



## Stuurbaar bodemleven?

Effect van  
lignine-rijke gewasresten  
op *Verticillium*

Willemijn Cuijpers  
Soraya C. França  
Jane Debode  
Monique Hospers-Brands

LOUIS BOLK  
I N S T I T U U T

de natuurlijke kennisbron



In samenwerking met:



© 2015 Louis Bolk Instituut

Stuurbaar bodemleven? Effect van lignine-rijke  
gewasresten op *Verticillium*

Willemijn Cuijpers<sup>1</sup>, Soraya C. França<sup>2</sup>, Jane  
Debode<sup>3</sup> en Monique Hospers-Brands<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Louis Bolk Instituut, <sup>2</sup>Universiteit Gent, <sup>3</sup>ILVO

Bodemweerbaarheid, *Verticillium dahliae*,  
*Verticillium tricorpus*, *Verticillium isaacii*,  
antagonisten, lignine, gewasresten, bodemleven

Publicatienummer 2015-042 LbP

41 pagina's

Bestelwijze: Deze publicatie is te downloaden op  
[www.louisbolk.nl/publicaties](http://www.louisbolk.nl/publicaties)

[www.louisbolk.nl](http://www.louisbolk.nl)

[info@louisbolk.nl](mailto:info@louisbolk.nl)

T 0343 523 860

F 0343 515 611

Hoofdstraat 24

3972 LA Driebergen

 @LouisBolk

Louis Bolk Instituut: onafhankelijk, internationaal kennisinstituut  
ter bevordering van écht duurzame landbouw, voeding en gezondheid

## Voorwoord

Het grootste deel van het bodemleven bevindt zich in de beroemde *black box*. De organismen waar we het meeste van weten, zijn vaak ook het meest schadelijk voor de land- en tuinbouw.

Geleidelijk komt er meer kennis over de positieve spelers in het bodemleven. De focus kan dan verschuiven van het bestrijden van bodemziekten, naar het creëren van een weerbaar systeem. De vraag die dan direct opkomt is: hoe stuurbaar is het bodemleven? Is het werkelijk mogelijk om een verschuiving in het bodemleven te veroorzaken, door bepaalde maatregelen? Dit onderzoek draagt een klein steentje bij aan de kennis die we op dit gebied hebben. De eerste fase van het onderzoek is op labschaal uitgevoerd. Vervolgens hebben we in een praktijkproef gekeken of deze maatregelen ook op praktijkniveau toepasbaar zijn.

Het onderzoek is in eerste instantie ingegeven door de problemen met *Verticillium dahliae*, die de laatste jaren op steeds meer biologische glastuinbouwbedrijven opduiken. Daarnaast komt de inspiratie uit de pogingen van telers om met bewust bodemmanagement, naar een gezonde bodem toe te werken. Een paar telers willen we met name bedanken: Frank de Koning, Nico Enthoven, Ron van Dijk, en Jacques, Fons en Leo Verbeek zijn nauw betrokken geweest bij de opzet van het onderzoek. Het idee om met lignine-rijke gewasresten te werken, is al in een eerder stadium in de teelt van bloemkool getest tegen *Verticillium longisporum*. We zijn dan ook veel dank verschuldigd aan de leerstoelgroep Fytopathologie van de Universiteit Gent, onder leiding van Monica Höfte. In de eerste fase van het onderzoek hebben een aantal mensen ons geholpen met het verzamelen van lignine-rijke gewassen. Graag willen we Yorick van Leeuwen en Jan de Lange (Proefcentrum Zwaagdijk), Marlijn Hellendoorn-Vos (Vandijke Semo), Geert van Diepen (DLV Bloembollen), Harry Verstegen (PPO Vredepeel) en de Fa. Maters (Anna Paulowna) hiervoor bedanken. Tenslotte willen we ook graag Riekje Bruinenberg bedanken, voor de uitvoering van een groot aantal analyses. Het onderzoek maakt deel uit van het door EL&I gefinancierde onderzoeksprogramma BO-12.10-007.04 Duurkas, en is onderdeel van het project Biovitaalkas, waarin telers en onderzoekers samen zoeken naar mogelijkheden om de bodemweerbaarheid in de biologische teelten onder glas te verhogen.

September 2015,  
Willemijn Cuijpers & Monique Hospers-Brands (LBI)  
Soraya C. França (Universiteit Gent)  
Jane Debode (ILVO)



# Inhoud

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Samenvatting</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Summary</b>   | <b>8</b>  |
| <b>1 Inleiding</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1 Controleren versus sturen                                  | 9         |
| 1.2 Voeden van het bodemleven                                  | 10        |
| <b>2 Vraagstelling en onderzoeksdoel</b>                       | <b>11</b> |
| <b>3 Materiaal en methode</b>                                  | <b>13</b> |
| 3.1 Laboratorium proef lignine-rijke gewasresten               | 13        |
| 3.2 Potproef   | 15        |
| 3.3 Praktijkproef  | 15        |
| 3.4 Bepalen <i>Verticillium</i> dichtheid                      | 16        |
| <b>4 Resultaten</b>  | <b>17</b> |
| 4.1 Literatuuronderzoek  | 17        |
| 4.1.1 <i>Afbraak van micro-sclerotiën in de bodem</i>          | 17        |
| 4.1.2 <i>Effect van pure lignine</i>                           | 18        |
| 4.1.3 <i>Effect van lignine uit gewasresten</i>                | 18        |
| 4.1.4 <i>Effect van combinatie van antagonisten en lignine</i> | 19        |
| 4.1.5 <i>Lignine gehalten van gewasresten</i>                  | 20        |
| 4.2 Laboratorium proef   | 21        |
| 4.2.1 <i>Uitgangssituatie</i>                                  | 21        |
| 4.2.2 <i>Analyseresultaten gewasresten</i>                     | 22        |
| 4.2.3 <i>Onderdrukking van <i>Verticillium</i></i>             | 22        |
| 4.3 Potproef   | 24        |
| 4.3.1 <i>Bodemonderzoek</i>                                    | 24        |
| 4.3.2 <i>Hoeveelheden toegediend lignine en drogestof</i>      | 24        |
| 4.3.3 <i>Onderdrukking van <i>Verticillium</i></i>             | 24        |
| 4.3.4 <i>Nitraatgehaltes in de bodem</i>                       | 25        |
| 4.4 Praktijkproef  | 26        |
| 4.4.1 <i>Bodemonderzoek</i>                                    | 26        |
| 4.4.2 <i>Onderdrukking van <i>Verticillium</i></i>             | 26        |
| 4.4.3 <i>Identificatie van <i>Verticillium</i> soorten</i>     | 27        |
| 4.4.4 <i>Nitraatgehaltes in de bodem</i>                       | 28        |
| <b>5 Discussie</b>   | <b>29</b> |
| 5.1 Effect van lignine-rijke gewasresten                       | 29        |
| 5.2 Pathogeniciteit van <i>Verticillium</i> soorten            | 30        |
| <b>6 Conclusie en aanbevelingen voor verder onderzoek</b>      | <b>33</b> |
| <b>Literatuur</b>  | <b>35</b> |
| <b>Bijlage 1 Lignine-gehalten gewasresten</b>                  | <b>37</b> |
| <b>Bijlage 2 Nieuwe <i>Verticillium</i> soorten</b>            | <b>39</b> |



## Samenvatting

In de biologische glastuinbouw is een goede bodemgezondheid van cruciaal belang. Het streven is om een systeem te ontwikkelen met meer veerkracht en een betere bodemweerbaarheid. In dit onderzoek wordt het bodemleven gevoed met lignine-rijke gewasresten. Het doel is om de natuurlijk voorkomende witrotschimmels te stimuleren die lignine omzetten, en daarmee ook de overlevingsstructuren (microsclerotiën) van plant-pathogene *Verticillium* schimmels af te breken. Houtige gewassen bevatten het meeste lignine, gevolgd door grassen en granen. Ook gewasresten van broccoli en boon bevatten relatief veel lignine.

In een laboratorium proef is grond van twee bedrijven met een natuurlijke besmetting met *Verticillium dahliae* gemengd met 7 lignine-rijke gewasresten. De twee gronden reageerden verschillend. Op locatie Schalkwijk (rivierklei) hadden maïsstengels, broccoli, rietstengels en Japanse haver (*Avena strigosa av. astrigosa*) een significant effect op de hoeveelheid levensvatbare microsclerotiën in de bodem. In 4 weken is in de variant met 10% (m/m) maïsstengels de hoeveelheid *Verticillium* met 69% afgenomen ten opzichte van de controle. Op locatie Tinte (zeeklei) hadden alleen rietblad en rietstengel een significant effect. Door toevoeging van rietblad (10% m/m) neemt de hoeveelheid *Verticillium* met 66% af. Op locatie Tinte is er een significante relatie tussen de hoeveelheid toegevoegde lignine en de afname van het aantal microsclerotiën van *Verticillium*. Voor locatie Schalkwijk is dit verband niet gevonden, hier spelen mogelijk andere mechanismen een rol.

In de potproef is 1, 2 en 10% (m/m) riet en 2% tarwestro ingewerkt in van nature met *Verticillium* besmette grond. Na 12 weken zijn in de variant met 2% riet 75% minder microsclerotiën van *Verticillium* aanwezig dan in de controle, maar deze afname is niet significant. Resultaten van real-time PCR analyse laten echter wel een significante afname van de hoeveelheid *Verticillium* zien, in de varianten waar 1% en 10% riet is ondergewerkt. Bij toenemende percentages riet, neemt ook de immobilisatie van stikstof significant toe. Stro veroorzaakt meer immobilisatie dan riet.

In de praktijkproef is 2% (m/m) riet ondergewerkt. Na 3 weken is er op het perceel paprika geplant. Na in totaal 12 weken is de afname van de hoeveelheid *Verticillium* bepaald. Uitplaten laat een lichte stijging zien van de hoeveelheid *Verticillium* in de controle, terwijl in de behandeling met 2% riet de hoeveelheid *Verticillium* afneemt. Deze verschillen zijn echter niet significant. Bij de real-time PCR analyse zien we een significant effect van het bemonsteringstijdstip. In december is er meer DNA van *Verticillium* in de bodem dan in maart. Dit is echter ook in de controle het geval. Er is dus geen significant effect meetbaar van het toevoegen van de gewasresten aan de bodem.

In alle experimenten is veel meer *Verticillium tricorpus* aanwezig dan *Verticillium dahliae*. *V. dahliae* kan al in zeer kleine hoeveelheden gewasschade aanbrengen. De rol van *V. tricorpus* is onduidelijk. DNA sequencing van een isolaat van *V. tricorpus* op het betreffende glastuinbouw bedrijf laat zien dat deze soort geassocieerd kan worden als *Verticillium isaacii*. Het is noodzakelijk een goed beeld te krijgen van de aanwezige *Verticillium* soorten en hun pathogeniciteit voordat nieuwe bestrijdingsmethoden van *Verticillium* verder ontwikkeld worden.

## Summary

Healthy soils are of vital importance to organic greenhouse horticulture. The ambition is to develop a production system with a higher level of resilience and a better disease suppressiveness. This report describes the nourishment of soil life with lignin-rich crop residues. The purpose is to stimulate naturally occurring white rot fungi, converting lignin and at the same time breaking down the spores of plant pathogenic *Verticillium* fungi. Woody crop residues retain the greatest quantities of lignin, followed by grasses and grains. Crop residues of broccoli and bean also contain relatively large amounts of lignin.

In a laboratory trial, soils of two greenhouses with a natural infection of *Verticillium dahlia* is mixed with 7 types of lignin-rich crop residues. The two soils react different to the amendments. On the location with river clay, corn stalks, broccoli, reed stalks and Bristle Oat (*Avena strigosa* cv. *astrigosa*) had a significant effect on the amount of viable microsclerotia in the soil. When adding 10% (w/w) corn stalks, the number of viable microsclerotia decreased with 69% compared to the control treatment. On seaclay, only reed leaves and reed stalks had a significant effect. Reed leaves (10% w/w) decreased the amount of viable microsclerotia with 66%. On seaclay, a significant correlation is found between the amount of lignin added and the decrease in microsclerotia. For the river clay location the correlation with lignin was absent: other mechanisms may be involved.

In the pot experiment, 1,2 and 10% (w/w) reed and 2% wheat straw is amended to the naturally infected sea clay soil. After 12 weeks, plating showed that the treatment with 2% reed contained 75% less viable microsclerotia than the control, but these differences were not significant. When analysed by real-time PCR, a significant decrease of the amount of *Verticillium* was shown in treatments with 1 and 10% reed. With increasing amounts of reed, the immobilization of nitrogen increased significantly. Wheat straw induced more nitrogen immobilization than reed.

In the field trial, 2% reed is incorporated in the sea clay soil. After 3 weeks, plots were planted with sweet pepper. After 12 weeks, the effect on *Verticillium* microsclerotia was determined. Plating showed a slight increase in viable microsclerotia in the control plots, whereas the amount of microsclerotia in the treatment with 2% reed decreased. These differences were however not significant. Real-time PCR analysis showed a significant effect of time (december versus march), but not of treatment. In total, the field trial showed no significant effects of the amendment of lignin-rich materials.

In all experiments *Verticillium tricorpus* predominated over *Verticillium dahlia*. Very small amounts of *V. dahliae* may already cause crop damage. The role of *V. tricorpus* is not clear. DNA sequencing of an isolate of *V. tricorpus* from the greenhouse soil showed that the species would be classified as *Verticillium isaacii*, according to a recently proposed new classification of *Verticillium* species. It is necessary to investigate the occurrence of different *Verticillium* species and their pathogenicity to different crops, before new control measures against *Verticillium* are further developed.



# 1 Inleiding

## 1.1 Controleren versus sturen

**Controle van ziekteverwekkers** Een goede bodemgezondheid is voor de biologische glastuinbouw van cruciaal belang, maar lastig te realiseren. Met name de intensieve, jaarrond teelten van glasgroenten stellen hoge eisen aan de bodem. Door de krappe vruchtwisseling ontstaat een grote gevoeligheid van het systeem voor typische pathogenen die goed gedijen op de belangrijkste families van vruchtgroenten, de Solanaceae (Nachtschade-familie) en Cucurbitaceae (Komkommer-familie). Bekende ziekteverwekkers in de bodem zijn het warmteminnende wortelknobbelaaltje (*Meloidogyne incognita*), het noordelijke wortelknobbelaaltje (*Meloidogyne hapla*) en een aantal bodemschimmels, zoals *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* en *Pyrenochaeta lycopersici* (kurkwortel). Door de intensiteit van de teelt kunnen telers zich geen grote opbrengstverliezen permitteren. De strategie van intensieve biologische telers om bodemziekten te beheersen is daardoor vooral gericht op controle. Door een goede bedrijfshygiëne (bijvoorbeeld het verwijderen van zieke gewasresten) en door maatregelen om de ziekteverwekker in de bodem te doden, proberen telers de ziekten beheersbaar te houden. Maatregelen die in eerste instantie effectief de ziekteverwekker bestrijden (stomen, biologische grondontsmetting, biofumigatie), zijn echter ook destructief voor het overige bodemleven. Sommige groepen organismen kunnen zich snel herstellen na stomen (zoals bacteriën en bacterie-etende aaltjes). Dit zijn in het algemeen de organismen die een hoge voortplantingssnelheid en een korte regeneratietijd hebben. Ze profiteren van het grote voedselaanbod en hoeven vlak na het stomen niet te concurreren met andere organismen. Andere groepen organismen kunnen zich echter veel moeilijker of helemaal niet herstellen. Dit betekent dat het bodemsysteem eenzijdiger qua samenstelling wordt, en daardoor ook gevoeliger voor verstoring. Dit maakt nog meer controle noodzakelijk om pathogenen op een acceptabel niveau te houden.

**Effect op veerkracht** In het hierboven beschreven intensieve teeltsysteem lijkt een hoog niveau van controle onafwendbaar om bodemziekten onder de duim te houden. Het resultaat is echter een systeem met weinig veerkracht, dat gevoelig is voor verstoring. In het algemeen bevindt de activiteit van het bodemleven zich op glastuinbouwbedrijven op een hoog niveau. Er is sprake van hoge organische stofgehalten en hoge nutriëntengehalten in de bodem. In het systeem zijn het voornamelijk bacteriën die verantwoordelijk zijn voor het omzetten van relatief makkelijk beschikbare organische stof uit compost, organische hulp meststoffen en gewasresten. Doordat er op veel intensieve bedrijven om de twee jaar gestoomd wordt, kunnen met name de organismen hoger in het voedselweb zich moeilijk herstellen. De veerkracht van het systeem wordt vaak gerelateerd aan het aantal relaties tussen organismen in het systeem, de verbondenheid of 'connectedness'. Als bepaalde organismen wegvallen uit het systeem, kunnen andere organismen hun rol op zich nemen. Dat zorgt ervoor dat het systeem stabiel kan blijven en veerkracht heeft. Als het systeem te eenzijdig wordt door stomen, verdwijnt ook een stukje van die veerkracht.

**Sturen op bodemweerbaarheid** De mogelijkheden om bijvoorbeeld met vaste mest of compost de bodemgezondheid te verbeteren zijn heel beperkt. De organische stofgehalten in de bodem zijn in de biologische glastuinbouw hoog, omdat er met een grote (organische) voorraadbemesting wordt gewerkt. Hierdoor is de algemene activiteit van het bodemleven al op een hoog niveau. Dit draagt bij aan een grote concurrentiekracht van het bodemleven. Bodemziekten die zwak staan tegenover concurrenten, zoals *Pythium*, spelen in de biologische glastuinbouw dan ook een minder

grote rol. Om de bodem ook weerbaarder te maken tegen bodemziekten zoals bijvoorbeeld *Meloidogyne* of *Verticillium* is een hoge algemene activiteit van het bodemleven echter niet voldoende. Er zijn specifieke spelers nodig die ervoor zorgen dat de overlevingskans van pathogenen minder groot wordt. Die spelers kunnen van buiten geïntroduceerd worden. De kans op succes wordt in het algemeen als gering gezien. Om een organisme te introduceren moet het eerst gekweekt kunnen worden – op voorwaarde dat het toegelaten is. Vervolgens moet het kunnen overleven en zodanig kunnen groeien dat het effectief het pathogeen kan onderdrukken. Het lijkt logischer om gebruik te maken van organismen die al in de bodem aanwezig zijn, en waarvan bekend is dat ze een ziekteonderdrukkende werking hebben. De vraag is echter of die organismen in voldoende mate gestimuleerd kunnen worden om daadwerkelijk de pathogeen te onderdrukken.

## 1.2 Voeden van het bodemleven

Het vergroten van de diversiteit van het voedselaanbod voor het bodemleven, zou een andere mogelijkheid kunnen bieden om pathogenen aan te pakken. In de open teelten wordt op die manier geprobeerd de infectiedruk van *Verticillium longisporum* te verlagen. De focus ligt hier op het inwerken van lignine-rijke, verse plantmaterialen, die voeding kunnen geven aan witrotschimmels in de bodem. Deze schimmels breken met behulp van extern uitgescheiden enzymen lignine af. En passant wordt, behalve het plantaardige lignine, ook de beschermingslaag van de overlevingsstructuren (microsclerotiën) van *Verticillium*, die bestaat uit melanine, aangetast. Hierdoor worden de microsclerotiën minder vitaal en sterven af. Het bodemleven wordt dus gestimuleerd in een bepaalde richting, door het te voeden met gewasresten die normaliter niet ter beschikking staan, om op die manier de pathogene bodemorganismen terug te dringen en de bodem op een natuurlijke manier gezonder te maken.

## 2 Vraagstelling en onderzoeksdoel

Het onderzoek dat tot nu toe gedaan is naar de relatie tussen lignine-rijke gewassen en de afbraak van overlevingssporen in de grond heeft betrekking op *V. longisporum* in de open teelten, en op de bestrijding van *Rhizoctonia solani* en *Sclerotinia sclerotiorum* in de teelt van sla onder glas (Debode et al., 2005; Van Beneden, 2009; Van Beneden et al., 2010) In dit onderzoek willen we kijken in hoeverre de toepassing van lignine-rijke gewasresten ook voor de bestrijding van *V. dahliae* in de biologische vruchtgroenteteelt geschikt is.

### Onderzoeksdoel

Bepalen van de toepasbaarheid van lignine-rijke gewasresten in de (biologische) vruchtgroenteteelt, met als doel het bodemleven zodanig te sturen dat deze op een natuurlijke manier in staat is om *Verticillium dahliae* te onderdrukken.

Het onderzoek is opgebouwd uit de volgende onderdelen:

1. Literatuurstudie naar de mogelijkheden om lignine-rijke gewasresten toe te passen;
2. Laboratorium studie naar het effect van een aantal verschillende lignine-rijke gewasresten, in verschillende bodemtypes, op de overleving van microsclerotiën van *V. dahliae*;
3. Praktijk onderzoek naar de toepassing van de meest veelbelovende gewasresten uit het laboratorium onderzoek.

In het literatuuronderzoek willen we de volgende vragen beantwoorden:

- Wat is bekend over afbraak van microsclerotiën van pathogene schimmels, door het stimuleren van lignine-afbrekende schimmels in de bodem?
- Wat zijn gewasresten of plantenresten met hoge gehalten aan lignine?

In het lab- en praktijkonderzoek komen de volgende vragen aan de orde:

- Welke gewasresten veroorzaken de sterkste afname in microsclerotiën van *V. dahliae*?
- Is er een verschil in grondsoorten bij de afbraak van microsclerotiën door het onderwerken van lignine-rijk materiaal?
- Wat is het effect van het onderwerken van lignine op de stikstofgehalten in de grond?



## 3 Materiaal en methode

### 3.1 Laboratorium proef lignine-rijke gewasresten

**Locatie** De bodemtypes voor de proef zijn verzameld op basis van de ernst van de *Verticillium* aantasting op het bedrijf. Daarbij is geprobeerd om een diverse set aan bodemtypes in de proef te laten meedraaien. In augustus is grond van 3 biologische glastuinbouwbedrijven verzameld. Op één bedrijf (locatie Tinte) was een sterke plantuitval in paprika door *Verticillium* en op één bedrijf (locatie Schalkwijk) was er een lichte uitval van zoete puntpaprika (Ramiro, ongeënt) langs het pad. Op het derde bedrijf (locatie Velden) was geen duidelijke uitval door *Verticillium* waargenomen, maar waren er wel vermoedens van *Verticillium* besmetting.

**Grondmonsters** De grond is verzameld met behulp van een 2 cm brede guts tot 25 cm diepte, in totaal 4 kg grond per bedrijf. De monsters zijn dicht bij de stengel van zieke planten genomen, om een zo hoog mogelijke dichtheid van micro-sclerotiën in de grondmonsters te krijgen. De veldvochtige grond is goed gemengd en gezeefd over een 5 mm zeef (kleigronden) en 2 mm zeef (lemige zandgrond) en tot gebruik in de koelcel bewaard bij een temperatuur van 7°C. Van de gronden is het droge stofgehalte, organische stofgehalte, percentage lutum en percentage CaCO<sub>3</sub> bepaald.

**Gewasresten** Op basis van gegevens over lignine-gehaltenes van gewasresten, en beschikbaarheid van gewasresten, zijn op 24 september verschillende soorten lignine-rijke gewasresten verzameld:

- Broccoli (stengel) (*Brassica oleracea* 'Koros' (Nickerson-Zwaan)) (Zwaagdijk)
- Japanse Haver (hele plant) (*Avena strigosa* cv. *astrigosa* (Innoseeds)) (Anna Paulowna)
- Riet (stengel en blad) (*Phragmites australis*) (Anna Paulowna)
- Ethiopische/Abessijnse mosterd (hele plant) (*Brassica carinata* (Vandijke SEMO)) (Horst)
- Maïs (stengel en blad) (*Zea mais*)

De gewasresten zijn tot gebruik in de koelcel bewaard.

**Experiment** Op 27 en 28 september zijn de gewasresten in stukjes van ca. 1 cm geknipt, en 5 gram gewas (versgewicht) is gemengd met 50 gram veldvochtige grond (10% m/m) en gedurende 4 weken in bakjes in weckpotten geïncubeerd bij een temperatuur van 23°C. Het experiment is uitgevoerd in 5 herhalingen en grond zonder gewasresten is als controle gebruikt. Voor het experiment zijn alleen de gronden van de locaties Schalkwijk en Tinte (oudere locatie Kloosterweg) gebruikt, omdat deze hoge aantallen microsclerotiën bevatten.

**Analyses** Aan het begin en aan het einde van de proef is de dichtheid aan *Verticillium* in de grond bepaald (zie par. 3.4). Van de gewasresten is het droge stofgehalte bepaald en het gehalten aan N en ADL (Acid Detergent Lignin).



*Figuur 3-1: Gebruikte gewasresten in incubatieproef. v.l.n.r. boven: Japanse Haver, Riet; beneden: Maïs, Abessijnse mosterd. Inzet: Broccoli.*

### 3.2 Potproef

**Locatie** De grond voor de potproef is tijdens de teeltwisseling (16 december) verzameld op de nieuwe locatie KW6 van een biologisch glastuinbouwbedrijf in Tinte. Van slechte plekken in de kas, met veel *Verticillium* aantasting in de voorafgaande tomatenteelt, is grond verzameld. De grond is met behulp van een betonmolen gemengd, om een homogene uitgangssituatie te krijgen. Hiermee zijn potten van ca. 10 liter gevuld na mengen met verschillende lignine-rijke materialen.

**Materialen** Uit de laboratorium proef bleek dat voor de locatie Tinte riet het meest perspectiefvolle materiaal was om de *Verticillium* besmetting van de grond terug te brengen. Omdat naast riet ook tarwestro een makkelijk beschikbaar materiaal is, is in de proef ook één variant met stro meegenomen. De behandelingen met riet zijn in 4 herhalingen uitgevoerd, de behandeling met stro in 3 herhalingen. In de potproef liggen de volgende behandelingen:

- controle (geen bijmenging van lignine-rijke materialen)
- 1 % riet (m/m)
- 2 % riet (m/m)
- 10 % riet (m/m)
- 2 % tarwestro (m/m)

**Experiment** De potten zijn langs de wand in de kas geplaatst. De eerste 3 weken hebben de potten bij een temperatuur van ca. 10°C gestaan. Enkele dagen voor de plantdatum op 6 januari is de temperatuur naar ruim 20°C gegaan. 8 en 12 weken na het inzetten van de proef zijn er deelmonsters uit de potten genomen voor *Verticillium* bepalingen.

**Analyses** De gebruikte gewasresten zijn geanalyseerd op droge stofgehalte en ligninegehalte. Direct na het mengen van de gewasresten met de grond, is aan de grond (in één mengmonster per behandeling) een bepaling uitgevoerd van pH, Mn, N-min, N-totaal en organische stof. Daarnaast is (in één mengmonster per behandeling) de hoeveelheid *Verticillium* in de grond bepaald door uitplaten op MSEA agar én door real-time PCR-analyse. Na 8 en 12 weken zijn deelmonsters uit de potten genomen. De 8-weeken monsters zijn alleen door middel van real-time PCR geanalyseerd. De 12-weeken monsters zijn zowel met behulp van uitplaten op MSEA agar als met behulp van real-time PCR geanalyseerd. Na 12 weken is opnieuw de hoeveelheid N-min in de bodem bepaald.

### 3.3 Praktijkproef

**Locatie** De proef is aangelegd op de nieuwe locatie KW6 van een biologisch glastuinbouwbedrijf in Tinte, op een plek in de kas met veel uitval door *Verticillium* in de voorafgaande tomatenteelt. De proef is aangelegd tijdens de teeltwisseling (16 december). Planten van de voorafgaande tomatenteelt (Capricia op onderstam Emperador) zijn geruimd op 9 december. Op 6 januari is paprika geplant (Spider op onderstam Snooker).

**Behandelingen** In de proef liggen de volgende 3 behandelingen:

- controle (geen bijmenging van lignine-rijke materialen)
- 2% riet (m/m) (60 ton/ha vers materiaal / bouwvoor 30 cm)
- 2% tarwestro (m/m) (60 ton/ha vers materiaal / bouwvoor 30 cm)

Het materiaal is over ca. 15 cm diepte ingespit. In de bovenste laag van de bouwvoor is de concentratie 4% (m/m), in de onderste laag zit geen lignine-rijk materiaal. De controle behandeling en de behandeling met 2% riet liggen in 4 herhalingen in de proef. De behandeling met stro ligt zonder herhalingen in de proef. De lignine-rijke materialen zijn tegelijk met de voorraadbemesting (150 m<sup>3</sup>/ha compost, 2000 kg/ha Agrobiosol en 20 m<sup>3</sup> ha houtsnippers met *Trichoderma*) ingefreesd. De controle en met riet behandelde veldjes zijn 1 bed breed en 4 meter lang. Het veldje met stro ligt aangrenzend aan de proef en is 1 bed breed en 2.5 meter lang.

**Analyses** Bij aanleg van de praktijkproef zijn van de controle en van de behandeling met 2% riet mengmonsters genomen voor analyse van organische stofgehalte, N-totaal, pH, en mangaan (voordat het organisch materiaal is ondergewerkt). Daarnaast zijn per herhaling grondmonsters genomen voor analyse van de uitgangssituatie voor *Verticillium*. Deze grondmonsters zijn geanalyseerd met behulp van real-time PCR-analyse en door uitplaten op MSEA-agar. Daarnaast is het gehalte aan N-mineraal bepaald. Na 8 weken zijn er per herhaling grondmonsters genomen voor PCR-analyse op *Verticillium*. Na 12 weken zijn er per herhaling grondmonsters genomen voor analyse op *Verticillium*, zowel met PCR-analyse als door uitplaten op MSEA-agar, en voor bepaling van het gehalte aan N-mineraal.

### 3.4 Bepalen *Verticillium* dichtheid

In de verschillende experimenten is op twee manieren de dichtheid aan microsclerotiën bepaald: door uitplaten op MSEA (Modified Soil Extract Agar) en door real-time PCR analyse.

**Uitplaten op MSEA** Voor het bepalen van de dichtheid microsclerotiën is een gedeelte van de grond gedurende twee weken aan de lucht gedroogd. Hierna is 12.5 gram (lucht)droge grond met 50 ml 1% NaHMP (natriumhexametafosfaat) gedurende 1 uur geschud en gezeefd over een 160 µm en 20 µm zeef. Het mengsel van grond en micro-sclerotiën dat achterblijft op de 20 µm zeef is opgelost in 50 ml demiwater. Van deze oplossing is 0.8 ml uitgeplaat op een petrischaal met MSEA (Modified Soil Extract Agar) medium. Per grondmonster zijn 5 of 6 platen gemaakt. De platen zijn gedurende 4 weken in het donker bij 23°C geïncubeerd. Daarna zijn de gronddeeltjes van de platen gewassen met demiwater, en zijn de platen nog 2 weken langer geïncubeerd (Harris et al., 1993). Het aantal kolonies *Verticillium* is onder een binoculair geteld. Op MSEA zijn twee verschillende typen *Verticillium* kolonies geïdentificeerd. Gebaseerd op morfologie, zijn ze als kolonies van *V. dahliae* en *V. tricorpus* geïdentificeerd (Davis et al., 2000).

**PCR analyse** Door het Instituut voor Landbouw- en Visserij Onderzoek (ILVO) in Vlaanderen is een methode ontwikkeld om met behulp van real-time PCR analyse de hoeveelheid DNA van *Verticillium* in de grond te kwantificeren (Debode en Van Poucke et al., 2011). Hierbij kan onderscheid gemaakt worden tussen *V. dahliae*, *V. longisporum* en *V. tricorpus*. Omdat het onderscheid tussen de soorten op basis van morfologie niet eenvoudig is, is dit een belangrijke aanvulling op de traditionele bepaling door uitplaten.

**ITS sequencing** In 2011 zijn door Inderbitzin et al. 5 nieuwe *Verticillium* soorten beschreven. Na afloop van de voorgaande experimenten zijn op de nieuwe locatie Tinte (KW6) grondmonsters genomen, die door het ILVO met behulp van ITS sequencing zijn geïdentificeerd op soortniveau.



## 4 Resultaten

### 4.1 Literatuuronderzoek

Door middel van literatuuronderzoek willen we de volgende vragen beantwoorden:

- Welke informatie is er over afbraak van micro-sclerotiën van pathogene schimmels, door het stimuleren van lignine-afbrekende schimmels in de bodem?
- Wat zijn gewasresten of plantenresten met hoge gehalten aan lignine?

Recent is de beschrijving van 5 nieuwe *Verticillium* soorten gepubliceerd (Inderbitzin et al., 2011). Dit is relevant voor de betrokken *Verticillium* soorten in dit onderzoek. Een omschrijving van de in totaal 10 op dit moment onderscheiden soorten staat in bijlage 2.

#### 4.1.1 Afbraak van micro-sclerotiën in de bodem

Voor de bestrijding van *Verticillium* is de afbraak van micro-sclerotiën van groot belang. Zodra er enkele weken geen waardplant meer op de bodem staat, kan de schimmel alleen in de vorm van microsclerotiën overleven. Deze ruststructuren zijn zo hardnekkig omdat ze melanine bevatten (zie kader). In een eerdere publicatie binnen het onderzoeksprogramma Biologische Bedekte Teelten zijn verschillende strategieën besproken om *Verticillium* te bestrijden, waaronder biologische grondontsmetting en de werking van antagonisten (Cuijpers et al., 2008). Onderzoek van de Universiteit Gent heeft laten zien dat (micro)sclerotiën van *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* en *Verticillium longisporum* in de bodem ook teruggebracht kunnen worden door het onderwerpen van lignine-houdende materialen (Van Beneden, 2009; Debode et al., 2005). Een aantal mechanismen kunnen hierbij een rol spelen.

Melanines uit de microsclerotiën kunnen afgebroken worden door lignine. Het toevoegen van lignine aan de grond, stimuleert de natuurlijk voorkomende lignine-afbrekende organismen in de bodem (Butler en Day, 1998a; 1998b). Witrotschimmels zijn van alle bekende organismen het beste in staat om lignine snel en volledig af te breken. Er bestaan ook bruinrot-schimmels, zachtrotschimmels en bacteriën die lignine kunnen modificeren, of tot op beperkte hoogte kunnen afbreken. De meeste lignine wordt in de natuur echter snel en effectief door witrotschimmels afgebroken.

Er bestaan duizenden soorten witrotschimmels, en onderling verschillen ze sterk in hun vermogen om andere plantendelen zoals cellulose efficiënt om te zetten (Tuomela, 2000; Cullen, 1997). Het zijn aërobe schimmels, behorend tot de Basidiomyceten. Door lignine in het hout af te breken, krijgen de schimmels toegang tot de celluloses en hemicelluloses die in de lignine matrix ingebouwd zijn (Hammel, 1997). Dit type schimmels gebruikt 4 verschillende groepen extracellulaire enzymen om lignine af te breken: lignine peroxidases, mangaan peroxidases, laccases en glyoxal oxidases. Deze enzymen kunnen vervolgens inwerken op de melanine uit de persistente overlevingsstructuren, de microsclerotiën. Microsclerotiën met aangetast melanine zijn gevoeliger voor antagonisten zoals *Trichoderma*, actinomyceten en Gram-negatieve bacteriën.

### **Melanine belangrijk voor pathogene schimmels**

Veel schimmelstructuren die heel hardnekkig in de bodem overleven, bevatten donkerbruin of zwart pigment dat bestaat uit melanine. Melanines behoren tot de meest stabiele, onoplosbare en resistente stoffen. Verschillende soorten schimmels gebruiken verschillende biochemische 'routes' om melanine te maken. De natuurlijke vorming van melanine volgt geen precies patroon, waardoor datgene wat we uiteindelijk 'melanine' noemen, moleculen met verschillende structuren bevat. Melanine bevindt zich in de celwand van de schimmel. Behalve in overlevingsstructuren, gebruiken pathogene schimmels melanine ook nog voor een ander doel. Wanneer sporen net gekiemd zijn wordt er een aparte structuur gevormd in de punt van de schimmeldraad, het apressorium. Dat puntje oefent een heel grote druk uit op de celwand van de plant, waarbij er een gaatje in de celwand van de plant ontstaat. Melanine vormt een belangrijk deel van dit 'puntje', en zorgt ervoor dat er binnenin de celwand een hele hoge osmotische druk opgebouwd kan worden. Een aantal systemische fungiciden bevatten stoffen die de productie van melanine door de schimmel blokkeren.

#### **4.1.2 Effect van pure lignine**

Potproeven hebben laten zien dat wanneer er aan de grond 1% (m/m) Kraft pine lignine (een restproduct uit de papierindustrie dat alleen uit lignine bestaat) wordt toegevoegd, de levensvatbaarheid van de sclerotien van *R. solani* afneemt, samen met een toename van het mycoparasitisme. Het effect is echter wel afhankelijk van de grondsoort. In de grond wordt na toevoeging van lignine een *toename* gevonden in schimmels en actinomyceten, samen met een stijging in het lignine-afbrekende enzym mangaanperoxidase. Bij toevoeging van Kraft pine lignine kan een grote hoeveelheid lignine worden toegevoegd, met relatief weinig materiaal. Er zijn echter ook andere ligninerijke producten, zoals riet, houtvezels of vlasleem (het gebroken hout van strovlas) die naast lignine ook cellulose en hemicellulose bevatten. Een nadeel van deze materialen is dat er relatief veel volumineus materiaal moet worden ondergewerkt om een bepaalde hoeveelheid lignine toe te voegen. Vlas is bovendien gevoelig voor *V. dahliae*, en kan daarom beter niet gebruikt worden. Onderzoek heeft laten zien dat lignine-rijke gewasresten juist *wel* effect kunnen hebben, in gronden waar Kraft pine lignine geen effect heeft. Mogelijk speelt de meer diverse samenstelling van het materiaal daarin een rol.

#### **4.1.3 Effect van lignine uit gewasresten**

Verschillende – meer houtige – gewasresten bevatten een relatief hoog gehalte aan lignine. In een incubatieproef (Debode et al., 2005) is gekeken naar het effect van gewasresten van broccoli, bloemkool, Indiase mosterd (*Brassica juncea*), Engels raaigras en maïs, op twee grondsoorten met een natuurlijke besmetting met *Verticillium*. Het inwerken van raaigras en maïs was in deze proef effectiever dan het onderwerken van gewasresten van kruisbloemigen. Het effect was echter verschillend op de twee verschillende grondsoorten. Als de pure lignine uit de gewasresten werd geïsoleerd, was ze minder effectief dan in combinatie met het resterende deel van de gewasresten.

#### 4.1.4 Effect van combinatie van antagonisten en lignine

**Rhizoctonia** In de glastuinbouw in België is de jaarrond teelt van sla gebruikelijk, waarbij in de grond wordt geteeld. Eén van de meest algemeen voorkomende problemen is smet, een ziektebeeld dat door verschillende bodemschimmels kan worden veroorzaakt, waaronder *Sclerotinia* spp., *Botrytis cinerea*, *R. solani* en *Pythium* spp.. In een veldexperiment in 3 opeenvolgende slateelten is gekeken naar het effect van lignine op de overleving van sclerotiën van *Rhizoctonia*. Dit zorgde geleidelijk aan voor de bestrijding van de sclerotiën in de grond. In de derde teelt was niet alleen ondergronds een reductie in sclerotiën zichtbaar, maar ook bovengronds in een significante reductie van de smetsymptomen. In combinatie met de biologische bestrijders Contans (*Coniothyrium minitans*) en Radix (*Trichoderma asperellum* en *T. gamsii*) verdween het effect van de lignine, mogelijk door onderlinge interactie van de bestrijders (Van Beneden, 2009).

**Sclerotinia** Voor de bestrijding van *Sclerotinia* is er al een specifieke biologische bestrijder op de markt, in de vorm van *Coniothyrium minitans* (Contans). In een veldproef in 3 opeenvolgende slateelten werd de combinatie van Contans met lignine uitgetest. Hierdoor werden de sclerotiën gevoeliger voor aantasting, wat weerspiegeld werd in minder ziektedruk door *Sclerotinia* in de derde slateelt (Van Beneden, 2009).

**Verticillium** Er zijn maar weinig antagonisten daadwerkelijk op de markt toegelaten in Nederland. Dit maakt de keuze erg beperkt. Verder is er nog geen kennis beschikbaar over de combinatie van antagonisten en lignine in de bestrijding van *Verticillium*. Een aantal antagonisten wordt hier kort aangestipt. *Talaromyces flavus* is een bodemschimmel met antagonistische eigenschappen tegen *Verticillium*, die korte tijd door Prophyta op de markt gebracht is geweest als Protus®. De schimmels *Gliocladium roseum* en *G. catenulatum* zijn ook effectief tegen de microsclerotiën van *Verticillium*, en in de EU door Verdera op de markt gebracht als Prestop®. *Pythium oligandrum* (als Polyversum® in de EU op de markt) bestrijdt de symptomen van *Verticillium dahliae*, maar tast de schimmel zelf niet aan. Ook Trichoderma soorten hebben antagonistische eigenschappen tegen *Verticillium*. De bodembacterie *Pseudomonas chlororaphis* (als Cedomon® in de EU op de markt) heeft in laboratorium-onderzoek een antagonistische werking tegen *Verticillium*. In Nederland is ook het middel Mycostop® toegelaten, de bodembacterie *Streptomyces griseovirides*. Het effect op *Verticillium* is echter onduidelijk, waarschijnlijk is het belangrijk dat de wortels van de planten al in de opkweekfase met de bacterie geïnoculeerd worden (Cuijpers et al., 2008).

### Samenvatting

Pure lignine heeft als voordeel dat in de praktijk met weinig materiaal toch veel lignine toegevoegd kan worden. Nadeel is de eenzijdige samenstelling: het bevat geen cellulose of hemicellulose, waardoor het soms minder effectief is dan gewasresten.

Het effect van lignine in gewasresten kan verschillen per soort gewas en per grondsoort. Mogelijk heeft dit te maken met de natuurlijke samenstelling van het bodemleven per locatie.

Het effect van lignine toevoegingen heeft tijd nodig. Hoewel het effect op de levensvatbaarheid van de micro-sclerotiën direct zichtbaar is, heeft de afbraak van de micro-sclerotiën meer tijd nodig, en duurt het langer voor het effect ook in het gewas zichtbaar is.

Antagonisten kunnen soms het effect van lignine-toevoeging versterken (*Coniothyrium minitans* werkt met lignine beter tegen *Sclerotinia*), maar soms ook het effect van lignine teniet doen (*Coniothyrium* en *Trichoderma* tegen *Rhizoctonia*).

Een aantal antagonisten hebben mogelijk ook een werking tegen *Verticillium*, maar deze zijn nog nooit in combinatie met lignine getest. De beschikbaarheid op de markt is op dit moment beperkt tot *Trichoderma*.

#### 4.1.5 Lignine gehalten van gewasresten

**Verschillende meetmethoden lignine** In de literatuur zijn verschillende bronnen te vinden voor lignine gehalten van gewasresten. Een gedeelte van de informatie kan gevonden worden in de literatuur gericht op afbraaksnelheid en mineralisatie van gewasresten in de bodem. Daarnaast biedt de literatuur over voederwaarde van gewassen informatie over lignine gehalten. Lignine gehalten zijn ook belangrijk voor uitgangsmateriaal dat gebruikt wordt in de papierindustrie. Tenslotte biedt de recente literatuur over riet- en grassoorten die gebruikt worden als biobrandstoffen informatie over lignine gehalten.

Probleem bij het vergelijken van deze bronnen is echter dat er verschillende analyse-methoden in omloop zijn om de lignine gehalten te meten. De eerste soort methodes gebruikt heel sterke minerale zuren, die alle andere organische componenten afbreken, waarna alleen lignine overblijft. Hiertoe behoort bijvoorbeeld de Klason methode. De tweede soort methodes gebruikt oxiderende stoffen om lignine selectief te verwijderen uit de monsters. Uit de tweede klasse is de ADL (Acid Detergent Lignin) de bekendste methode, die onder andere gebruikt wordt om voedergewassen te analyseren. De ADL is een standaard analyse die door BLGG kan worden uitgevoerd. De twee soorten methodes geven echter heel verschillende uitkomsten voor de lignine gehalten. Voor grassen zijn de gevonden waarden van Klason lignine ongeveer 2 tot 4 keer zo groot dan van de ADL. Bij vlinderbloemigen zijn de Klason gehalten ongeveer 30% hoger dan de ADL (Jung et al., 1997). De Klason methode heeft in de loop van de tijd verschillende wijzigingen doorgaan. Bij de Forest Products Method wordt ook zwavelzuur gebruikt, maar als eerst de wateroplosbare bestanddelen uit de monsters verwijderd worden, zijn de gevonden lignine gehalten weer lager (Rahn et al., 1999). Vergelijking van lignine-gehalten uit verschillende bronnen is dus erg lastig. Voor verschillende gewassen zijn de gehalten aan lignine gerelateerd aan de rijpheid van de

stengels. Rijpe stengels van luzerne, kropaar en vingergras, hebben in het algemeen hogere gehalten aan ADL en Klason Lignin dan onrijpe stengels (Hatfield et al., 1994).

**Ligninegehalten** De gegevens over ligninegehalten staan vermeld in bijlage 1. Ze zijn ingedeeld in 4 verschillende groepen gewasresten: akker/tuinbouwgewassen, grassen & granen, vlinderbloemigen en houtige gewassen. De hoogste gehalten worden gevonden bij gewasresten van houtige gewassen, zoals het blad van beuk (45.0% Klason) en eik (40.2% Klason). Daarna volgen gewasresten van met name grassen en granen, zoals stengels van vingergras (>30% Klason), prachtriet (28.5% Klason), tarwe (25.9% Klason) en pijlrriet (20.5% Klason). Gewasresten zoals stengels van broccoli (26.8% ADL), boon (25.6% ADL), aardappel (22% Klason), bloemkool (16.9% Klason) en suikerriet (16.6% Klason) bevatten ook relatief veel lignine. Aardappel is echter een waardplant voor *Verticillium dahliae*, en om deze reden niet bruikbaar.

## 4.2 Laboratorium proef

### 4.2.1 Uitgangssituatie

In de uitgangssituatie werden op 2 bedrijven hoge aantallen microsclerotien (ms) van *Verticillium* in de grond aangetroffen: 567 ms/10 gram grond (locatie Schalkwijk) en 258 ms/10 g grond (locatie Tinte). Op basis van morfologie bestaat de populatie in Schalkwijk voor ca. 21% uit *V. dahliae* (117 ms *V.dahliae*/10 g grond), in Tinte voor ca. 16% (42 ms *V.dahliae*/10 g grond). Omdat de grond selectief is verzameld rondom zieke planten geven deze aantallen echter niet het gemiddelde weer van de besmetting van de afdeling. Het grootste gedeelte van de gevonden *Verticillium* wordt op basis van morfologie als *V. tricorpus* geïdentificeerd. Op de nieuwe locatie Tinte (KW6) is één isolaat uit de bodem, verkregen uit een *V.tricorpus* kolonie, door middel van ITS sequencing geïdentificeerd als *Verticillium isaacii*. Ook is *Verticillium* geïsoleerd uit aubergine planten (onderstam Mao) van de oude locatie Tinte (KW5). Dit betreft *V. dahliae*. Het is onbekend of het isolaat *V.isaacii* representatief is voor de hele populatie op het bedrijf, die in eerste instantie als *V. tricorpus* is aangeduid. Voor locatie Schalkwijk is geen ITS sequencing toegepast. Op het 3e bedrijf (locatie Velden) werd géén *Verticillium* in de grond aangetroffen. Deze grond is niet in vervolg experimenten meegenomen.

De *Verticillium* dichtheid is voor de twee besmette grondmonsters ook bepaald met behulp van een real-time PCR bepaling (Debode et al., 2011). Hierbij is geen *V. longisporum* in de grond aangetroffen, een kleine hoeveelheid *V. dahliae* en zeer hoge aantallen *V. tricorpus* (Tabel 4-1). In de real-time PCR bepaling is geen onderscheid gemaakt tussen *V. tricorpus* en de nieuwe soorten *V. isaacii* en *V. zaregamsianum*. Op basis van de PCR analyse is op beide bedrijven slechts 6% van het gevonden DNA afkomstig van *V. dahliae*. De verhouding in aantal tussen de PCR en de uitplaatmethode, hoeft niet gelijk te zijn voor verschillende soorten *Verticillium*. Op dit moment werken het ILVO en de Universiteit Gent aan de vertaalslag van de resultaten van de nieuwe PCR methode naar de gebruikelijke techniek van het uitplaten.

Tabel 4-1: Hoeveelheid *Verticillium* in de grond volgens real-time PCR analyse in fg (femtogram =  $10^{-15}$  gram) DNA/g grond.

| Locatie    | <i>V. dahliae</i><br>fg DNA/g grond | <i>V. tricorpus</i><br>fg DNA/g grond |
|------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Schalkwijk | 25                                  | 2196                                  |
| Tinte      | 36                                  | 1557                                  |

#### 4.2.2 Analyseresultaten gewasresten

De gewasresten zijn geanalyseerd op nutriëntengehalten, C/N verhouding van het materiaal (Tabel 4-2) en lignine-gehalte (Tabel 4-3), De C/N verhouding van de gebruikte materialen loopt sterk uiteen, van 87.3 in maïsstengel en 81.5 in rietstengel, tot 12.1 in Ethiopische mosterd en 14.1 in Japanse haver. De hoogste lignine gehalten (Acid Detergent Lignin / ADL) vinden we in de rietstengel (79 g/kg droge stof), gevolgd door rietblad (50 g/kg ds) en broccoli stengel (48 g/kg ds). De laagste gehalten vinden we in het maïsblad (19 g/kg), Ethiopische mosterd (23 g/kg ds), Japanse haver (24 g/kg ds) en maïsstengel (35 g/kg ds). Doordat het riet en de maïs relatief hoge droge stofgehalten hebben, zijn hier uiteindelijk veel grotere hoeveelheden lignine toegevoegd per gram grond, dan bij de andere typen gewasresten.

Tabel 4-2: Analyseresultaten van de gebruikte gewasresten. De gehalten zijn uitgedrukt in g/kg droge stof, m.u.v. de sporelementen mangaan, zink en ijzer, deze zijn in mg/kg droge stof. De droge stofgehalten staan vermeld in Tabel 4-3.

| Gewas               | N    | P   | K  | Mg  | Na  | Ca   | S   | Mn  | Zn  | Fe  | C/N  |
|---------------------|------|-----|----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|
| Broccoli stengel    | 25,5 | 5,9 | 65 | 2,4 | 1,3 | 9,5  | 7,3 | 10  | 25  | 68  | 15,9 |
| Ethiopische mosterd | 34,2 | 6,6 | 62 | 2,7 | 1,6 | 13,9 | 4,8 | 46  | 128 | 105 | 12,1 |
| Japanse haver       | 30,7 | 6,6 | 46 | 2,1 | 2,1 | 6,2  | 2,9 | 33  | 64  | 124 | 14,1 |
| Maïs blad           | 29,2 | 3,3 | 14 | 5,9 | 0,3 | 9,7  | 2,1 | 255 | 103 | 160 | 16,4 |
| Maïs stengel        | 5,4  | 0,8 | 14 | 2,2 | 0,1 | 1,4  | 0,6 | 46  | 70  | 55  | 87,3 |
| Riet blad           | 24   | 1,5 | 7  | 1,2 | 1,6 | 10   | 4,8 | 34  | 19  | 118 | 20,0 |
| Riet stengel        | 5,7  | 0,6 | 6  | 0,3 | 1,1 | 1,5  | 1,4 | 9   | 23  | 70  | 81,5 |

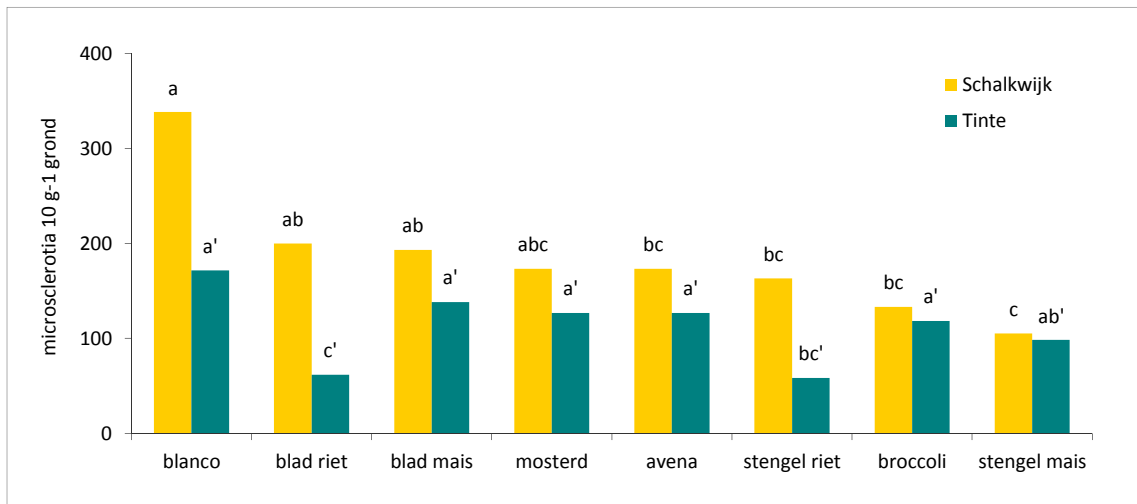
Tabel 4-3: Droge stof en lignine (Acid Detergent Lignin) gehalten van de verschillende gewasresten. In de laatste kolom is de hoeveelheid toegevoegd lignine weergegeven in de veldvochtige grond bij een gehalte van 10% (m/m).

| Gewas               | DS % gewas | Lignine g/kg ds | Toegevoegd lignine mg/g grond |
|---------------------|------------|-----------------|-------------------------------|
| Broccoli stengel    | 7.9        | 48              | 0,38                          |
| Ethiopische mosterd | 7.8        | 23              | 0,18                          |
| Japanse haver       | 9.5        | 24              | 0,23                          |
| Maïs blad           | 17.9       | 19              | 0,34                          |
| Maïs stengel        | 17.5       | 35              | 0,61                          |
| Riet blad           | 54.6       | 50              | 2,73                          |
| Riet stengel        | 55.8       | 79              | 4,41                          |

#### 4.2.3 Onderdrukking van Verticillium

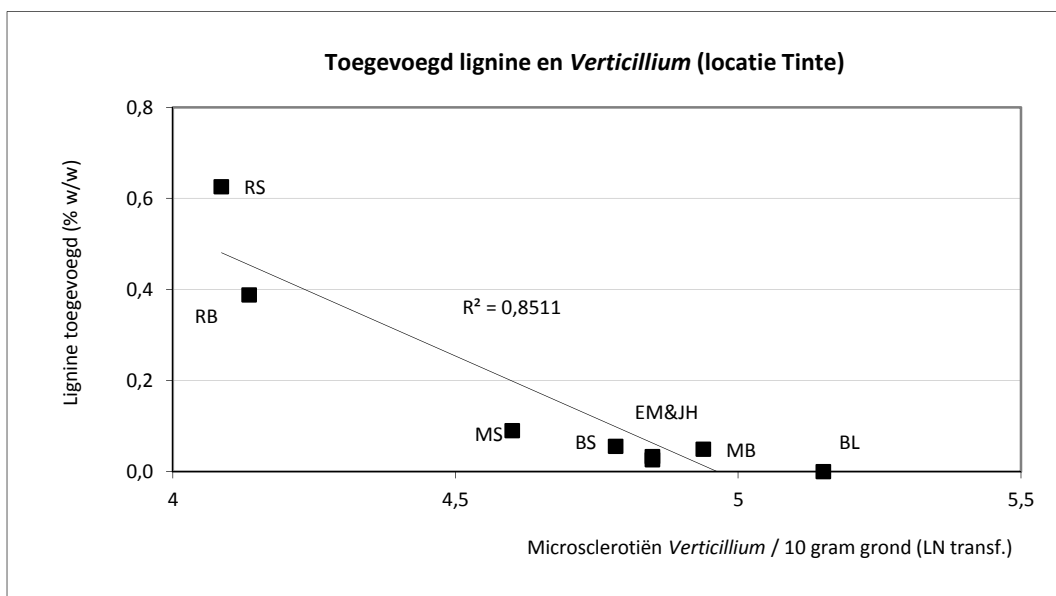
Na 4 weken incubatie van de grond zien we significante verschillen tussen de grondsoorten van de twee bedrijven en tussen de verschillende gewasresten. Daarnaast is er ook sprake van een significante interactie tussen grondsoort en gewasrest. De verschillende gewasresten hebben op de twee bedrijven dus niet hetzelfde effect (Figuur 4-1). In een vervolganalyse hebben we daarom de twee bedrijven los van elkaar geanalyseerd. Bij grond van locatie Schalkwijk hebben met maïs stengels, broccoli, riet stengels en Japanse haver een significant effect ten opzichte van de blanco. Het is opvallend dat maïs stengels, broccoli en Japanse haver een sterk effect hebben, terwijl de toegevoegde hoeveelheid lignine hier veel lager is dan bij riet blad en riet stengels (Tabel 4-3). Blijkbaar is het niet alleen de lignine die hier zorgt voor een afname van het aantal levensvatbare schimmelsporen. Mogelijk spelen bij de toevoeging van broccoli en Japanse haver ook nog vluchtige componenten zoals isothiocyanaten een rol, die afdoding van schimmelsporen kunnen geven. Maar het kunnen ook andere componenten in het gewas zijn die hiervoor verantwoordelijk

zijn. Met de toevoeging van maïsstengels is na 4 weken bij locatie Schalkwijk de hoeveelheid *Verticillium* met 69% afgenomen ten opzichte van de blanco.



Figuur 4-1. Aantal *Verticillium microsclerotia* (CFU) in grond van de locatie Tinte (wit) en locatie Schalkwijk (zwart) 4 weken na het mengen van de grond met verschillende lignine-rijke gewasresten (10% m/m). De grafiek geeft de totale hoeveelheid *Verticillium* weer, zonder onderscheid te maken tussen de verschillende soorten. De letters geven significante verschillen tussen de behandelingen weer, waarbij de locaties Schalkwijk en Tinte los van elkaar zijn vergeleken.

Bij grond van de locatie Tinte hebben het blad en de stengel van riet een significant effect op de hoeveelheid microsclerotïen van *Verticillium*. Ten opzichte van de blanco (zonder toevoeging van gewasresten) is het hoogste percentage reductie 66% met rietstengel. Op locatie Tinte is een significante relatie gevonden tussen de hoeveelheid ondergewerkt lignine (ADL: acid detergent lignin) en het aantal overgebleven microsclerotïen in de grond (LN-getransformeerd) (zie Figuur 4-2). Voor de locatie Schalkwijk is dit verband niet gevonden: hier spelen mogelijk andere mechanismen dan lignine een rol bij de afbraak van microsclerotïen.



Figuur 4-2. Verband tussen de hoeveelheid toegevoegd lignine met de gewasresten (ADL) en de afname van het aantal micro-sclerotïen van *Verticillium* in de grond (LN-getransformeerd). (RS = riet stengel, RB = riet blad, MS = maïs stengel, BS = broccoli stengel, EM = ethiopisch mosterd, JH = japanse haver; MB = maïs blad; BL = blanco controle).

## 4.3 Potproef

### 4.3.1 Bodemonderzoek

De grond van locatie Tinte die gebruikt is voor de potproef bevat ca. 8% lutum, 3.8% CaCO<sub>3</sub> en heeft een pH van 7.1. Omdat mangaan van invloed kan zijn op de activiteit van witrotschimmels, is ook gekeken naar de hoeveelheid beschikbaar mangaan in de grond. Op deze locatie ligt de hoeveelheid beschikbaar mangaan onder de detectiegrens van 250 µg Mn/kg grond. Opvallend is dat de toevoeging van 2% tarwestro leidt tot een lichte pH-verhoging (7.3) en een grotere hoeveelheid beschikbaar mangaan (730 µg Mn/kg grond). De toevoeging van riet had geen effect op de pH of de mangaan beschikbaarheid.

### 4.3.2 Hoeveelheden toegediend lignine en drogestof

Riet bevatte 54,5% ds en een ligninegehalte (ADL, Acid Detergent Lignin) van 90 g/kg ds; tarwestro bevatte 86,1% ds en een ligninegehalte van 48 g/kg ds. De hoeveelheden toegediende lignine liggen daarmee in de potproef bij toediening van 2% riet (m/m) iets hoger dan bij 2% stro (m/m) (Tabel 4-4). De lignine gehalten van het gebruikte riet liggen in de potproef hoger dan van het riet dat gebruikt is bij de incubatieproef (79 g ADL/kg ds in de stengel en 50 g ADL/kg ds in het blad). Het droge stofgehalte van het riet was vergelijkbaar met het riet dat gebruikt is in de incubatieproef (55.8% ds in de stengel en 54.6% ds in het blad). Mogelijk heeft de latere oogstdatum (december potproef, september incubatieproef) een positief effect op het ligninegehalte. Dit blijkt in de literatuur ook voor andere gewassen te gelden.

Tabel 4-4: Toegediende hoeveelheden lignine (Acid Detergent Lignin) in de verschillende behandelingen met riet en stro.

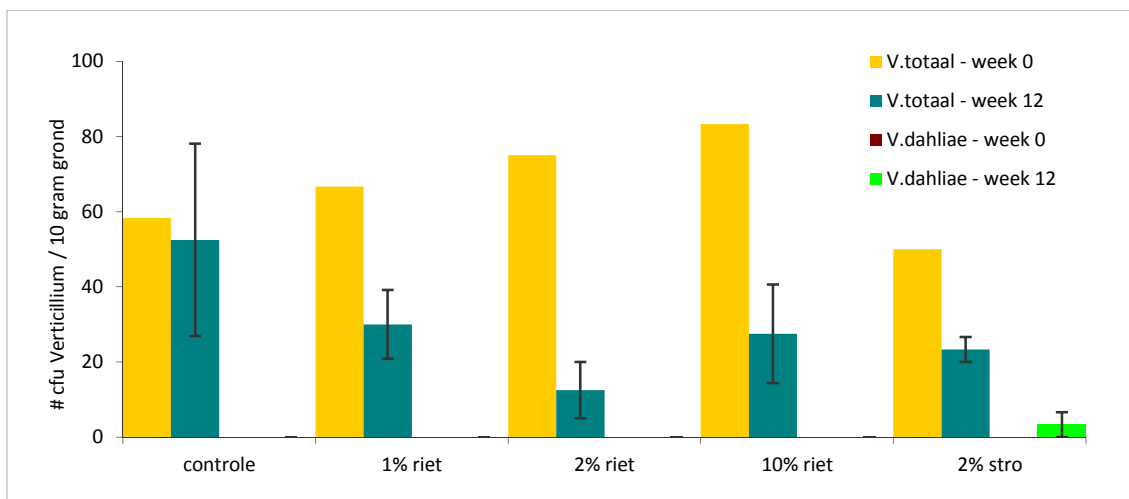
| Behandeling        | Lignine (ADL) (mg/g veldvochtige grond) |
|--------------------|---|
| Controle           | 0                                       |
| 1% riet (m/m)      | 0,49                                    |
| 2% riet (m/m)      | 0,98                                    |
| 10% riet (m/m)     | 4,91                                    |
| 2% tarwestro (m/m) | 0,83                                    |

### 4.3.3 Onderdrukking van *Verticillium*

Zowel bij het uitplaten als bij de PCR bepalingen is met name *V. tricorpus* gevonden, en niet of nauwelijks *V. dahliae*. In de potproef werd bij uitplaten na 12 weken alleen in de variant met 2% stro *V. dahliae* aangetroffen (3 cfu's / 10 g grond).

**Resultaat uitplaten *Verticillium* potproef** Na 12 weken incubatie met lignine-rijk materiaal zijn er geen significante verschillen tussen de behandelingen ontstaan. In de controle behandeling zonder toevoeging van lignine-rijk materiaal vinden we gemiddeld 53 microsclerotiën (kolonievormende eenheden: cfu's) van *Verticillium* per 10 g grond. In de variant met 2% riet zijn er nog 13 microsclerotiën per 10 g grond aanwezig (75% minder dan in controle). Deze verschillen zijn echter niet significant (Figuur 4-3).





Figuur 4-3: Totale hoeveelheid *Verticillium* en hoeveelheid *V.dahliae* in de grond na toevoeging van lignine-houdende materialen in potproef. De hoeveelheid *Verticillium* is uitgedrukt in kolonie-vormende eenheden (CFU's) per 10 g grond, en gemeten aan het begin van de proef en na 12 weken incubatie. Foutbalken geven de standaardfout van het gemiddelde weer (SEM).

**Resultaat PCR analyse potproef** Bij de real-time PCR analyse is in de potproef maar zeer weinig *V. dahliae* aangetroffen. Bij de monsternamen in december is maar in 1 van de 5 monsters DNA van *V. dahliae* aangetroffen, in een zeer kleine hoeveelheid. Bij de real-time PCR analyse van de grond, werd na 12 weken in de controle 24 fg DNA/g grond van *V. dahliae* aangetroffen, in de variant met 1% riet 9 fg, in de variant met 10% riet 5 fg, en in de varianten met 2% riet en stro geen *V. dahliae*. Het grootste gedeelte van de *Verticillium* die in de grond gevonden is, betreft *V. tricorpus*. In de PCR analyse vinden we aantallen van 1026 fg DNA/g grond, bij de controle behandeling na 12 weken. De kleinste hoeveelheid die we na 12 weken vinden is die in de behandeling met 1% riet (188 fg DNA/g grond). In de behandeling met 10% riet zit na 12 weken 318 (fg DNA/g grond). De behandelingen met 1% riet en 10% riet verschillen significant ( $F_{\text{prob}} 0.035$ ) met de controle, de behandeling met 2% riet echter niet. De behandeling met stro is niet meegenomen in de statistische analyse, omdat hier minder herhalingen zijn ingezet (zie Tabel 4-5).

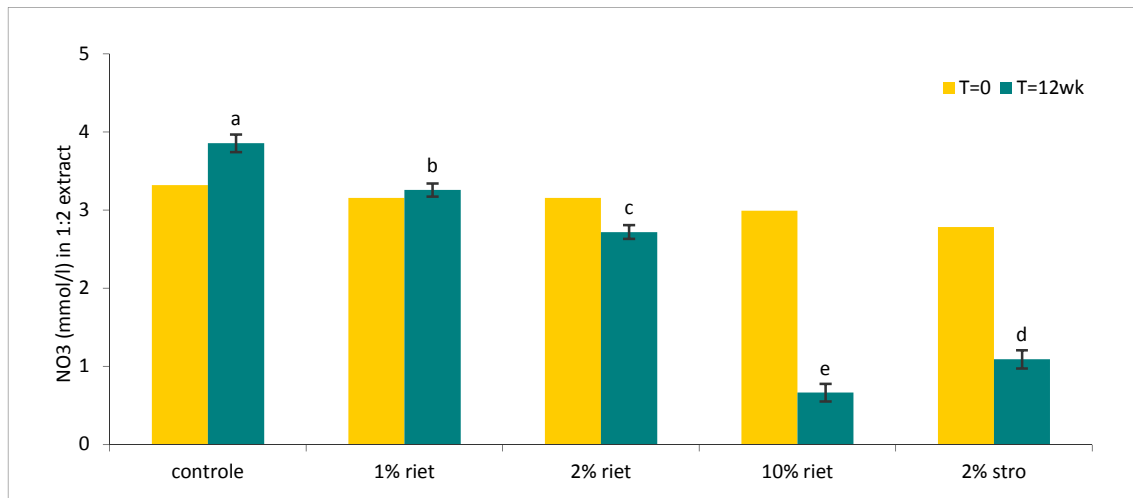
Tabel 4-5: Verloop van de hoeveelheid *V. dahliae* en *V. tricorpus*, gemeten met real-time PCR analyse, in femtogram ( $10^{-15}$ ) DNA/gram grond. De aantallen zijn bepaald na 0,8 en 12 weken. Op  $t=0$  is er één analyse uitgevoerd op de grondmonsters, op  $t=8$  in duplo, en op  $t=12$  in 4 herhalingen. Tussen haakjes staat de standaardfout van het gemiddelde (SEM).

|          | V. dahliae (fg DNA/g grond) |       |                 | V. tricorpus (fg DNA/g grond) |       |                   |
|----------|-----------------------------|-------|-----------------|-------------------------------|-------|-------------------|
|          | T=0                         | T=8wk | T=12wk          | T=0                           | T=8wk | T=12wk            |
| controle | 63                          | <4    | 24( $\pm 9.2$ ) | 615                           | 229   | 1026( $\pm 380$ ) |
| 1% riet  | <4                          | <4    | 9( $\pm 6.4$ )  | 224                           | 182   | 188( $\pm 45$ )   |
| 2% riet  | <4                          | <4    | <4              | 630                           | 1062  | 510( $\pm 136$ )  |
| 10% riet | <4                          | <4    | 5( $\pm 2.3$ )  | 388                           | 261   | 318( $\pm 99$ )   |
| 2% stro  | <4                          | <4    | <4              | 1142                          | 1067  | 441( $\pm 277$ )  |

#### 4.3.4 Nitraatgehaltes in de bodem

Bij het inzetten van de proef in december, liggen de nitraatgehaltes (vlak na het doormengen van het organisch materiaal) tussen de 2.8 (stro) en 3.3 (controle) mmol  $\text{NO}_3$  / liter in het 1:2 extract (zie Figuur 4-4). Deze bepaling is voor de verschillende behandelingen alleen aan een mengmonster uitgevoerd. Na een incubatieperiode van 12 weken, zijn er grote en significante verschillen ontstaan tussen de nitraatgehaltes. In de controle heeft er een lichte mineralisatie van stikstof

plaatsgevonden, en is het nitraatgehalte gestegen tot 3.9 mmol/liter. Bij toevoeging van 1% riet treedt er in vergelijking met de controle een lichte immobilisatie van stikstof op. Bij toevoeging van 2% riet is het nitraatgehalte gedaald naar 2.7 mmol/liter. Bij toevoeging van 10% riet is er nog maar 0.7 mmol NO<sub>3</sub>/liter aanwezig. Toevoeging van eenzelfde hoeveelheid stro leidt tot lagere nitraatgehalten in de grond. Bij 2% stro is het nitraatgehalte na 12 weken gedaald tot 1.1 mmol/liter. Bij eenzelfde hoeveelheid stro inwerken is er dus meer immobilisatie te verwachten dan bij het onderwerken van riet.



Figuur 4-4: Verloop van nitraatgehalte in de potproef met onderwerken van lignine-rijke materialen. Foutbalkjes geven de standaardfout van het gemiddelde (SEM) weer. Letters geven significante verschillen tussen de behandelingen na 12 weken weer ( $P < 0.001$ ).

## 4.4 Praktijkproef

### 4.4.1 Bodemonderzoek

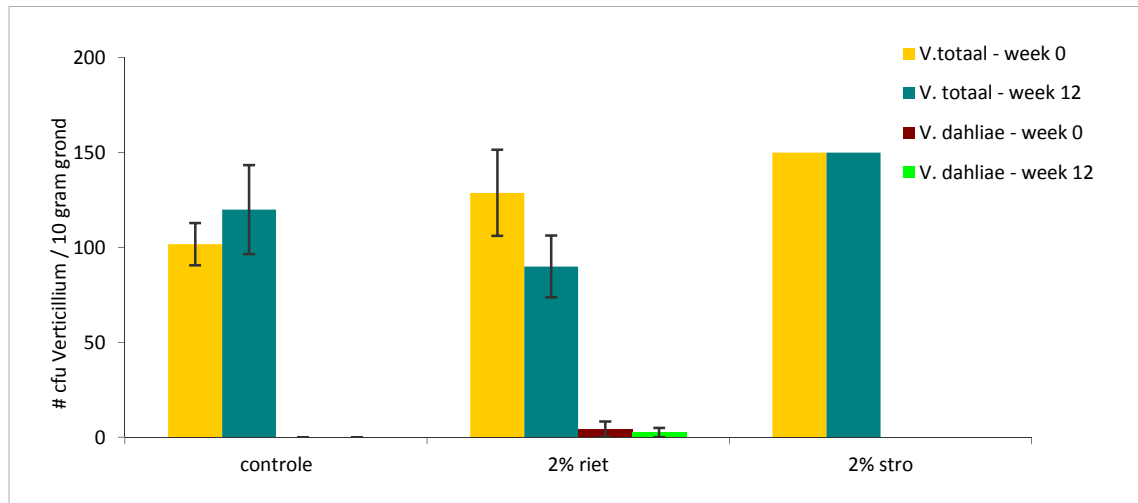
In de praktijkproef zijn de bodemparameters alleen gemeten in de uitgangssituatie, voorafgaand aan het onderwerken van riet of tarwestro. De bodem op de praktijklocatie heeft een pH van 7.2, een lutumgehalte van 10% en 4.7% CaCO<sub>3</sub>. Het gehalte beschikbaar mangaan ligt onder de detectiegrens (<250 µg/kg). In de uitgangssituatie is het organische stofgehalte in de controle veldjes iets hoger (4.8% OS) dan in de veldjes waar riet ondergewerkt zal worden (4.5% OS).

### 4.4.2 Onderdrukking van *Verticillium*

Bij het beoordelen van de praktijkproef moeten we meenemen dat er na 3 weken paprika geplant is in de veldjes. De lignine-rijke gewasresten hebben dus 3 weken lang zonder waardplant effect op *Verticillium* kunnen hebben. Daarna heeft het effect nog 9 weken kunnen doorwerken tot aan het einde van de veldproef, terwijl er een waardplant op de veldjes stond.

**Resultaat uitplaten *Verticillium* praktijkproef** De totale hoeveelheid *Verticillium* in de grond, is in de praktijkproef ongeveer twee keer zo groot als in de potproef. In de veldjes waar riet ondergewerkt gaat worden, is de hoeveelheid aan het begin van de proef 129 ms/10 g grond, in de controle veldjes 102 ms/10 g grond. Na een periode van 12 weken zijn er in de controle veldjes gemiddeld 120 ms/10 g grond, en in de veldjes met riet 90 ms/10 g grond. Deze verschillen zijn echter *niet significant*. Van deze totale hoeveelheid bestaat maar een zeer klein gedeelte uit *V. dahliae*. In de controle veldjes is bij uitplaten geen *V. dahliae* aangetroffen, in de veldjes waar riet is

ondergewerkt is aan het begin van de proef 4.2 ms/10 g grond aangetroffen, en aan het eind van de proef 2.5 ms/10 g grond. Het grootste gedeelte van de gevonden *Verticillium* bestaat uit *V. tricorpus*. Omdat er maar één veldje met stro in de proef lag, kunnen we deze resultaten niet vergelijken met de controle of de veldjes met riet.



Figuur 4-5: Totale hoeveelheid *Verticillium*, en hoeveelheid *V. dahliae* in de grond na toevoeging van ligninehoudende materialen in praktijkproef (60 ton/ha). De hoeveelheid *Verticillium* is weergegeven in aantallen kolonie-vormende eenheden (CFU's) per 10 g grond, en gemeten aan het begin van de proef en na 12 weken. Na 3 weken is er op de betreffende veldjes paprika geplant.

**Resultaat PCR analyse praktijkproef** Ook uit de PCR analyse blijkt dat in de praktijkveldjes aan het begin van de proef maar weinig *V. dahliae* aanwezig is: gemiddeld 17 fg DNA/g grond in de controle en 101 fg DNA/g grond in de veldjes waar 2% riet ondergewerkt zal worden. In februari is er in de controle geen *V. dahliae* meer detecteerbaar, en in de veldjes met riet zit dan gemiddeld nog 14 fg DNA/g grond. Aan het einde van de proef in maart is er in geen enkel veldje meer *V. dahliae* detecteerbaar.

In de PCR analyse van *V. tricorpus* zien we wel significante verschillen tussen de tijdstippen (zie Tabel 4-6): in maart is er significant minder *V. tricorpus* aanwezig dan in december en februari. Dit geldt zowel voor de controle als voor de behandeling met 2% riet. In beide gevallen daalt de hoeveelheid *Verticillium tricorpus*. De behandeling met stro is niet meegenomen in de analyse omdat deze zonder herhaling in de praktijkproef heeft gelegen.

Tabel 4-6: Verloop van de hoeveelheid *Verticillium dahliae* en *Verticillium tricorpus*, gemeten met real-time PCR analyse, in femtogram ( $10^{-15}$ ) DNA/gram grond. De aantallen zijn bepaald na 0,8 en 12 weken. De controle en 2% riet behandeling is in 4 herhalingen gemeten, de 2% stro in enkelvoud. Tussen haakjes staat de standaardfout van het gemiddelde (SEM).

|          | V.dahliae (fg DNA/g grond) |           |        | V.tricorpus (fg DNA/g grond) |            |           |
|----------|----------------------------|-----------|--------|------------------------------|------------|-----------|
|          | T=0                        | T=8wk     | T=12wk | T=0                          | T=8wk      | T=12wk    |
| controle | 17(±13.2)                  | <4        | <4     | 734(±304)                    | 1777(±704) | 376(±222) |
| 2% riet  | 101(±85.8)                 | 14(±10.4) | <4     | 627(±135)                    | 521(±167)  | 331(±121) |
| 2% stro  | <4                         | n.d.      | <4     | 1100                         | n.d.       | 185       |

#### 4.4.3 Identificatie van *Verticillium* soorten

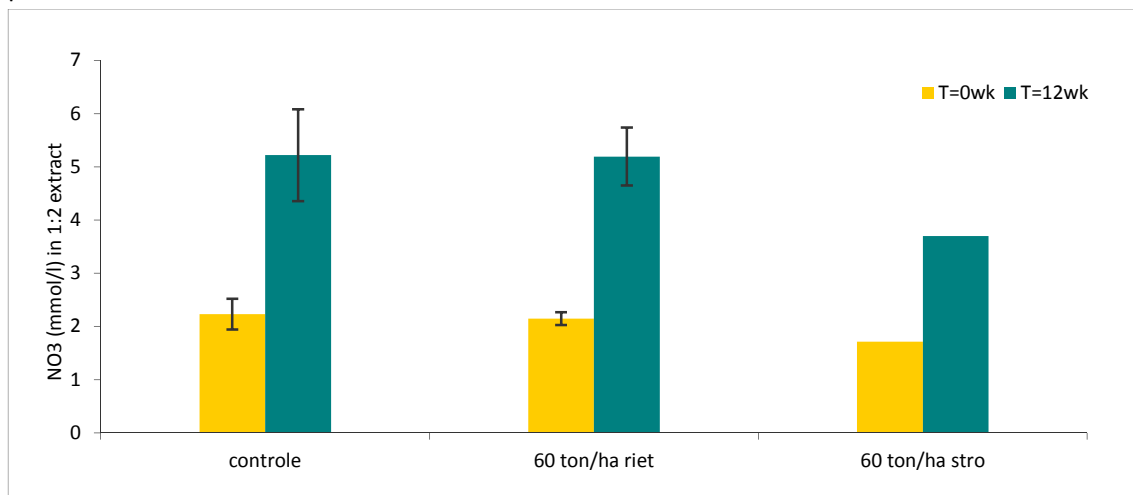
Door middel van sequencing is bepaald om welke soorten *Verticillium* het in de praktijkproef gaat. Uit de grond (nulmeting) van de nieuwe locatie KW6 is *Verticillium isaacii* geïsoleerd, naast *Verticillium dahliae*. *Verticillium tricorpus* is op deze locatie niet gevonden. Hoewel op deze locatie

in het jaar voorafgaand aan de praktijkproef een zeer zware aantasting in tomaat is geconstateerd, is de daaropvolgende paprikateelt vrijgebleven van *Verticillium* aantasting.

Van de oude locatie KW5 zijn in het voorjaar aangetaste onderstammen uit het achterste gedeelte van de kas geanalyseerd op *Verticillium* soorten. Hierbij werd uit aubergine (onderstam Mao) *Verticillium dahliae* geïsoleerd. Het aangetaste plantmateriaal van puntpaprika (onderstam Snooker) kon niet geanalyseerd worden, door te sterke contaminatie met bacteriën.

#### 4.4.4 Nitraatgehaltenes in de bodem

In de praktijkproef werd op 16 december gestart met nitraatgehaltenes in de bodem tussen 1.7 en 2.2 mmol/liter (Figuur 4-6). Het verhakselde riet en tarwestro werd tegelijk met de voorraadbemesting ingewerkt. De toevoeging van riet heeft niet tot immobilisatie van stikstof geleid: 12 weken na onderwerken van het materiaal zijn de gehaltenes in de bodem gelijk aan die van de controle (5.2 mmol/liter). Het verschil tussen de tijdstippen is wel significant, het verschil tussen wel of geen toevoeging van riet niet. Bij toevoeging van stro lijkt immobilisatie op te treden: het nitraatgehalte in maart is iets lager (3.7 mmol/liter). De variant met stro ligt echter zonder herhalingen in de proef.



Figuur 4-6: Nitraatgehaltenes in de bodem in praktijkproef met toevoeging van ligninerijke gewasresten van riet en tarwestro, aan het begin van de proef en na 12 weken. Foutbalken geven de standaardfout van het gemiddelde (SEM) weer. De behandeling met stro is zonder herhalingen uitgevoerd.

## 5 Discussie

### 5.1 Effect van lignine-rijke gewasresten

Het onderzoek naar het effect van lignine-rijke gewasresten op *Verticillium* is opgeschaald vanaf labniveau, naar een potproef en naar praktijkniveau. Om de resultaten te beoordelen zijn de verschillende hoeveelheden materiaal en incubatietijden van de 3 proeven naast elkaar weergegeven (Tabel 5-1). Tijdens de labtest zijn geen real-time PCR analyses uitgevoerd, wel in de potproef en praktijkproef.

Tabel 5-1: Proefopzet in 3 experimenten met lignine-houdende gewasresten.

|               | aantal grondsoorten | aantal soorten gewasresten | hoeveelheid materiaal |   | aantal grondsoorten |
|---------------|---------------------|----------------------------|-----------------------|---|---------------------|
| labtest       | 2                   | 7                          | 10%                   | 4 weken                                   | 5                   |
| potproef      | 1                   | 2                          | 1,2 en 10%            | 12 weken                                  | 4                   |
| praktijkproef | 1                   | 2                          | 2%                    | 12 weken (de eerste 3 weken zonder gewas) | 4                   |

De labtest is een korte test (4 weken), waarbij een relatief grote hoeveelheid organisch materiaal (10% m/m) door de grond is gemengd. Vanwege de kleine omvang van de proef, is het materiaal heel fijn verdeeld door de bodem. De effectiviteit van de behandeling in de labtest is groot (66-69% afname van levensvatbare micro-sclerotiën). Voor locatie Tinte zien we ook een sterk verband tussen de hoeveelheid toegediend lignine (ADL) en het totaal aantal levensvatbare *Verticillium* micro-sclerotiën aan het einde van de proef. De gebruikte grond is relatief zwaar geïnfecteerd (16% *V.dahliae* en 84% *V. tricorpus*). *V.tricorpus* zou naar verwachting ook als saprofiet op dood organisch materiaal kunnen groeien. De sterke afname in levensvatbaarheid tijdens de labtest, kan er op wijzen dat ook de micro-sclerotiën van *V.tricorpus* gevoelig zijn voor de afbraakprocessen die door het lignine-rijke materiaal in gang worden gezet.

De resultaten van de labtest hebben we niet kunnen bevestigen met de potproef en praktijkproef. Het materiaal in de potproef en praktijkproef is minder fijn gemaakt, en er is in de praktijkproef ook met lagere concentraties gewerkt. De labproef is uitgevoerd bij een constante temperatuur van 23°C, gedurende 4 weken. De potproef en praktijkproef hebben de eerste 3 weken bij 10°C gestaan, waarna nog 9 weken bij ruim 20°C. In de praktijkproef zijn naast de riet/stro behandeling ook nog houtsnippers ondergewerkt (ook in de controle). Vanaf week 3 heeft er in de praktijkproef ook een vatbaar gewas op het veld gestaan. Deze factoren kunnen het effect van de potproef en praktijkproef verkleind hebben. Daarnaast zijn er in de potproef minder herhalingen toegepast. De potproef en praktijkproef zijn in eerste instantie gericht op het terugdringen van de hoeveelheid *V.dahliae* in de grond. De gemeten hoeveelheden in de real-time PCR liggen echter in de meeste monsters beneden de detectielimiet.

**Relatie uitplaten en PCR** We vinden in onze experimenten geen (lineair) verband tussen de hoeveelheid *Verticillium tricorpus* die we aantreffen bij uitplaten, en in de PCR analyses. Dit kan verschillende oorzaken hebben:

- Microsclerotiën kunnen van grootte verschillen: ze kunnen uit één cel bestaan of uit klompjes cellen. Dit betekent dat de hoeveelheid DNA die in een scleroot voorkomt niet constant is.

Terwijl bij uitplaten 1 (levensvatbare) microscleroot in principe 1 kolonie geeft, hoeft de hoeveelheid DNA per microscleroot niet constant te zijn.

- Door het toevoegen van lignine wordt de levensvatbaarheid van de microscleroten aangetast. Ze hebben dan niet meer het vermogen om te kiemen (en dus een kolonie te vormen bij het uitplaten). Een real-time PCR analyse zou mogelijk wel nog DNA kunnen aantonen, ook al is de microscleroot niet meer levensvatbaar. Bij verschillende behandelingen met lignine zou dit de vergelijkbaarheid van de resultaten kunnen verslechteren.
- Er zou sprake kunnen zijn van verschillende soorten *Verticillium*, binnen de groep die we nu met PCR en uitplaten classificeren als *V. tricorpus*. De gemiddelde grootte van de scleroten zou per groep kunnen verschillen. Dit zou een vergelijking van de methodes moeilijker maken, omdat bijv. *V. isaacii* en *V. tricorpus* andere verhoudingen in uitplaten en PCR zouden kunnen geven.

## 5.2 Pathogeniciteit van *Verticillium* soorten

Hoewel de aantallen *V. dahliae* die we in de grond vinden erg laag zijn (zowel bij uitplaten als bij DNA analyse), zijn er op het betreffende bedrijf grote problemen geweest met *Verticillium* het voorafgaande jaar. In principe kan een kleine hoeveelheid *V. dahliae* al een grote aantasting geven: exacte schadedrempels zijn voor vruchtgroenten niet bekend. Het NAK hanteert voor aardbei een schadedrempel van < 3 microsclerotiën / 10 g grond waarbij de grond niet besmet zou zijn, en tussen 3-10 ms / 10 g grond is de grond licht besmet. In de praktijkproef varieerde het aantal microsclerotia van *V. dahliae* tussen 0 en 4.2 ms/10 gram grond.

In tegenstelling tot de kleine hoeveelheid *V. dahliae*, is er een veel grotere hoeveelheid *V. tricorpus* in de gronden aanwezig. De aanwezigheid van *V. tricorpus* is in verband gebracht met een verlaging van de *Verticillium* aantasting van aardappel in de VS en bloemkool in België (Davis et al., 2000; França et al., niet gepubliceerde data). Er zijn aanwijzingen dat *V. tricorpus* planten kan koloniseren als endofiet, en ze kan beschermen tegen de pathogene *Verticillium* soorten (Davis et al., 2000; Robinson et al., 2007; Qin et al., 2008). Anderzijds bestaat er ook literatuur over pathogene varianten van *V. tricorpus* op sla, paprika en tomaat. Mogelijk is er een verklaring voor deze tegenstrijdigheid. Wat in voorgaande studies *V. tricorpus* is genoemd, bestaat uit een mengsel van verschillende soorten, zoals voorgesteld door Inderbitzin et al., 2011. Uit een *V. tricorpus* kolonie uit de grond van de nieuwe locatie KW6 is een *Verticillium* isolaat verkregen. Het DNA van het isolaat is geëxtraheerd en gesequenced. De sequentie is vergeleken met de referentie sequenties van Inderbitzin et al. (2011), en het resultaat wijst erop dat het isolaat gereclassificeerd zou worden als *Verticillium isaacii*. *Verticillium isaacii* is geïsoleerd uit grond van tomatenteelten in Canada, maar de pathogeniciteit op tomaat is niet bekend. Tot nu toe is *V. isaacii* alleen getest in sla en artisjok. In deze gewassen was deze soort niet pathogeen (Qin et al., 2008).

Hoewel op deze locatie in het jaar voorafgaande aan de praktijkproef een zeer zware aantasting in tomaat is geconstateerd, is de daaropvolgende paprikateelt vrijgebleven van *Verticillium* aantasting. Interessant is dat de hoeveelheid *V. tricorpus* in deze veldjes hierbij nog steeds hoog was.

Resistentie tegen *Verticillium dahliae* is bekend in tomaat, maar niet in paprika. In paprika is alleen tolerantie beschreven. De gebruikte onderstammen van tomaat (in het jaar voorafgaand aan de praktijkproef) en paprika (in het jaar van de praktijkproef) zijn respectievelijk resistent en tolerant

tegen *Verticillium dahliae* (Tabel 5-2). De onderstam Emperador wordt verondersteld resistent te zijn tegen *Verticillium dahliae*, omdat deze het Ve-resistentie gen bevat. Dit gen geeft echter resistentie tegen *V. dahliae* ras 1, maar niet tegen *V. dahliae* ras 2. Aangezien ras 1 veel agressiever is dan ras 2 (De Jonge et al, 2012), bevatten de meeste commerciële tomatencultivars op dit moment het Ve gen. Hierbij moet opgemerkt worden dat dit gen de ziekte beperkt in planten die geïnfecteerd zijn met *V. dahliae* ras 1, maar dat het niet volledig de symptomen onderdrukt (Robb et al., 2007).

Tabel 5-2: Resistentie en tolerantie van de in de praktijkproef gebruikte cultivars/onderstammen van tomaat en paprika tegen *Verticillium dahliae*. Ma: *Meloidogyne arenaria*; Mi: *M. incognita*; Mj: *M. javanica*; Mh: *M. hapla*; Pl: Kurkwortel; Fol: Amerikaanse vaatziekte; For: *Fusarium* voet- en wortelrot.

| Gewas   | Onderstam              | Resistentie/tolerantie   | Referentie                     |
|---------|------------------------|--|--------------------------------|
| Tomaat  | Emperador (Rijk Zwaan) | Hoog resistent:<br>Va:0 <i>Verticillium albo-atrum</i><br>Vd:0 <i>Verticillium dahliae</i><br>Pl: <i>Pyrenochaeta lycopersici</i><br>Fol:0,1 <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i><br>For: <i>Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici</i><br>Intermediair resistent:<br>Nematoden: Ma, Mi, Mj | Rijk Zwaan, 2015               |
| Paprika | Snooker (Syngenta)     | Intermediair resistent:<br>Nematoden: Mj, Mh, Ma, (volgens Labrie, 2008 niet resistent tegen Mi)<br>Pc: <i>Phytophthora capsici</i><br>Tolerant:<br>Pl: <i>Pyrenochaeta lycopersici</i><br>Vd: <i>Verticillium dahliae</i>   | Labrie, 2008<br>Syngenta, 2014 |





## 6 Conclusie en aanbevelingen voor verder onderzoek

Het onderwerpen van lignine-rijke materialen is een interessante mogelijkheid om de bodemweerbaarheid tegen *Verticillium* te vergroten. De labstudie laat het potentieel zien van verschillende lignine-houdende materialen, maar in de beperkte setting van veldonderzoek hebben we deze resultaten niet kunnen herhalen. Uit deze studie blijkt ook dat er meer informatie nodig is over de verschillende *Verticillium* soorten voordat toekomstig onderzoek over het onderwerp wordt opgezet. Een interessante resultaat uit de huidige studie is dat er meerdere *Verticillium* soorten aanwezig zijn in de (grondgebonden) tomaten- en paprikateelt. In de bodem van deze glastuinbouwbedrijven zijn onverwacht hoge hoeveelheden *Verticillium tricorpus* aangetroffen. DNA analyse laat zien dat het hier waarschijnlijk gaat om de nieuw onderscheiden soort *Verticillium isaacii*. De rol van *V. dahliae* en *V. tricorpus (V. isaacii)* bij de aantasting door, en mogelijk bescherming tegen *Verticillium* verwelkingsziekte in paprika en tomaat moet verder onderzocht worden. Daarbij speelt ook het type *Verticillium* ras dat aanwezig is op de bedrijven een rol. Daarnaast is het nodig om de interacties van de verschillende *Verticillium* soorten met verschillende cultivars en combinaties onderstam-cultivar te onderzoeken, met verschillende niveaus van tolerantie/gevoeligheid. Zonder een goed begrip van de verschillende interacties tussen *Verticillium* soorten en waardplant, is het niet mogelijk een goede strategie te ontwikkelen om het bodemleven te sturen. In het praktijkonderzoek is het vanwege de gemengde aaltjes-*Verticillium* problematiek ook nodig om ook de mogelijke interacties tussen nematoden en *Verticillium* mee te nemen. Daarnaast is het voor vervolgonderzoek naar lignine-houdende materialen ook belangrijk om de focus te richten op materialen die makkelijk verkrijgbaar, weinig volumineus en makkelijk in te werken zijn.



## Literatuur

- Beneden, S. van (2009). **Basal rot in Belgian lettuce greenhouses: causal agents and development of sustainable control measures**. PhD Thesis, Universiteit Gent, Gent, 198 pp.
- Beneden, S. van, D. Roobroeck, S.C. França, S. de Neve, P. Boeckx en M. Höfte (2010). **Microbial populations involved in the suppression of *Rhizoctonia solani* AG1-1B by lignin incorporation in soil**. *Soil Biology and Biochemistry* 42, pp. 1268-1274.
- Bollen, G.J., O. Hoekstra, K. Scholte, T.W. Hofman, M.J. Celetti en A. Schirring (1989). **Incidence of soilborne pathogens in potato related to the frequency of potato growing on a clay loam**. In: J. Vos, C.D. van Loon en G.J. Bollen (eds.) *Effects of crop rotation on potato production in the temperate zones*. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht, pp. 203-222.
- Butler, M.J. en A.W. Day (1998a). **Fungal melanins: a review**. *Canadian Journal of Microbiology* 44, pp. 1115-1136.
- Butler, M.J. en A.W. Day (1998b). **Destruction of Fungal Melanins by Ligninases of *Phanerochaete chrysosporium* and Other White Rot Fungi**. *International Journal of Plant Sciences* 159(6), pp. 989-995.
- Cuijpers, W., L. Janmaat en G. van der Burgt (2008). **Bodemgezondheid in de biologische kasteelt. Deel 2: ziekteverendheid tegen bodemgebonden schimmels**. Louis Bolk Instituut, Driebergen, 52 p.
- Cullen, D. (1997). **Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi**. *Journal of Biotechnology* 53, pp. 273-289.
- Davis, J.R., D.O. Everson, L.H. Sorensen en A.T. Schneider (2000). **Associations of *Verticillium tricorpus* with soil suppressiveness of *Verticillium* wilt of potato**. In: Tjamos, E.C., R.C. Rowe, J.B. Heale and D.R. Fravel (Eds.). *Advances in *Verticillium* research and disease management*. Saint Paul, APS press, pp. 347-351.
- Debode, J. en K. van Poucke, S.C. França, M. Maes, M. Höfte en K. Heungens (2011). **Detection of Multiple *Verticillium* Species in Soil Using Density Flotation and Real-Time Polymerase Chain Reaction**. *Plant Disease* 95(12), pp. 1571-1580.
- Debode, J., K. Spiessens, L. de Rooster and M. Höfte (2002). ***Verticillium* wilt of Cauliflower in Belgium**. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent* 67/2, pp. 241-249.
- Debode, J., E. Clewes, G. de Backer and M. Höfte (2005). **Lignin is involved in the reduction of *Verticillium dahliae* var. *longisporum* inoculum in soil by crop residue incorporation**. *Soil Biology and Biochemistry* 37, pp. 301-309.
- De Jonge, R., van Esse, H.P., Maruthachalam, K., Bolton, M.D., Santhanam, P., Saber, M.K., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K.V., Thomma B.P.H.J. (2012). **Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing**. *PNAS* 109: 5110-5115.
- Hammel, K.E. (1997). **Fungal Degradation of Lignin**. In: *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*. G. Cadisch en K.E. Giller (eds.), pp. 33-45.
- Harris, DC, Yang, JR, Ridout MS (1993). **The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil**. *Plant Pathology* 42:238-250.
- Hatfield, R.D., H.G. Jung, J. Ralph, D.R. Buxton en P.J. Weimer (1994). **A Comparison of the Insoluble Residues Produced by the Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Procedures**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, pp. 51-58.
- Inderbitzin, P., R.M. Bostock, R.M. Davis, T. Usami, H.W. Platt en K.V. Subbarao (2011). **Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Description of Five New Species**. *PLoS ONE* 6(12): e28341. doi:10.1371/journal.pone.0028341, pp. 1-22.
- Jabnoun-Khiareddine, H., M. Daami-Remadi en M. el Mahjoub (2005). **Emergence in Tunisia of new pathotypes of *Verticillium tricorpus* able to attack tomato, aubergine and potato**. *Bulletin EOPP/OEPP* 35, pp. 497-503.
- Jabnoun-Khiareddine, H., M. Daami-REmadi, K. Hibar, F. Ayed en M. El Mahjoub (2006). **Pathogenicity of Tunesian Isolates of Three *Verticillium* Species on Tomato and Eggplant**. *Plant Pathology Journal* 5(2), pp. 199-207.
- Jung, H.G., D.R. Mertens en A..J. Payne (1997). **Correlation of Acid Detergent Lignin and Klason Lignin with Digestibility of Forage Dry Matter and Neutral Detergent Fiber**. *Journal of Dairy Science* 80, pp. 1622-1628.
- Labrie C. (2008). **Onderstammen voor de biologische teelt van vruchtgroenten**. Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk.

- Lecluyse, C. (2008). **Interactie tussen *Verticillium tricorpus* en *Verticillium longisporum* bij bloemkool**. Eindwerk Hogeschool West-Vlaanderen, Brugge/Kortrijk, 95 pp.
- Neve, S. de en G. Hofman (1996). **Modelling N mineralization of vegetable crop residues during laboratory incubations**. *Soil Biology and Biochemistry* 10/11, pp. 1451-1457.
- Qin, Q. G.E. Vallad en K.V. Subbarao (2008). **Characterization of *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus* isolates from lettuce and artichoke**. *Plant Disease* 92, pp. 69-77.
- Rahn, C.R. en R.D. Lillywhite (2001). **A study of the quality factors affecting the short-term decomposition of field vegetable residues**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, pp. 19-26.
- Rahn, C.R., G.D. Bending, R.D. Lillywhite en M.K. Turner (1999). **Chemical characterisation of vegetable and arable crop residue materials: a comparison of methods**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, pp. 1715-1721.
- Rijk Zwaan (2015). **Biologische catalogus 2015-2016**. Brochure, 43 pp. [www.rijkszwaan.nl](http://www.rijkszwaan.nl)
- Robb J, Lee B, Nazar RN (2007). **Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction**. *Planta* 226:299-309.
- Robinson N, Platt HW, Hale LR (2007). **Interactions of various *Verticillium* species in combination with *V. albo-atrum* on *Verticillium* wilt disease development in potato**. *American Journal of Potato Research* 84:133-141.
- Sariyildiz, T. en J.M. Anderson (2003). **Interaction between litter quality, decomposition and soil fertility: a laboratory study**. *Soil Biology & Biochemistry* 35, pp. 391-399.
- Soesanto, L. (2000). **Ecology and biological control of *Verticillium dahliae***. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, 120 pp.
- Syngenta (2014). **Paprika Benelux 2014-2015**. Brochure, 17 pp. [www3.syngenta.com](http://www3.syngenta.com)
- Taylor, B.R., D. Parkinson en W.F.J. Parsons (1989). **Nitrogen and Lignin Content as Predictors of Litter Decay Rates: A Microcosm Test**. *Ecology* 70(1), pp. 97-104.
- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka en M. Itävaara (2000). **Biodegradation of lignin in a compost environment**. *Bioresource Technology* 72, pp. 169-183.
- Ververis, C. K. Georghiou, N. Christodoulakis, P. Santas en R. Santas (2004). **Fiber dimensions, lignin and cellulose content of various plant materials and their suitability for paper production**. *Industrial Crops and Products* 19, pp. 245-254.

## Bijlage 1 Lignine-gehaltes gewasresten

Lignine-gehaltes (Acid Detergent Lignin en analysemethodes gebaseerd op Klason lignine) van verschillende gewasresten en plantensoorten. \*\* = niet aangegeven in literatuur, waarschijnlijk percentage van vers. Referenties: (1) Rahn et al., 1999; (2) De Neve en Hofman, 1996; (3) Rahn en Lillywhite, 2001; (4) Jung et al., 1997; (5) Hatfield et al., 1994; (6) Ververis et al., 2004; (7) Stubbs et al., 2009; (8) Taylor et al., 1989; (9) Sariyildiz en Anderson, 2003

| Gewasresten           |  | Gedeelte van plant | Acid Detergent Lignin (ADL) % van ds | Klason lignine % van ds | Ref. |
|-----------------------|--|--------------------|--------------------------------------|-------------------------|------|
| <b>Akker/tuinbouw</b> |  |                    |                                      |                         |      |
| Aardappel             | <i>Solanum tuberosum</i>                               | gewasresten        |                                      | 17.7-22.0               | (1)  |
| Andijvie              | <i>Cichorium endivia</i>                               | blad               | 6                                    |                         | (2)  |
| Bloemkool             | <i>Brassica oleracea var botrytis</i>                  | gewasresten        |                                      | 15.0-16.9               | (1)  |
| Broccoli              | <i>Brassica oleracea var italica</i>                   | blad               | 10,9                                 |                         | (2)  |
| Broccoli              | <i>Brassica oleracea var italica</i>                   | bovenkant stengel  | 14,7                                 |                         | (2)  |
| Broccoli              | <i>Brassica oleracea var italica</i>                   | gewasresten        |                                      | 14.3                    | (3)  |
| Broccoli              | <i>Brassica oleracea var italica</i>                   | onderkant stengel  | 26,8                                 |                         | (2)  |
| Koolzaad              | <i>Brassica napus</i>                                  | gewasresten        |                                      | 11.8                    | (3)  |
| Peen                  | <i>Daucus carota</i>                                   | gewasresten        |                                      | 15.0                    | (3)  |
| Prei                  | <i>Allium porrum</i>                                   | gewasresten        |                                      | 12.1                    | (3)  |
| Rode biet             | <i>Beta vulgaris subsp vulgaris var conditiva</i>      | gewasresten        |                                      | 15.8                    | (3)  |
| Rode biet             | <i>Beta vulgaris</i>                                   | gewasresten        |                                      | 12.3-14.5               | (1)  |
| Rodekool              | <i>Brassica oleracea convar. capitata var. Rubra</i>   | blad               | 10,2                                 |                         | (2)  |
| Savooiekool           | <i>Brassica oleracea convar. capitata var. Sabauda</i> | blad               | 10,7                                 |                         | (2)  |
| Selderij              | <i>Apium graveolens</i>                                | blad               | 11,9                                 |                         |      |
| Sla                   | <i>Lactuca sativa</i>                                  | blad               | 5,2                                  |                         | (2)  |
| Sla                   | <i>Lactuca sativa</i>                                  | gewasresten        |                                      | 13.7                    | (3)  |
| Sla                   | <i>Lactuca sativa</i>                                  | stengel            | 9,6                                  |                         | (2)  |
| Sluitkool             | <i>Brassica oleracea var capitata</i>                  | gewasresten        |                                      | 11.1                    | (3)  |
| Spruitkool            | <i>Brasica oleracea var gemmifera</i>                  | gewasresten        |                                      | 14.1-15.4               | (1)  |
| Spruitkool            | <i>Brasica oleracea var gemmifera</i>                  | gewasresten        |                                      | 10.3                    | (3)  |
| Suikerbiet            | <i>Beta vulgaris subsp vulgaris</i>                    | gewasresten        |                                      | 16.6                    | (3)  |
| Boon                  | *  | blad               | 10,7                                 |                         | (2)  |
| Tuinboon              | <i>Vicia faba</i>                                      | gewasresten        |                                      | 16.1                    | (3)  |
| Boon                  | *  | stengel            | 25,6                                 |                         | (2)  |
| Ui                    | <i>Allium cepa</i>                                     | gewasresten        |                                      | 13.3                    | (3)  |
| Venkel                | <i>Foeniculum vulgare</i>                              | blad               | 12,1                                 |                         | (2)  |
| <b>Grassen/granen</b> |  |                    |                                      |                         |      |
| Engels raaigras       | <i>Lolium perenne</i>                                  |                    | 2.8-3.4                              | 8.4-11.7                | (4)  |
| Gerst                 | <i>Hordeum vulgare</i>                                 |                    | 2.1-2.8                              | 6.6-8.7                 | (4)  |
| Haver                 | <i>Avena sativa</i>                                    |                    | 2.9-4.1                              | 9.5-10.7                | (4)  |
| Kropaar               | <i>Dactylis glomerata</i>                              |                    | 2.7-3.9                              | 11.6-12.5               | (4)  |
| Kropaar               | <i>Dactylis glomerata</i>                              | blad               | 2.7                                  | 4.1                     | (5)  |
| Kropaar               | <i>Dactylis glomerata</i>                              | stengel            | 1.5-4.5                              | 5.8-13.2                | (5)  |
| Kweekdrav             | <i>Bromus inermis</i>                                  |                    | 5.9-6.1                              | 12.0-12.8               | (4)  |
| Parelgierst           | <i>Pennisetum glaucum</i>                              |                    | 2.7-3.1                              | 8.4-9.1                 | (4)  |

| Gewasresten               |   | Gedeelte van plant | Acid Detergent Lignin (ADL) % van ds | Klason lignine % van ds | Ref. |
|---------------------------|---|--------------------|--------------------------------------|-------------------------|------|
| Pijlriet                  | <i>Arundo donax</i>                         | stengelknopen      |                                      | 17.1-19.7**             | (6)  |
| Pijlriet                  | <i>Arundo donax</i>                         | stengelleden       |                                      | 16.0-20.5**             | (6)  |
| Prachtriet                | <i>Miscanthus x giganteus</i>               | stengel            |                                      | 26.7-28.5**             | (6)  |
| Rietgras                  | <i>Phalaris arundinacea</i>                 |                    | 1.6-2.2                              | 9.6-10.1                | (4)  |
| Rietzwenkgras             | <i>Festuca arundinacea</i>                  |                    | 1.7-2.5                              | 6.4-8.4                 | (4)  |
| Tarwe                     | <i>Triticum aestivum</i>                    | gewasresten        |                                      | 24.3-25.9               | (1)  |
| Tarwe                     | <i>Triticum vulgare</i>                     | gewasresten        |                                      | 18.0                    | (3)  |
| Timoteegras               | <i>Phleum pratense</i>                      |                    | 3.3-4.8                              | 9.6-10.1                | (4)  |
| Vingergras                | <i>Panicum virgatum</i>                     |                    |                                      | >30**                   | (6)  |
| Vingergras                | <i>Panicum virgatum</i>                     | stengel            | 5.4-7.5                              | 12.7-14.5               | (5)  |
| Wintertarwe               | <i>Triticum aestivum</i>                    | stro               | 8.7-9.8**                            | n.d.                    | (7)  |
| Zomergerst                | <i>Hordeum vulgare</i>                      | stro               | 9.3-10.6**                           | n.d.                    | (7)  |
| Zomertarwe                | <i>Triticum aestivum</i>                    | stro               | 8.8-10.2**                           | n.d.                    | (7)  |
| <b>Vlinderbloemigen</b>   |   |                    |                                      |                         |      |
| Gewone rolklaver          | <i>Lotus corniculatus var. Corniculatus</i> |                    | 8.8-9.4                              | 12.2-14.3               | (4)  |
| Luzerne                   | <i>Medicago sativa</i>                      |                    | 7.7-9.4                              | 10.4-13.5               | (4)  |
| Luzerne                   | <i>Medicago sativa</i>                      | blad               | 2.9                                  | 3.2                     | (5)  |
| Luzerne                   | <i>Medicago sativa</i>                      | stengel            | 8.2-11.7                             | 11.0-15.2               | (5)  |
| Rode klaver               | <i>Trifolium pratense</i>                   |                    | 6.3-7.9                              | 13.4-13.7               | (4)  |
| Witte klaver              | <i>Trifolium repens</i>                     |                    | 4.9-5.2                              | 9.5-10.3                | (4)  |
| <b>Houtachtigen</b>       |   |                    |                                      |                         |      |
| Amerikaanse ratelpopulier | <i>Populus tremuloides</i>                  | blad               |                                      | 14.1**                  | (8)  |
| Balsem populier           | <i>Populus balsamifera</i>                  | blad               |                                      | 13.6**                  | (8)  |
| Beuk                      | <i>Fagus sylvatica</i>                      | blad               |                                      | 36.9-45.0**             | (9)  |
| Douglasspar               | <i>Pseudotsuga menziesii</i>                | naalden            |                                      | 20.5**                  | (8)  |
| Eik                       | <i>Quercus robur</i>                        | blad               |                                      | 26.3-40.2**             | (9)  |
| Witte spar                | <i>Picea glauca</i>                         | naalden            |                                      | 13.1**                  | (8)  |

## Bijlage 2 Nieuwe *Verticillium* soorten

De recente publicatie van genetisch onderzoek laat zien dat er naast de 5 bekende soorten *Verticillium* nog 5 nieuwe soorten bestaan (Inderbitzin et al., 2011). De 'bekende' soorten zijn:

- *Verticillium dahliae*;
- *Verticillium longisporum*;
- *Verticillium albo-atrum*;
- *Verticillium tricorpus*;
- *Verticillium nubilum*.

De 5 nieuwe soorten zijn:

- *Verticillium alfalfae*;
- *Verticillium nonalfalfae*;
- *Verticillium zaregamsianum*;
- *Verticillium klebahnii*;
- *Verticillium isaacii*.

**Verticillium dahliae** De *Verticillium* soort die bij biologische vruchtgroententelers in Nederland grootschalige uitval in het gewas kan veroorzaken, wordt meestal aangeduid als *Verticillium dahliae*. Al in lage concentraties kan de schimmel grote schade toebrengen aan het gewas. *V. dahliae* is een bodemgebonden pathogene schimmel, die in een groot scala gastheren uit 14 verschillende plantenfamilies verwelkingsziekte kan veroorzaken. Niet alleen planten uit de Nachschadefamilie (paprika, tomaat, aubergine, pepers en aardappels) zijn gevoelig, maar ook planten uit de Komkommerfamilie (komkommer, meloen), Vlinderbloemigenfamilie (lupine), Composieten (sla, artisjok, zonnebloem, chrysant), Kruisbloemigen (bloemkool), Vlasfamilie (vlas), Rozenfamilie (aardbei) en Ganzevoet-achtigen (spinazie). Ook onkruiden zoals de gewone melkdistel, herderstasje en kleverige nachtschade zijn gevoelig voor *Verticillium*. Eénzaadlobbigen (grassen en granen) zijn meestal niet gevoelig voor *Verticillium*, met uitzondering van gerst (Soesanto, 2000). *V. dahliae* heeft in de bodem zelf geen saprotrofisch stadium. Dit betekent dat de schimmel niet verder kan groeien op dood organisch materiaal (anders dan de dode gewasresten van de waardplant). Om te kiemen hebben de micro-sclerotiën wortellexudaten nodig: stofjes die uit de wortels van de gastheer worden uitgescheiden. Nadat de schimmel de wortel is binnengedrongen, worden conidiën (een vorm van sporen) gevormd, die met de sapstroom van de plant worden meegevoerd, totdat ze tegen een celwand aanbotsen. Daar kiemen ze en dringen door in het volgende vaatsegment van de plant. *Verticillium* scheidt pectinolytische enzymen uit, die de celwanden van de plant afbreken. De aangrenzende xyleemvaten van de plant raken verstopt met een soort gom-achtig materiaal. Daarnaast produceert *Verticillium* toxines die verwelking veroorzaken. Dit remt de ademhaling en fotosynthese van de plant. De symptomen starten met het verwelken van de laagste bladeren. Typisch is dat in eerste instantie maar het halve blad (of de ene helft van de stengel) verwelkingsverschijnselen vertoont. Vaak is het enige symptoom het vroegtijdig verouderen van de plant. Na het afsterven van de plant gaat de schimmel door met koloniseren van het dode plantmateriaal, waarna er massaal micro-sclerotiën (persistente klompjes schimmelsporen) worden gevormd. Als het dode plantmateriaal door de grond wordt gewerkt, worden de klompjes micro-sclerotiën in eerste instantie bij elkaar gehouden door het plantenweefsel, maar ze vallen uit elkaar als de plant wordt afgebroken. Volgens sommige

onderzoekers kunnen micro-sclerotiën wel 12-14 jaar in de bodem overleven. Het lastige van zulke observaties uit het veld is echter dat de schimmel ook niet-gevoelige waardplanten heeft, waarop ze wel micro-sclerotiën kunnen produceren, maar zonder dat de plant daar last van heeft. Waarschijnlijk kan maar een kleine fractie van de micro-sclerotiën werkelijk gedurende meerdere jaren in de bodem overleven. Bollen et al. (1989) ontdekten bijvoorbeeld dat wanneer er na aardappel 4 jaar lang werkelijk niet-waardplanten werden geteeld, *Verticillium* voldoende onderdrukt kon worden.

**Verticillium alfalfae en non-alfalfae** De eerste twee van de nieuwe soorten lijken morfologisch zo veel op *Verticillium albo-atrum*, dat het niet mogelijk is om consistent onderscheid tussen de 3 soorten te maken op basis van morfologie. De twee soorten zijn echter nauwer verwant met *V. dahliae*. Luzerne (*Medicago sativa*) is op dit moment de enige bekende waardplant van *Verticillium alfalfae*. *Verticillium nonalfalfae* komt niet voor op luzerne, maar wel op een aantal andere plantensoorten: o.a. aardappel, hop en spinazie.

**Verticillium tricorpus** De publicatie van genetisch onderzoek door Inderbitzin (2011) heeft de kennis die we hebben over *Verticillium tricorpus* op losse schroeven gezet. De schimmel die tot nu toe op basis van morfologische kenmerken '*Verticillium tricorpus*' werd genoemd, blijkt in werkelijkheid uit 3 verschillende soorten te bestaan: *V. tricorpus*, *Verticillium isaacii* en *Verticillium klebahnii*. Dit betekent dat oude informatie over de pathogeniteit van *V. tricorpus* voor tomaat of paprika, en de eventuele antagonistische werking van *V. tricorpus*, nu misschien gekoppeld moet worden aan 1 van de 3 soorten, die op basis van alléén de vorm niet van elkaar te onderscheiden zijn. Er is dus altijd genetisch onderzoek nodig om het onderscheid tussen deze 3 soorten te kunnen maken. De soort die nu gedefinieerd is als *V. tricorpus* is geïsoleerd uit aardappel, tomaat, ridderspoor en anjer.

**Verticillium isaacii** *Verticillium isaacii* is bij uitplaten (op basis van morfologische = vorm kenmerken) niet te onderscheiden van *V. tricorpus*. *Verticillium isaacii* is gevonden op sla en spinazie (USA), op tomaat (UK), en in de bodem (Canada). Dit laatste kan betekenen dat de schimmel ook saprotroof kan groeien (op dood organisch materiaal). Verder komt de schimmel voor op artisjok en nachtschade. Op sla en artisjok was de schimmel niet pathogeen. Het is vooralsnog onbekend of de schimmel pathogeen is voor de andere gewassen.

**Verticillium klebahnii** Ook *Verticillium klebahnii* is morfologisch niet te onderscheiden van *V. tricorpus* of *V. isaacii*. Tot nu toe is deze schimmel alleen in de USA gevonden op sla.

**Verticillium zaregamsianum** Morfologisch verschilt *Verticillium zaregamsianum* van alle andere *Verticillium* soorten door de vorming van microsclerotia, tegelijk met geel-gepigmenteerde hyphen. *V. tricorpus*, *V. isaacii* en *V. klebahnii* verschillen door de grote aantallen chlamydo-sporen die ze vormen. *V. zaregamsianum* is alleen in Japan gevonden op sla.

**Verticillium tricorpus als antagonist** In onderzoek naar het voorkomen van *Verticillium longisporum* in bloemkool in België, bleek dat in sommige streken *Verticillium* veel schade veroorzaakte in het gewas, terwijl in andere streken de schade erg beperkt bleef. In beide gebieden kwam *V. longisporum* in de grond voor. Opvallend was dat in het gebied waar de minste schade van *Verticillium* in de grond optrad, nog een andere *Verticillium* soort voorkwam, namelijk *V. tricorpus*. Mogelijk zorgt de aanwezigheid van *V. tricorpus* ervoor dat *V. longisporum* minder schade kan



veroorzaken aan het gewas. Davis et al. (2000) veronderstellen dat bodemweerbaarheid tegen *V. dahliae* in aardappel veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van *V. tricorpus*. Bij gelijktijdige inoculatie van sla met *V. dahliae* en *V. tricorpus* treden minder symptomen op van de ziekte dan bij inoculatie met alleen *V. dahliae*. Wanneer *V. tricorpus* een week eerder wordt geïnoculeerd dan *V. dahliae* zijn de symptomen nog minder sterk. Ook dit suggereert dat kolonisatie van de plant met *V. tricorpus* de plant beschermt tegen *V. dahliae*. (Lecluyse, 2008). Voor al deze onderzoeken geldt echter, dat het niet 100% zeker is dat het hier om *V. tricorpus* gaat. Er zou ook sprake kunnen zijn van *V. isaacii* of *V. klebahnii*.

**Verticillium tricorpus als pathogeen** *V. tricorpus* werd voor het eerst gedetailleerd beschreven door Isaac (1953). De soort was pathogeen op de destijds geteste tomaat cultivar. *V. tricorpus* werd tot vrij recent gezien als een zwakke pathogeen, die sporadisch ziekte kan veroorzaken. Het NAK maakt in analyses bijvoorbeeld geen aparte melding van de aanwezigheid van *V. tricorpus*, hoewel deze wel morfologisch worden onderscheiden in de geanalyseerde monsters (Ludeking, pers. med.). Recent onderzoek uit Tunesië laat echter zien dat *V. tricorpus* ook sterk pathogeen op tomaat en aubergine kan zijn (Jabnoun-Khiareddine et al., 2005; 2006).