



Biorationals binnen IPM tegen ondergrondse ziekten in gerbera teelt

Marta Streminska¹, Hui Ming Huisman¹, Floortje Tili¹, Els Verstappen², Anne D. van Diepeningen² Rapport WPR-1313

¹ Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw en Bloembollen; ² Wageningen University & Research, BU Biointeracties en Plantgezondheid

Referaat

In dit project is het infectieproces van *Fusarium oxysporum* in gerbera bestudeerd met behulp van plantpathogene *Fusarium oxysporum* gemarkeerd met groen fluorescent eiwit (GFP). Met deze methode is er ook onderzoek gedaan naar het effect van nuttige micro-organismen uit biopesticiden op snelheid van de *Fusarium* infectie in gerbera. Ook zijn er praktijkproeven uitgevoerd bij twee bedrijven met beheersing van *Fusarium/Verticillium* gedurende de teelt van gerbera met vijf verschillende biopesticiden.

Uit onderzoek blijkt dat antagonistische micro-organismen de infectie van *Fusarium oxysporum* in gerbera planten kunnen vertragen.

Abstract

In this project, the infection process of *Fusarium oxysporum* in gerbera was studied using plant pathogenic *Fusarium oxysporum* marked with green fluorescent protein (GFP). This method has also been used to investigate the effect of beneficial microorganisms from biopesticides on the speed of *Fusarium* infection in gerbera. Experiments in gerbera greenhouses with control of *Fusarium/Verticillium* during gerbera cultivation with five different biopesticides have also been carried out at two companies producing gerbera flowers. Research shows that antagonistic microorganisms can delay the spread of *Fusarium oxysporum* in gerbera plant.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1313

Projectnummer: 3742287900

BO-nummer: BO-56-001-045

DOI: <https://doi.org/10.18174/652701>

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van door de bijdrage van Topsector Tuinbouw & Uitgangsmateriaal, Stichting Kennis in je Kas en gewascoöperatie gerbera.

TOPSECTOR
TUINBOUW & UITGANGSMATERIALEN

Stichting
Kennis in je Kas



Disclaimer

© 2024 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

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

Stichting Wageningen Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 - 48 56 06

F +31 (0)10 - 522 51 93

glastuinbouw@wur.nl

wur.nl/glastuinbouw

Inhoud

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
2 Bestuderen <i>Fusarium</i> infectie in gerbera	8
2.1 Introductie	8
2.2 Materiaal en Methode	8
2.2.1 GFP- <i>F. oxysporum</i>	8
2.2.2 Ingeperkt gebruik	8
2.2.3 Opzet van de proeven	8
2.2.4 Microscopie	9
2.3 Resultaten	9
2.3.1 <i>Fusarium</i> infectie in Gerbera	9
2.3.2 Effecten van niet pathogene <i>Fusarium</i> op infectie	11
2.3.3 Vergelijking van meerdere middelen	13
2.4 Conclusies en Discussie	14
3 Teeltwisseling en Schimmeldruk	15
3.1 Introductie teeltwisselingsproeven	15
3.2 Materiaal en Methode	15
3.2.1 Protocol bemonstering	15
3.2.2 Tellingen	16
3.3 Resultaten	16
3.4 Conclusies en Discussie	19
4 Detectiemethoden <i>Fusarium</i> en <i>Verticillium</i>	20
4.1 Introductie	20
4.2 Materiaal en Methode	20
4.2.1 TaqMan detectie	20
4.2.2 LAMP detectie	21
4.2.3 Bemonstering	21
4.2.4 Bedrijfssurvey en cultivars	21
4.3 Resultaten	22
4.3.1 Bemonstering	22
4.3.2 Bedrijfssurvey en cultivars	23
4.4 Conclusies en Discussie	26
5 Praktijkproef beheersing wortelziektes	27
5.1 Introductie	27
5.2 Materiaal en Methode	27
5.2.1 Opzet praktijkproeven	27
5.2.2 Ziektebeoordeling	28
5.2.3 Bemonstering en TaqMan Analyse	28
5.3 Resultaten	28
5.3.1 Observaties en afwijkingen van proefopzet	28
5.3.2 Ziektescores	28
5.3.3 Resultaten TaqMan PCR Lucht	34
5.3.4 Resultaten TaqMan PCR watermonsters	35
5.3.5 TaqMan Plantmateriaal	36
5.4 Conclusies en Discussie	38

6	Conclusies	39
	Literatuur	40
Bijlage 1	Teeltwisseling	41
Bijlage 2	Plattegronden praktijkproeven	43
Bijlage 3	Behandelingen praktijkproeven	45

Samenvatting

In dit project is het infectieproces van *Fusarium oxysporum* in gerbera bestudeerd met behulp van plantpathogene *Fusarium oxysporum* gemarkeerd met groen fluorescent eiwit (GFP). Met deze methode is er ook onderzoek gedaan naar effect van nuttige micro-organismen uit biopesticiden op de snelheid van de *Fusarium* infectie in gerbera.

Uit onderzoek *in planta* blijkt dat *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* gerbera kan besmetten zowel via bovengrondse delen als via de wortel. De infectie via de wortel gaat sneller omdat deze zich met de sapstroom via de haarvaten door de plant kan verspreiden.

Preventieve behandeling van de planten met niet pathogene *F. oxysporum* Fo47 remt de infectie van (GFP)-*F. oxysporum* f.sp. *gerberae*. De niet pathogene *Fusarium* remt het aantal plaatsen waarop infectie plaatsvindt, leidt tot kleinere infectiehaarden in het weefsel en lijkt zich vooral te beperken tot groei rondom de cellen en niet of minder in de cellen zelf.

Ook zijn er twee andere antagonisten tegen plantpathogene (GFP)-*Fusarium* getest *in planta*. *Streptomyces k61* en *Trichoderma asperellum* T34 beperken de groei van (GFP)- *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* in de plant, al lijken deze soorten iets minder de plantpathogene *Fusarium* te remmen dan *F. oxysporum* Fo47.

Binnen dit project zijn ook praktijkproeven uitgevoerd bij twee bedrijven met beheersing van *Fusarium/Verticillium* gedurende de teelt van gerbera met vijf verschillende biorationale producten (Lalstop k61, Asperello T34 Biocontrol, niet plantpathogene *F. oxysporum* Fo47, ANLBF-2 en Exp.1).

Uit praktijkproeven blijkt dat cultivars van gerbera sterk kunnen verschillen in gevoeligheid voor verwelking/uitval door *Fusarium/Verticillium*. Sommige van de toegepaste biorationale producten kunnen infectie van *Fusarium/Verticillium* in gerbera vertragen, ook als ze niet preventief toegepast worden (1^{ste} toepassing van de biorationals is uitgevoerd in planten die al meer dan een half jaar in de kassen stonden). Het effect van de biorationals op *Fusarium/Verticillium* infectie was ook cultivar afhankelijk. Dat zijn belangrijke aanwijzingen voor de praktijk. De keuze van cultivars en preventief inzetten van biorationals (bij zo jong mogelijke planten) en inzet op hygiëne, om druk van de pathogenen laag te houden, zullen een belangrijke bijdrage leveren aan beperken van verspreiding van infectie veroorzaakt door *Fusarium/Verticillium* in gerbera.

1 Inleiding

Zowel grondgebonden als substraatteelten onder glas zijn gevoelig voor de verschillende ziekten (voet en wortelrot, verwelking) die veroorzaakt worden door o.a. *Fusarium*. Deze ondergrondse ziekten kunnen leiden tot grote uitval tijdens de teelt.

In de afgelopen jaren is de beschikbaarheid (en in sommige gevallen ook effectiviteit) van middelen voor chemische controle van *Fusarium* ziekten sterk gedaald. Bovendien staat gebruik van chemische bestrijding onder druk in verband met mogelijke risico's voor volksgezondheid en milieu. Daarom is de vraag naar biorationale oplossingen in de afgelopen jaren enorm toegenomen. Ondanks een substantiële groei in de markt van biorationals is er nog steeds een gebrek aan openbaar beschikbare gegevens over effectiviteit van deze producten op (semi)praktijkschaal. Om die redenen blijven deze producten tot nu toe in de praktijk onderbenut.

Biorationals zijn gewasbeschermingsproducten (van natuurlijke oorsprong) die relatief weinig risico's hebben voor de volksgezondheid en het milieu. Deze producten kunnen verdeeld worden in verschillende groepen zoals biopesticiden (op basis van micro-organismen), biochemische pesticiden (op basis van metabolieten van micro-organismen), botanicals (op basis van planten en algen extracten), basisstoffen en elicitors. Biorationals zijn goed geschikt voor geïntegreerde plaagbestrijdingsprogramma's (IPM), in combinatie met verschillende teeltmaatregelen tegen ondergrondse ziekten. Biorationals kunnen ook worden gebruikt in rotatie met synthetische pesticiden om de kans op resistentie ontwikkeling in pathogenen te vertragen, of in combinatie met synthetische pesticiden die additieve, zo niet synergetische effecten bieden (Xu et al., 2011).

Idee om plantenziekten tegen te gaan met inzet van nuttige micro-organismen, hun metabolieten of algen/planten extracten is natuurlijk niet nieuw (Van Lenteren et al., 2018). Wetenschappelijk onderzoek heeft aangetoond dat gebruik van de juiste micro-organismen (biopesticide), andere biorationals of combinaties daarvan, ondergrondse ziekten op verschillende manieren kunnen onderdrukken: a) direct antagonisme (o.a. productie van antibiotica en andere metabolieten); b) aanschakelen van geïnduceerde resistentie in planten (Bakker et al., 2013) en c) indirect effect op pathogenen door veranderingen in (functionele) samenstelling van plant/bodem/substraat microbiom (Chowdhury et al., 2013). Er zijn veel voorbeelden bekend van het succesvol gebruik van antagonistische bacteriën en schimmels (o.a. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*) tegen substraat- en grondgebonden plantpathogene oomyceten, schimmels en aaltjes in in vitro studies en kleine kasexperimenten (o.a.: Adam et al., 2014; Bubici, 2018; Chowdhury et al., 2013; Fira et al., 2018; Postma et al., 2019). Sommige van deze antagonistische micro-organismen zijn ook op dit moment commercieel beschikbaar. Deze producten zijn voorbeelden van zogenaamd inundatief/inoculatief benadering in biologische bestrijding van grondgebonden plantpathogenen, die streeft naar populatieopbouw van antagonist in substraat/bodem door inoculatie met grote aantallen van antagonistische micro-organismen (Mazzola en Freilich, 2017).

In dit project is het infectieproces van *Fusarium oxysporum* in gerbera bestudeerd met behulp van plantpathogene *Fusarium oxysporum* gemarkeerd met groen fluorescent eiwit GFP. Met deze methode is er ook onderzoek gedaan naar het effect van nuttige micro-organismen uit biopesticiden op de snelheid van de *Fusarium* infectie in gerbera.

Ook zijn er praktijkproeven uitgevoerd bij twee bedrijven met beheersing van *Fusarium/Verticillium* gedurende de teelt van gerbera met biopesticiden (Lalstop k61, Asperello T34 Biocontrol, niet plantpathogene *F. oxysporum* Fo47, ANLBF-2 en Exp.1). Gedurende deze praktijkproeven zijn er driemaal monsters genomen van water (voeding na ontsmetten, voeding uit druppelaars bij de planten, drainwater, lucht en plantenmonsters). Deze monsters zijn vervolgens onderzocht met TaqMan PCR op aanwezigheid van *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* en *V. dahliae*.

2 Bestuderen *Fusarium* infectie in gerbera

2.1 Introductie

De kristalkwal (*Aequorea victoria*) maakt van nature een blauw fluorescent eiwit aan waardoor de kwal kan oplichten. In de biologie worden tegenwoordig veel varianten van dat fluorescente eiwit in andere kleuren zoals groen, rood en geel gebruikt als merkers in allerlei organismen om hun gedrag beter te kunnen bestuderen. In schimmels wordt vaak gebruik gemaakt van groen fluorescente eiwitten (*green fluorescent proteins* of GFP) om gedrag in de gastheer plant te bestuderen (bijvoorbeeld Visser et al., 2004 voor *Fusarium oxysporum* infectie in banaan). Binnen de PPS masterplan *Fusarium* is van de *F. oxysporum* pathogeen van Gerbera een dergelijke GFP-variant gemaakt die onder invloed van UV licht groene fluorescentie laat zien.

Het veranderen van *Fusarium* met dergelijke fluorescente eiwitten valt onder genetische manipulatie (gm). Werken met dergelijke genetische gemodificeerde organismen (gmo's) mag alleen onder speciale vergunning in ingeperkte laboratoria. WUR beschikt over faciliteiten waar dergelijke GFP *Fusarium*-stammen ook in planten getest kunnen worden.

De GFP-*F. oxysporum* is in dit onderzoek gebruikt om te kijken hoe deze pathogeen de Gerbera infecteert en hoe biologische middelen deze infectie beïnvloeden.

2.2 Materiaal en Methode

2.2.1 GFP-*F. oxysporum*

Met behulp van de bacterie *Agrobacterium tumefaciens* is een plasmide met daarop de eigenschappen voor het maken van groen fluorescent eiwit (GFP) en een selecteerbaar resistentiegen voor hygromycine, een antischimmelmiddel ingebracht in *F. oxysporum* f.sp. *gerberae*. Door doorkweken op medium met hygromycine is daarbij een stabiele mutant geselecteerd die zowel GFP vormt (te testen onder UV licht) als hygromycine resistent is. Ook van een van de gebruikte middelen non-pathogene *F. oxysporum* Fo47 zijn er fluorescente stammen aanwezig: hiervan is zowel een groen fluorescente (GFP) als een rood-fluorescente (RFP) stam.

2.2.2 Ingeperkt gebruik

Werken met genetisch gemodificeerde en mogelijk sporulerende schimmels, betekent dat er extra maatregelen nageleefd moeten worden om vrijkomen van de GFP-stam te voorkomen. Alle werkzaamheden vinden daarom plaats in een extra ingeperkte ruimte. Alle planten worden daarin extra ingeperkt in speciale kweekbakken in een op licht- en temperatuur ingestelde incubator. Alle handelingen met de planten worden verder verricht in een laminar flow cabinet.

2.2.3 Opzet van de proeven

Als plantgoed is er voornamelijk gebruikt gemaakt van de voor *Fusarium* vatbare cultivar Babble. Een van de herhalingen is uitgevoerd met de cultivar Albino toen Babble niet verkrijgbaar was maar deze experimenten waren minder duidelijk omdat Albino minder gevoelig is dan Babble. Plantgoed was voornamelijk beschikbaar op kokossubstraat, maar een van de herhalingen is gedaan met plantgoed op steenwol.

Allereerst is een studie gemaakt hoe *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* de plant kan infecteren vanuit de wortel en vanaf het blad (2.5×10^4 sporen/ml). Daarna zijn opeenvolgende proeven uitgevoerd naar de effecten van een drietal biocontrole organismen op de infectie via de wortel. Deze behandelingen zijn (1) behandeling met non-pathogene *F. oxysporum* Fo47 (10^6 /ml), (2) behandeling met *Streptomyces griseoviridens* K61 (Lalstop K61; 10^5 /ml) en (3) met *Trichoderma asperellum* (Asperello T34 10^4 /ml).

Alle planten met GFP *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* zijn opgekweekt in met tape dicht geplakte kunststof kweekbakken in een incubator met 16h licht/8 uur donker afwisselende belichting en constante temperatuur van 23°C. Planten worden gevolgd over de tijd en beoordeeld op aantallen groene, gele en verwelkte bladeren om de ontwikkeling van de ziekte te volgen.

2.2.4 Microscopie

Op verschillende momenten tijdens de infectie kunnen monsters genomen worden van plantendelen zoals wortels, bladsteel en blad. Coupes van deze monsters kunnen dienen als basis voor microscooppreparaten en bekeken worden onder een microscoop met UV belichting. Microscooppreparaten worden gemaakt met speciale rubber *seals* tussen object- en dekglas om de *Fusarium* goed in te perken. Bij het beoordelen van de preparaten wordt de volgorde aangehouden van wortel naar hogere delen van de plant om de infectie te volgen als een plant rond de wortels besmet is. Als een plant via het blad besmet is, wordt de beoordeling van boven naar beneden gemaakt. Van de verschillende behandelingen worden even grote aantallen preparaten/coupes van plantendelen vergeleken om deze ook op zwaarte van besmetting onder een bepaalde behandeling te kunnen vergelijken.

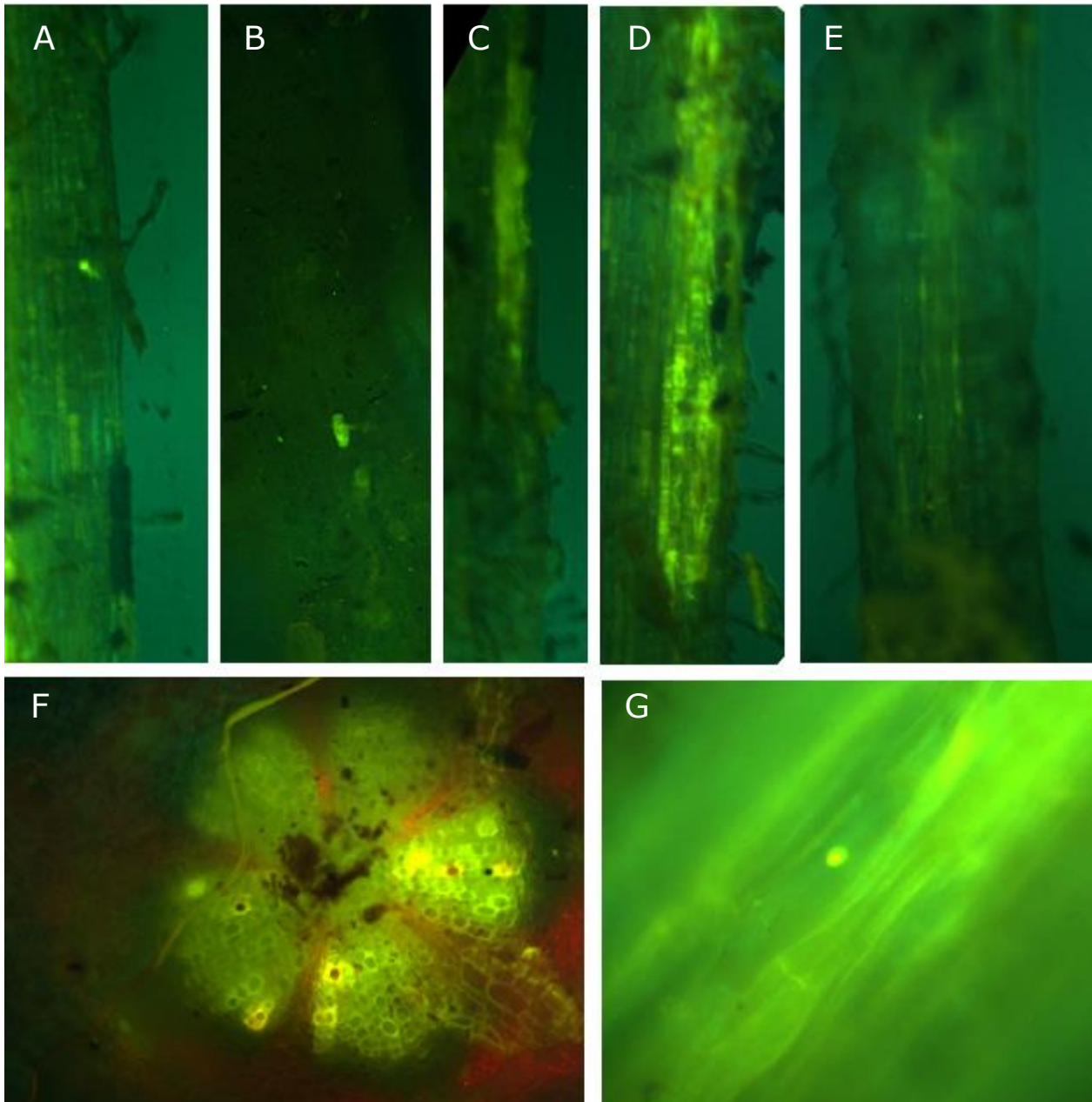
2.3 Resultaten

2.3.1 *Fusarium* infectie in Gerbera

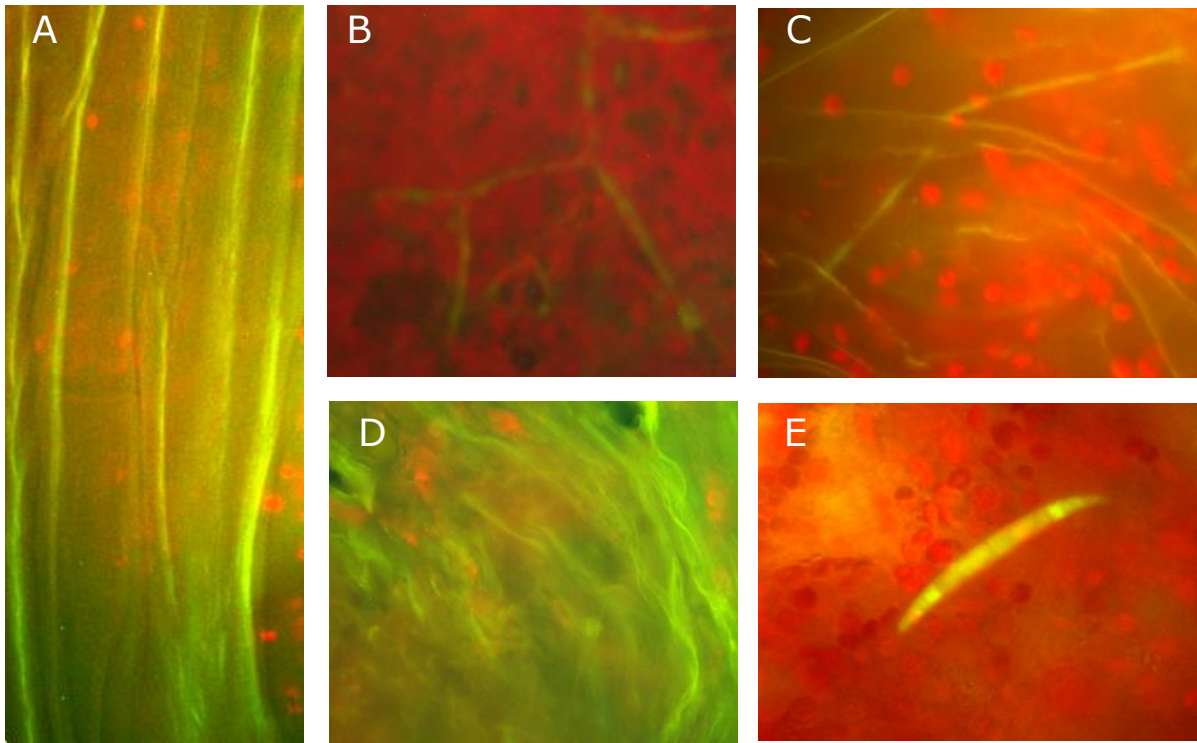
Tijdens de infectie van Gerbera vanuit de wortel, groeit de kiemende *Fusarium*spore eerst rondom de wortel. Bij het binnendringen van de wortel groeit de *Fusarium* uit in het wortelweefsel, tussen de cellen en dringt de schimmel ook plantencellen in de wortel binnen. Als de *Fusarium* door de cortex rondom de vaatbundel heen dringt groeit de schimmel door de vaatbundel omhoog. Verder in de besmetting kan de schimmel zo hele vaatbundels blokkeren. De schimmel vormt in de plant ook conidiosporen die zich verder met de sapstroom in de plant kunnen verspreiden (geïllustreerd in Figuur 2.1).

In de wortel ligt de vaatbundel centraal in de wortel, bij de wortelhals gaat deze over in kleinere losse vaatbundels die overlopen in de bladstengels naar de bladeren. *Fusarium* groeit verder door de haarvaten van de plant, door de vaten in de bladsteel naar het blad. Daar groeit hij eerst door de nerven, maar tast dan verder het bladmoes aan. In en op het verwelkende, afstervende blad (rood in de foto's) vormt de schimmel meer sporen om zich verder te kunnen verspreiden (geïllustreerd in Figuur 2.2).

Ook de infectie vanuit het blad is bekeken door een stukje mycelium op het blad van een jonge Gerbera te leggen. De schimmel kan dan zijn infectie vanuit het blad beginnen en kan vanuit het blad langzaam tegen de sapstroom in groeien om de rest van de plant te bereiken. Deze infectie start meer lokaal en verliep in de testplanten trager dan de infectie vanuit de wortel waarbij de schimmel zich met de sapstroom mee verspreid.



Figuur 2.1 Infectieverloop in de wortel. A. *Fusarium* conidiospore aan buitenzijde van een wortel. B. kiemende conidiospore, C. *Fusarium* is de wortel binnen gedrongen en tast het weefsel in de wortel aan. D. aangetaste weefsel breidt uit. *Fusarium* zit tussen en in de cellen. E. *Fusarium* is door de cortex in het vaatweefsel gekomen en groeit door de houtvaten omhoog. F. dwarsdoorsnede door de vaatbundel waar *Fusarium* doorheen groeit. G. sporen worden in de plant gevormd en door de vaatbundel verder verspreid.



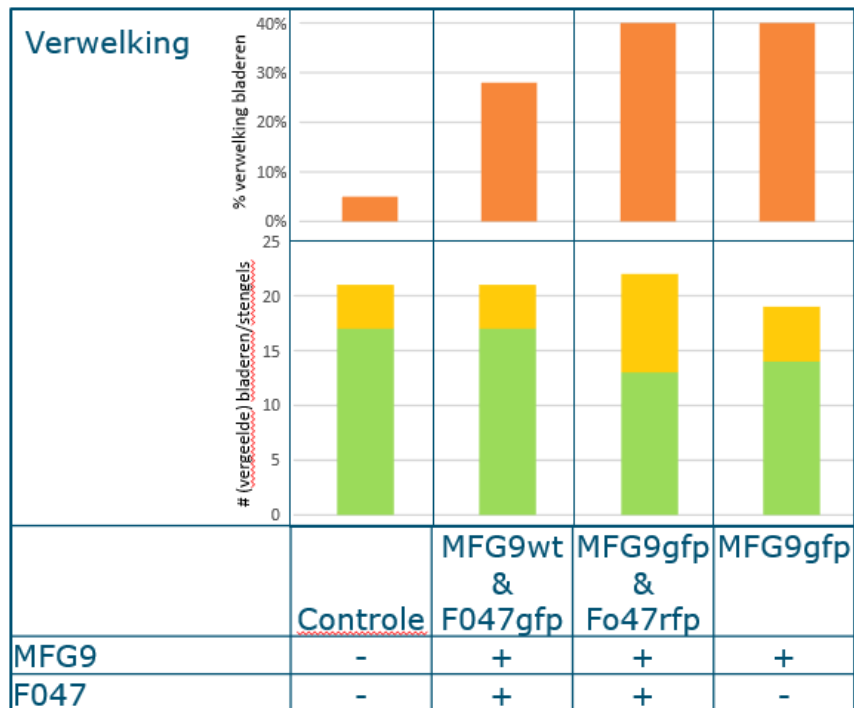
Figuur 2.2 Infectieverloop in bovengrondse delen. A. *Fusarium* groei door de houtvaten in de stengel. B *Fusarium* groei door de nerven in een blad. C en D. *Fusarium* groei door nerven van een blad en door het bladmoes. E. *Fusarium macrospore* gevormd op het blad.

2.3.2 Effecten van niet pathogene *Fusarium* op infectie

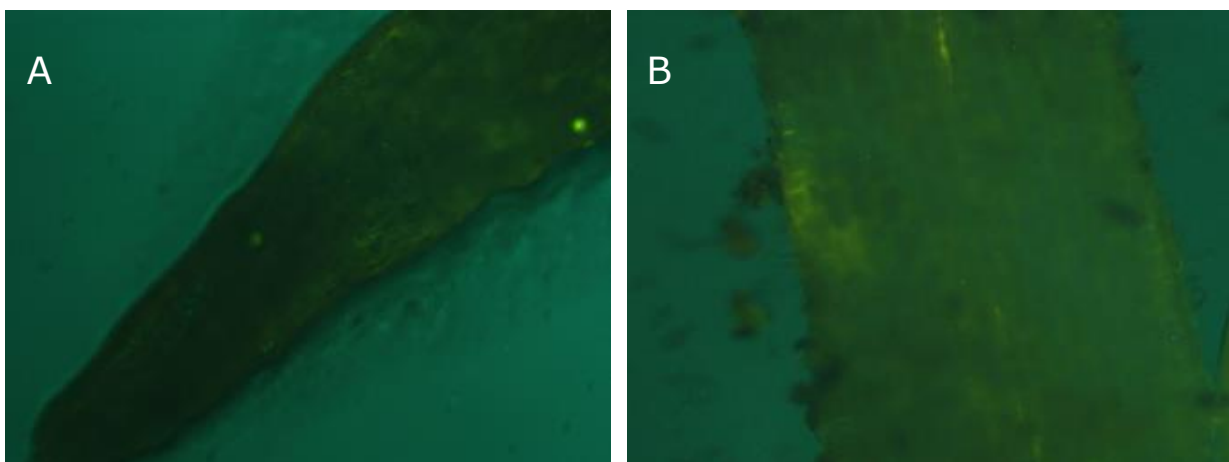
De niet pathogene stam *F. oxysporum* Fo47 is getest op biocontrole eigenschappen in het pathosysteem Gerbera en *F. oxysporum* f.sp. *gerberae*. Kijkend naar de effecten van infectie kunnen we zien dat de infectie met *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* zorgt de vorming van minder bladeren en bloemstengels en dat in de testperiode 40% van de gevormde bladeren verwelkte. Toevoegen van *F. oxysporum* Fo47 leidde tot de vorming van een gelijk aantal bladeren/bladstengels als in de niet geïnoculeerde controle in de testperiode, maar dit kon de verwelking niet altijd tegengaan (Figuur 2.3).

Sporen van *F. oxysporum* Fo47 toegediend aan het substraat kunnen net als de pathogeen de wortel bereiken en hier omheen groeien. De stam komt ook endofytisch in de plant terecht waar deze in het wortelweefsel alleen tussen de cellen groeit, waar de pathogeen (zie Figuur 2.1) ook in de cellen groeit. *F. oxysporum* Fo47 groeit ook in lichte mate door de vaatbundels naar bovengrondse delen (Figuur 2.4).

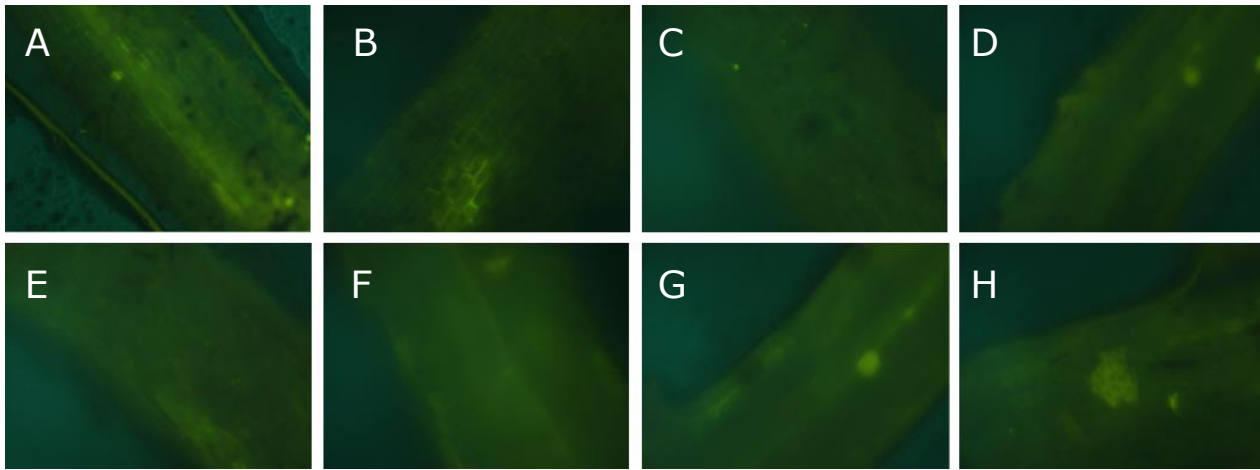
Als we de groei van gfp- *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* vergelijken in planten zonder en met *F. oxysporum* Fo47, kunnen we zien dat *F. oxysporum* Fo47 de besmetting met de pathogeen verminderd en groei ervan meer beperkt. De groei van het GFP-pathogeen leidt tot kleinere infectiehaarden, minder groei en lijkt zich vooral te beperken tot groei rondom de cellen (Figuur 2.5).



Figuur 2.3 Percentage verwelkte bladeren en aantal verwelkte bladeren en bloemstengels op het totaal aantal bij verschillende behandelingen. MFG9wt- is wilde type van *Fusarium oxysporum* f.sp. *gerberae*; F047gfp- is niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47 met groen fluorescerende eiwit; F047rfp is niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47 met rood fluorescerende eiwit. Groen- gezonde bladeren, geel-verwelkte bladeren.



Figuur 2.4 A. *Fusarium oxysporum* Fo47 sporen bij de wortel. B. *Fusarium oxysporum* Fo47 groeit endofytisch tussen de plantencellen (niet erin) en groeit in lichte mate door het vaatweefsel.



Figuur 2.5 A, B, E, F Infectie door GFP-F. *oxysporum f.sp. gerberae*. C, D, G, H. Door niet pathogene *F. oxysporum Fo47* geremde infectie door GFP-F. *oxysporum f.sp. gerberae*.

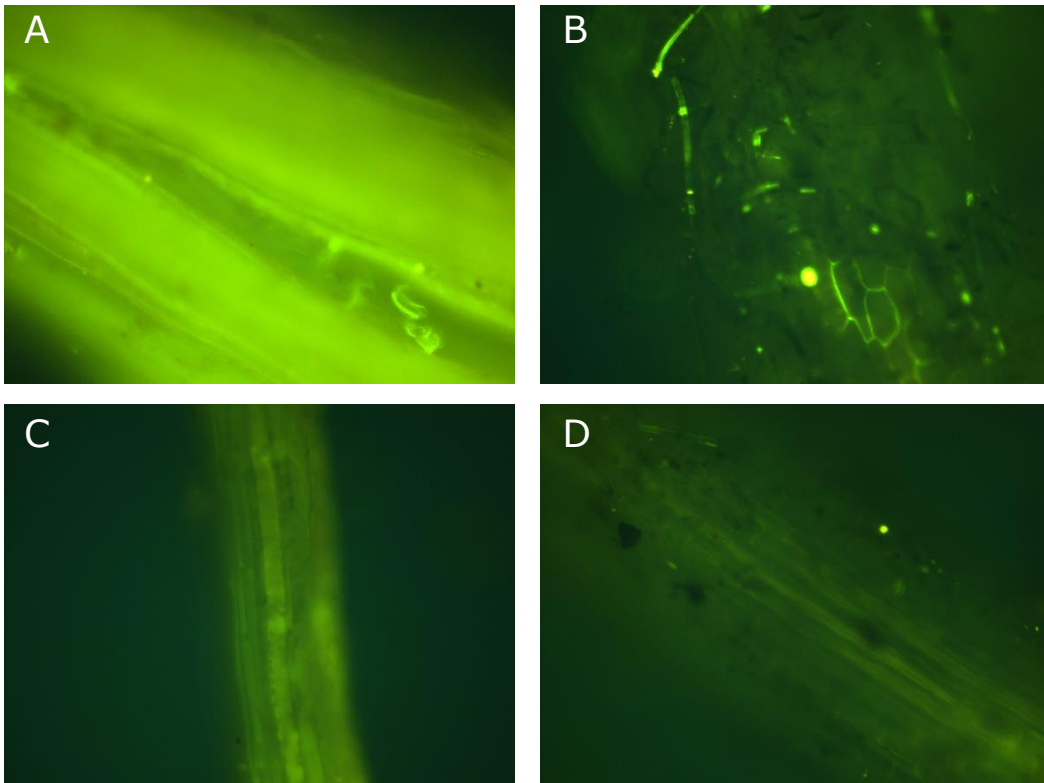
2.3.3 Vergelijking van meerdere middelen

Naast niet pathogene *Fusarium oxysporum Fo47*, zijn daarnaast de effecten van behandeling met *Streptomyces griseoviridis* K61 (Lalstop K61) en met *Trichoderma asperellum* T34 (Asperello T34) getest. Dit experiment is eerst uitgevoerd met cultivar Albino omdat de eerder gebruikte cultivar Babble niet verkrijgbaar was in de geplande periode. Onder de omstandigheden van de ingeperkte proef werden deze cultivars niet erg ziek en het verloop van de ziekte door de GFP-F. *oxysporum f.sp. gerberae* was daardoor niet goed te volgen. Alle toepassingen afzonderlijk en zelfs de behandeling met de pathoogen leken een licht stimulerende werking te hebben op de groei van de cultivars (Figuur 2.6).



Figuur 2.6 Cultivar Albino behandeld met van links naar rechts (1) niet pathogene *F. oxysporum Fo47*, (2) *Streptomyces* behandeling, (3) *Trichoderma*, (4) negatieve controle en (5) positieve controle. Op de negatieve controle na zijn alle andere behandelingen besmet met *F. oxysporum f.sp. gerberae*.

De proef is daarop herhaald met cultivar Babble. Kijkend naar de infectie in de plant met GFP-F. *oxysporum f.sp. gerberae*, kunnen we zien dat onder alle behandelingen GFP-F. *oxysporum f.sp. gerberae* in de plant komt. In de behandeling met niet pathogene *F. oxysporum Fo47* lijkt deze infectie het meest beperkt te worden, maar ook met *Streptomyces* en *Trichoderma* wordt de infectie geremd (Figuur 2.7). Echter met alle behandelingen zijn er aan de plant zelf wel verwelkingsverschijnselen waar te nemen.



Figuur 2.7 Cultivar Babble met infectie met GFP-*F. oxysporum f.sp. gerberae* onder verschillende behandelingen A. zonder biocontrole product. B. met niet pathogene *F. oxysporum Fo47*. C. met *Trichoderma asperellum T34*. D. met *Streptomyces griseoviridis k61*.

2.4 Conclusies en Discussie

F. oxysporum f.sp. gerberae kan Gerbera besmetten zowel via bovengrondse delen als via de wortel. De infectie via de wortel gaat sneller omdat deze zich met de sapstroom via de haarvaten door de plant kan verspreiden. *F. oxysporum f.sp. gerberae* begint (1) met het binnendringen van wortel of blad en groeit tussen en later ook in de cellen (2) na doordringen in het vaatweefsel groeit in de houtvaten, met of tegen de sapstroom in. Gevormde sporen kunnen zich met de sapstroom verder door de plant verspreiden. (3) Vorming van sporen in en op de plant helpt de schimmel zich in en tussen planten verder te verspreiden.

Toevoeging van *F. oxysporum Fo47* remt de infectie van (GFP)- *F. oxysporum f.sp. gerberae*. De niet pathogene Fusarium remt het aantal plaatsen waarop infectie plaatsvindt, leidt tot kleinere infectiehaarden in het weefsel en lijkt zich vooral te beperken tot groei rondom de cellen en niet of minder in de cellen zelf. Als we kijken naar de hele planten, blijkt echter nog steeds een deel van de wortels en blad en bloemstengels die erdoor gevoed worden niet beschermd te zijn. Dit kan zijn omdat tijdens de groei steeds nieuwe wortels en door die wortels gevoede blad en bloemstengels gevormd worden. Mogelijk is er dus een hoger inoculum van *F. oxysporum Fo47* nodig of moet deze herhaald of anders worden toegediend.

Ook *Streptomyces k61* en *Trichoderma asperellum T34* beperken de groei van (GFP)- *F. oxysporum f.sp. gerberae*, al lijken deze soorten iets minder te remmen dan dat *F. oxysporum Fo47* deed, die ook de type groei tijdens de infectie meer lijkt te veranderen (zoals meer groei tussen dan in cellen). Geen van de behandelingen geeft echter totale bescherming. Dit zou te maken kunnen hebben met de hoeveelheid en toediening van de middelen (aangieten, twee of meer dagen voor toediening van het pathogeen), maar ook met de groei van gerbera waarbij steeds nieuwe stengels en bladeren gevormd worden.

Cultivar Babble lijkt gevoeliger voor *F. oxysporum f.sp. gerberae* dan de geteste batch van cultivar Albino. De Babble cultivar is voor deze testen met GFP-*F. oxysporum f.sp. gerberae* daarom de meest geschikte cultivar.

3 Teeltwisseling en Schimmeldruk

3.1 Introductie teeltwisselingsproeven

Een à twee keer per jaar vindt er op de meeste bedrijven een teeltwisseling plaats waarbij in zo kort mogelijke tijd een deel van het oude plantgoed weggehaald wordt, er schoongemaakt wordt en er jong plantgoed in de kas geïnstalleerd wordt. De ervaring heeft geleerd dat er hiermee vaak een hoop stof in de lucht terecht komt afkomstig van oud blad, vloeren en tafels. Telers proberen het neerslaan van het stof vaak tegen te gaan door het ophangen van plastic zeilen om delen van de kas die niet gewisseld worden te beschermen.

Tijdens de PPS Masterplan Fusarium zijn er op een aantal Gerberabedrijven metingen gedaan om meer grip te krijgen op de epidemiologie van *Fusarium*. *Fusariumproblemen* kunnen hierbij zowel veroorzaakt worden door *F. oxysporum*, *F. solani* en in mindere mate door *F. proliferatum*. Deze pathogenen zitten in en op planten met Fusariumverwelking, maar kunnen ook al in en op plantmaterialen zitten die geen symptomen vertonen. Ook in op de grond gelegen plantenresten bleken de pathogenen vaak aanwezig en paden, karren, tafels tot en met handschoenen die met besmet plantmateriaal in aanraking waren geweest bleken besmet te zijn. Metingen van luchtmonsters lieten zien dat deze alleen bij zware besmettingen besmet waren met *Fusarium*, maar dat dat *F. solani* en *F. oxysporum* niet of nauwelijks in luchtmonsters aanwezig waren.

Omdat met de teeltwisseling veel stof in de lucht terecht komt is het de vraag hoeveel *Fusarium* daarmee in de lucht terecht komt en schoongemaakte en eventueel naastliggende delen van de kas kan besmetten. Daarom zijn er proeven opgezet waarbij de teler zelf voor, tijdens en na teeltwisselingsactiviteiten, kan bepalen hoeveel schimmelsporen er in de lucht zweven door te kijken naar depositie uit de lucht op Petrischalen met voedingsmedium voor schimmels. Op grond van de uiterlijke kenmerken van de schimmelsporen na enkele dagen groei bij kamertemperatuur kan een inschatting gemaakt worden van algemene schimmelaantallen als ook van de mogelijke Fusariumkolonies die vaak wit tot lichtroze van kleur zijn en een dicht mycelium vormen.

3.2 Materiaal en Methode

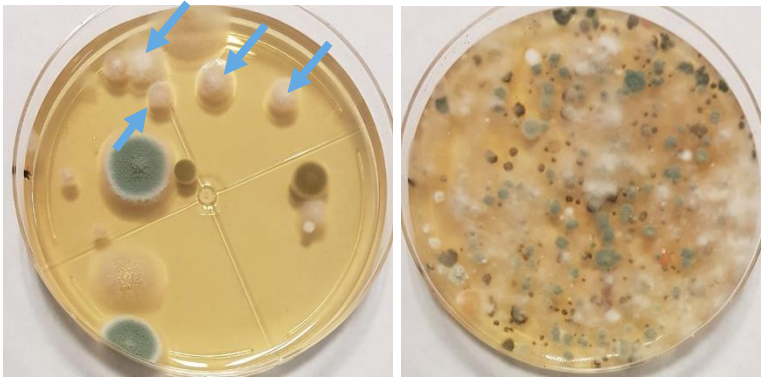
3.2.1 Protocol bemonstering

Voor het nemen van de luchtmonsters is een protocol opgesteld waarmee telers op eigen gekozen plekken in de kas monsters konden nemen (Zie Bijlage 1 voor de uitnodiging). De hoeveelheid schimmelsporen wordt daarbij bepaald door een 9 cm diameter Petrischaal met voedingsmedium (oppervlakte circa 63,6 cm²) gedurende tussen de 2 en 5 minuten open te zetten. Het gebruikte voedingsmedium is een aardappel-dextrose medium (*potato dextrose agar* of PDA) met daarin twee antibiotica om bacteriegroei tegen te gaan. Het gebruikte protocol bestaat uit de volgende stappen:

- Zet de plaat op een plaats naar keuze, waar je de metingen wilt doen. Dit kan in de ruimte zijn waar de teeltwissel plaatsvindt, maar ook in een belendend perceel. Zet later de volgende platen op dezelfde plaats.
- Zet de plaat 2 minuten open (in de ruimte waar de teeltwissel plaats vindt) of 5 minuten open (belendend perceel). Houdt altijd dezelfde tijd aan en time deze.
- Doe de plaat dicht na de meting en tape de plaat eventueel dicht met twee stukjes plakband zodat deze niet open kan vallen. Zet de platen daarna bij kamertemperatuur in het donker weg.
- Neem foto's van de platen na 5 dagen en mail deze naar anne.vandiepeningen@wur.nl of marta.streminska@wur.nl

3.2.2 Tellingen

Ingestuurde foto's worden geprint in kleur en het totaal aantal schimmelkolonies worden geteld. Daarnaast wordt een inschatting gemaakt van het aantal *Fusarium*-kolonies. *Fusarium oxysporum*, *solani* en *proliferatum* geven in vijf dagen tijd, typisch wit tot lichtroze getinte kolonies met een vrij dichte mycelium. Het hart van dit mycelium zal geen donkerder kleur geven dan de rest van het mycelium (Figuur 2.1). Totaal aantal schimmels en aantallen *Fusarium*-achtige schimmels worden daarna verwerkt tot staafdiagrammen naar locatie en tijdstip van de meting tijdens de teeltwisseling. Gevolgen van acties tijdens de teeltwisseling op hoeveelheden sporen in de lucht, inclusief *Fusarium* kunnen daarmee inzichtelijk worden gemaakt.



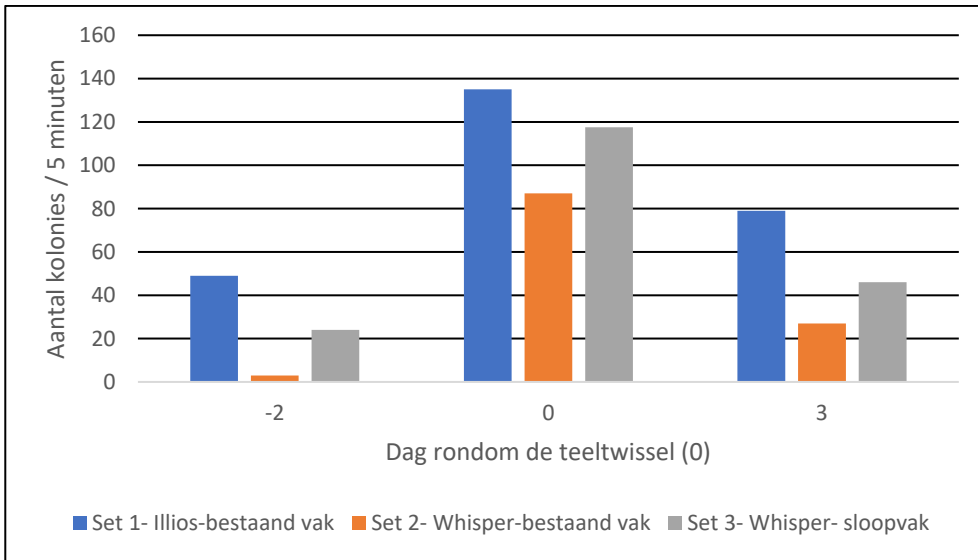
Figuur 3.1 Voorbeelden van voedingsmedia (PDA met antibiotica) van luchtmonsters na 5 dagen groei bij kamer temperatuur. Op de plaat links zijn met blauwe pijlen kolonies aangegeven die *Fusarium* zouden kunnen zijn.

3.3 Resultaten

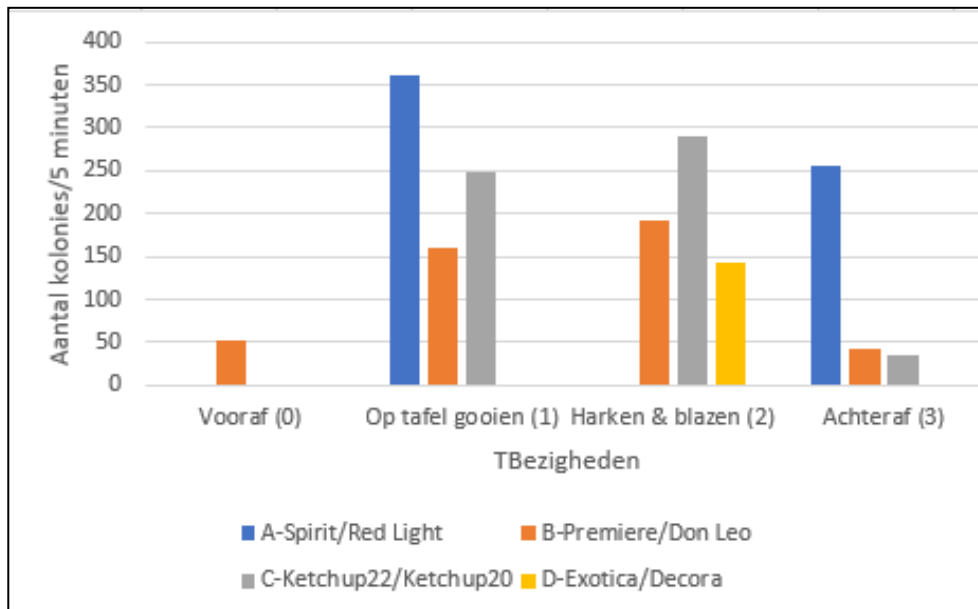
In 2022 en 2023 zijn er verschillende bedrijven geweest die van WUR platen hebben ontvangen om de gevolgen van de teeltwisseling op de verspreiding van schimmelsporen inzichtelijk te maken. Een deel van de telers heeft foto's gestuurd naar de onderzoekers voor beoordeling en een aantal van deze beoordelingen staan hieronder beschreven.

Per bedrijf zijn over het algemeen verschillende locaties bemonsterd, zowel in vakken die gelegeerd werden als in vakken die na ruimen bleven staan. Over het algemeen is de depositie voor de teelt zo rond de 50 sporen per 5 minuten en na de teelt zakt het aantal gemeten sporen ook langzaam terug naar dat niveau (Figuren 2.2, 2.3 en 2.4). Tijdens de teeltwisseling neemt het aantal sporen toe tot wel ruim 7x zo veel. Vooral bij activiteiten zoals op tafel gooien, harken, blazen en blad ruimen neemt het aantal sporen in de lucht toe.

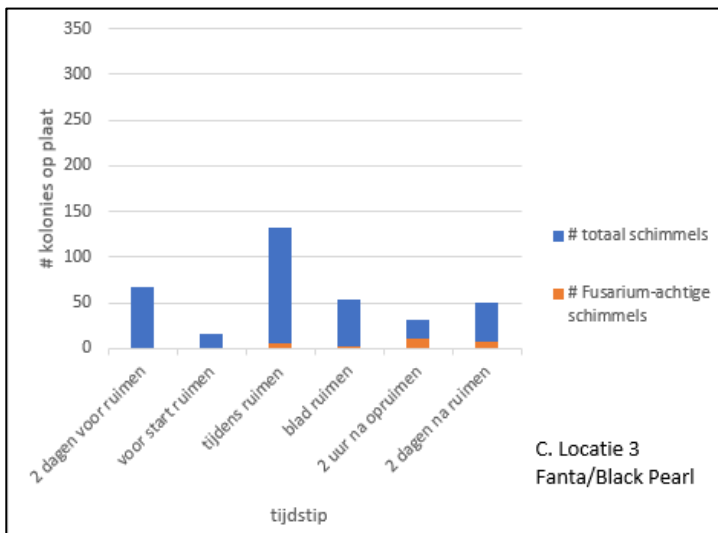
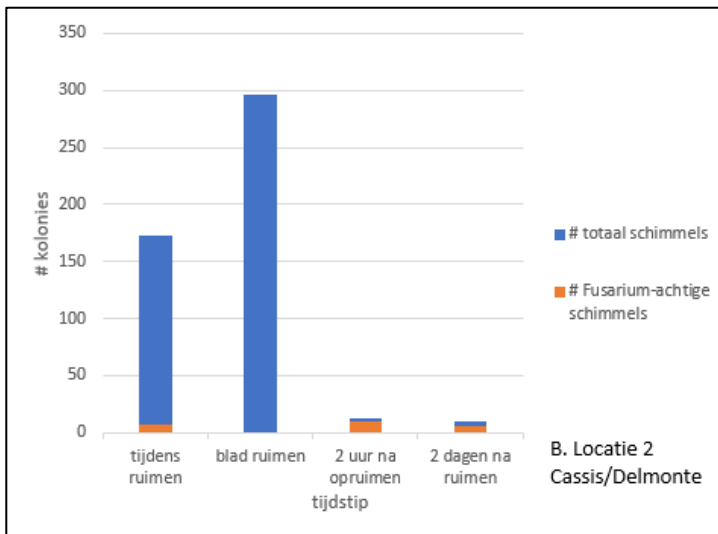
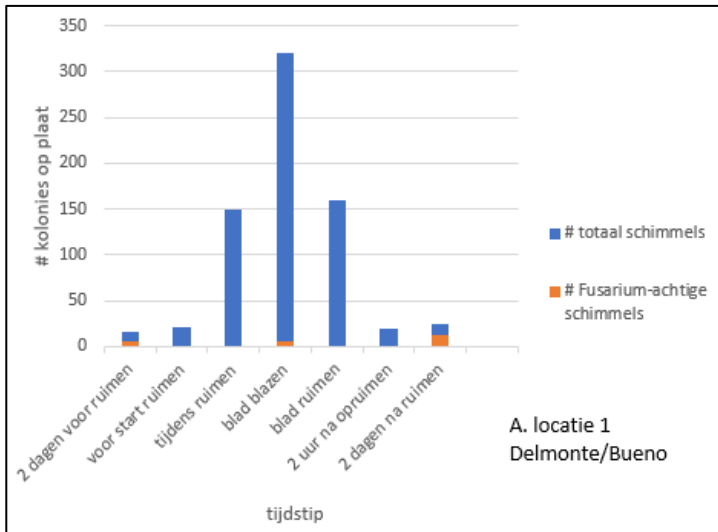
De toename van sporen in de lucht is ook sterk te meten in vakken die niet geruimd worden en niet alleen in geruimde vakken. Kijkend naar het aantal *Fusarium*-achtige kolonies kunnen we zien dat dergelijke sporen op elk gemeten moment van de teeltwisseling voor kunnen komen, maar zeker na de teeltwisseling soms een groot deel van de in de lucht aan te treffen kolonies kan vormen (Figuur 3.4, vooral Figuur 3.4B).



Figuur 3.2 Bedrijf 1. Aantallen schimmels in luchtmonsters genomen 2 dagen voor, tijdens en 3 dagen na de teeltwisseling op drie verschillende locaties in het bedrijf. Locaties 1 en 2 blijvende vakken en locatie 3 in het sloopvak.



Figuur 3.3 Bedrijf 2. Aantal schimmels in monsters genomen voor, tijdens en na de teeltwisseling op vier verschillende locaties in het bedrijf.



Figuur 3.4 Bedrijf 3. Aantal schimmels en aantallen Fusarium-achtige schimmels in monsters genomen voor, tijdens en na de teeltwisseling op drie verschillende locaties in het bedrijf (A, B en C). Eerste cultivar blijft staan, tweede cultivar wordt geruimd. Gemeten in vak dat blijft staan.

3.4 Conclusies en Discussie

In de lucht zweven altijd schimmelsporen. Rondom de teeltwisseling met activiteiten als bladruimen, harken en blazen en schoonmaken komt er een flinke hoeveelheid sporen extra in de lucht waaronder mogelijk Fusariumsporen. Na de teeltwisseling zakt dit aantal sporen geleidelijk aan terug naar het begin-niveau. De vaak na de teeltwisseling waargenomen laag stof in geruimde vakken, maar ook in vakken ernaast bestaat voor een deel uit neergeslagen schimmelsporen.

De identificatie van Fusariumsporen op grond van hun morfologie als relatief snelgroeiende, relatief dichte kolonies die over de hele kolonie wit of licht roze zijn, is gezien het waarnemen in kassen waarschijnlijk juist, maar kan op grond van een foto niet worden bevestigd. Daarvoor zouden de platen zelf verder geanalyseerd moeten worden. Bij hoge dichtheden van schimmels op een plaat zijn de mogelijke Fusariumsporen minder goed of soms niet waarneembaar. Door de competitie met andere schimmels om aanwezige voedingsstoffen blijven dan vaak alle kolonies klein of overgroeien ze elkaar en dan is kleur en myceliumdichtheid moeilijker waarneembaar.

Om infectie via de lucht te beperken kan het goed zijn om jong plantmateriaal niet direct het geruimde en schoongemaakte vak te zetten maar 1 of 2 dagen te wachten tot de hoeveelheden in de lucht zijn gedaald tot het basisniveau. Dan oppervlaktes (nogmaals) te ontsmetten met schimmeldodende schoonmaakmiddelen en dan pas jong plantgoed binnen te zetten.

Omdat ook in vakken naast de teeltwisseling de hoeveelheid schimmelsporen in de lucht sterk toenemen, ondanks de soms opgehangen verticale plastic zeilen. Zou het hier een optie kunnen zijn om tijdelijk de planten af te schermen met een horizontaal plastic dek over de planten wat na het schoonmaken van het geruimde vak en voor het weghalen bespoten wordt met een schoonmaakmiddel met schimmeldodende eigenschappen.

4 Detectiemethoden *Fusarium* en *Verticillium*

4.1 Introductie

In Gerbera zijn er meerdere pathogenen die verwelkingsziekten kunnen veroorzaken. Binnen het genus *Fusarium* zijn dat in ieder geval *Fusarium oxysporum*, *F. solani* en *F. proliferatum*. Daarnaast kan *Verticillium dahliae* vergelijkbare verwelkingsverschijnselen veroorzaken. De verwelkingsverschijnselen met vergelend en verwelkend blad en soms bruinverkleuring in wortel en stelen van de plant zijn meer reacties van de plant op (effectoreiwitten geproduceerd door) een pathogeen dat infectie in weefsel geeft en daarbij vaatbundels verstopt dan dat het aangeeft welke pathogeen de verschijnselen veroorzaakt.

Detectiemethoden zijn nodig om *Fusarium*-soorten en *Verticillium dahliae* uit elkaar te houden. Kennis over het pathogeen kan belangrijk zijn als er voor bepaalde pathogenen resistente of tolerante cultivars voor handen zijn of bijvoorbeeld als pathogenen een andere epidemiologie vertonen en daardoor door verschillende hygiënemaatregelen beter te beheersen kunnen zijn.

Detectiemethoden kunnen bijvoorbeeld zijn het isoleren van pathogenen op meer of minder selectieve schimmelvoedingsmedia. Alleen zijn bijvoorbeeld verschillende *Fusarium*-soorten lastig visueel uit elkaar te halen en kan identificatie op grond van DNA daarna alsnog nodig zijn. Isolatie van schimmels kan kwantitatief zijn, maar als hele plantendelen direct gebruikt worden zegt dit niks over de hoeveelheid pathogeen aanwezig in een monster. Maar er zijn ook detectiemethoden die gebruik maken van DNA. LAMP-detectie is daarbij een op DNA gebaseerde methode die op locatie toegepast kan worden, met voor ieder pathogeen een andere reactie. Via TaqMan-detectie in het lab kunnen meerdere pathogenen in een reactie getest worden en kan dit ook kwantitatief gebeuren voor als men bijvoorbeeld de effectiviteit van behandelingen wil testen op een pathogeen.

Binnen de PPS Masterplan *Fusarium* zijn voor *F. oxysporum*, *F. solani* en *F. proliferatum* TaqMan detectiemethodes ontwikkeld. Voor de pathogeen *V. dahliae* is een TaqMan beschreven door Bilodeau en collega's (2012). Binnen de PPS *on site* detectie zijn LAMP methodes voor alle vier de pathogenen getest hun werking.

4.2 Materiaal en Methode

4.2.1 TaqMan detectie

TaqMan detectie is een real time techniek die toegepast kan worden op symptomatisch en asymptomatisch materiaal. Real Time, betekent in dit geval dat tijdens het lopen van de reactie het signaal gevolgd kan worden en dat afhankelijk van de beginconcentratie van het targetorganisme er sneller of later signaal meetbaar wordt. De methode kan dus ook kwantitatief gebruikt worden. Voor *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* zijn er TaqManprobes en -primers die afzonderlijk of als een triplex reactie gebruikt kunnen worden. Voor *Verticillium dahliae* gebruiken we de primers en probe gepubliceerd door Bolideau en collega's (2012). Primer- en probe-sequenties staan in Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Primer sets voor TaqMan.

Verticillium dahliae		
Vdahl	Vd-F929-947	CGTTTCCCGTTACTCTTCT
	Vdhrc FAM	[5' 6-FAM] CACCGCAAGCAGACTCTTGAAAGCCA [3' BHQ1]
	Vd-R1076-1094	GGATTTCGGCCAGAAACT
Fusarium oxysporum		
Foxy	FoxyTEF1Fw	TGAGTACTCTCCTCGACAATG
	FoxyTEF1Pr	quencher-CATCGTCAATCCCAGACCAAGACCTG+dye
	FoxyTEF1Rv	CGGTCTGTGAAACGATGTCAG
Fusarium solani		
Fsol	FsolTEF1Fw	CACCGTAAGTCAAACCCTCAT
	FsolTEF1Pr	quencher-CTGCTTATCTCGGGTCGTGGAACC+dye
	FsolTEF1Rv	GTGT=ACCGGTCTGTAGATGATTG
Fusarium proliferatum		
Fpro	BioInt32145Fw	GTCACCATCACAGCGAAA
	BioInt32145Pr	quencher-CGGCCTCAACAACGATGGCAC+dye
	BioInt31245Rv	ACGTTGTAAAGCTTGAAGTTAG

4.2.2 LAMP detectie

LAMP detectie wordt in de praktijk alleen gedaan op symptomatisch materiaal. Bij voldoende aanwezigheid van DNA van het te detecteren pathogeen helpen de zes afzonderlijke primers in de reactie zo veel, grote kopieën te maken van het DNA te maken dat deze met een algemene kleurstof zichtbaar te maken is. Uit wetenschappelijke literatuur hebben we verschillende primersets getest voor *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en *V. dahliae*. In Tabel 4.2 staan de sets die het beste resultaat gaven.

4.2.3 Bemonstering

Om te kijken welke plantendelen het best te beoordelen zijn op besmetting, zijn vijf gerbera planten met verwelkingsverschijnselen verzameld op een bedrijf. Van deze planten zijn monsters genomen van groen en verwelkt blad, groen en verwelkte bladsteel, groen en verwelkte bloemsteel, bruine en witte wortels en van de basis van de plant. Alle monsters zijn opgedeeld in gelijke submonsters, die getest zijn voor alle vier de TaqMantesten en alle vier de LAMP testen. Uiteindelijk is gekeken welke type monsters het vaakst een positief signaal gaven en of deze voor dezelfde pathogenen positief scoorden.

4.2.4 Bedrijfssurvey en cultivars

Voor een survey naar welke problemen bij afzonderlijke bedrijven spelen en of bepaalde cultivars gevoeliger zijn voor bepaalde pathogenen zijn er 150 sets bladeren met bladsteel ingeleverd, van 11 bedrijven en van in totaal 14 cultivars. 125 monsters kwamen van symptomatische planten, 25 van symptoomvrije planten. Alle monsters zijn verrijkt op medium selectief voor *Fusarium* en *Verticillium* en getest op de vier voorkomende pathogenen *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en *V. dahliae* met behulp van TagMan Assays.

Tabel 4.2 Succesvolle primer sets voor LAMP.

Verticillium dahliae		
Vd1	Vd1-FIP	ACATGGTCAGACCATGGCCG AAAGTCTCATGCCCCCTTCT
	Vd1-BIP	CGCCCTCGGCAGTCAAGAT GCTTGGGGCTCAAGGAACG
	Vd1-F3	AGTAACCCCCCCCCAAAC
	Vd1-B3	TGTCTCGTGTGTGTGTGTG
	Vd1-LF	ACCCAGCACATGATAGACAAA
	Vd1-LB	ACCCCTTCACGACAACCTGG
Fusarium oxysporum		
Foxy2	Foxy2-FIP	CCAGGCCTACTTGAAGGAACCGTCAAGCAGTCACTAACCAT
	Foxy2-BIP	GTCAAGCAGTCACTAACCATACGGTGACATAGTAGCGA
	Foxy2-F3	ACAACCTCAATGAGTGCG
	Foxy2-B3	CATGAGCGACAACATACCA
	Foxy2-LF	AGCGTGAGCGTGGTATCAC
	Foxy2-LB	ACGGTGACATAGTAGCGA
Fusarium solani		
Fsol1	Fsol1-FIP	CTTTGTCCAACGTCGCCGAGTTTTGCGGTTGACCGTAAT
	Fsol1-BIP	AACACCAAACCCTCTTGCGCAGCGGTTCTATTGTTGAA
	Fsol1-F3	GCTTCTCCCAGTCCCAA
	Fsol1-B3	AGGAACCCTTACCGAGCT
	Fsol1-LF	GCATCACGTGGTTCATAACAGACA
	Fsol1-LB	GGGGTAAATGCCCCACCAAAAA
Fusarium proliferatum		
Fpro1	Fpro1-FIP	AAGTTCGAGACTCCTCGCTACTGAGGAAGTAGGATGAGGTATGA
	Fpro1-BIP	CTCGGCCTTGAGCTTGTCA-ACAATAGGAAGCCGCTGAG
	Fpro1-F3	AGTACCAGTGATCATGTTCTTG
	Fpro1-B3	TCCTGTCCACAACCTCAA
	Fpro1-LF	TCACCGTCATTGGTATGTTGT
	Fpro1-LB	AGGCGTACTTGAAGGAACC

4.3 Resultaten

4.3.1 Bemonstering

Vijf Gerbera planten met verwelkingsverschijnselen zijn verzameld en geanalyseerd. Van elke plant zijn monsters genomen van groen en verwelkt blad, groen en verwelkte bladsteel, groen en verwelkte bloemsteel, bruine en witte wortels en van de basis van de plant. Al deze monsters zijn opgedeeld in gelijke submonsters, die getest zijn voor alle vier de TaqMantesten en alle vier de LAMP testen. Uiteindelijk is gekeken welk type monsters het vaakst een positief signaal gaven en of deze voor dezelfde pathogenen positief scoorden (Tabel 4.3.)

De verzamelde planten scoorden vooral positief op besmetting met *Verticillium dahliae* en op *Fusarium oxysporum*. De TaqMan detectie is duidelijk gevoeliger dan de LAMP detectie. Terwijl ook de TaqMan detectie wat gevoeliger lijkt te zijn omdat deze een multicopy regio in het genoom detecteert terwijl detectie in *Fusarium* gebaseerd is op een *single copy gen* (dus 100 tot 120 kopieën die gedetecteerd worden in plaats van 1 per cel).

Tabel 4.3 Gemeten positieve monsters met signalen van *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en/of *V. dahliae*, gemeten met TaqMan of met LAMP.

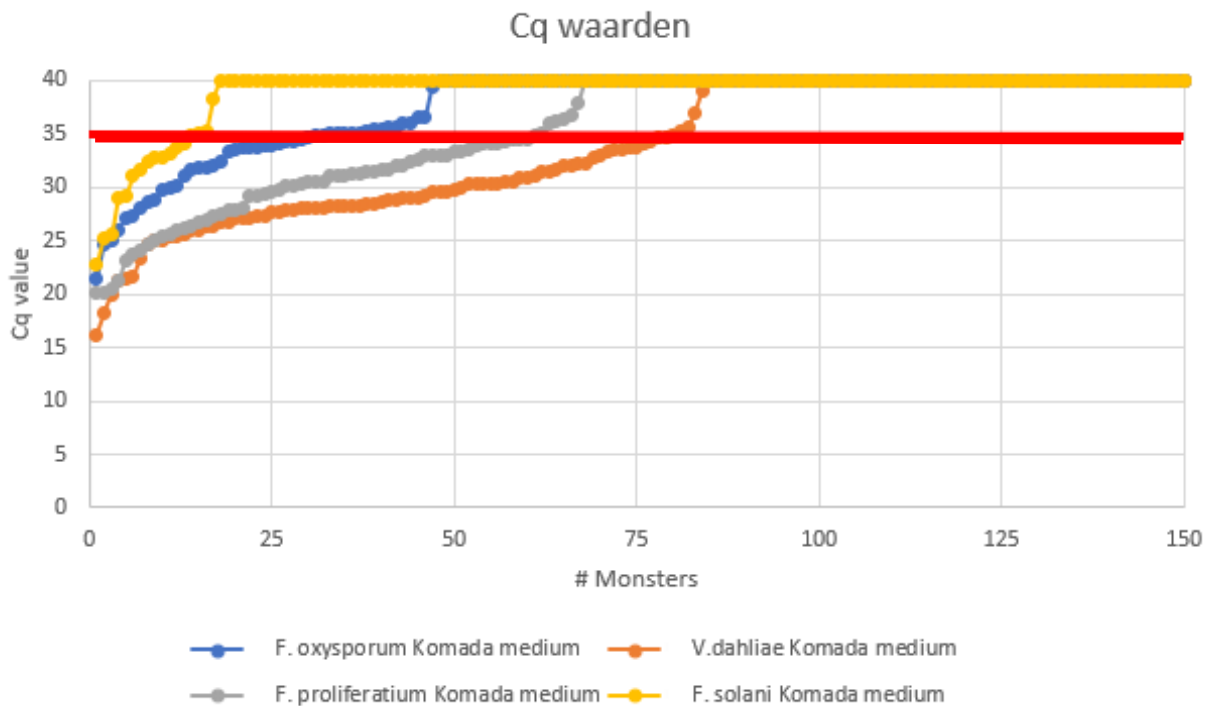
Monster van	TaqMan positief	LAMP positief
Blad, groen	1/5	1/5
Blad, verwelkt	3/5	-
Bladsteel, groen	3/5	-
Bladsteel verwelkt	4/5	-
Bloemsteel, groen	3/4	-
Bloemsteel, verwelkt	3/5	3/5
Wortel, gezond	2/5	2/5
Wortel, bruin	4/5	2/5
Basis	4/5	3/5

De plantendelen die het beste aantonen dat er een infectie zit in de plant zijn de basis van de plant, symptomatische wortels en bladstelen van verwelkende bladeren. Bemonstering van wortel en plantbasis betekent over het algemeen dat de plant uit elkaar gehaald moet worden voor de bemonstering. Voor het nemen van symptomatische bladeren hoeft dit niet. Daarom nemen we voor het vervolg onderzoek vooral monsters van bladstelen van verwelkende bladeren en verwerken deze met TaqMan analyse.

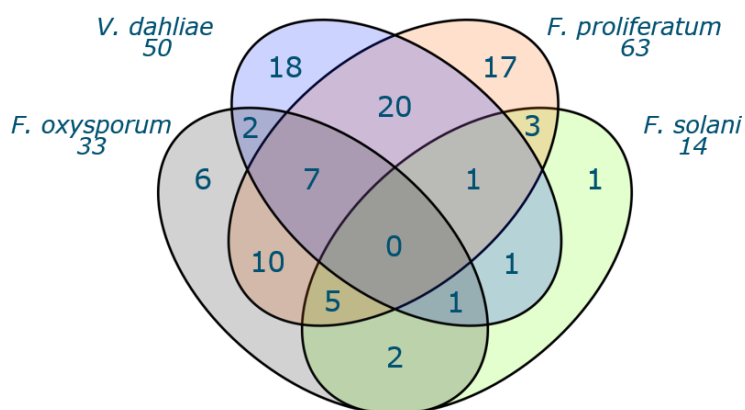
4.3.2 Bedrijfssurvey en cultivars

Voor een survey naar welke problemen bij afzonderlijke bedrijven spelen en of bepaalde cultivars gevoeliger zijn voor bepaalde pathogenen zijn er 150 sets bladeren met bladsteel ingeleverd, van 11 bedrijven en van in totaal 14 cultivars. 125 monsters kwamen van symptomatische planten, 25 van symptoomvrije planten. Van alle monsters zijn de bladstelen aan de buitenkant ontsmet, bermalen en verrijkt op medium selectief voor *Fusarium* en *Verticillium* en vervolgens getest op de vier voorkomende pathogenen met behulp van de TaqMan assays voor de vier pathogenen.

Uiteindelijk bleken in totaal 94 planten positief. Ook in de symptomatische planten was een flink deel van de planten besmet. *Verticillium dahliae* werd het vaakst gedetecteerd, maar dat kan zijn omdat deze test gebaseerd is op een multicopy regio en dus een 100x gevoeliger is. Daarna werd *F. proliferatum* het meest aangetroffen, gevolgd door *F. oxysporum* en uiteindelijk *F. solani* (Figuur 4.1). Besmettingen komen relatief vaak samen voor (Figuur 4.2), wat suggereert dat een besmette plant met één pathogeen, gevoeliger is voor secundaire besmettingen.



Figuur 4.1 Cq waarden van de monsters voor de verschillende tests op *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en *V. dahliae*. Een monster is positief voor het pathogeen als de waarde lager is dan 35 (rode lijn). Hoe lager de Cq waarde des te groter de hoeveelheid pathogeen. De *V. dahliae* TaqMan is sneller positief omdat deze test een regio detecteert die in 100 à 120 kopieën aanwezig is in het genoom.



Figuur 4.2 Aantal keer dat *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* en *V. dahliae* alleen of samen voorkwamen in de 150 bemonsterde planten.

In symptotische planten werd in 29.6% van de planten een besmetting met *F. oxysporum* waargenomen, terwijl in asymptotische planten deze pathogeen in 24% van de planten gevonden werd, wat suggereert dat we meer *F. oxysporum* zien als er ook daadwerkelijk symptomen zijn (Tabel 4.4). *F. proliferatum* werd net zo vaak gevonden in planten met als in planten zonder symptomen, terwijl *F. solani* minder vaak gevonden werd in planten met symptomen. Dit suggereert dat *F. oxysporum* de sterkste pathogeen is van de drie, terwijl *F. proliferatum* in gerbera net als in veel andere teelten heel goed verspreid en veel aanwezig is, maar eerder een secundair pathogeen lijkt te zijn. *V. dahliae* werd veel gedetecteerd maar net als *F. solani* ook veel in niet symptotisch materiaal.

Tabel 4.4 Aantallen en percentages planten besmet met *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* of *V. dahliae* in de monsters van symptomatisch en niet-symptomatisch materiaal. Vetgedrukte getallen zijn significant hoger dan in de andere klasse.

Symptomen	<i>F. oxysporum</i>	%	<i>V. dahliae</i>	%	<i>F. proliferatum</i>	%	<i>F. solani</i>	%	totaal
Aanwezig	37	29,6	71	56,8	52	41,6	9	7,2	125
Afwezig	6	24,0	17	68,0	10	40,0	5	20,0	25

Op alle bedrijven waren minimaal twee pathogenen tot wel alle vier de pathogenen aanwezig (Tabel 4.5). Op sommige bedrijven werd in de ingezonden planten een of 2 pathogenen niet gevonden. Dit kan betekenen dat deze niet op deze bedrijven voorkomen, of ook dat ze op de ingezonden cultivars minder gevonden worden. We hebben daarom ook gekeken naar de infecties per cultivar. Kijkend naar cultivars waarvan we een flink aantal monsters hebben ontvangen, kunnen we zeggen dat zeker Anna en Albino gevoelig zijn en vaak besmet zijn, terwijl een Delmonte weinig *F. oxysporum* besmetting lijkt te hebben en Olympic gold relatief weinig positieve monsters oplevert uit de bladsteel, waarbij de vraag is of deze minder makkelijk besmet raakt of vooral verwelkt door besmettingenlager in de plant.

Tabel 4.5 Gemeten positieve monsters met signalen van *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en/of *V. dahliae*, gemeten op de verschillende bedrijven. Bedrijfsnamen onder code met 1^e letter bedrijf en volgnummer.

Bedrijf	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>	# monsters	# cultivars
B1	0	1	1	0	6	1
G1	6	2	4	2	12	2
G2	1	4	4	0	12	2
H1	2	5	8	0	24	4
K1	0	15	9	0	18	3
K2	5	18	7	5	22	5
K3	4	0	8	0	18	3
N1	2	6	3	0	6	1
N2	2	5	6	3	6	1
R1	8	20	11	4	23	4
W1	3	3	2	0	3	1

Tabel 4.6 Gemeten positieve monsters met signalen van *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en/of *V. dahliae*, gemeten in de verschillende cultivars.

Cultivar	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>	# monsters	# bedrijven
Albino	6	14	14	3	18	4
Allure	0	4	4	0	6	1
Anna	6	22	18	4	24	4
Bueno	2	11	6	0	18	3
Delmonte	0	9	5	2	17	3
Julia	5	1	3	2	7	1
Kimsey	3	3	5	0	9	2
Lido	0	1	1	0	6	1
Moët	1	3	0	2	5	1
Olympic gold	4	1	3	0	11	3
Picnic	0	5	3	0	6	1
Rich	1	0	2	0	6	1
Suri	1	0	0	0	6	1
Whisper	2	10	2	1	11	2

4.4 Conclusies en Discussie

Voor de detectie van *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en *V. dahliae* hebben we nu de beschikking over zowel een TaqMan analyse methode als een LAMP methode. De LAMP methode is minder gevoelig, niet kwantitatief, maar heeft de mogelijkheid om *on site* in gezet te worden. De TaqMan methode is gevoeliger, kan alleen in het lab worden uitgevoerd maar kan ook kwantitatieve data opleveren.

Analyses van ziek plantmateriaal laat zien dat zieke wortels, de basis van een zieke plant maar ook de bladsteel van verwelkend blad geschikte monsters zijn om aan te tonen welke pathogeen aanwezig is. Omdat het bemonsteren van de bladsteel inhoudt dat niet de hele plant aan stukken gescheurd hoeft te worden, lijkt de bladsteel van verwelkend blad het beste en eenvoudigst te bemonsteren monstertype te zijn. De bladsteel is ook makkelijk te ontsmetten en fijn te maken voor verdere verwerking.

Kijkend naar monsters uit de praktijk, zijn veel bedrijven besmet met meerdere pathogenen. Zowel *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* als *V. dahliae* werden gevonden in de monsters, vaak samen met een of meer van de andere pathogenen wat suggereert dat een zieke plant makkelijker met meer pathogenen besmet raakt. Een aantal van de bemonsterde cultivars lijkt vaker en zwaarder besmet te zijn dan andere cultivars. Alhoewel dit ook kan betekenen dat in sommige cultivars de infecties dieper in de plant zitten en minder makkelijk aantoonbaar zijn in de bladsteel.

5 Praktijkproef beheersing wortelziektes

5.1 Introductie

In hoofdstuk 2 is beschreven hoe met behulp van GFP-pathogenen, de effecten van biocontrole middelen op plant niveau te bestuderen is en is de infectie van *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* bestudeerd en de effecten van een drietal middelen op het verloop van die infectie. In hoofdstuk 4 is beschreven hoe op veel van de praktijkbedrijven niet alleen *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* aanwezig is maar ook *F. solani*, *F. proliferatum* en *V. dahliae*, die elk afzonderlijk, maar ook samen in symptomatisch plantmateriaal te vinden zijn.

Als laatste onderdeel van deze PPS, is daarom gekeken hoe de drie eerder geteste middelen die op plant niveau een reductie in de mate van infectie gaven tijdens de circa 8-10 weken GFP-proeven (hoofdstuk 2) en twee nieuwe behandelingen, op praktijkbedrijven in verschillende gevoelige cultivars de ziekteverschijnselen en de mate van infectie met de 4 verschillende pathogenen beïnvloeden. Ziektebeoordelingen worden in dit geval gedaan aan de hand van verwelkings-symptomen in de planten en de aantallen verwijderde planten. Daarnaast wordt met de eerder ontwikkelde moleculaire detectiemethodes gemeten welke pathogenen aanwezig zijn en hoe deze veranderen over de tijd. De effecten op de productie van de behandelde planten worden niet meegenomen.

5.2 Materiaal en Methode

5.2.1 Opzet praktijkproeven

In 2023 zijn er bij twee gerberabedrijven gedurende negen maanden verschillende behandelingen met biorationale middelen toegepast die gericht zijn op de controle van *Fusarium* of dan wel op het weerbaarder maken van de plant. Bij aanvang van de praktijkproeven stonden de proefplanten al ongeveer 9 maanden lang in de kas te groeien.

Plantsoort:	Gerbera; planten in de pot met steenwol
Cultivars:	Anna en Café (Bedrijf 1); Atlanta en Plot (bedrijf 2)
Behandelingen:	1- <i>Streptomyces</i> k61 2- <i>Trichoderma asperellum</i> T34 3- <i>Fusarium oxysporum</i> Fo47 (niet pathogeen voor gerbera) 4- ANLBF-2 (op basis van micro-organisme) 5- Exp.1 (op basis van mix micro-organismen) 6- controle (zonder behandeling gericht op <i>Fusarium</i>)
Kasverdeling:	In elke cultivar zijn er in totaal 60 veldjes uitgezet (met 25 planten per veldje) Er zijn 10 herhalingen (veldjes) van een behandeling per cultivar (25 planten per veldje, totaal 250 planten). Plattegronden met verdeling van proefvakken zijn te vinden in Bijlage 2.
Uitvoering:	Behandelingen met biorationals zijn herhaaldelijk toegepast. Behandelingen met <i>Streptomyces</i> k61, <i>Fusarium oxysporum</i> Fo47, ANLBF-2 zijn elke zes weken herhaald. Behandeling <i>Trichoderma asperellum</i> T34 is elke 12 weken herhaald. Behandeling met Exp.1 is elke twee weken herhaald. Informatie over dosering van biorationals is te vinden in Bijlage 3. Elke maand zijn de planten visueel gescoord op ziektesymptomen.
Bemonsteringen:	Drie keer gedurende de proefperiode zijn er monsters genomen van de plantmateriaal, voedingswater (direct na ontsmetter en uit druppelaars), drainwater en lucht voor een PCR check op aanwezigheid van gerbera pathogenen (<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> en <i>Verticillium dahliae</i>).
Start praktijkproeven:	9 maart 2023 (Bedrijf 1, proefweek 1) en 16 maart 2023 (Bedrijf 2, proefweek 2)
Datum bemonsteringen:	9 maart 2023, 30 juni 2023 en 6 december (Bedrijf 1) 16 maart 2023, 5 juli 2023 en 13 december (Bedrijf 2)

5.2.2 Ziektebeoordeling

Eerste visuele beoordeling van de ziektesymptomen heeft zeven weken na de start van de proef plaatsgevonden. Daarna zijn elke vier weken de aantallen zieke en dode (en vervangen) planten per behandeling/vak genoteerd om het verloop van de ziekte in elk blok en behandeling bijhouden.

5.2.3 Bemonstering en TaqMan Analyse

In maart 2024 bij het begin van de proef (0-meting), halverwege in de zomer (meting 1; juni/juli 2023) en aan het eind in december 2023 (meting 2) worden 3x10 bladeren verzameld per cultivar per behandeling met random bladeren uit elk blok. In het lab worden de bladstelen verzameld, gesteriliseerd (oppervlak) en gewassen en dan gezamenlijk vermalen en in de verrijking gezet. Naast planten monsters worden er ook monsters genomen van voedingswater (5 liter monsters, gefilterd) en drainwater (2 liter monsters, gefilterd) en met behulp van een Coriolis air sampler luchtmonsters (3 m³) in de vakken met planten.

Uit de verrijking wordt een monster genomen, DNA geïsoleerd en met de in hoofdstuk 5 beschreven TaqMan analyses beoordeeld op het voorkomen van *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en *V. dahliae*. Naast de plant monsters worden ook de lucht- en watermonsters op DNA geanalyseerd.

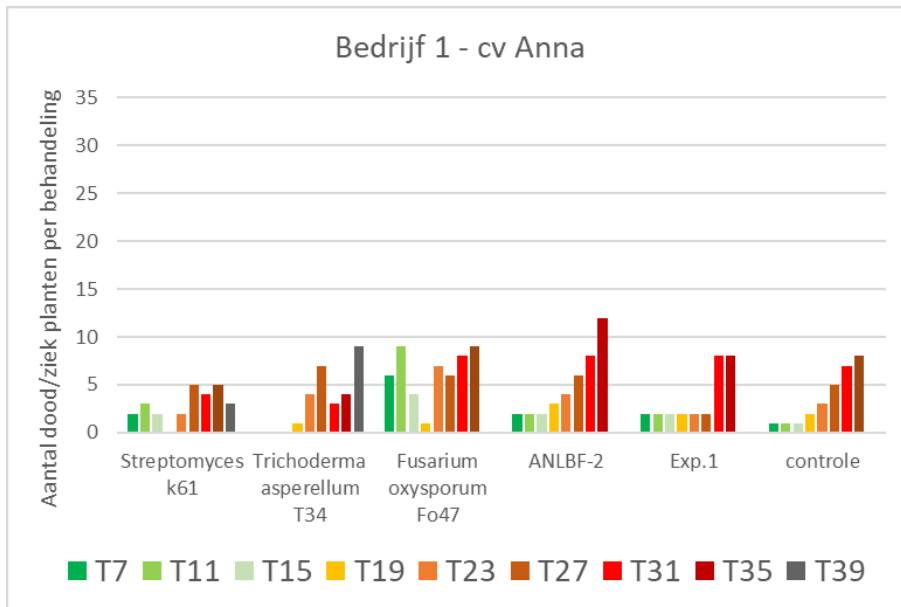
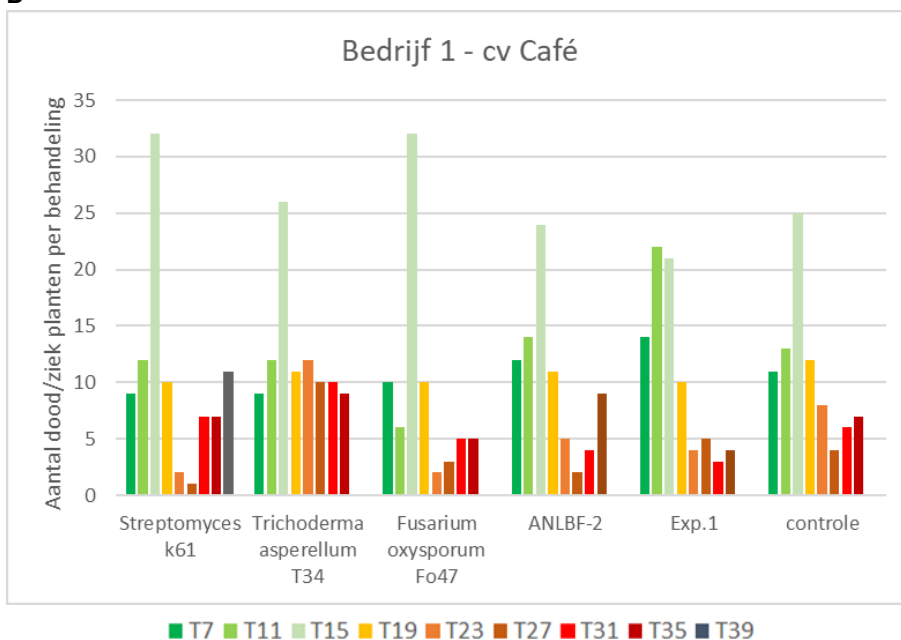
5.3 Resultaten

5.3.1 Observaties en afwijkingen van proefopzet

Tijdens de praktijkproef zijn er op Bedrijf 1 tussentijds, in de week 15 van de proef, zieke en dode planten verwijderd (in cultivar Café). Er zijn nieuwe planten gezet op de plekken van verwijderde planten. Op Bedrijf 2 zijn er tussentijds geen planten verwijderd.

5.3.2 Ziektescores

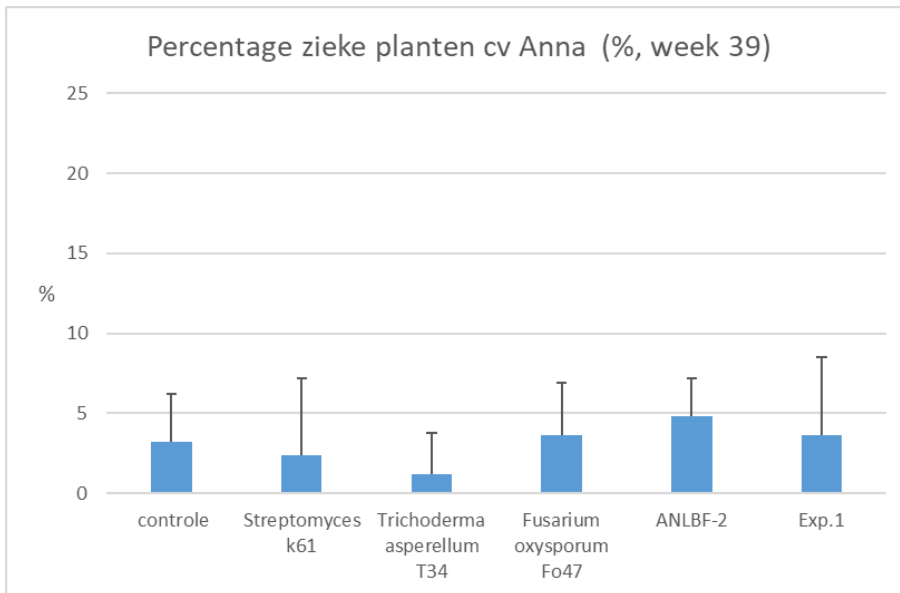
Ziektesymptomen en plantuitval ontwikkelden zich met verschillende snelheden in verschillende cultivars (Figuur 5.1 en Figuur 5.4).

A**B**

Figuur 5.1 Ziekteontwikkeling (o.a. verwelkingssymptomen) gedurende de praktijkproef op Bedrijf 1 (T7,T11,T15,T19,T23,T27,T31,T35,T39- weeknummers vanaf de start van de praktijkproef (aantal planten per behandeling 250).

Op Bedrijf 1 bleek cultivar Café gevoelig te zijn voor verwelking en uitval. In de week 15 van de proef waren er tussen 8% en 12.8% planten ziek, respectievelijk in behandeling Exp.1 en behandelingen met *Streptomyces k61* en *F. oxysporum Fo47* (Figuur 5.1B). Terwijl van cultivar Anna minder dan 1.6% van de planten symptomen van verwelking vertoonden in de week 15 van de proef (Figuur 5.1A). Daarom zijn er, na de beoordeling in week 15, planten weggehaald bij cultivar Café en er zijn nieuwe planten tussen gezet in de proef, wat verklaard de scherpe daling van aantal zieke planten van cv Café tussen de week 15 en week 19.

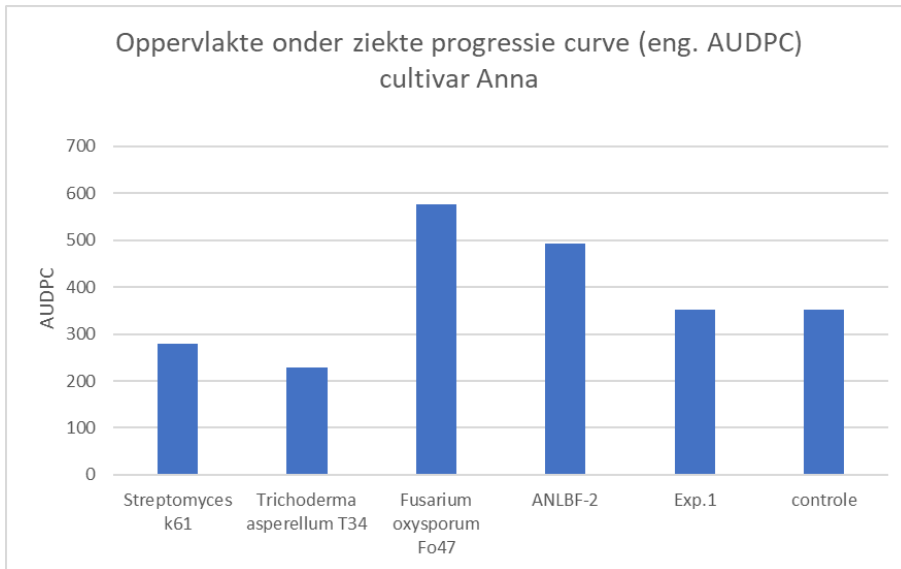
Geen van de toegepaste middelen was in staat de uitval van gerbera op Bedrijf 1 volledig te beperken. Volledig inhibitie van de infectie was onwaarschijnlijk, omdat de praktijkproef is gestart nadat de planten onbehandeld al 9 maanden in de kas aan het groeien waren. *Fusarium* was ook in plantmateriaal aangetoond tijdens de eerste bemonstering (start van de praktijkproef) (zie Tabel 5.1). Er waren verschillen tussen de behandelingen in gemiddelde percentage zieke planten (in cv Anna) in de laatste week van de beoordeling (proefweek 39, Figuur 5.2), helaas waren deze verschillen niet statistisch significant ($p > 0.05$).



Figuur 5.2 Gemiddelde percentage van zieke (verwelkte) planten in cultivar Anna in de proefweek 39 (gemiddelde van 10 veldjes per behandeling). Foutbalken geven de standaarddeviatie aan.

Ondanks het feit dat er geen significante verschillen waren in gemiddelde percentage zieke planten aan het eind van de proef, hebben de behandelingen mogelijk effect gehad op de snelheid van de ontwikkeling van ziektesymptomen in gerbera. Om te checken of dat inderdaad het geval was, is er een berekening gemaakt van de oppervlakte onder de ziekte progressie curve die het verloop van de ziekte in de tijd weergeeft (eng. Area Under Disease Progression Curve- AUDPC) laat zien dat (Figuur 5.6). Lagere AUDPC waarden betekenen dat ziekte zich langzamer ontwikkelt. In cultivar Anna hebben de behandelingen met *Streptomyces k61* en *Trichoderma T34* geresulteerd in lagere AUDPC waarden dan in controle behandeling (onbehandeld) (Figuur 5.3). Dat betekent dat ziekteontwikkeling was trager in planten uit deze twee behandelingen ten opzichte van onbehandelde planten.

Berekening van de oppervlakte onder de ziekte progressie curve was alleen mogelijk in cultivar Anna omdat er veel planten van cultivar Café tussentijds verwijderd zijn.



Figuur 5.3 Oppervlakte onder ziekte progressie curve (eng. Area Under Disease Progression Curve- AUDPC) in verschillende behandelingen in cultivar Anna tijdens praktijkproef op Bedrijf 1.

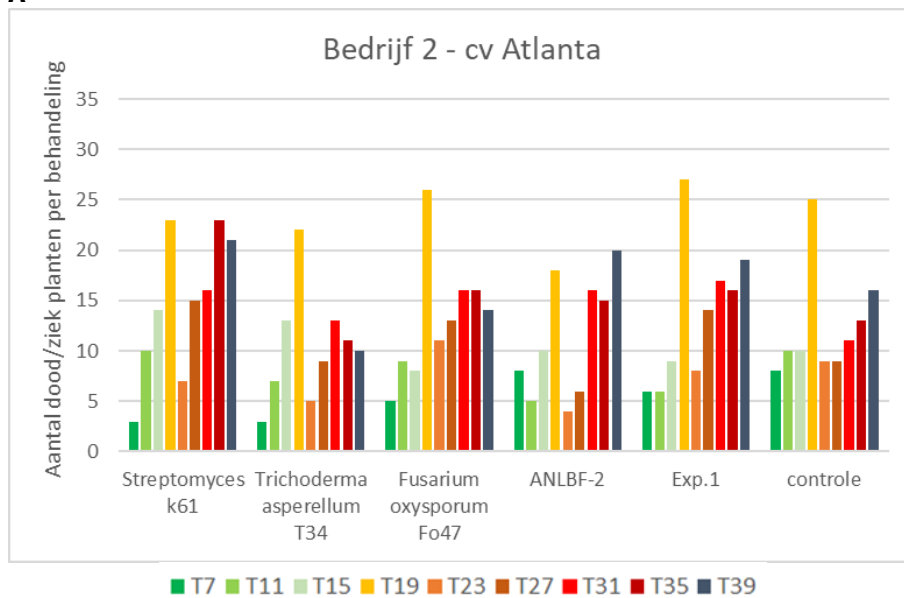
Op Bedrijf 2 was de ziekteontwikkeling (verwelkingsymptomen) in de week 19 hoger in cultivar Atlanta dan in cultivar Plot (Figuur 5.4A en Figuur 5.4B), echter dit verschil was niet waarneembaar in de week 23 van de praktijkproef.

Ook op Bedrijf 2 is er geen volledige inhibitie van infectie waargenomen. Echter net zoals bij Bedrijf 1 was het onwaarschijnlijk, omdat de planten al een tijd onbehandeld in de kas stonden en *Fusarium* pathogeen ook al aanwezig was in plantmateriaal bij de start van de praktijkproef (zie Tabel 5.3).

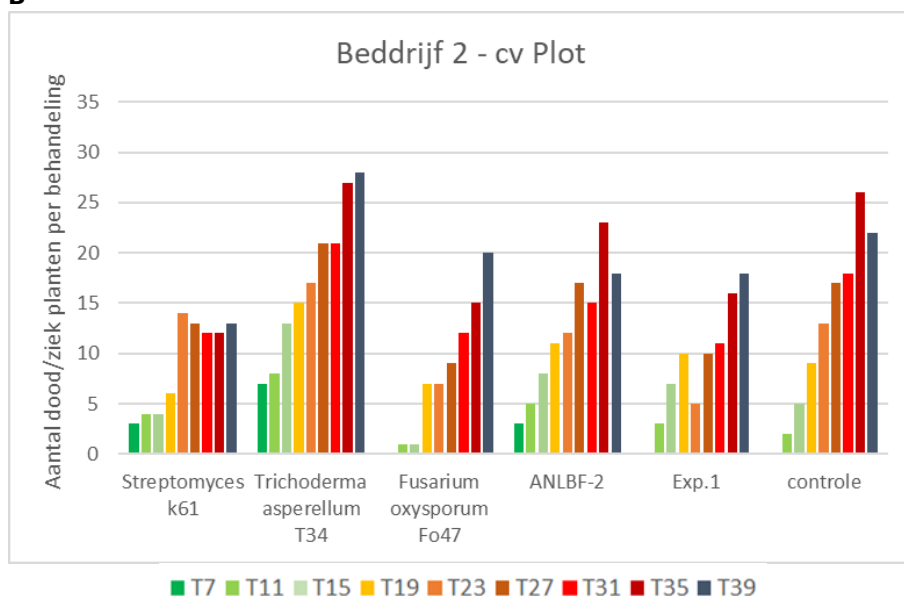
Aan het eind van de praktijkproef was uitval op Bedrijf vergelijkbaar in beide cultivars (Atlanta en Plot) (Figuur 5.5). De verschillen in gemiddelde percentage zieke planten tussen de behandelingen waren niet statistisch significant.

Berekening van de oppervlakte onder de ziekte progressie curve weergeeft hoe snel ziektesymptomen zich ontwikkelden in de gerbera planten op Bedrijf 2 (eng. Area Under Disease Progression Curve- AUDPC) (Figuur 5.6). Lagere AUDPC waardes betekenen dat ziekte zich langzamer ontwikkeld. In cultivar Atlanta heeft geen van de toegepaste behandelingen effect gehad op ziekte progressie gemeten met AUDPC (Figuur 5.6A). In cultivar Plot hebben de behandelingen met *Streptomyces* k61, *F. oxysporum* Fo47 en Exp.1 ziekte progressie vertraagd (AUDPC waardes zijn lager bij langzamer progressie ziekte, Figuur 5.6B).

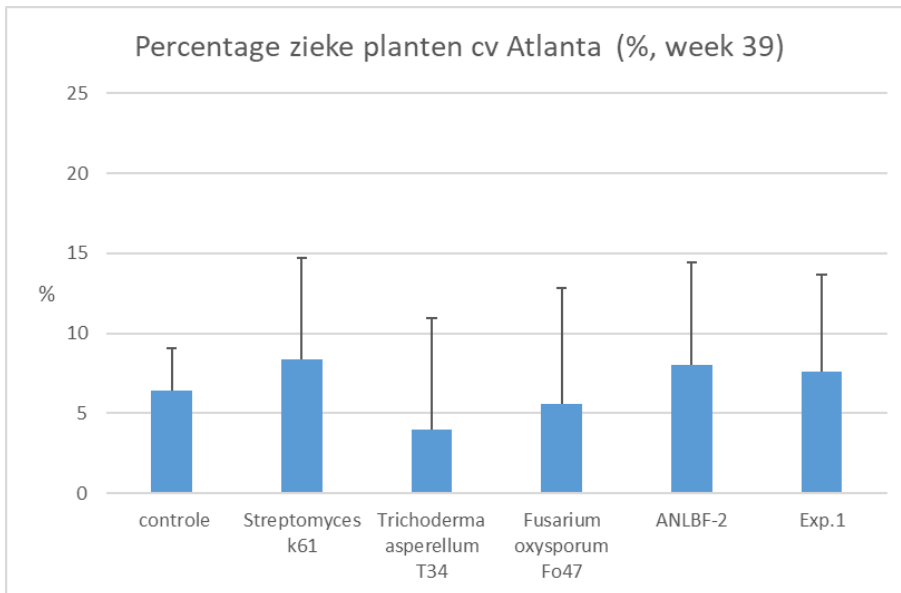
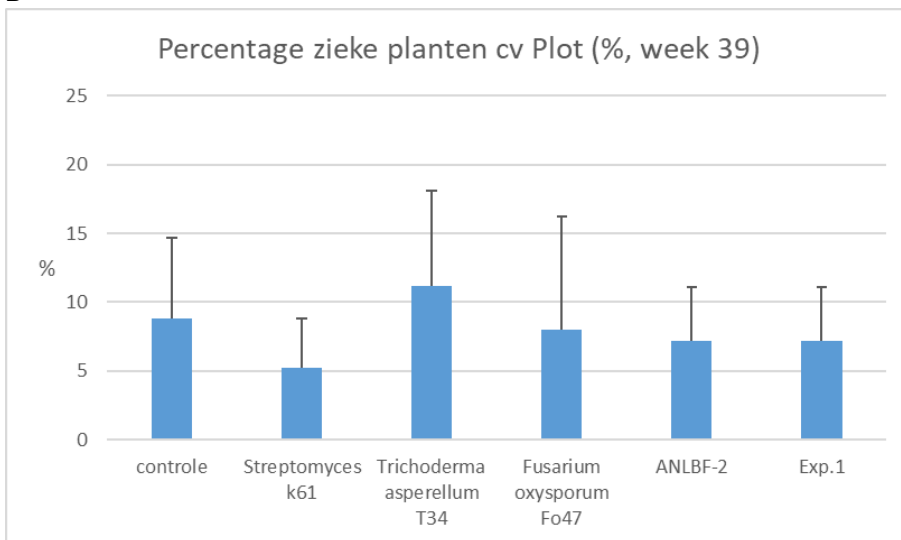
A



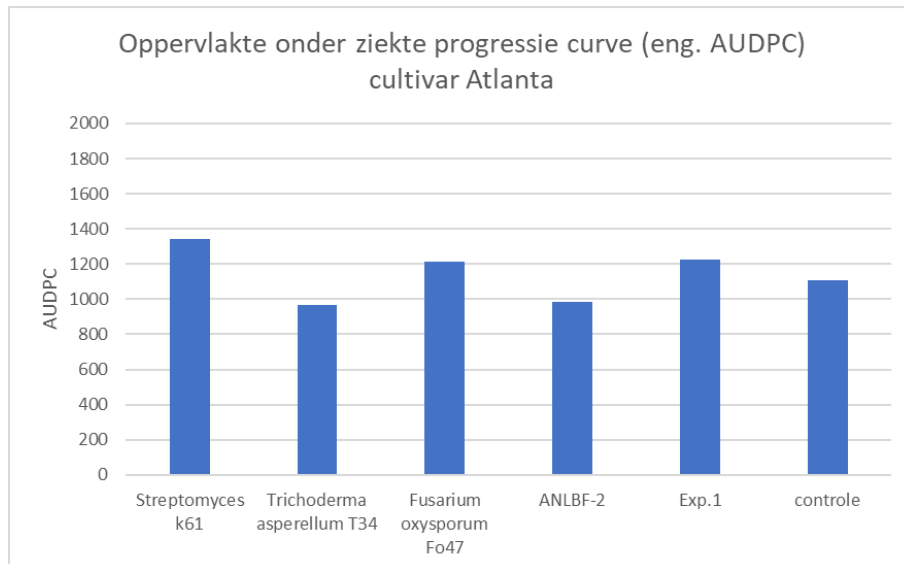
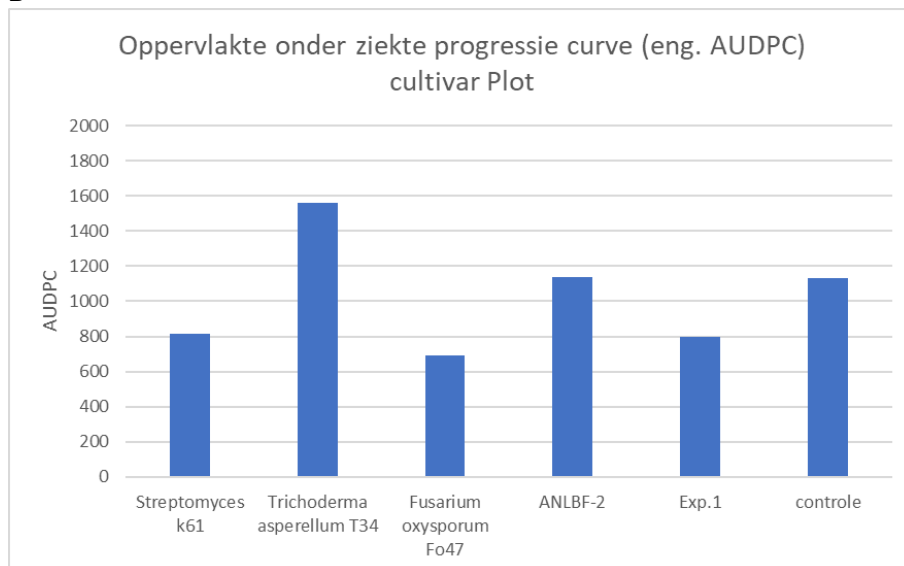
B



Figuur 5.4 Ziekteontwikkeling (o.a. verwelkingssymptomen) gedurende de praktijkproef op Bedrijf 1 (T7,T11,T15,T19,T23,T27,T31,T35,T39- weeknummers vanaf de start van de praktijkproef (aantal planten per behandeling 250).

A**B**

Figuur 5.5 Gemiddelde percentage van zieke (verwelkte) planten in cultivars Atlanta en Plot in de proefweek 39 (gemiddelde van 10 veldjes per behandeling). Foutbalken geven de standaarddeviatie aan.

A**B**

Figuur 5.6 Oppervlakte onder ziekte progressie curve (eng. Area Under Disease Progression Curve- AUDPC) in verschillende behandelingen in cultivars Atlanta en Plot tijdens praktijkproef op Bedrijf 2.

5.3.3 Resultaten TaqMan PCR Lucht

Per vak met de verschillende cultivars en behandelingen is per hoofdbemonstering in maart, juni/juli en december drie kubieke meter lucht bemonsterd met behulp van een *Coriolis airsampler*. Met de TaqMan PCR methode is in de monsters bepaald hoeveel sporen er in die 3 kubieke meter lucht zaten. Bij bedrijf 2 werden bij de eerste en tweede metingen sporen van *F. solani* in de lucht waargenomen in beide vakken, bij bedrijf 1 werd in het vak met Café in de 2^e meting ook *F. solani* waargenomen, maar niet in het andere vak. *F. proliferatum* werd bij bedrijf 2 bij de eerste meting waargenomen in het vak met Plot en bij de derde meting in het vak met Atlanta. *Fusarium oxysporum* en *Verticillium dahliae* werden niet waargenomen in de lucht (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Besmettingen met de 4 verschillende pathogenen in 3m³ lucht in de verschillende vakken op de verschillende bedrijven tijdens metingen (1) maart, (2) juni/juli en (3) december.

Lucht	3 m ³	meting	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
Bedrijf 1	Anna	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
	Café	1	0	0	0	0
		2	6x10 ⁴	0	0	0
		3	0	0	0	0
Bedrijf 2	Atlanta	1	1x10 ³	0	0	0
		2	2x10 ⁴	0	0	0
		3	0	50	0	0
	Plot	1	5x10 ²	50	0	0
		2	6x10 ⁴	0	0	0
		3	0	0	0	0

5.3.4 Resultaten TaqMan PCR watermonsters

Ook van de watermonsters zijn er op drie momenten monsters genomen en geanalyseerd, in maart, juni/juli en in december. In Tabel 5.2 staan de aantallen cellen van de pathogeen die in het volume geteste water dat per liter werden waargenomen. Water wat het systeem in gaat, is relatief schoon, zeker bij bedrijf 1, en er zitten minder pathogenen in al zijn er wel momenten waar te nemen dat de druk hoger lijkt te zijn. Zeker het drainwater wat uit het systeem komt is flink besmet en hierin kunnen alle pathogenen worden waargenomen. Ontsmetten van drainagewater voor hergebruik is dus een belangrijk aandachtspunt. Drainwatermonster 3 van de Café plot is afkomstig van een gescheurde filter en is een onderschatting van het aantal pathogenen.

Tabel 5.2 Besmettingen per liter met de 4 verschillende pathogenen in watermonsters van de verschillende bedrijven tijdens metingen (1) maart 2023, (2) juni/juli 2023 en (3) december 2023. Drainwatermonsters zijn grijs gearceerd, monsters van water wat het systeem in gaat zijn niet gearceerd.

Bedrijf	Water	meting	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
Bedrijf 1	voedingswater voor teelt, na ontsmetter	1	0	1x10 ²	1x10 ²	0
		2	0	0	2x10 ¹	1
		3	1x10 ³	4x10 ²	2x10 ³	0
	voedingswater bij de planten	1	0	0	2x10 ³	0
		2	0	0	0	1
		3	0	0	0	0
Bedrijf 2	voedingswater voor teelt, na ontsmetter	1	0	0	0	0
		2	6x10 ²	1x10 ²	7x10 ³	1
		3	1x10 ⁴	0	0	0
	voedingswater bij de planten	1	2x10 ²	0	2x10 ⁴	0
		2	3x10 ²	10	2x10 ³	1
		3	8x10 ²	50	2x10 ³	0
Bedrijf 1	drainwater Anna	1	0	1x10 ⁴	1x10 ⁵	0
		2	2x10 ⁴	50	1x10 ⁵	10
		3	1x10 ³	1x10 ³	4x10 ³	0
	drainwater Café	1	8x10 ³	1x10 ⁵	1x10 ⁵	0
		2	2x10 ⁴	2x10 ²	2x10 ⁴	1
		3*	1x10 ¹	0	1x10 ¹	0
Bedrijf 2	drainwater Atlanta	1	5x10 ²	5x10 ²	1x10 ⁵	0
		2	3x10 ⁴	1x10 ³	1x10 ⁵	25
		3	3x10 ²	3x10 ²	1x10 ³	0
	drainwater Plot	1	10	1x10 ³	8x10 ³	0
		2	4x10 ³	4x10 ³	3x10 ⁴	10
		3	4x10 ²	1x10 ⁵	4x10 ³	0

5.3.5 TaqMan Plantmateriaal

In maart 2023 is op tijdstip 1 een nulmeting in het gewas gedaan, in principe is op dat moment variatie in de druk van de verschillende pathogenen in de verschillende plots afhankelijk van de locatie van een plot zoals dicht bij de wand van een kas, mogelijk van cultivar en van leeftijd van de cultivar, maar niet van verschillen in behandelingen van de planten. Gemiddelde besmettingen staan weergegeven in Tabel 5.3 als ook het aantal plots dat positief testte voor besmetting. Vooral *F. solani* en *F. oxysporum* werden volop waargenomen, gevolgd door *F. proliferatum* en er werd in maart nauwelijks *V. dahliae* waargenomen in de bladeren.

Tabel 5.3 Top: Hoeveelheden schimmels van de vier geteste pathogenen per monster van 10 bladstengels. Onder: het aantal van de monsters (18 per cultivar; 48 totaal) dat positief testte voor besmetting met een pathogeen.

hoeveelheden		<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
Bedrijf 1	Anna	2x10 ³	15	3x10 ³	35
	Café	1x10 ⁴	8x10 ³	6x10 ³	0
Bedrijf 2	Atlanta	8x10 ³	4x10 ³	1x10 ⁴	0
	Plot	1x10 ⁴	1x10 ²	6x1 ²	0
	gemiddelde	7,5x10 ³	3,0x10 ³	4,9x10 ³	8,7

# positieve monsters		<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
Bedrijf 1	Anna	3	1	7	3
	Café	14	11	7	0
Bedrijf 2	Atlanta	8	5	11	0
	Plot	11	6	11	0
totaal positief/48		36	23	36	3

Als we per cultivar kijken naar de effecten van de behandelingen, zijn deze effecten nauwelijks tot niet meetbaar en inzichtelijk te maken (slechts 3 metingen per cultivar). Als we kijken over de bedrijven en cultivars heen, dan worden het aantal metingen dat we vergelijken 3x4= 12 metingen en dat maakt de effecten beter zichtbaar (Tabel 5.4).

Als we kijken naar *F. solani* dan zien na 9 maanden van behandeling bij de Lalstop, Asperello, Exp.1, maar ook bij de controle een significante afname van de besmetting, terwijl in de zomer geen van deze behandelingen een effect laat zien en de behandeling met niet pathogene *F. oxysporum* Fo47 zelfs een toename laat zien. Kijken we naar *F. proliferatum*, zien we daar vooral een vermindering in de infectie in de zomer met Lalstop k61, Asperello T34, ANLBF-2 en Exp. 1. Maar in december laat alleen Lalstop k61 en de controle behandeling daar nog een effect zien. Als we vervolgens kijken naar *F. oxysporum* dan zien zowel na 4 maanden als na 9 maanden van behandeling effect bij de Lalstop k61, Asperello T34, en ANLBF-2 behandeling, maar ook bij de controle een significante afname van de besmetting.

Tenslotte is *V. dahliae* vooral een pathogeen wat in de warmere maanden de kop op steekt. Bij de metingen van maart en december zien we de pathogeen nauwelijks, maar in de zomer zien we deze toenemen onder alle behandelingen.

Tabel 5.4 Veranderingen in de hoeveelheid waargenomen pathogeen tussen bemonstering 1 (t=1) en bemonstering 2 (t=2) en tussen bemonstering 1 (t=1) en bemonstering 3 (t=3) en of deze veranderingen (toe- of afname) significant zijn (significant als p-waarde kleiner dan 0.05; significante waarden vetgedrukt).

Behandeling	<i>F. solani</i>				<i>F. proliferatum</i>				<i>F. oxysporum</i>				<i>V. dahliae</i>			
	t=1 vs. t=2		t=1 vs. t=3		t=1 vs. t=2		t=1 vs. t=3		t=1 vs. t=2		t=1 vs. t=3		t=1 vs. t=2		t=1 vs. t=3	
	verandering	p-waarde	verandering	p-waarde	verandering	p-waarde	verandering	p-waarde	verandering	p-waarde	verandering	p-waarde	verandering	p-waarde	verandering	p-waarde
Controle	geen	0,179	afname	0,019	geen	0,145	afname	0,026	afname	0,002	afname	0,001	toename	0,000	geen	*
<i>Streptomyces</i> k61	geen	0,142	afname	0,004	afname	0,024	afname	0,011	afname	0,004	afname	0,011	toename	0,000	geen	*
<i>Trichoderma asperellum</i> T34	geen	0,053	afname	0,007	afname	0,042	afname	0,195	afname	0,010	afname	0,011	toename	0,000	geen	*
<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	toename	0,041	geen	0,366	geen	0,383	geen	0,309	geen	0,483	geen	0,211	toename	0,000	geen	*
ANLBF-2	geen	0,077	geen	0,263	afname	0,010	geen	0,111	afname	0,002	afname	0,008	toename	0,001	geen	0,091
Exp.1	geen	0,226	afname	0,042	afname	0,047	geen	0,102	geen	0,194	geen	0,157	toename	0,000	geen	0,382

5.4 Conclusies en Discussie

In lucht werden in een deel van de monsters *F. solani* gedetecteerd tijdens de eerste en tweede meting. Er werd meer gedetecteerd op bedrijf 2, dan op bedrijf 1. *F. solani* is een homothallische soort die speldeknoopgrote, rode vruchtlichaampjes maakt en daaruit sporen de lucht in kan lanceren. De metingen suggereren dat minimaal in voorjaar en zomer zulke vruchtlichaampjes aanwezig zijn geweest en er via de lucht verspreiding heeft plaats gevonden. Een kleine hoeveelheid *F. proliferatum* werd waargenomen tijdens de eerste en laatste meting bij bedrijf 2, waarbij het waarschijnlijk gaat om conidiosporen die hier in de lucht terecht komen. *Fusarium oxysporum* en *Verticillium dahliae* werden bij de metingen niet waargenomen in de lucht.

In drainage-monsters zitten over het algemeen veel pathogenen en kunnen alle vier de pathogenen worden aangetoond. Bij hergebruik van het water is ontsmetting dus een belangrijk aandachtspunt. Bij bedrijf 1 is het water wat het systeem in gaat gedurende metingen relatief schoon, bij het tweede bemonsterde bedrijf vinden we hier iets meer pathogenen die het systeem weer terug in gaan.

Per cultivar zijn de effecten van de verschillende behandelingen niet of nauwelijks waarneembaar. Kijken we over de bedrijven en cultivars heen, dan worden het aantal metingen dat we vergelijken $3 \times 4 = 12$ metingen en dat maakt de effecten beter zichtbaar. *Streptomyces* k61, *Trichoderma asperellum* T34 en soms ANLBF-2 of Exp1 geven remming op *F. solani* en *F. oxysporum*. Alleen lijkt hier ook in de controle de druk van de pathogenen af te nemen. De effecten op *F. proliferatum* zijn minder sterk en wisselen meer over de tijd. Terwijl *V. dahliae* meer een zomerseizoen gebonden pathogeen is, waar de behandelingen weinig effect op hebben.

6 Conclusies

In Gerbera zijn er meerdere pathogenen die verwelkingsziekten kunnen veroorzaken. Binnen het genus *Fusarium* zijn dat in ieder geval *Fusarium oxysporum*, *F. solani* en *F. proliferatum*. Daarnaast kan *Verticillium dahliae* vergelijkbare verwelkingsverschijnselen veroorzaken, maar dit pathogeen lijkt vooral in de zomer meer problemen te geven in en op planten. De verwelkingsverschijnselen met vergelend en verwelkend blad en soms bruinverkleuring in wortel en stelen van de plant zijn meer reacties van de plant op (effectoreiwitten geproduceerd door) een pathogeen dat infectie in weefsel geeft en daarbij vaatbundels verstopt, dan dat het aangeeft welke pathogenen de verschijnselen veroorzaakt.

Om pathogenen te kunnen herkennen zonder deze eerst uit plantenweefsel of andere monsters te hoeven kweken zijn verschillende op DNA-detectie gebaseerde methodes voorhanden. De LAMP detectie is daarbij geschikt voor detectie in symptomatisch materiaal en op locatie te gebruiken. De TaqMan detectie moet worden uitgevoerd in het lab maar kan de pathogenen ook kwantitatief detecteren.

Door gebruik te maken van groen—fluorescente mutanten van *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* kunnen we de infectie van de pathogeen via wortel of blad in de plant volgen. Vanaf de wortel verloopt de infectie als volgt (1) na binnendringen van de wortel infecteert de schimmel het weefsel rondom de vaatbundel door zowel tussen als in de cellen van de plant te groeien. (2) Na binnendringen van de vaatbundel groeit de schimmel verder de plant in. (3) Via bladstengel en daarna de nerven bereikt de pathogeen het bladmoes. (4) sporen kunnen zowel in de plant als op de plant gevormd worden,

Door gebruik te maken van groen—fluorescente mutanten van *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* kunnen we ook kijken wat voor effecten verschillende biologische bestrijders hebben. Niet pathogene *F. oxysporum* Fo47 beperkte de groei in de plant en zorgde er voor dat de pathogeen *F. oxysporum* f.sp. *gerberae* niet meer in de cellen groeide. *Streptomyces* k61 en *Trichoderma asperellum* T34 remden in deze test ook het verloop van de infectie af.

Bij de bedrijfstoetsen met verschillende behandelingen konden we per cultivar niet of nauwelijks effecten van behandelingen waarnemen op aanwezigheid van de pathogenen in plantmateriaal (aangetoond met TaqMan PCR op basis van DNA). Nemen we alle cultivars tezamen, dan zijn er wel effecten van behandelingen te zien op verschillende *Fusarium* pathogenen zoals opnieuw met *Streptomyces* k61 en *Trichoderma asperellum* T34 en soms met ANLBF-2 of Exp1. Al waren er vaak nog steeds planten waar wel infecties in waar te nemen waren. Lastig is hierbij dat ook de controle zonder middelen een positief effect had. Of dit is omdat algehele infectie afneemt in het vak of dat de waarnemingen meer seizoen-effecten zijn is moeilijk vast te stellen. Duidelijk is dat *V. dahliae* vooral in de zomer een groter probleem vormt.

Tijdens de teeltwisseling is er een groot risico dat door alle ruim- en opruimactiviteiten veel sporen in de lucht terecht komen. Om de hygiëne te verbeteren zou het hier een optie kunnen zijn om schoonmaakactiviteiten een of enkele dagen na het ruimen uit te voeren en pas daarna jong plantgoed binnen te brengen. Delen van vakken die blijven staan zouden mogelijk door horizontaal afdekken met plastic beter tegen neerdalende schimmelsporen beschermd kunnen worden.

Toegepaste biorationale producten (*Streptomyces* k61, *Trichoderma asperellum* T34, *Fusarium oxysporum* Fo47 en Exp.1) hebben de ontwikkeling van de verwelking/uitval kunnen vertragen in gerbera. Echter, het effect was cultivar afhankelijk en niet alle producten waren effectief in alle vier geteste cultivars. Tijdstip van de eerste toepassing van de middelen heeft de effectiviteit daarvan waarschijnlijk beïnvloedt. Middelen waren toegediend bij de planten die al ongeveer negen maanden in de kas stonden en er bleken al *Fusarium* pathogenen aanwezig te zijn in plantmateriaal (asymptomatisch). De verwachting is dat biorationale oplossingen een grotere effectiviteit hebben als ze preventief toegepast kunnen worden (voordat de pathogeen de plant binnendringt).

Literatuur

- Adam, M., Heuer, H., Hallmann, J. 2014.
Bacterial Antagonists of Fungal Pathogens Also Control Root-Knot Nematodes by Induced Systemic Resistance of Tomato Plants. *PloS one*. 9. e90402. 10.1371/journal.pone.0090402.
- Bakker, P. A., Doornbos, R. F., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., & Pieterse, C. M. 2013.
Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. *The plant pathology journal*, 29(2), 136–143. doi:10.5423/PPJ.SI.07.2012.0111
- Bilodeau, G.J., Koike, S.T., Uribe, P., Martin, F.N. 2012. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. *Phytopathology*. 102(3):331-43. doi: 10.1094/PHYTO-05-11-0130. PMID: 22066673.
- Broekhoven, G., and H. Savenije. 2012. *Moving forward with forest governance, ETFRN news; issue no. 53*. Wageningen: Tropenbos International.
- Bubici, G. 2018.
Streptomyces spp. as biocontrol agents against Fusarium species. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*. 13. 10.1079/PAVSNNR201813050.
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H, et al. 2013.
Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. *PLoS ONE* 8(7): e68818. doi:10.1371/journal.pone.0068818
- De Graaf, L. 2012. "Communication about medications for better patient transition. Needed: Format for switching." *Pharmaceutisch Weekblad* no. 147 (8):14-15.
- Fernandes, Alvaro A. A., Alasdair J. G. Gray, and Khalid Belhajjame. 2011. *Advances in Databases: 28th British National Conference on Databases, BNCOD 28, Manchester, UK, July 12-14, 2011, Revised Selected Papers*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. 2018.
Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 285. 44–55. 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.
- Mazzola, M., Freilich, S. 2016.
Prospects for Biological Soilborne Disease Control: Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. *Phytopathology*. 107. 10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW.
- Postma, J., Nijhuis, E. 2019.
Pseudomonas chlororaphis and organic amendments controlling *Pythium* infection in tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 10.1007/s10658-019-01743-w.
- van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Kohl, J., Ravensberg, W. J., Urbaneja, A. 2018.
Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63: 39-59
- Visser, M., Gordon, T.R., Wingfield, B.D. et al. Transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, causal agent of Fusarium wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene. *Australasian Plant Pathology* **33**, 69–75 (2004). <https://doi.org/10.1071/AP03084>
- Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., Jeger, M. J. 2011.
Combined Use of Biocontrol Agents to Manage Plant Diseases in Theory and Practice. *Phytopathology* 101: 1024-1031

Bijlage 1 Teeltwisseling

Teeltwisseling in Gerbera – Wat doet dat met de schimmeldruk?

Heel wat Gerberabedrijven wisselen de komende weken een deel van hun plantgoed. Die teeltwissel gaat vaak gepaard met een piek aan bewegingen en schoonmaakactiviteiten in een kas. Maar wat doet dat met de schimmeldruk in je kas?

De hoeveelheid schimmelsporen is simpel te meten door Petrischalen met een voedingsmedium voor schimmels een vast aantal minuten (2 of 5 minuten) open te zetten. Schimmelsporen kunnen op het voedingsmedium vallen en de hoeveelheid kolonies die na een dag of 5 groeien bij kamertemperatuur in een donker kastje zichtbaar worden, zijn een maat voor de hoeveelheid sporen in de lucht. Door een serie platen tijdens de vruchtwisseling open te zetten, kan men een beeld krijgen wat er gebeurt (Foto 1). Door op verschillende plekken in een kas te meten, kan men ook zien of het afschermen van compartimenten effectief is om verspreiding tegen te gaan.

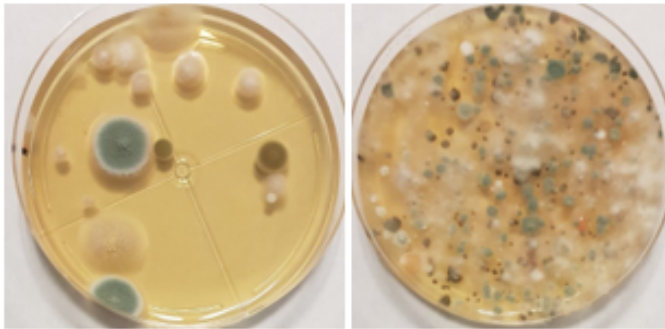
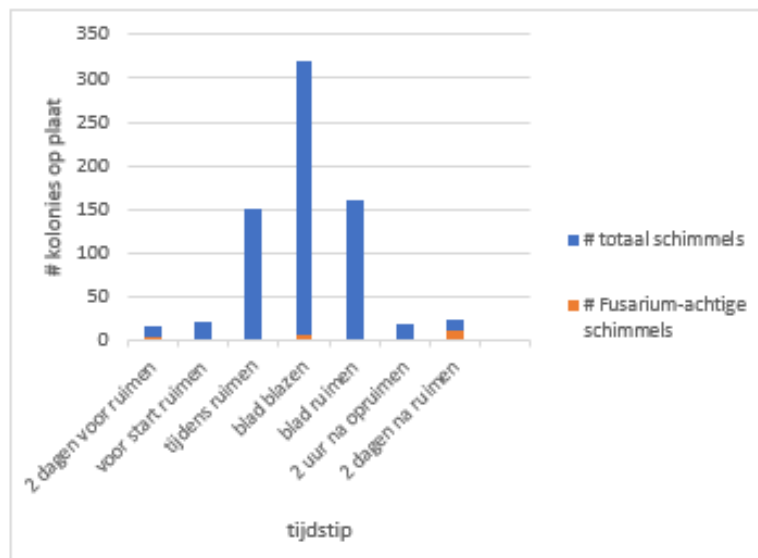


Foto 1: links 2 dagen voor de teeltwisseling zijn er weinig sporen in de lucht, rechts de sporendruk tijdens de teeltwisseling (Planten met algemeen schimmelmedium, 5 minuten open gezet; daarna 5 dagen in het donker bij kamertemperatuur bewaren).

Lucht is niet steriel en er zweven altijd schimmelsporen en bacteriën in. Onder normale omstandigheden zijn de hoeveelheden schimmels in de kas redelijk stabiel. Maar op het moment van de teeltwisseling als veel materiaal in en uit de kassen verschoven worden en er flink wordt schoongemaakt, kan er flink stof en schimmelsporen in de lucht bijkomen (Figuur 1). Daar kunnen ook plantpathogene schimmels zoals *Fusarium* bij zijn. *Fusarium* is op de platen zichtbaar als een relatief snelgroeiende witte kolonie, die wit of licht roze blijft of wordt. Deze schimmels zijn ook te tellen op groeimedia waar veel andere schimmels niet op kunnen groeien maar de sterke *Fusarium*schimmels wel.

Na de teeltwissel neemt de sporendruk in de lucht weer geleidelijk aan af doordat stof en een deel van de schimmels neerslaan. Dat neerslaan gebeurt dan ook op de schoongemaakte oppervlaktes als op het net binnengebrachte en al staande gewas.



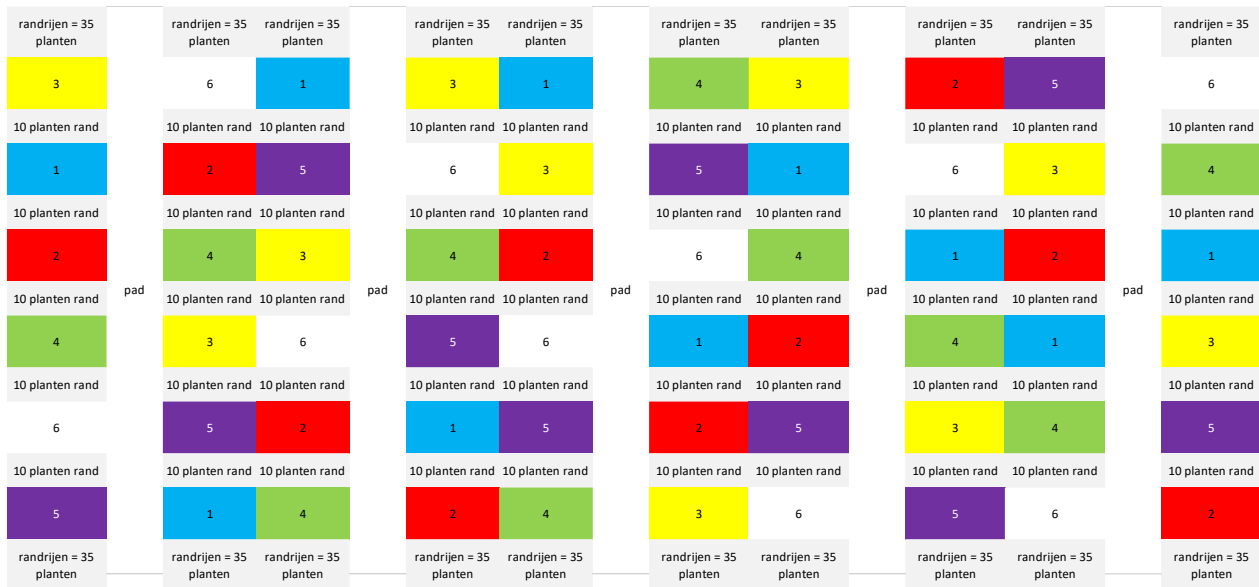
Figuur 1. Aantal kolonies op algemeen groeimedium (5 minuten open platen in een kap op enige afstand van de teeltwissel). Kolonies geteld na 5 dagen. Wit of lichtgekleurde Fusariumachtige schimmels apart geteld.

Wil je zelf testen hoe de schimmeldruk verandert voor tijdens en na de teeltwisseling? Binnen het lopende onderzoek in de PPS Biorationals is het mogelijk om enkele platen met groeimedia op te halen bij WUR Glastuinbouw en Bollen aan de Violierenweg 1 in Bleiswijk. Voor aanmelden of meer informatie kan men contact opnemen met Marta.Streminska@wur.nl of Anne.vanDiepeningen@wur.nl.

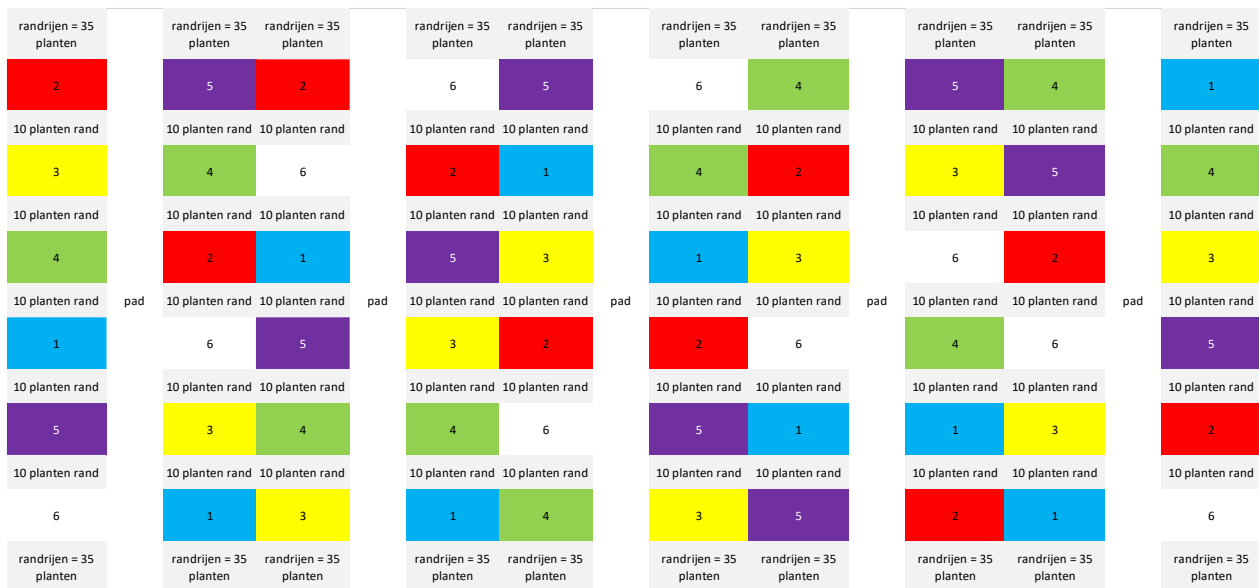
Bijlage 2 Plattegronden praktijkproeven

Bedrijf 1:

cultivar Anna



cultivar Café

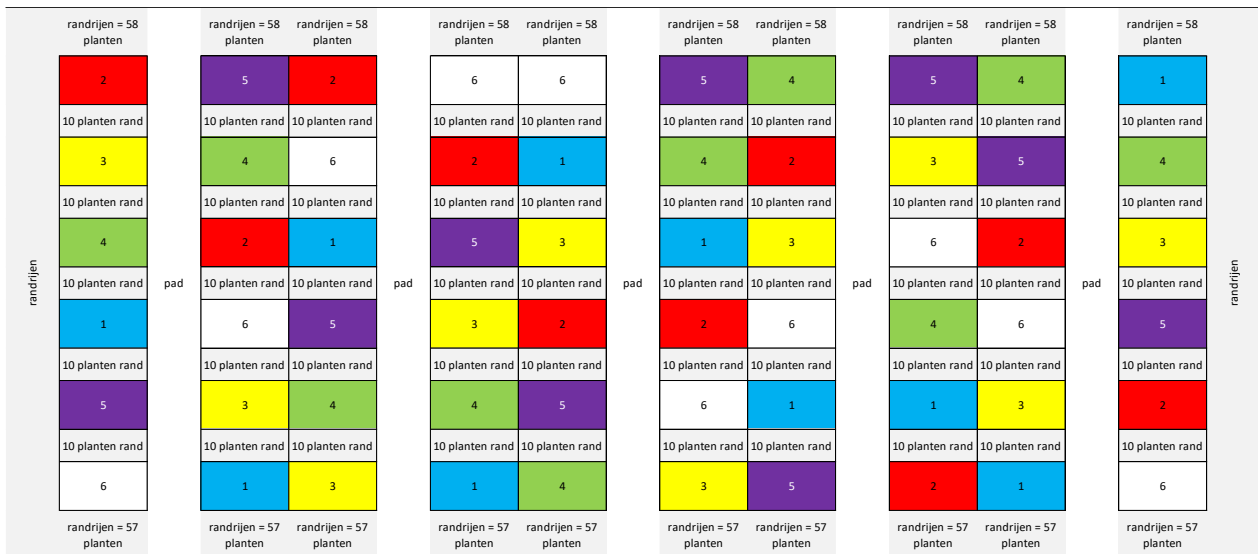


1 behandelingsblok = 25 planten
 tussen behandelingen = 10 randplanten
 totaal per behandeling = 250 planten
 totaal = 1500 toetsplanten

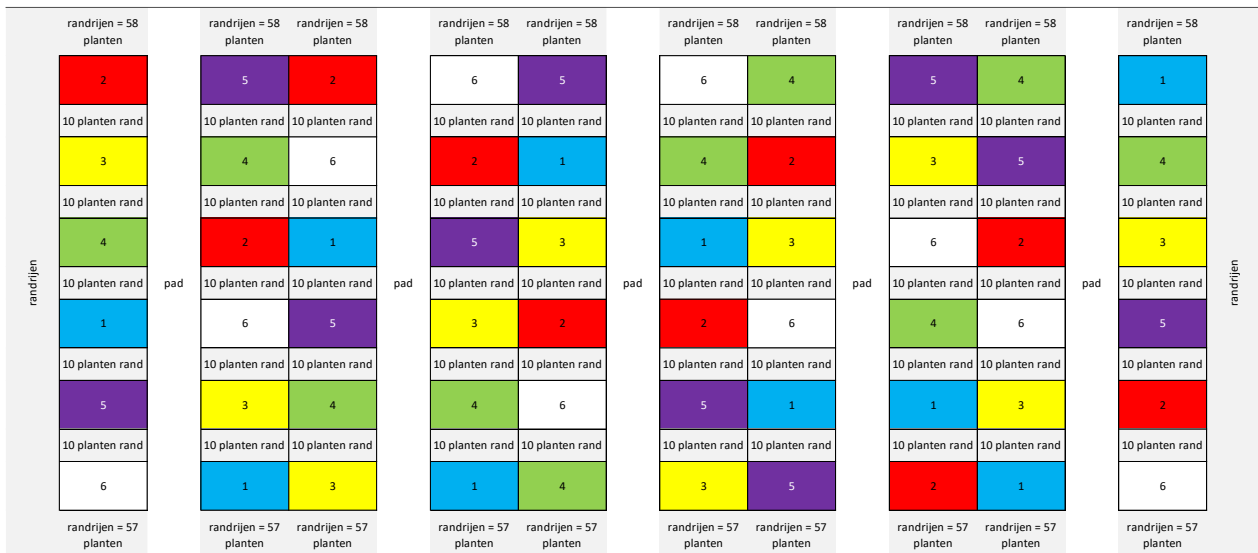
- 1 *Streptomyces* K61
- 2 *Trichoderma asperellum* T34
- 3 *Fusarium oxysporum* Fo47
- 4 ANLBF-2
- 5 Exp.1
- 6 controle zonder behandeling (neg. controle)

Bedrijf 2:

cultivar Atlanta



cultivar Plot



1 behandelingsblok = 25 planten
 tussen behandelingen = 10 randplanten
 totaal per behandeling = 250 planten
 totaal = 1500 toetsplanten

- 1 *Streptomyces* K61
- 2 *Trichoderma asperellum* T34
- 3 *Fusarium oxysporum* Fo47
- 4 ANLBF-2
- 5 Exp.1
- 6 controle zonder behandeling (neg. controle)

Bijlage 3 Behandelingen praktijkproeven

Streptomyces k61

Werkzame stof	<i>Streptomyces</i> stam k61 ($5 \cdot 10^8$ kve/g)
Beschrijving	<i>Streptomyces k61</i> is een bacterie die antagonistisch is tegen veel plantpathogene schimmels.
Dosering	1 kg/ha
Toediening	aangieten in steenwol
Frequentie	elke 6 weken

Trichoderma asperellum T34

Werkzame stof	<i>Trichoderma asperellum</i> stam T34 (10^9 kve/g)
Beschrijving	<i>T. asperellum</i> stam T34 koloniseert de wortels en vormt een barrière tegen ziekteverwekkende schimmels en activeert het afweermechanisme van de plant.
Dosering	1.5 kg/ha
Toediening	aangieten in steenwol
Frequentie	elke 12 weken

Fusarium oxysporum Fo47

Werkzame stof	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47
Beschrijving	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47 in niet plantpathogene <i>Fusarium oxysporum</i> die koloniseert de wortels en vormt een barrière tegen ziekteverwekkende schimmels en activeert het afweermechanisme van de plant.
Dosering	10^5 kve/mL steenwol
Toediening	aangieten in steenwol
Frequentie	elke 6 weken

ANLBF-2

Werkzame stof	<i>Bacillus</i> (10^{10} kve/g)
Beschrijving	Micro-organisme in ANLBF-2 is niet plant pathogeen en koloniseert de wortels en vormt een barrière tegen ziekteverwekkende schimmels en activeert het afweermechanisme van de plant.
Dosering	2L/ha
Toediening	aangieten in steenwol
Frequentie	elke 6 weken

Exp.1

Werkzame stof	<i>mix micro-organismen o.a. Bacillus en Trichoderma</i>
Beschrijving	Micro-organismen zijn niet plant pathogeen en koloniseren de wortels en vormen een barrière tegen ziekteverwekkende schimmels en activeert het afweermechanisme van de plant.
Dosering	0.3 kg/ha
Toediening	aangieten in steenwol
Frequentie	elke 2 weken

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-1313

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.600 medewerkers (6.700 fte) en 13.100 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.