaad vatbaarder voor *B. cinerea*, alle bollen worden dan aangetast. Ook zonder verwonden treedt voldoende aantasting op, dus het is een extra handeling die niet noodzakelijk is.

Er zijn geen verschillen tussen de verschillende inoculumconcentraties.

Proef 2

Herhaling le proef, maar met de cv. "Prominence".

Plantdatum 21-4-'89; beoordeeld 1-6-'89.

Resultaten

Aantallen bollen en bloemen aangetast door *B. cinerea* (n=10)

<u><i>B. cinerea</i></u>	<u>bollen</u>	<u>bloemen</u>
0 -	0	0
0 +	0	0
10^4 -	8	0
10^4 +	9	0
10^5 -	9	3
10^5 +	9	3
10^6 -	9	2
10^6 +	8	1

N.B.: - = bollen niet verwond, + = wel verwond

Conclusies

Iets minder effect van verwonding op de aantasting dan in de eerste proef, geen verschillen wel of niet verwond. Geen effect waargenomen van inoculumconcentratie op mate van bolaantasting.

Net als in de vorige proef zijn er minder zieke bloemen dan bollen, dus een zieke bol resulteert niet altijd in een bleke bloem.

4.2.2 Vergelijking grondbesmetting en bolbesmetting

In deze proef is inoculatie van bollen vergeleken met grondbesmetting door middel van een sporensuspensie.

- cv. "Rosario".
- 25 bollen per behandeling, geplant in gesteriliseerde grond. Na 6 weken 9°C werden de bollen gerooid en beoordeeld op bolsymptomen.
- concentraties sporensuspensies voor boldompeling: 0 - 10 - 10² - 10³ - 10⁴ sporen/ml.
- Grondbesmetting: 10⁴ - 10⁵ - 10⁶ sporen/liter grond.

Resultaten

Bij het beoordelen van deze proef is gebruik gemaakt van indexcijfers om de mate van bolaantasting aan te geven. Indexcijfer 0 wil zeggen een gezonde bol, bij indexcijfer 1 was 1/4 van de bol aangetast door *B. cinerea* enz., dus indexcijfer 4 geeft aan dat de hele bol aangetast was. In de tabel is het gemiddelde indexcijfer gegeven over de 25 bollen per behandeling.

Doordat deze proef laat geplant was (eind maart/begin april) kwam er veel *Penicillium* aantasting op de bollen voor, waardoor een aantal bollen niet beoordeeld konden worden.

De bolaantasting door Botrytis bij verschillende inoculumdichtheden:

<u>boldompeling</u>	<u>gemiddeld indexcijfer</u>
sp/ml 0	0.08
10	0.5
10 ²	2.0
10 ³	1.6
10 ⁴	3.7

	<u>grondbesmetting</u>	<u>gemiddeld indexcijfer</u>
--	------------------------	------------------------------

sp/1	10 ⁴	0.6
	10 ⁵	2.4
	10 ⁶	2.9

Conclusies

Grondbesmetting en boldompeling gaven allebei goede resultaten wat betreft bolaantasting. Bij boldompeling waren 10² en 10³ de meest geschikte concentraties.

In vervolgprouwen is gekozen voor inoculatie met boldompeling, omdat dit proeftechnisch beter uitvoerbaar is.

4.2.3 Bolbesmetting

- cv "Rosario".
- inoculeren d.m.v. boldompeling in sporensuspensies.
- concentraties *B. cinerea* in sporensuspensies: 0 - 10 - 10² - 10³ - 10⁴ sporen/ml
- gedompelde bollen zijn geplant in gestoomde grond, 25 bollen per behandeling, bij 9°C gezet en na 6 weken geroid.

Resultaten

Bolaantasting door Botrytis bij verschillende inoculumdichtheden

concentratie <i>B. cinerea</i>	gemiddelde indexcijfers
0	0.16
10	0.48
10 ²	0.52
10 ³	1.36
10 ⁴	2.12

Conclusies

De bolaantasting is in deze proef minder zwaar dan in de vorige proef. Het is duidelijk, dat de vatbaarheid van de bollen per proef kan variëren.

Het zal noodzakelijk zijn de bollen te inoculeren met meerdere concentraties *B. cinerea*.

4.3 *Effect van oude potgrond op aantasting van tulpen door Botrytis cinerea*

In de praktijk wordt verondersteld dat in potgrond waarin al eens tulpen zijn gebroeid, minder Botrytis aantasting voorkomt, dan in verse, onbeteelde potgrond. Dit effect wordt toegeschreven aan het vóórkomen van antagonisten in die potgrond.

Deze proef is opgezet om dit effect waar te nemen. Om aan te tonen dat dit inderdaad berust op aanwezigheid van antagonisten, wordt de grond ook geautoclaveerd, om alle levende organismen (en dus ook antagonisten) te doden. In deze grond moeten de bollen dus zwaarder aangetast worden.

Geautoclaveerde potgrond wordt gemengd met oude potgrond en een aantal weken geïncubeerd, zodat de geautoclaveerde grond vanuit de oude potgrond gekoloniseerd kan worden. Wanneer vlak voor planten wordt gemengd, is de grond nog niet gekoloniseerd en zal dus zwaardere aantasting optreden.

In behandelingen waarin veel zieke bollen voorkwamen, zullen van bollen die gezond gebleven waren antagonisten geïsoleerd worden.

Oude potgrond was verzameld van 3 herkomsten: A - B - C. Van A was zeker dat het voor meerdere jaren gebruikt was om tulpen in te broeien.

Behandelingen:

1- oude potgrond

2- geautoclaveerde oude potgrond

3- geautoclaveerde oude potgrond mengen met een deel oude potgrond (1/10 en 1/100) en 7 weken incuberen bij 20°C.

4- geautoclaveerde oude potgrond mengen als bij 3, maar direct voor planten.

- A: 25 bollen per behandeling, apart geplant. Van B en C was minder grond beschikbaar; alleen behandelingen 1 en 2 werden ingezet, 15 bollen per behandeling.

- inoculeren: bollen gedompeld in een sporensuspensie *B. cinerea* 10⁴ sp/ml.

- bollen na 5 weken gerooid en beoordeeld. Voor de beoordeling van de bolaantasting werden indexcijfers gebruikt:

1/4 bol aangetast door <i>B. cinerea</i> ~	indexcijfer	1
2/4	"	2
3/4	"	3
4/4	"	4

Resultaten

N.B.: omdat deze proef erg laat geplant was (eind maart), kwam veel *Penicillium* aantasting voor, waardoor niet alle bollen beoordeeld konden worden op Botrytis aantasting.

Gemiddelde indexcijfers bolaantasting

bolaantasting

A1	2.0
A2	3.5
A3 1/10	2.3
A3 1/100	1.8
A4 1/10	2.8
A4 1/100	3.4
B1	1.7
B2	3.3
C1	1.1
C2	2.3

Conclusies

In oude potgrond komt minder zware aantasting voor dan in de geautoclaveerde grond, dus het effect berust inderdaad op levende organismen in de grond. Er was in deze proef geen controle opgenomen met verse, onbeteelde potgrond om de aantasting te vergelijken met die in oude potgrond. Wanneer geautoclaveerde potgrond werd gemengd met oude potgrond was de mate van aantasting ook minder zwaar, nl. vergelijkbaar met de oude potgrond alleen. In behandeling A3 waren er geen verschillen tussen de verdunningen 1/10 en 1/100. Bij behandeling A4 1/00 was de aantasting vergelijkbaar met die in geautoclaveerde potgrond, er was geen effect van het mengen van de oude potgrond vlak voor planten. Bij A4 1/10 was er een lagere aantasting dan verwacht

De volgende mogelijke antagonisten zijn van bollen geïsoleerd en in de collectie aangehouden:

Trichoderma hamatum A3b-3
T. hamatum A3b-10
T. hamatum B1-11
T. hamatum C1-6
Penicillium sp. A2-23

4.4 Proeven met mogelijke antagonisten tegen *Botrytis cinerea*

Geïsoleerde antagonisten werden getest op hun bestrijdend effect op bolaantasting door *Botrytis cinerea*. De antagonist werd steeds door de grond gemengd, en de bollen geïnoculeerd met *B. cinerea* door ze te dompelen in een sporensuspensie. De bollen werden elk apart geplant, en na planten in een cel bij 9°C gezet.

4.4.1 Proeven I en II (1988 en 1989)

Deze proeven hebben dezelfde proefopzet en zijn in hetzelfde broeiseizoen uitgevoerd met dezelfde partij bollen.

- cv. "Apeldoorn"
- antagonisten: *Streptomyces* sp. proef I
Gliocladium roseum
Trichoderma hamatum

Trichoderma sp. I2200 proef II
Penicillium sp.
Streptomyces sp. I2875
Acrophialophora levis

De antagonisten werden door de grond gemengd (10^4 sporen/ml grond): direct voor planten, of eerst 14 dagen geïncubeerd bij 25°C.

- concentratie *B. cinerea* inoculum: 10^4 of 10^5 sporen /ml.
- controles:
 - geen *B. cinerea* (bollen gedompeld in water)
 - geen antagonist, alleen *B. cinerea*, 10^4 en 10^5 sp/ml.
- 5 bollen per behandeling, geplant in gestoomde grond. Bollen werden op verschillende data in december 1988 geplant (late broei).
- bollen kregen 19 weken koeling bij 9°C na opplanten, en werden dan in de kas ingehaald om in bloei te komen.

Resultaten

In beide proeven waren nauwelijks bloemen gevormd, of ze waren verdroogd.

Beoordeling bolaantasting: zie tabel.

Tabel: aantallen zieke bollen

proef I				
<u>Antagonist</u>	<u><i>B. cinerea</i> - antagonist (sporen/ml)</u>	<u>grond met antagonist alleen <i>B. c.</i></u>	<u>direct geplant</u>	<u>geïncub.</u>
<i>G. roseum</i>	0	0	0	0
	10 ⁴	5	2	4
	10 ⁵	2	4	5
<i>Streptomyces</i> sp.	0	0	0	0
	10 ⁴	5	5	4
	10 ⁵	5	5	4
<i>T. hamatum</i>	0	2	1	1
	10 ⁴	4	3	4
	10 ⁵	5	5	2
proef II				
<i>Trichoderma</i> sp. I2200	0	0	0	0
	10 ⁴	5	5	4
	10 ⁵	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	0
	10 ⁴	5	5	3
	10 ⁵	5	4	5
<i>Streptomyces</i> sp. I 2875	0	0	0	0
	10 ⁴	5	4	5
	10 ⁵	5	5	5
<i>A. levis</i>	0	0	0	0
	10 ⁴	4	5	4
	10 ⁵	5	5	5

Conclusies

In deze proeven geen duidelijke effecten van antagonisten op bolaantasting door *B. cinerea*.

4.4.2 Proef III. (1989/1990)

- cv. "Rosario"
- antagonisten: *T. hamatum*
T. viride
Penicillium sp. S28
Streptomyces sp. I21

G. roseum
A. levis

De antagonisten werden vooraf 6 weken geïncubeerd in de grond bij optimum temperatuur voor de groei. Na 6 weken werd d.m.v. herisolaties op moutagar vastgesteld of de antagonist de grond goed had gekoloniseerd.

- concentratie *B. cinerea* inoculum: 10^4 sporen/ml.
- controles:
 - antagonist - *B. cinerea*
 - antagonist + *B. cinerea*
- bollen geplant in geautoclaveerde grond. Plantdata: 27 en 28 november '89
- in deze proef werden de bollen volgens twee methodes geplant:
 1. apart in plastic kweekzakken, waarbij de bollen werden gedompeld in sporensuspensie (25 bollen per behandeling).
 2. in kistjes, 16 bollen per kistje. Hierbij werd zowel de grond als de bollen geïnoculeerd met sporensuspensie. 2 kistjes per behandeling.
- 19 weken koeling bij 9 °C na opplanten, dan naar de kas (18°C) om in bloei te komen.

Resultaten

- herisolaties antagonisten: behalve *Streptomyces* (geen uitgroei) hadden de antagonisten de grond goed gekoloniseerd (ongeveer 10^6 kolonies per gram grond).

1. Bollen apart geplant: aantallen zieke bollen per behandeling.

controles -antagonist:	-B. c.	1
	+B. c.	25
<i>G. roseum</i>		18
<i>A. levis</i>		22
<i>Penicillium</i>		22
<i>Streptomyces</i>		21
<i>T. hamatum</i>		22
<i>T. viride</i>		22

N.B. alle bollen met symptomen in behandelingen met antagonisten waren even zwaar angetast als de bollen met symptomen in de controle met alleen *B.cinerea*.

2. Bollen geplant in kistjes: aantallen bollen met lichte, matige of zware *Botrytis* aantasting.

	herhaling	
	1	2
- <i>B. cinerea</i> -antagonist	1 zwaar 15 gezond	1 zwaar 15 gezond
+ <i>B. cinerea</i> -antagonist	11 zwaar 5 matig	16 zwaar
<i>A. levis</i>	16 zwaar	16 zwaar
<i>Penicillium</i>	12 zwaar 4 gezond	6 zwaar 10 matig
<i>G. roseum</i>	10 zwaar 3 matig 3 gezond	12 zwaar 4 matig
<i>T. viride</i>	10 zwaar 3 matig 3 gezond	10 zwaar 5 matig 1 gezond
<i>Streptomyces</i>	11 zwaar 5 matig	11 zwaar 4 matig 1 gezond
<i>T. hamatum</i>	7 zwaar 2 matig 5 licht 2 gezond	10 zwaar 3 matig 2 licht

Conclusies

Behandelingen met antagonisten hebben tot nu toe niet méér gezonde bollen tot gevolg dan in de controles, maar er wordt wel een minder zware aantasting waargenomen.

In volgende proeven moeten de bollen worden beoordeeld op mate van aantasting door *Botrytis* en niet alleen of ze wel of niet zijn aangetast.

4.4.3 Methode voor overige proeven

In de volgende broeiproeven met antagonisten werden de bollen steeds apart geplant in plastic kweekzakken, 25 bollen per behandeling, en na 6 weken 9°C gerooid en beoordeeld op symptomen van *Botrytis* aantasting. Voor de beoordeling van de symptomen werden indexcijfers gebruikt: 0= gezonde bol, 1= 1/4 bol aangetast, enz. t/m 4= hele bol

aangetast.

De antagonisten werden in geautoclaveerde potgrond geënt en voordat de bollen werden geplant 6 weken geïncubeerd bij de optimale temperatuur voor de groei van de antagonist (meestal 25 °C, voor *A. levis* 40°C). Ook de grond voor de controle behandelingen werd 6 weken bij 25°C gezet. Na die 6 weken werd d.m.v. herisolaties op agar bepaald of de antagonist de grond goed had gekoloniseerd. Als bij de proeven niets vermeld wordt, was dat inderdaad het geval.

Als controles werden in elke proef behandelingen opgenomen zonder antagonist/met *B. cinerea* en zonder antagonist/zonder *B. cinerea*

4.4.4 Proef IV (1990/1991)

- cv. "Rosario".
- antagonisten: *A. levis*
Penicillium sp. S28
G. roseum
T. viride IVA2
T. viride isolaten T004; T218; T226
- concentraties *B. cinerea* inoculum: 10² en 10³ sporen/ml.
- geplant december 1990

Resultaten

1. Percentage gezonde bollen

<u>antagonist</u>	<i>B. cinerea</i>		
	0	10 ²	10 ³
geen	96	0	0
T004		32	0
Pen.		32	20
T218		24	4
T226		20	8
A.l.		0	4
G.r.		0	4
T.V. IVA2		8	8

2. gemiddelde indexcijfers bolaantasting

<u>antagonist</u>	<u><i>B. cinerea</i></u>	<u>bolaantasting</u>
geen	0	0.04
	10 ²	2.3
	10 ³	2.4
T004	10 ²	1.4
	10 ³	2.0
Penicill.	10 ²	1.4
	10 ³	1.6
T218	10 ²	1.8
	10 ³	2.3
T226	10 ²	1.6
	10 ³	2.4
<i>A. levis</i>	10 ²	2.9
	10 ³	2.6
<i>G. roseum</i>	10 ²	3.0
	10 ³	2.7
T.v. IVA2	10 ²	2.4
	10 ³	2.1

Conclusies

Enkele antagonisten bieden perspectief. De aantasting in de controles is nog te zwaar, alle bollen zijn aangetast. Inoculumconcentraties van *B. cinerea* moet nog verder verlaagd worden in volgende proeven.

4.4.5 Proef V (1990-1991)

- cv. "Rosario".
- Antagonisten: *Trichoderma hamatum* C1-6 } geïsoleerd uit oude
Trichoderma hamatum B1-11 } potgrond
Trichoderma viride T004
- inoculumconcentraties *B. cinerea*: 10² en 10³ sporen/ml.

- geplant in januari 1991

Resultaten

bolaantasting door *B. cinerea*.

<u>antagonist</u>	<u><i>B. cinerea</i></u>	<u>gem. indexcijfer</u>
geen	0	1.6
	10 ²	1.2
	10 ³	0.5
T004	10 ²	0.7
	10 ³	0.8
C1-6	10 ²	0.4
	10 ³	1.6
B1-11	10 ²	1.2
	10 ³	2.2

Conclusies

Veel aantasting in de controles zonder *B. cinerea* inoculatie (18 van de 24 gerooide bollen waren aangetast). Ook is het vreemd, dat de behandeling 10² sporen/ml *B. cinerea* een hoger indexcijfer heeft dan 10³ sporen/ml. Daardoor is het niet mogelijk de effecten van de antagonisten te beoordelen.

4.4.6 Proef VI (1991/1992)

Het is gebleken uit voorgaande broeiproeven dat potgrond moeilijk te steriliseren is. In deze proef is bekeken, of ook gewerkt kan worden met niet-steriele potgrond. Om niet-steriele potgrond te koloniseren, heeft de antagonist extra voeding nodig, bijv. in de vorm van zemelen.

De antagonist wordt eerst 7 dagen voorgeïncubeerd op de zemelen, dan geënt in potgrond (1%). De zemelen kunnen ook een effect hebben op de *Botrytis* aantasting. Als controle werden daarom zemelen+antagonist geautoclaveerd en daarna gemengd door de grond. Bovendien is ook een controle opgenomen waarbij antagonisten werden gekweekt op zemelen en daarna geënt in steriele grond.

- cv. "Rosario".
- antagonisten: *Trichoderma viride* isolaten T004; T218 en T226
Penicillium sp. isolaat S28
- concentraties inoculum *B. cinerea*: 10 en 10² sporen/ml.

- geplant december 1991
- behandelingen:

1. antagonist	; 0, 10, 10 ² <i>B.cinerea</i> ;	steriele grond
2. antagonist+zemelen	; 0, 10, 10 ² <i>B.cinerea</i> ;	niet-steriele grond
3. antagonist+zemelen	; 0, 10, 10 ² <i>B.cinerea</i> ;	steriele grond
4. geen antagonist	; 0, 10, 10 ² <i>B.cinerea</i> ;	wel en niet steriele grond
5. antagonist+zemelen geautoclaveerd;	; 10 ² <i>B.cinerea</i> ;	wel en niet steriele grond
- herisolaties antagonist na 6 weken 25°C: T218 en T226 hadden de grond te weinig gekoloniseerd om alle behandelingen uit te kunnen voeren. Behandeling 1. is daardoor alleen uitgevoerd met de antagonist *Trichoderma* T004 en *Penicillium*.

Resultaten

Na 6 weken zijn een aantal bollen uit de controle behandelingen (geen antagonist, alleen geïnoculeerd met *B. cinerea*) gerooid. Het bleek, dat er nauwelijks aantasting voorkwam. Daarom werd besloten, de rest van de proef bij 9°C te laten staan en te wachten met beoordelen.

Na 16 weken is uiteindelijk de hele proef gerooid en beoordeeld.

Bolaantasting door *B. cinerea*: gemiddelde indexcijfers

behandeling	antagonist	concentratie <i>B. cinerea</i>		
		0	10	10 ²
1. antagonist gester. grond	Pen.	0	0	0.04
	T004	0	0.04	0.12
2. ant/zemelen niet gest. grond	Pen.	0	0	0.12
	T004	0	0.08	0.08
	T218	0	0.04	0.08
	T226	0	0.04	0.12
3. ant/zemelen gester. grond	Pen.	0	0.04	0.16
	T004	0	0	0.24
	T218	0	0.04	0.28
	T226	0	0	0.68
4. gest. grond	-antagonist	0	0.08	0.0
niet-gest. grond	-antagonist	0	0	0.04
5. geautocl. zemelen				
gest. grond				0.56
niet-gest. grond				0.20

Conclusies

In deze hele proef kwam nauwelijks bolaantasting door *B. cinerea* voor, zelfs niet na 16 weken 9°C. Dit is vermoedelijk een weinig vatbare partij.

4.4.7 Proef VII en VIII. (1992/1993)

In de broeiproef vorig jaar waren weinig bollen aangetast door *B. cinerea*, vermoedelijk doordat de partij te weinig vatbaar was. Nu is geprobeerd dit te ondervangen door 2 partijen van verschillende herkomst te gebruiken, waarmee identieke proeven zijn uitgevoerd. Beide partijen waren van de cv. "Prominence". Eén partij was vroeg gerooid, de andere laat.

Naast bolsymptomen werden dit jaar ook de bloemen beoordeeld op aantasting door Botrytis (bleke bloemen). Daarom moesten de bollen de volledige koudeperiode krijgen. Voor deze cultivar betekende dat 16 weken 9°C, waarvan 10 weken droge koeling werd gegeven en 6 weken opgeplant. Daarna werd de helft van de proef gerooid en beoordeeld op bolsymptomen, de andere helft werd in de kas gezet (18°C), tot de bloemen beoordeeld konden worden.

- Inoculumconcentraties *B. cinerea*: 0-10²-10³-10⁴ sporen/ml sporensuspensie.
- Bollen werden geplant in niet-steriele potgrond. De antagonisten werden daarom

vooraf gekweekt op een medium van zand/zemelen en zoals altijd 6 weken voor planten door de grond gemengd.

In de proef werd ook een controle behandeling opgenomen met geautoclaveerde zemelen + antagonist.

- Antagonisten: *Trichoderma viride* T004; T218; T226
Trichoderma hamatum B1-11

Resultaten

(zie ook grafieken op volgende pagina's)

Proef VII:

B1-11 toonde significant antagonistisch effect t.o.v. de controles bij concentraties *B. cinerea* 10^2 en 10^3 sporen/ml.

T004 was alleen significant verschillend t.o.v. controles bij 10^4 sp/ml *B. cinerea*

T218 was bij alle *B. cinerea* concentraties significant verschillend.

T226 had significant effect bij 10^2 en 10^4 sp/ml *B. cinerea*

Proef VIII:

In de hele proef waren de bollen erg licht aangetast.

Er was alleen significant verschil t.o.v. de controles bij T218, 10^4 sporen/ml *B. cinerea*.

Bloemsymptomen: aantallen verkleurde (bleke) bloemen + planten zonder bloem.

<u>B.cinerea</u>	<u>-antagonist</u>	<u>antagonist</u>			
		<u>B1-11</u>	<u>T004</u>	<u>T218</u>	<u>T226</u>
0	0	0	1	0	0
10^2	8	0	2	3	2
10^3	11	9	10	10	13
10^4	25	20	24	21	18

Na de kasperiode zijn de bolsymptomen ook weer beoordeeld, maar de bollen waren zo zwaar aangetast, ook door andere organismen dan *Botrytis*, dat de indexcijfers niet meer konden worden gebruikt om de verschillen tussen de behandelingen aan te tonen.

Conclusies

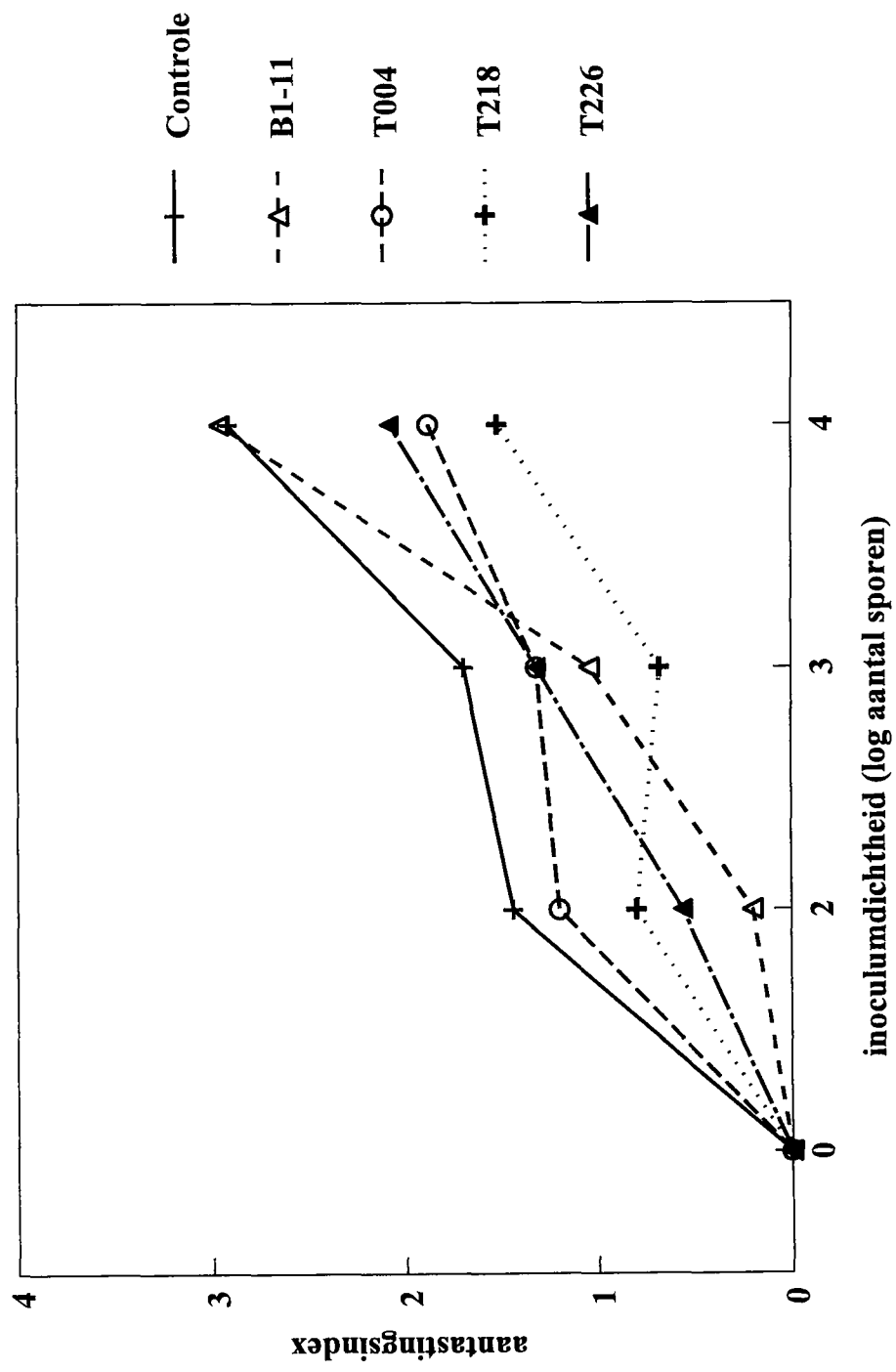
Deze methode is goed bruikbaar om antagonisten te selecteren: er zijn verschillen tussen antagonisten onderling en tussen antagonisten en de controles zonder antagonisten.

De effecten bij bloemsymptomen zijn minder duidelijk, er lijkt wel een antagonistisch effect te zijn, vooral bij 10^2 sporen/ml *B. cinerea*.

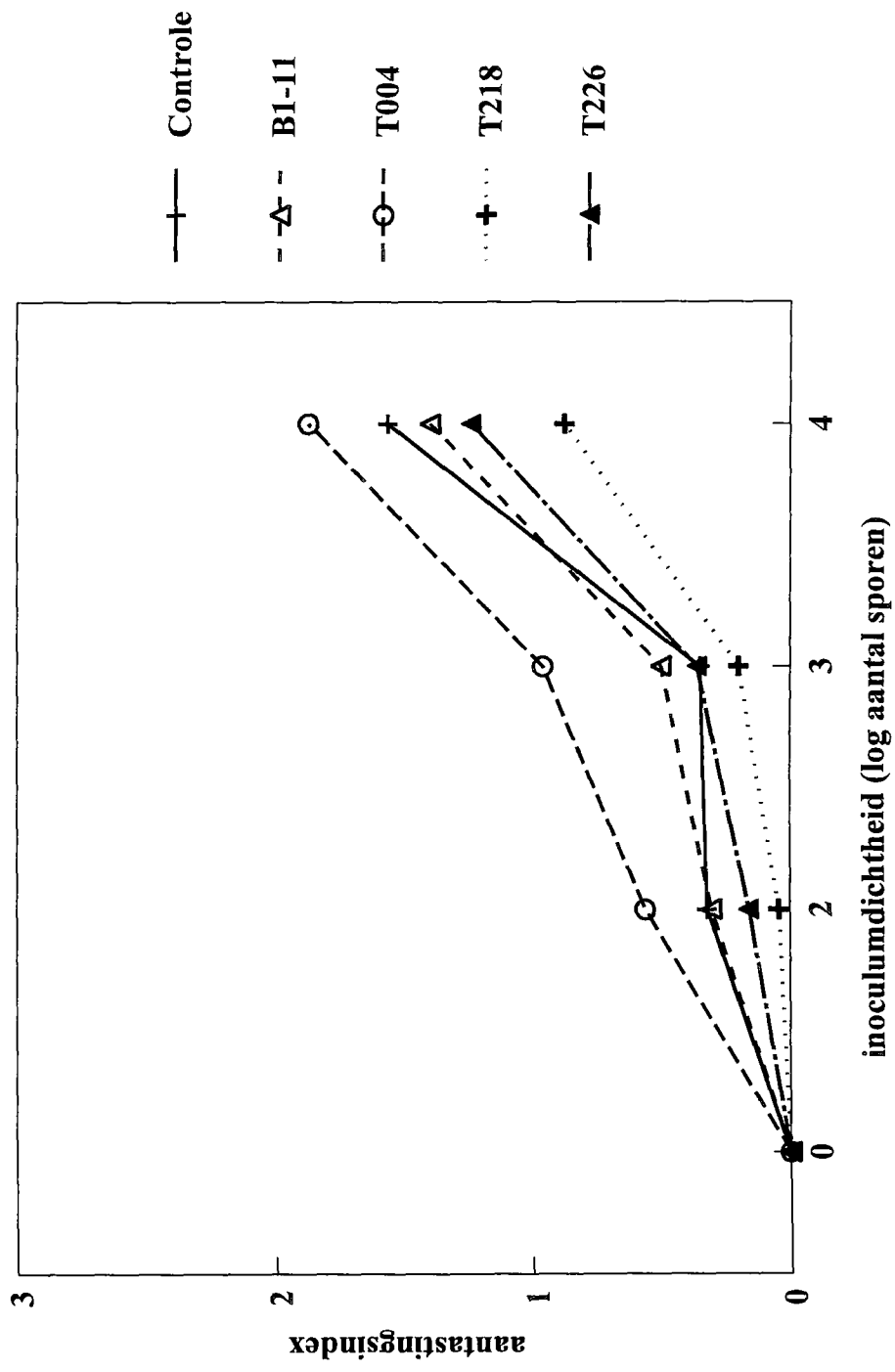
In deze proeven is er verschil in vatbaarheid tussen de 2 partijen. Dit kan een gevolg zijn van het verschil in vroeg of laat rooien, dit moet nader worden bekeken in andere proeven.

In ieder geval moet volgend broeiseizoen weer met meerdere partijen gewerkt worden.

Het effect van enkele antagonisten op de Botrytis-aantasting (proef VII)



Het effect van enkele antagonisten op de Botrytis-aantasting (proef VIII)



4.4.8 Proeven IX, X en XI (1993/1994)

- Proeven IX en X: 2 partijen cv. "Prominence" van verschillende herkomst.
Proef nr. XI: cv. "Rosario".
- de bollen krijgen totaal 16 weken koudebehandeling, 10 weken droge koeling en 6 weken opgeplant, alles bij 9°C.
- concentraties inoculum *B. cinerea*: 0-10²-10³-10⁴ sporen/ml.
- bollen geplant in niet-gestoomde potgrond (antagonisten gekweekt op zand/zemelen).
- ook controle zand/zemelen begroeid met antagonist, dan geautoclaveerd (alleen proef IX).
- antagonisten: *Trichoderma viride* T218
Trichoderma hamatum isolaten B1-11; C1-6; A3b-10
(van bollen geïsoleerd)
- plantdata: IX 27-1-'94; X en XI op 9 en 10-2-'94.

Resultaten

(zie ook grafieken volgende pagina's)

In proef IX had geen enkele antagonist een significant effect ten opzichte van de controles zonder antagonist.

In proef X had alleen *T. hamatum* A3b een significant effect, bij alle drie de concentraties inoculum *B. cinerea*.

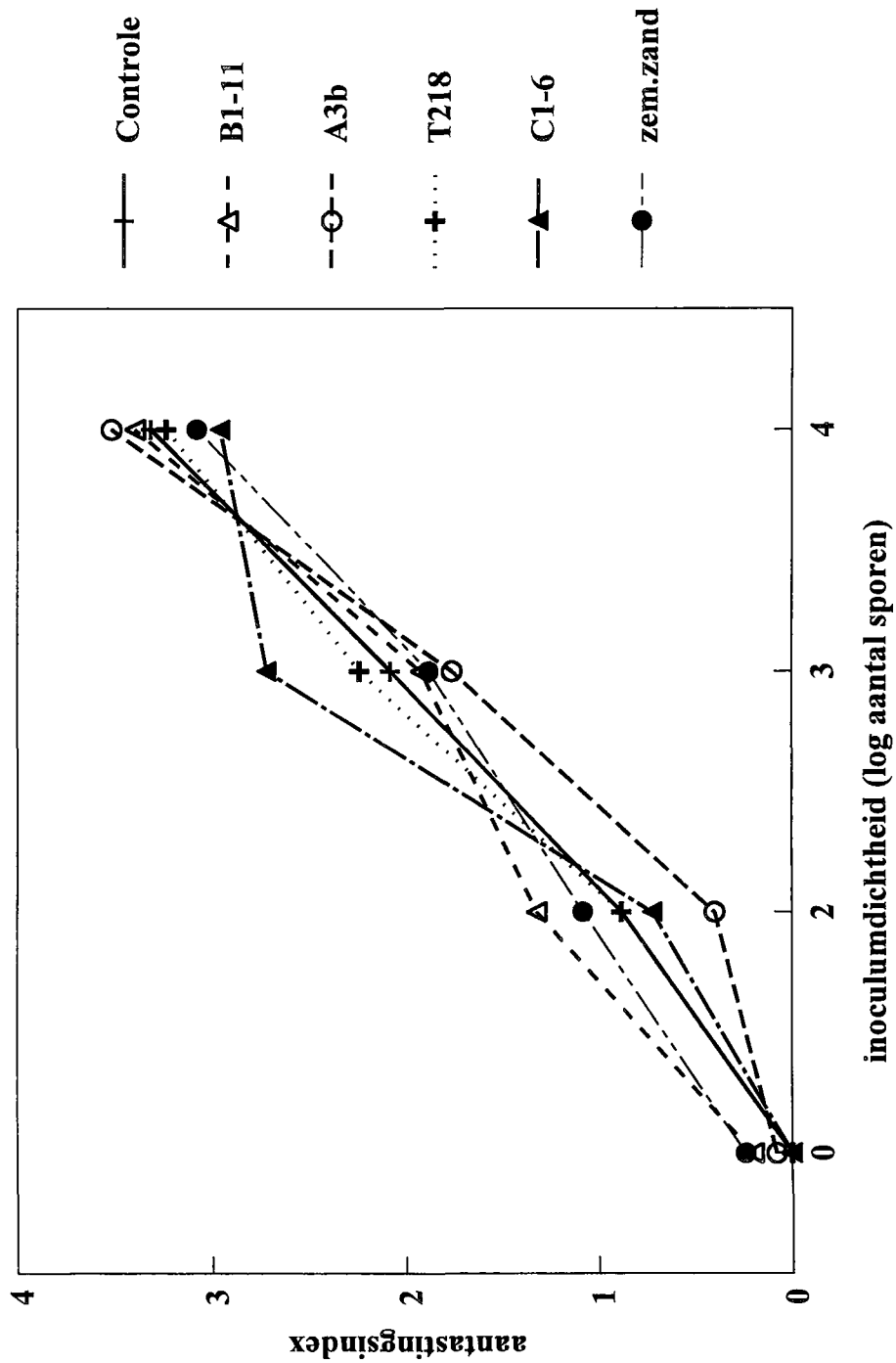
In proef XI had *T. hamatum* A3b alleen een effect bij 10³ sporen *B. cinerea*/ml; *T. viride* T218 verschild van de controles bij de concentraties *B. cinerea* 10² en 10³ sp/ml en *T. hamatum* C1-6 alleen bij 10⁴ sp/ml. *T. hamatum* B1-11 had helemaal geen significant effect op bolaantasting.

Conclusies

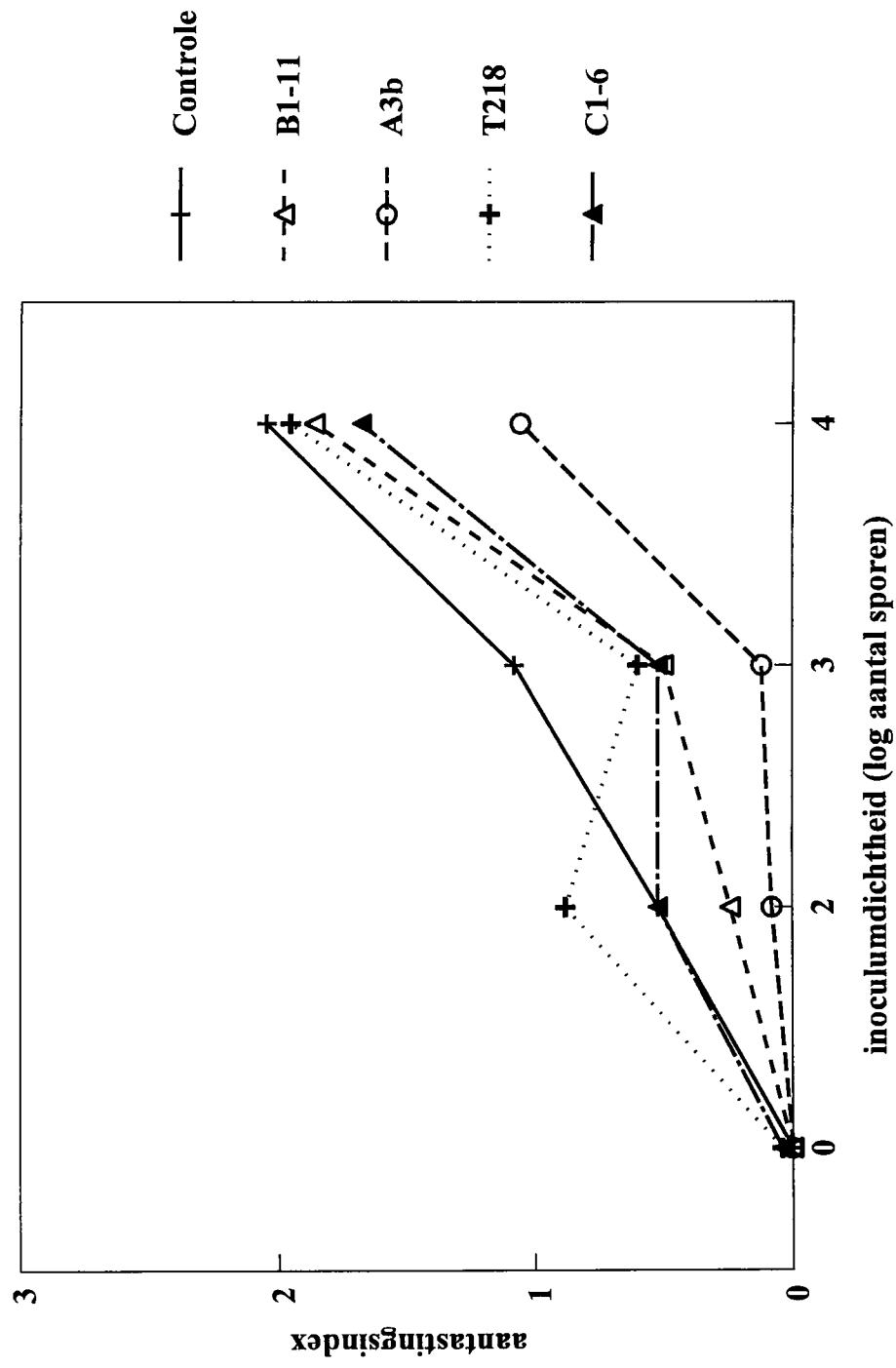
De effecten van de antagonisten verschillen sterk binnen de drie proeven in dit broeiseizoen. Bovendien komen ze ook helemaal niet overeen met de resultaten van de broeiproeven van vorig jaar, voor de antagonisten die in beide jaren in de proeven waren opgenomen.

De onvoorspelbaarheid van de effecten van de antagonisten maken ze niet geschikt voor introductie in de praktijk. Het lijkt niet zinvol, om volgend jaar opnieuw op deze manier mogelijke antagonisten te testen.

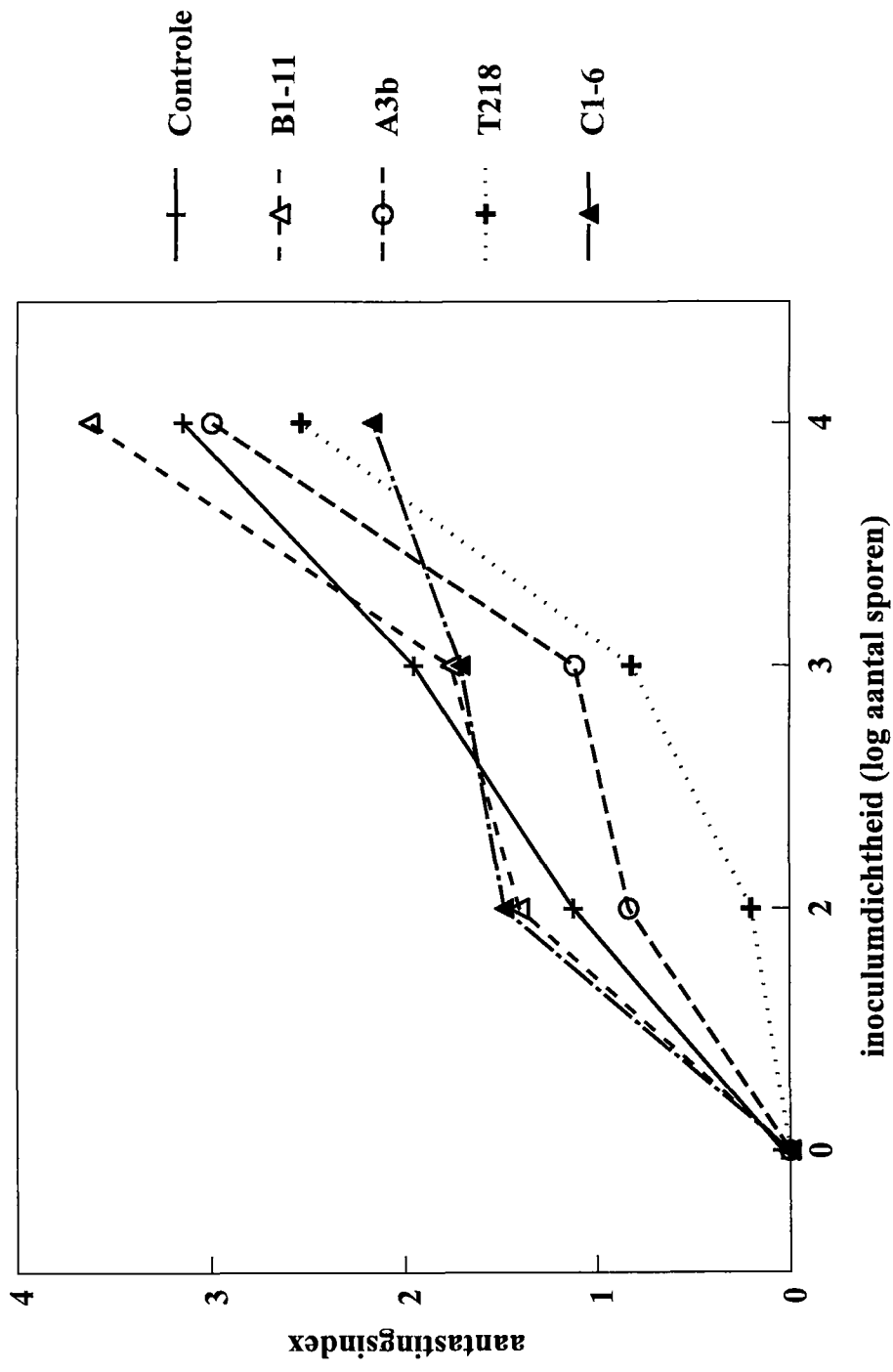
Het effect van enkele antagonisten op de Botrytis-aantasting (proef IX)



Het effect van enkele antagonisten op de Botrytis-aantasting (proef X)



Het effect van enkele antagonististen op de Botrytis-aantasting (proef XI)



HOOFDSTUK 5

EFFECT VAN OMSTANDIGHEDEN OP *B. CINEREA* BOLAANTASTING

De volgende proeven zijn uitgevoerd zonder toegevoegde antagonisten, om informatie te krijgen over de omstandigheden waarbij de bollen worden aangetast door *B. cinerea*.

5.1 *Bolaantasting door B. cinerea wanneer de bollen gedurende verschillende periodes zijn opgeplant*

In een proef in broeiseizoen '92/'93 waren bollen die 16 weken waren opgeplant zwaarder aangetast door *B. cinerea* dan bollen van dezelfde partij die 6 weken waren opgeplant (en 10 weken droog bewaard bij 9°C). In beide gevallen was de aantasting overigens erg laag.

In 1994 is een proef uitgevoerd waarbij de bollen (cv. "Prominence") allemaal 16 weken koeling krijgen bij 9°C, maar met verschillende periodes droge/opgeplante koeling. De start van de koeling en de rooidatum was voor alle behandelingen hetzelfde.

De bollen werden geïnoculeerd met *B. cinerea*: 0 - 10² - 10³ - 10⁴ sporen/ml.

Behandelingen: 12 weken droog/4 weken opgeplant
8 weken droog/8 weken opgeplant
4 weken droog/12 weken opgeplant
16 weken opgeplant

Resultaten

indexcijfers bolaantasting, gemiddelden van 25 bollen per behandeling.

Behandeling	inoculumdichtheid sporen B.c./ml			
	0	10 ²	10 ³	10 ⁴
<u>droog/opgeplant</u>				
0/16	0	2.8	4.0	3.7
4/12	0	0.2	2.8	3.5
8/8	0	1.6	3.7	4.0
12/4	0.08	1.7	2.6	3.2

Conclusie

De resultaten van deze proef tonen geen enkele verband tussen langer opplanten van bollen en de bolaantasting door *B. cinerea*.

5.2 *Effect rooitijdstip op vatbaarheid van de bollen voor B. cinerea (1994)*

In de broeiproeven in broeiseizoen '92/'93 werden 2 partijen cv. "Prominence" gebruikt; 1 partij was vroeg, de andere laat gerooid (op het veld). In de proef met vroeg gerooide bollen kwam veel meer aantasting voor door *B. cinerea* dan in de proef met laat gerooide bollen. Ook in de praktijk wordt verondersteld dat vroeg gerooide bollen vatbaarder zijn voor *B.*

cinerea in de broeierij, maar het is zinvol om dit met resultaten uit proeven aan te tonen.

Bollen cv. "Prominence" werden in 2 partijen verdeeld, A en B, en december '93 buiten geplant (ze hadden vanaf 20 oktober bij 20°C gestaan).

A is vroeg geroid, nl 20 juni '94; B is laat geroid, 5 juli '94.

Het verschil tussen vroeg en laat roeien zit vooral in de rijpheid van de bollen: vroeg gerooide bollen zijn nog helemaal wit, laat gerooide bollen hebben een bruine huid.

Het tijdstip vroeg of laat wordt bepaald door de temperatuur: na een warm voorjaar kunnen begin juni de "vroeg" bollen geroid worden. In '94 was het voorjaar koud, en werden pas eind juni de vroeg bollen geroid.

Afhankelijk van de temperatuur is er een verschil van 1-2 weken tussen vroeg en laat.

Het is belangrijk om vanaf begin juni op de tuin te kijken naar de rijpheid van de bollen.

In broeiseizoen '94/'95 zijn de 2 partijen A en B getest op hun vatbaarheid voor *B. cinerea*.

- Voor planten kregen de bollen 10 weken droge koeling bij 9 °C.
- Ze werden geïnoculeerd met *B. cinerea*: 0 - 10² - 10³ - 10⁴ sporen/ml.
- Voor A en B werden elk 25 bollen apart geplant. Plantdatum: 17 januari '95
- Rooidatum: 27 februari '95 (=na 6 weken).

Resultaten

Indexcijfers bolaantasting, gemiddelden van 25 bollen.

Concentratie B.c	partij	
	A (vroeg)	B (laat)
0	0	0
10 ²	0.2	0.2
10 ³	0.2	0.4
10 ⁴	0.8	0.8

Conclusie

In deze proef geen verschil vroeg of laat geroid. In de hele proef was de aantasting door *B. cinerea* erg laag.

De proef zal volgend jaar herhaald worden met de doorteelt van de kleinere maten van deze partij "Prominence" en met nog een andere partij, van een andere cultivar.

LITERATUURLIJST

- Blakeman, J.P. (1980). In: "The biology of Botrytis: (eds: Coley-Smith, J.R., K. Verhoeff, W.R. Jarvis), Academic Press, London. pp 115-150.
- Dennis, C and J. Webster (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41-48.
- Köhl, J. (1989). Eignung von Stämmen aus der Gattung *Trichoderma* für die biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze. Dissertation, Giessen. 151 pp.
- Küster, E. and S.T. Williams (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. Nature 202: 928-929.
- Muller, P.J. (1990). *Botrytis cinerea*, cause of different diseases in tulips. Acta Horticultura 266: 447-456.



LABORATORIUM VOOR
BLOEMBOLLENONDERZOEK
BULB RESEARCH CENTRE

VENNESTRAAT 22, POSTBUS 85
2160 AB LISSE, THE NETHERLANDS
TEL. (02521) 62121, FAX (02521) 17762
PER 10-10-1995: TEL. (0252) 462121, FAX (0252) 417762