

Fusarium in Bloembolgewassen: Detectiemethoden en vruchtwisselingsproblematiek

Suzanne Breeuwsma en Marjan de Boer

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
Juli 2004
PPO project 320689

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: 320689

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Bollen

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 - 462121

Fax : 0252 - 462100

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL & METHODEN EN RESULTATEN	9
2.1 Uitbreiding <i>Fusarium</i> Collectie.....	9
2.2 Veldpathogeniteitstoetsen	9
2.2.1 Narcis.....	9
2.2.2 Hyacint	11
2.3 Kastoets Amaryllis.....	12
2.4 Kasproef overleving <i>Fusarium</i>	14
3 DISCUSSIE EN CONCLUSIES	19
4 PRODUCTEN	21
BIJLAGE 1 VELDPATHOGENITEITSTOETS NARCIS	23
PROEFJAREN 2001 EN 2003.	23
BIJLAGE 2 VELDPATHOGENITEITSTOETS HYACINT.....	25
PROEFJAREN 2001 EN 2002.	25

Samenvatting

In dit verslag worden een tweetal veldpathogeniteitstoetsen met narcis en hyacint, een kastoets met amaryllis en een proef over de overleving van *Fusarium* isolaten op niet waardplant gewassen beschreven. In de veldpathogeniteitstoets narcis en hyacint worden de gewasspecifieke *Fusarium* isolaten getoetst op verschil in mate van pathogeniteit en op het soort ziekte symptoom dat ze kunnen veroorzaken. Uit beide veldproeven blijkt dat er een verschil is in mate van pathogeniteit binnen de gewasspecifieke isolaten. Ook is aangetoond dat isolaten die uit een bepaald soort ziektesymptoom zijn geïsoleerd weer andere ziektesymptomen kunnen induceren.

Bij de kaspathogeniteitstoets met amaryllis bollen is niet aangetoond welke *Fusarium* soorten bolrot kunnen veroorzaken.

Om inzicht te krijgen in overleving van *Fusarium* sporen i.v.m. vruchtwisselingen wordt in een kasproef de overleving op wortels, bol of in de grond onderzocht van pathogene *Fusarium* isolaten op niet waardplant bolgewassen. De overleving van *Fusarium* sporen van hyacint, narcis, krokus en tulp op het gewas krokus is het hoogst. Bij de gewassen hyacint, narcis en tulp is, m.u.v. de gewasspecifieke Fusaria de overleving van *Fusarium* sporen het laagst. Verder vindt er geen infectie plaats door de gewasspecifieke *Fusarium* soorten in de niet-specifieke gewassen.

1 Inleiding

Fusarium veroorzaakt bol- en knolrotziekten in vrijwel alle belangrijke bolgewassen. Deze bodemschimmel veroorzaakt in diverse bolgewassen economische schade. Er worden verschillende maatregelen getroffen (zoals chemische bestrijding) om de ziekte te beheersen maar deze werken niet afdoende. Een alternatief is het kweken van resistente bolgewassen. Om dit te bereiken is inzicht nodig in de verschillende *Fusarium* soorten die in de bolgewassen ziektes veroorzaken.

De afgelopen jaren is in het kader van een PT project (projectnummer 320361; Collectievorming en karakterisering van isolaten van *F. oxysporum* in *Liliaceae* en *Amaryllidaceae*) een grote collectie *Fusarium* isolaten opgebouwd die ziekte veroorzaken in diverse bolgewassen (gladiool, iris, krokus, tulp, lelie, hyacint, narcis, hippeastrum, nerine). Deze collectie is geïdentificeerd en gekarakteriseerd op basis van morfologische en genetische kenmerken (ITS-PCR). Om te onderzoeken of er tussen de isolaten onderling binnen een gewas verschillen aanwezig zijn werd er een VCG indeling en RAPD-PCR uitgevoerd. Om meer inzicht te krijgen in de ziektebeelden en de mate van aantasting zijn er diverse veldpathogeniteitstoetsen uitgevoerd voor de gewassen hyacint en narcis.

Uit dit voorgaand onderzoek is gebleken dat bij de gewassen hyacint, lelie en tulp maar één *Fusarium* soort voorkomt. Deze soorten zijn wel gewasspecifiek. Voor de resistentieveredeling houdt dit voor deze gewassen in dat er maar met één *Fusarium*isolaat getest hoeft te worden. Aangezien er wel verschillen in agressiviteit aanwezig zijn, zal er wel met het meest agressieve isolaat getest moeten worden. In narcis zijn de isolaten die bolrot of huidziek veroorzaken in 2 verschillende groepen ingedeeld. Bij de Amaryllis zijn verschillende *Fusarium*soorten gevonden. Voor deze beide gewassen geldt dat bij resistentietoetsing alle groepen en soorten getest moeten worden.

In hyacint werd op basis van morfologisch onderzoek aangenomen dat de ziektesymptomen zoals, krasbodem, bolrot en huidziek, werden veroorzaakt door *F. oxysporum f.sp. hyacinthi*. Uit morfologisch en moleculair genetisch onderzoek is gebleken dat niet *F. oxysporum* de ziekte veroorzaker is maar *F. hostae* (een nieuwe zustersoort van *F. redolens*). Met behulp van moleculaire technieken (AFLP, RAPD en ITS_PCR) en met de VCG toets is bepaald dat de isolaten uit hyacint genetisch zeer nauw verwant zijn aan elkaar. Blijkbaar zijn isolaten, geïsoleerd uit verschillende ziektesymptomen, toch sterk aan elkaar verwant. Dit blijkt ook uit de pathogeniteitstoets waarin verschillende isolaten hetzelfde ziektesymptoom (nl. krasbodem) induceren. Het is mogelijk dat deze isolaten onder verschillende condities de diverse ziektesymptomen (zoals bolrot, huidziek en krasbodem) kunnen veroorzaken.

In de veldpathogeniteitstoets narcis werden isolaten uit beide groepen getest op verschil in mate van pathogeniteit en ziektesymptomen. Hieruit bleek dat isolaten geïsoleerd uit bolrot verschillen in mate waarin ze opnieuw in de veldproef bolrot kunnen veroorzaken. Isolaten geïsoleerd uit huidziek veroorzaken ook bolrot. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de isolaten die uit bolrot geïsoleerd zijn genetisch nauwer verwant zijn aan elkaar vergeleken met de groep isolaten uit huidziek geïsoleerd zijn. De omstandigheden van de bollen op het veld en tijdens de bewaring zijn hoogstwaarschijnlijk verantwoordelijk voor het verschil in soort ziektesymptoom.

Doel van dit project.

Het doel van dit project is om de isolaten collectie verder uit te breiden met interessante *Fusarium* isolaten uit diverse bolgewassen. Deze isolaten zijn van belang voor diagnostiek en resistentieveredeling.

De veldpathogeniteitstoetsen voor hyacint en narcis worden voor een tweede maal uitgevoerd om de betrouwbaarheid van de veldtoetsen te vergroten.

Daarnaast wordt onderzocht of verschillende soorten *Fusarium* die worden aangetroffen op zieke Amaryllis bollen allemaal pathogeen zijn of dat een deel van de aangetroffen *Fusarium* soorten secundair pathogeen zijn.

Om meer inzicht te krijgen op het effect van vruchtwisseling op *Fusarium* overleving wordt er onderzocht of pathogene *Fusarium* isolaten van een bepaald bolgewas kunnen overleven op een niet waardplant bolgewas.

Veldpathogeniteitstoets

Bij de veldpathogeniteitstoets hyacint zijn de geteste isolaten uit het eerste jaar aangevuld met *Fusarium* isolaten uit Hosta planten omdat de *Fusarium* soorten uit hyacint en hosta genetisch nauw verwant zijn aan elkaar. Door deze nauwe genetische verwantschap zijn de isolaten mogelijk ook pathogeen op beide gewassen. Dit kan consequenties hebben voor vruchtwisseling op zandgronden waarop naast hyacinten ook vaste planten zoals Hosta worden geteeld.

De veldpathogeniteitstoets narcis op dezelfde manier uitgevoerd als de keer daarvoor.

Kastoets Amaryllis

Bij de amaryllisbollen wordt bolrot veroorzaakt door *Fusarium sacchari*. Er worden echter ook andere *Fusarium* soorten op zieke bollen aangetroffen. Vaak worden meerdere soorten uit een bol of partij bollen geïsoleerd. Op basis van ITS-PCR analyse, RAPD-PCR analyse en morfologische eigenschappen is gebleken dat onder andere de volgende *Fusarium* soorten op zieke bollen zijn aangetroffen: *F. oxysporum*, *F. proliferatum* en *F. solani*. Onbekend is of al deze soorten pathogeen zijn op de amaryllis bollen of dat ze secundair pathogeen zijn. In een kaspathogeniteitstoets wordt onderzocht welke van de bovenstaande *Fusarium* soorten pathogeen zijn.

Overleving *Fusarium* isolaten op niet waardplant gewassen

In een vruchtwisselingschema wordt een rotatie van 1:6 geadviseerd als er *Fusarium* is geconstateerd in een gewas. Er wordt aangenomen dat er niet of nauwelijks meer pathogene *Fusarium* sporen in de grond zitten na vijf jaar. Het is echter mogelijk dat een pathogeen *Fusarium* isolaat van een bepaald bolgewas kan overleven en wellicht kan groeien op een niet waardplant gewas. De *Fusarium* veroorzaakt dan geen ziekte maar blijft wel in vrij hoge dichtheden aanwezig in de grond. Dit kan een probleem opleveren met betrekking tot vruchtwisseling.

In een kasproef wordt onderzocht of pathogene *Fusarium* isolaten kunnen overleven op wortels of in de grond van bolgewassen waar deze *Fusarium* isolaten geen ziekte op veroorzaken.

In dit proefverslag worden per proefonderdeel de Materiaal & Methode en de resultaten beschreven gevolgd door een algemene conclusie.

2 Materiaal & Methoden en Resultaten

2.1 Uitbreiding *Fusarium* Collectie

Interessante *Fusarium* schimmels uit bolmateriaal werden reingekweekt op de daarvoor specifieke agarmedia. Deze isolaten werden gekarakteriseerd aan de hand van morfologische kenmerken en met behulp van ITS-PCR. Om te onderzoeken of tussen isolaten binnen een gewas onderling verschillen aanwezig waren werd er een VCG indeling en RAPD-PCR uitgevoerd. De isolaten zijn opgeslagen in -80°C vriezer. De collectie is onder andere uitgebreid met agressieve en niet agressieve *Fusarium* isolaten uit tulp; isolaten uit gladiool en narcis afkomstig uit Australië en Engeland; *Fusarium* uit iris bollen, hyacinten bollen en amaryllis bollen.

2.2 Veldpathogeniteitstoetsen

2.2.1 Narcis.

Materiaal en methode

Er werden 14 *Fusarium* isolaten getest en een controle behandeling zonder toevoeging van pathogeen (zie tabel 1)

Isolaat	Cultivar	symptoom	VCG indeling	RAPD indeling
Na1	?	?	1	A
Na2	Carlton	Bolrot top v.d bol	1	A
Na3	Jenny	Bolrot	1	A
Na4A	Jack Snipe	Bolrot	1	A
Na4B	Jack Snipe	Bolrot	2	B
Na5	Dick Wilde	Bolrot	1	A
Na6	Dutch Master	Bolrot	1	A
Na7	?	?	1	A
Na8	Carlton	Bolrot	1	A
Na9	Carlton	Bolrot	1	A
Na10	Tete a Tete	Huidziekte	3	C
Na11	Ice Folliers	Bolrot,	1	A
Na12	Small Talk	Bolrot	4	D
Na13	Small Talk	Huidziekte	3	C

Tabel 1. Overzicht van de gebruikte *Fusarium* isolaten uit narcis.

De *Fusarium* besmetting vond plaats door besmette aardmeelcultuur tot 10 cm diep te mengen in de veur. De besmetting in de grond bedroeg 0,1% van de aardmeelcultuur. De gevoelige cultivar Dutch Masters werd gebruikt. De bollen zijn niet gekookt maar alleen in formaline (0.5%) ontsmet. Per behandeling werden 20 bollen geplant en elke behandeling werd 3 maal herhaald. De behandelingen zijn random over het veld verdeeld (zie foto 1). Per behandeling werden de bollen geplant op 0.35 m bed. De bollen zijn eind oktober 2002 geplant op grond waar niet eerder proeven met *Fusarium* hebben gelegen.



Foto 1. Opzet veldpathogeniteitstoets narcis op proefveld PPO Lisse.

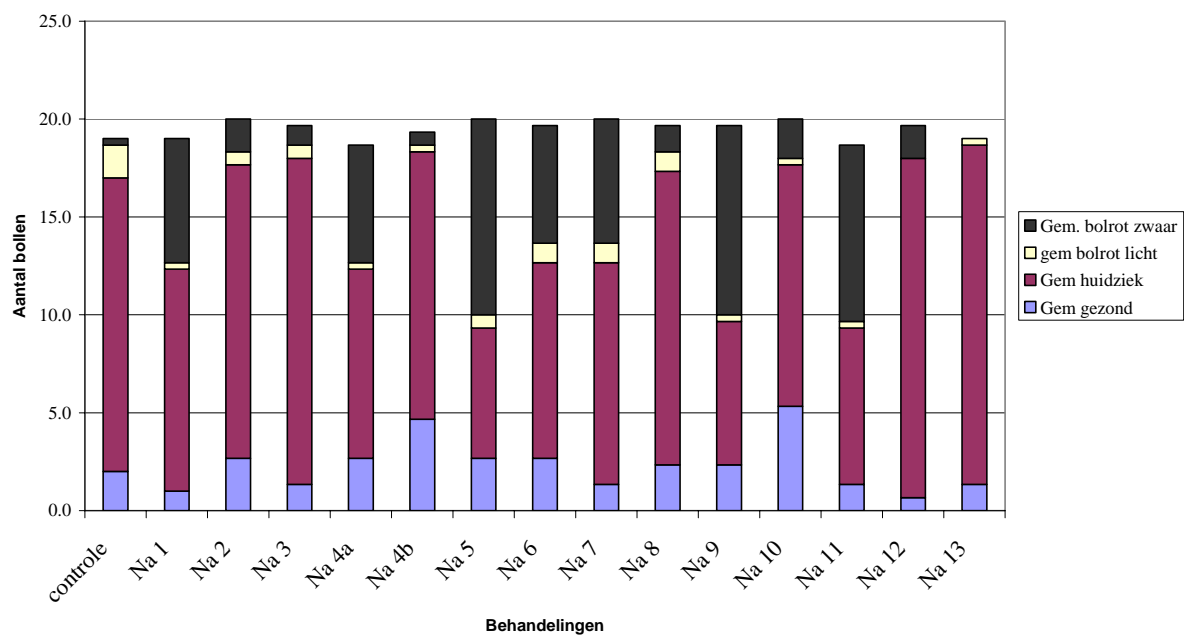
De bollen zijn geoogst in juni en hebben daarna 3 maanden bij 23°C gestaan om uit te ziekten zodat de ziektesymptomen beter beoordeeld konden worden.

De bollen werden na de bewaring in 23°C kas beoordeeld op:

- ◆ Gezonde bollen
- ◆ huidziek
- ◆ bolrot licht. Bij het verticaal doorsnijden van de bol is er bolrot aanwezig op de bolbodem en/of in de top.
- ◆ bolrot zwaar. De hele bollen zijn van binnen zwart van kleur en zijn licht in gewicht.

Resultaten

Veldpathogeniteitstoets. *Fusarium* in Narcis. 2003



Grafiek 1. Aantal narcis bollen per *Fusarium* isolaat met huidziek, bolrot licht, bolrot zwaar en gezond.

Er is een verschil in de mate waarin de verschillende isolaten bolrot kunnen veroorzaken (zie Grafiek 1). Na statistische verwerking (regressie analyse) blijkt er een tweedeling te zijn tussen isolaten die in lichte mate en in zwaardere mate bolrot veroorzaken. De isolaten die in zware mate bolrot veroorzaken zijn: Na1, 4a, 5, 6, 7, 9, en 11. De isolaten die in lichte mate bolrot veroorzaken zijn: controle, Na 2, 3, 4b, 8, 10, 12 en 13. Alle bollen met bolrot licht of bolrot zwaar bevatten ook huidzieksymptomen. Daarnaast zijn er bollen die niet de bolrot symptomen bevatten maar alleen huidziek symptomen waaronder de controle. Het komt vaker voor dat een partij narcisbollen huidziek ontwikkeld ondanks een ontsmetting met formaline. Bovendien kunnen huidziek symptomen veroorzaakt worden door diverse schimmels naast *Fusarium* en ook door mechanische beschadiging. Het gaat in deze proef met name om de lichte of zwaardere bolrot aantasting door de verschillende isolaten.

2.2.2 Hyacint

Materiaal en methode

Er zijn 10 verschillende *Fusarium* isolaten uit hyacint getest aangevuld met een controle behandeling en 2 *Fusarium* isolaten uit hosta planten (zie tabel 2).

Isolaat	Cultivar	symptoom	VCG indeling	RAPD indeling	<i>Fusarium</i> soort
Hy1	?	?	1	A	F. Hostae
Hy2	Pink Pearl	Bolrot	2	B	F. solani
Hy3	Pink Pearl	Krasbodem	1	A	F. Hostae
Hy4	White Pearl	Bolrot	1	A	F. Hostae
Hy5	Pink Pearl	Bolrot	1	A	F. Hostae
Hy6	Pink Pearl	Aantasting in top	1	A	F. Hostae
Hy7	Pink Pearl	Bolrot	1	A	F. Hostae
Hy8	White Pearl	Bolrot	1	A	F. Hostae
Hy9	Pink Pearl	Krasbodem	1	A	F. Hostae
Hy10	White Pearl	Krasbodem	1	A	F. Hostae
Hy11	Pink Pearl	Bolrot	1	A	F. Hostae
Hy12	Pink Pearl	Krasb/vethuidigh	1	A	F. Hostae
Hy13	Pink Pearl	Bolrot	1	A	F. Hostae
Hy14	White Pearl	Fus. In top	1	A	F. Hostae
Hos 2080	Albo Marginata	wortelrot	-	-	F. Hostae
Hos 2089	Gold Standard	wortelrot	-	-	F. Hostae

Tabel 2. Overzicht van de gebruikte *Fusarium* isolaten uit hyacint en hosta planten.

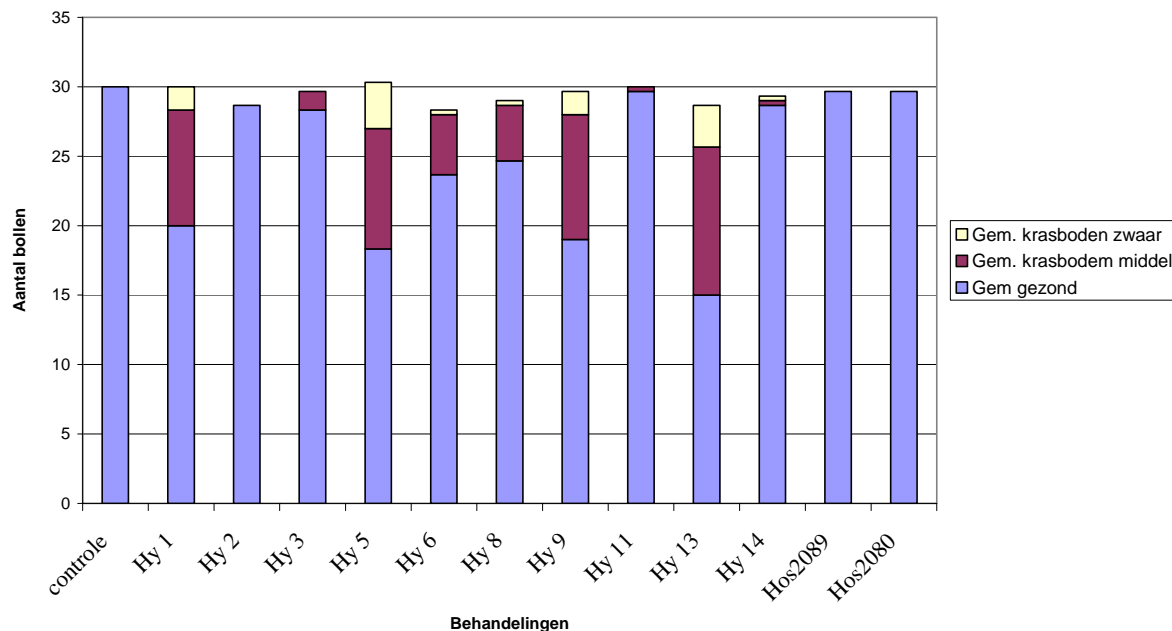
De *Fusarium* besmetting vond plaats door de bollen 10 minuten te dompelen in een sporensuspensie van 10^5 cfu/ml. Voor de proef werd de voor *Fusarium* gevoelige cultivar Pink Pearl gebruikt. Voor het besmetten en planten werden de bollen ontsmet in 0,5% formaline en teruggedroogd. Per behandeling werden 30 bollen geplant en elke behandeling werd drie maal herhaald. De bollen werden geplant op grond waar niet eerder proeven met *Fusarium* hebben gelegen.

De bollen werden geoogst in juni en bewaard bij 30°C om 3 maanden later op ziekte te kunnen scoren. Na de bewaring in 30°C kas werden de bollen beoordeeld op:

- ◆ Gezonde bollen
- ◆ Middel aantasting. Op de bodem van de bol is heel licht een “ster” te zien. Dit is het begin stadium van de krasbodem
- ◆ Zware aantasting. De bollen zijn van onderen opengesprongen

Resultaten

Veldpathogeniteitstoets. *Fusarium* in Hyacint. 2002



Grafiek 2. Aantal hyacinten bollen per *Fusarium* isolaat met krasbodem middel, krasbodem zwaar en gezond.

Het blijkt dat er veel verschillen aanwezig zijn tussen de isolaten (zie grafiek 2). De isolaten veroorzaken in verschillende mate krasbodem ondanks het feit dat de isolaten nauw verwant zijn aan elkaar. Een viertal isolaten (Hy 1, 5, 9 en 13) veroorzaken meer krasbodem dan de overige isolaten. De bollen die zijn geïnfecteerd met de *Fusarium* isolaten uit Hosta planten zijn niet aangetast en zien er gezond uit.

2.3 Kastoets *Amaryllis*.

Materiaal en methode

De *Fusarium* isolaten zijn gekweekt op AGA medium. Na 7 dagen werden de sporen geogst. Naast *Amaryllis* isolaten werden er *Fusarium* isolaten uit nerine, vallota, narcis en combinaties van drie *Fusarium* isolaten uit *Amaryllis* bollen getest. De combinaties van drie *Amaryllis* isolaten zijn geïsoleerd uit één *Amaryllis* bol (Zie tabel 3).

De bollen werden vervolgens voor 15 minuten gedompeld in 0,5 liter sporensuspensie met een concentratie van $1 \cdot 10^5$ sporen/ml. Daarna werden ze direct geplant in potgrond. Er zijn 10 *Amaryllis* bollen per behandeling geplant, 5 bollen per pot. De bollen werden zo geplant dat de neus van de bol net boven de grond uitstak. De bollen werden begin maart weggezet in een kas van 23°C tot eind augustus waarna de bollen werden beoordeeld op *Fusarium* bolrot. De gewasstand werd tussentijds regelmatig beoordeeld.

Isolaat	Cultivar	Identificatie <i>Fusarium</i> m.b.v. ITS-PCR	VCG groep	RAPD groep
am1	?	solani	5	E
am2	?	oxysporum	1	A
am3	?	proliferatum	6	F
am4	?	proliferatum	2	B
am5	Nagano	oxysporum	1	A
am6	Pamela	oxysporum/sacchari	7	G
am7	Hercules	solani	3	C
am8	Ludwig Dazzl	solani	4	D
am10	Orange Snow	solani		H
am11	?	solani		E
am12	Orange Sovereign	solani	4	D
am13	Orange Sovereign	proliferatum	8	I
am14	Orange Sovereign	proliferatum	2	B
am15	Red Lion	solani	3	C
am16	Red Lion	oxysporum	1	A
am17	Red Lion	proliferatum	2	B
am18	Red Lion/Minerva	oxysporum	1	A
Am 12+13+14	Orange Sovereign	Divers	nvt	nvt
Am15+16+17	Red Lion	Divers	nvt	nvt
Vallota 1	?	?	-	-
Nerine 1	?	sacchari	9	J
Nerine 2	Bowdenii	sacchari	10	K
Narcis 13	Small Talk	oxysporum	11	L

Tabel 3: Overzicht van de gebruikte *Fusarium* isolaten voor de kastoets amaryllis. Am 15 t/m 17 zijn bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures geïdentificeerd; Am 15= *F. solani*; Am 16= *F. oxysporum*; Am 17= *F. proliferatum*.

Resultaten

Er zijn geen verschillen tussen de behandelingen waargenomen bij de groei van de bladeren. Al het gewas kwam gelijkmatig op en bleef gedurende de proef groen.

De bollen werden uitwendig beoordeeld op *Fusarium* schade en inwendig op bolrot. Het bleek dat bij geen van de *Fusarium* isolaten de bollen ziek waren geworden.

2.4 Kasproef overleving *Fusarium*

Materiaal en methode

Op kunstmatig geïnoculeerde potgrond met een bekende hoeveelheid *Fusarium* sporen werden diverse gewassen geplant. Aangezien de bollen in het najaar werden geplant werd er alleen met bollen van narcis, hyacint, tulp en krokus gewerkt. Er werden *Fusarium* gevoelige cultivars gebruikt. Er is voor elk van deze vier gewassen één specifiek *Fusarium* isolaat gebruikt om de grond mee te besmetten. Daarnaast werd nog een isolaat van lelie aan de isolaten toegevoegd omdat in vruchtwisselingschema's ook lelies voorkomen. Naast het gebruik van inoculum in kunstmatig besmette potgrond werd besmette zandgrond afkomstig uit een proefveld gebruikt. Dit werd uitgevoerd om naast de potgrond behandelingen waarin de *Fusarium* zeer goed kan groeien een meer natuurlijke besmetting te gebruiken. Deze zandgrond is besmet met *Fusarium* van narcis (NaN) of tulp (TuN). De zandgrond met *Fusarium* uit narcis is afkomstig van de in dit verslag beschreven veldpathogeniteitstoets en de zandgrond besmet met *Fusarium* uit tulp is afkomstig uit een veldproef waarbij de grond is besmet met zure bollen afkomstig uit de praktijk (zie tabel 4).

Gewas	Isolaat	Identificatie <i>Fusarium</i> m.b.v. ITS-PCR	symptoom
Geen	Geen	-	-
hyacint	Hy9	<i>F.hostae</i>	krasbodem
narcis	Na9	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>narcissi</i>	bolrot
narcis	Na13	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>narcissi</i>	huidziek
tulp	Tu41	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>tulipae</i>	Bolrot minder agressief
tulp	Tu67	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>tulipae</i>	Bolrot agressief
krokus	Kr2	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i>	?
lelie	Fol10	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lilii</i>	Bolrot
Na N	Besmette grond van een veldproef	nvt	nvt
Tu N	Besmette grond van een veldproef	nvt	nvt

Tabel 4. Overzicht van de isolaten gebruikt voor de kasproef overleving *Fusarium*. Van hyacint en krokus werd van ieder gewas één *Fusarium* isolaat gebruikt omdat alle *Fusarium* isolaten van deze gewassen in één VCG groep zijn ingedeeld. Van narcis zijn twee isolaten gebruikt waarvan één afkomstig uit bolrot en de andere uit huidziek. Van lelie werd een isolaat gebruikt dat is geïsoleerd uit bolrot. Van tulp werd een agressief en een minder agressief isolaat gebruikt (afkomstig uit PT project 320791, Epidemiologie en beheersing van *Fusarium* in tulp).

De verschillende *Fusarium* isolaten werden gekweekt op aardemeelcultuur. Per isolaat en voor elk gewas werden 5 potjes gevuld met potgrond en werd in de bovenste 5 cm een *Fusarium* besmetting van 0,1% aangebracht. De kastemperatuur stond afgesteld op 17°C. Twee weken na besmetten van de grond werden de bollen geplant (zie foto2).



Foto 2. Opzet vruchtwisselingskasproef van tulp.

De bollen zijn ontsmet in 0,5% formaline en teruggedroogd voor planten. Vlak voor planten werd van elk *Fusarium* isolaat een grondmonster genomen om zo de start hoeveelheid sporen in de grond te kunnen bepalen.

Elk gewas onderging een gewas specifieke temperatuursbehandeling voordat de eindconcentratie *Fusarium* sporen in de grond, op de bol en op de wortels werd bepaald (zie tabel 5).

Gewas				
Narcis	4 weken 17°C voor beworteling en <i>Fusarium</i> aantasting	16 weken 13°C groei gewas		
Krokus	3 weken 9°C	3 weken 5°C	6 weken 2°C	8 weken 18°C
Hyacint	4 weken 17°C voor beworteling en <i>Fusarium</i> aantasting	8 weken 13°C groei gewas		
Tulp	8 weken 17°C			

Tabel 5. Verschillende temperatuursbehandelingen per gewas.

Na deze temperatuursbehandelingen werd van elk gewas de hoeveelheid *Fusarium* sporen bepaald op de wortels, op de bol en in de grond. Vlak voor deze bepalingen werd het bovengrondse gewas beoordeeld op groei. Stukjes wortel, de gehele bollen en kleine hoeveelheden grond werden ieder in een bepaalde hoeveelheid water uitgeschud. Dit extract werd vervolgens uitgeplaat op *Fusarium* specifiek agar medium (Komada medium). Na een aantal dagen werden de hoeveelheid *Fusarium* sporen op het agar medium geteld (zie foto 3).

Van de gewassen narcis, hyacint en krokus werd in enkelvoud de hoeveelheden *Fusarium* sporen in de grond, op wortels en op bol bepaald. Van 2,5 potje werden grond, wortels en 12 bollen verzameld voor de verschillende bepalingen. Van de gewassen narcis en hyacint werden 13 bollen in de bewaring gezet in een kas van 23°C om uit te ziekten. De hoeveelheid bollen met krasbodem in hyacint of bolrot in narcis konden worden bepaald. Van tulp werd van 2 maal 2,5 potje de verschillende bepalingen uitgevoerd.



Foto 3. Telling van *Fusarium* kolonies op Komada medium. De roze kolonies zijn de *Fusarium* sporen.

Resultaten

Krokus

Van de krokus werden alleen de hoeveelheid sporen in de grond (tabel 6) en op de wortels bepaald (tabel 7). Bij de beoordeling van het gewas zijn geen verschillen waargenomen tussen de verschillende behandelingen (tabel 9). Het gewas stierf gelijkmatig af.

In de grond zijn de hoeveelheid *Fusarium* sporen van krokus t.o.v de start hoeveelheid met 1/3 afgenomen (zie tabel 6). Bij de overige isolaten is de hoeveelheid *Fusarium* sporen in de grond zeer sterk afgenomen. Dit is in tegenstelling tot de hoeveelheid *Fusarium* sporen die uit de wortels werden geïsoleerd. De *Fusarium* isolaten van hyacint, narcis, krokus en tulp hebben t.o.v. de eindconcentratie *Fusarium* sporen die in de grond zit, een hogere hoeveelheid *Fusarium* sporen op de wortels (zie tabel 7).

Isolaat	Eindbepaling in de grond				Startbepaling in de grond	% verloren <i>Fusarium</i> sporen t.o.v start bepaling			
	Gewas krokus	narcis	hyacint	tulp		Gewas krokus	narcis	hyacint	tulp
Controle	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0	0.0	0.0	0.0
Hy 9	7.0E+02	0.0E+00	9.0E+02	0.0E+00	7.4E+03	90.6	100.0	87.9	100.0
Na 9	1.5E+03	1.7E+04	0.0E+00	1.0E+02	1.3E+04	88.6	-25.0	100.0	99.2
Na 13	1.2E+04	0.0E+00	5.0E+02	0.0E+00	4.6E+04	74.1	100.0	98.9	100.0
Tu 41	1.0E+02	0.0E+00	0.0E+00	2.5E+03	2.0E+04	99.5	100.0	100.0	87.5
Tu 67	1.0E+03	0.0E+00	0.0E+00	5.2E+03	3.1E+04	96.8	100.0	100.0	83.2
Kr 2	1.3E+04	2.0E+03	0.0E+00	0.0E+00	1.9E+04	31.0	89.4	100.0	100.0
FOL 10	3.0E+02	0.0E+00	1.0E+03	4.2E+03	3.4E+03	91.2	100.0	70.6	-22.1
Tu N	1.8E+03	8.0E+02	2.0E+02	8.4E+03	1.5E+02	-1100.0	-433.3	-33.3	-5500.0
Na N	0.0E+00	3.0E+02	0.0E+00	0.0E+00	9.2E+02	100.0	67.4	100.0	100.0

Tabel 6. Het aantal *Fusarium* sporen in de grond aan het begin van de biotoets (startbepaling) en aan het eind van de biotoets (eindbepaling) (cfu/g grond) en % verloren *Fusarium* sporen gedurende de biotoets t.o.v. het begin van de biotoets.

Isolaat	Gewas				Start bepaling grond
	krokus	narcis	hyacint	tulp	
Controle	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.63E+01	0.0E+00
Hy9	2.80E+03	0.00E+00	3.61E+04	0.00E+00	7.4E+03
Na9	9.00E+03	1.40E+04	2.13E+03	8.09E+02	1.3E+04
Na13	2.16E+05	3.67E+04	1.33E+02	5.40E+03	4.6E+04
Tu 41	1.20E+04	3.33E+02	0.00E+00	3.52E+04	2.0E+04
Tu67	8.60E+03	0.00E+00	2.67E+02	1.08E+05	3.1E+04
Kr2	1.10E+05	6.67E+03	8.00E+02	2.36E+04	3.4E+03
Fol 10	0.00E+00	0.00E+00	7.33E+02	4.29E+02	1.9E+04
Tu N	0.00E+00	4.00E+02	0.00E+00	8.37E+04	1.5E+02
Na N	6.67E+02	1.27E+05	5.00E+01	3.10E+03	9.2E+02

Tabel 7. Het aantal *Fusarium* sporen op de wortel (cfu/g wortel) aan het eind van de biotoets.

Narcis

Tijdens de bloei waren er duidelijke verschillen zichtbaar tussen de verschillende *Fusarium* isolaten op het gewas. De behandelingen met *Fusarium* isolaten uit narcis (Na9, Na13 en NaN) resulteerden in een lagere

gewasstand t.o.v. de controle behandeling (zie tabel 9). De gewasstand van de *Fusarium* isolaten die zijn geïsoleerd uit tulp was ook opvallend lager. Deze waarnemingen komen niet overeen met de beoordeling van bolrot in deze narcis bollen (zie tabel 10). Na 7 weken bewaring bij 23°C zijn de bollen opgesneden en beoordeeld op bolrot. In het algemeen zat er weinig bolrot in de bollen. De behandelingen met de isolaten Na9 en NaN bevatten de meeste bollen met bolrot. Dit komt overeen met de hoeveelheid *Fusarium* sporen die van deze twee isolaten in de grond worden teruggevonden (zie tabel 6). Van het isolaat Na9 neemt de hoeveelheid sporen t.o.v. de start hoeveelheid toe. Bij het isolaat NaN blijft 2/3 van de start hoeveelheid over. Van de overige isolaten worden weinig *Fusarium* sporen teruggevonden in de grond. Op de wortels worden veel *Fusarium* sporen terug gevonden in de behandelingen met de narcis isolaten Na9 en Na13. Daarnaast werden opvallend veel *Fusarium* sporen van het krokus isolaat teruggevonden op de narciswortels (zie tabel 7). Van deze drie isolaten werden ook veel *Fusarium* sporen op de narcis bollen aangetroffen (zie tabel 8). Dit geldt ook voor de tulpenisolaten Tu 41 en Tu N.

Isolaat	Gewas				Start bepaling grond
	krokus	narcis	hyacint	tulp	
Controle		6.33E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.0E+00
Hy 9		0.00E+00	2.08E+05	0.00E+00	7.4E+03
Na 9		1.60E+06	6.50E+04	0.00E+00	1.3E+04
Na 13		3.10E+04	6.50E+04	6.74E+05	4.6E+04
Tu 41		1.52E+05	8.25E+04	1.88E+07	2.0E+04
Tu 67		2.75E+04	2.50E+04	1.42E+08	3.1E+04
FOL 10		3.78E+04	1.50E+03	8.33E+05	3.4E+03
Kr 2		4.43E+04	2.80E+04	1.50E+06	1.9E+04
Tu N		2.37E+05	8.75E+03	2.53E+07	1.5E+02
Na N		1.57E+05	8.50E+03	0.00E+00	9.2E+02

Tabel 8. Aantal *Fusarium* sporen op de bol (cfu/bol) aan het eind van de biotoets.

Isolaat	Gewas			
	krokus	narcis	hyacint	tulp
Controle	10	7.8	10	10
Hy 9	10	7.4	8	8.5
Na 9	10	2	10	9
Na 13	10	5.4	10	9
Tu 41	10	6.6	10	2
Tu 67	10	8.2	10	2
FOL 10	10	7.2	10	10
Kr 2	10	8	10	9
Tu N	10	3.8	8	6
Na N	10	4.2	8	9

Tabel 9. Gewasstand aan het eind van de biotoets van de verschillende gewassen bij inoculatie van de grond met de verschillende isolaten (0 – zeer ziek tot 10 – helemaal gezond).

Hyacint

Bij het bovengrondse gewas zijn enkele kleine verschillen in gewasstand waargenomen (zie tabel 9). Ten opzichte van de controle behandeling stonden de behandelingen met de isolaten Hy9, NaN en TuN er lager bij. Het is mogelijk dat de lagere stand in de behandelingen met de NaN en TuN isolaten wordt veroorzaakt

doordat deze behandelingen in besmette zandgrond van de tuin zijn geplant i.p.v. in potgrond waar de rest van de behandelingen in geplant zijn.

Voor de bepaling van de hoeveelheid krasbodems in de bollen werden 13 bollen voor 7 weken bij 23°C weggezet en vervolgens beoordeeld. De bollen van isolaat Hy9 bevatten allemaal krasbodem (zie tabel 10). De bollen van de overige behandelingen zijn gezond.

In de grond wordt alleen een geringe hoeveelheid *Fusarium* sporen van het hyacinten en lelie isolaat terug gevonden (zie tabel 6).

Op de wortels en op de bollen worden alleen van het hyacinten isolaat veel *Fusarium* sporen terug gevonden (zie tabel 7 en 8). Van de overige isolaten worden van de wortels en bollen weinig *Fusarium* sporen geïsoleerd.

	Krasbodem in hyacint		bolrot in narcis		
	gezond	krasbodem	gezond	bolrot licht	bolrot zwaar
<i>Isolaat</i>					
<i>Controle</i>	13	0	13	0	0
<i>Hy 9</i>	0	13	13	0	0
<i>Na 9</i>	12	1 zacht	13	0	0
<i>Na 13</i>	12	1 zacht	9	4	1
<i>Tu 41</i>	bollen niet goed te beoordelen		13	0	0
<i>Tu 67</i>	13	0	11	1	1
<i>FOL 10</i>	13	0	12	1	0
<i>Kr 2</i>	13	0	9	1	0
<i>Tu N</i>	13	0	12	1	0
<i>Na N</i>	13	0	9	4	0

Tabel 10. Het aantal gezonde hyacintenbollen of bollen met krasbodems veroorzaakt door de diverse isolaten en het aantal gezonde narcisbollen of bollen met een lichte of zware bolrotaantasting. De bollen zijn na het beëindigen van de biotoets voor 7 weken weggezet waarna de hoeveelheid krasbodem of bolrot is bepaald.

Tulp

Bij de beoordeling van de gewasstand zijn er grote verschillen aanwezig tussen de isolaten die zijn geïsoleerd uit tulp en de overige isolaten. De tulpen die zijn geïnfecteerd met isolaten van tulp zijn bijna allemaal afgestorven (zie tabel 9). Ook zijn deze bollen in z'n geheel door de *Fusarium* aangetast. De bollen van de andere isolaten zagen er, met uitzondering van de bollen die zijn geïnfecteerd met het lelie isolaat gezond uit. De bollen van het lelie isolaat zijn bij de bolbodem bruin verkleurd. Het weefsel is niet zacht of verrot. Na het maken van isolaties groeit er geen *Fusarium* uit. Mogelijk is dit een overgevoeligheidsreactie op de *Fusarium* sporen van de tulp.

In de grond neemt de hoeveelheid *Fusarium* sporen bij alle isolaten in grote mate af behalve bij het krokus-isolaat waar een lichte toename van sporen is (zie tabel 6).

Er zitten niet tot nauwelijks wortels bij de isolaten Tu41, Tu 67, TuN en Fol10. De wortels die er zitten zijn t.o.v. de controle behandeling fijner van structuur. De overige isolaten hebben allemaal goede wortels. Met uitzondering van de controle behandeling en de isolaten Hy9 en Na9 zitten er van de overige isolaten veel *Fusarium* sporen op de bol en op de wortels (zie tabel 7 en 8).

Besmette grond van veldproeven

Van de behandeling met natuurlijke besmette zandgrond, TuN, neemt bij elk gewas de hoeveelheid sporen in de grond in grote hoeveelheden toe (zie tabel 6). Doordat er bij de bepaling van de start concentratie een kleine hoeveelheid grond is gebruikt is mogelijk de beginconcentratie te laag bepaald. Ondanks deze hoge percentages vindt de hoogste toename plaats bij het gewas tulp. Bij de behandeling NaN nemen de hoeveelheid sporen in de grond sterk af, behalve bij het gewas narcis.

Het is mogelijk dat de slechtere gewasstand van narcis, tulp en hyacint in de behandelingen met de NaN en TuN isolaten wordt veroorzaakt doordat deze behandelingen in besmette zandgrond van de tuin zijn geplant i.p.v. in potgrond waar de rest van de behandelingen in geplant zijn.

3 Discussie en Conclusies

Veel van de *Fusarium* isolaten die zijn verzameld om de isolaten collectie uit te breiden worden gebruikt in andere projecten. Onder andere worden isolaten uit tulp, iris en hyacint gebruikt om infectieproeven mee uit te voeren. Nieuw geïsoleerde isolaten worden vergeleken met oudere isolaten om mogelijke veranderingen in agressiviteit aan te tonen of om het isolaat in een nieuwe VCG groep in te delen.

In het eerste jaar dat de veldpathogeniteitstoets narcis werd uitgevoerd was er een verdeling tussen isolaten die weinig lichte en zware bolrot konden veroorzaken en isolaten die veel, met name zware bolrot konden veroorzaken. Hieruit bleek al dat isolaten die zijn geïsoleerd uit één bepaald ziektesymptoom, namelijk bolrot, in verschillende mate weer bolrot konden veroorzaken. Twee isolaten die zijn geïsoleerd uit bollen met een ander ziektesymptoom nl. huidziek (Na10 en Na13) veroorzaakten in lichte mate bolrot. De resultaten van het tweede jaar bevestigen de resultaten uit het eerste jaar (zie bijlage 1). Ook in het tweede jaar is er veel verschil in de mate waarin de isolaten lichte of zware bolrot kunnen veroorzaken. Over beide jaren vergeleken zijn het dezelfde isolaten die in lichte of in zware mate bolrot veroorzaken. In eerder onderzoek is aangetoond dat deze isolaten genetisch zeer nauw verwant zijn aan elkaar. Het lijkt erop dat er meer en minder virulente stammen van *Fusarium oxysporum* f.sp. *narcissi* isolaten voorkomen in narcis. Dit is vergelijkbaar met de situatie in tulp. Uit een PT gefinancierd project uit 2003 (project 320791, Epidemiologie en beheersing van *Fusarium* in tulp) blijkt dat er in tulp agressieve en minder agressieve stammen voorkomen. De agressieve stammen konden twee niet gevoelige tulpen cultivars zwaar aantasten. Uit de veldpathogeniteitstoets hyacint blijkt ook dat er verschil is in de mate waarin de verschillende isolaten krasbodem kunnen veroorzaken. In het eerste jaar dat de proef werd uitgevoerd waren er vier isolaten die in zwaardere mate krasbodem veroorzaakten (zie bijlage 2). Na het tweede proefjaar blijkt dat drie van deze vier isolaten over beide proefjaren heen de meeste krasbodem veroorzaken (Hy 1, 9 en 13). Deze virulente isolaten zijn geïsoleerd uit de verschillende ziektesymptomen krasbodem en bolrot. Een isolaat dat is geïsoleerd uit bolrot is ook in staat om krasbodem te veroorzaken. Het is zeer waarschijnlijk dat deze isolaten onder bepaalde condities verschillende ziektesymptomen kunnen veroorzaken. In deze proef is een gevoelige cultivar gebruikt. Het is nog onbekend in hoeverre deze virulente stammen krasbodem kunnen veroorzaken in minder gevoelige cultivars. Verder is uit de veldproef gebleken dat ondanks de zeer nauwe genetische verwantschap tussen de *Fusarium* uit hyacint en hosta planten de *Fusarium* uit Hosta niet pathogeen is op hyacinten bollen. Voor vruchtwisselingen is dit gunstig. Het is mogelijk om in een vruchtwisselingschema hyacint na Hosta planten te telen. Het is onbekend of *Fusarium* uit hyacint ziekte kan veroorzaken op Hosta.

Helaas is het niet mogelijk geweest vast te stellen welke *Fusarium* isolaten verantwoordelijk zijn voor bolrot van Amaryllis. Ondanks uitgebreide navraag en literatuuronderzoek voor de opzet van de kas pathogeniteitstoets is gebleken dat de methode waarop geprobeerd is de bollen ziek te maken niet de goede is geweest. Het is onduidelijk waar dit aangelegen heeft. Waarschijnlijk zijn er andere omstandigheden nodig om amaryllis bollen ziek te maken. Mogelijk zijn in de praktijk deze gunstige omstandigheden wel aanwezig waardoor er wel bolrot in amaryllis voorkomt.

Uit de vruchtwisselingskasproef blijkt dat alleen de *Fusarium* isolaten die zijn geïsoleerd uit een bepaald gewas ook alleen dat gewas ziek kunnen maken. Er vindt geen kruisbesmetting plaats tussen de gewasspecifieke *Fusarium* soorten (de zogenaamde Formae Specialis) en andere gewassen. Dit geldt alleen voor de in deze proef getoetste gewassen: krokus, narcis, hyacint en tulp.

Wel kunnen *Fusarium* soorten van een bepaald gewas zich vermeerderen op de wortels en op de bol zonder dat ze pathogeen zijn op dat gewas. Dit is duidelijk het geval bij het gewas krokus. Van bijna alle isolaten blijft de populatie *Fusarium* op de wortels van de krokussen in stand. Onbekend is of dit ook op de bollen van de krokussen voorkomt. Bij narcis en hyacint zijn het alleen de isolaten die ook zijn geïsoleerd uit narcis en hyacint waarbij de populatie *Fusarium* in stand blijft. Bij de tulp is er, naast de isolaten die zijn geïsoleerd uit tulp ook een lichte stijging van de *Fusarium* populatie van het krokus isolaat. Dit kan wel consequenties

hebben voor de vruchtopvolging bij krokus en tulp.

Door het planten van een gewas op een perceel dat besmet is met *Fusarium* van een ander gewas, kan de *Fusarium* zich in stand houden op de wortels. Hierdoor blijft de populatie van *Fusarium* nog een jaar extra op een hoog niveau. Uit deze proef blijkt echter wel dat de hoeveelheid *Fusarium* sporen in de grond zonder aanwezigheid van de wortels sterk afneemt bij elk gewas. Uitzonderingen hierop zijn de gewasspecifieke *Fusarium* isolaten van krokus en narcis. In deze kasproef nemen de hoeveelheid *Fusarium* sporen van krokus en narcis in de grond in geringe hoeveelheid af. Bij de gewassen hyacint en tulp worden bijna geen *Fusarium* sporen van hyacint en tulp terug gevonden in de grond. De hoeveelheden *Fusarium* sporen van het lelie isolaat nemen bij het gewas tulp in de grond toe.

Bij de behandelingen met natuurlijk besmette zandgrond (NaN en TuN) blijkt ook dat de gewasspecifieke *Fusarium* uit narcis zich goed in stand kan houden op narcis bollen en wortels en *Fusarium* uit tulp zich goed in stand kan houden op tulpen bollen. Naast de potgrond behandeling met alleen kunstmatig aangebracht inoculum blijft de populatie van de gewasspecifieke *Fusarium* uit narcis en tulp ook in stand in de meer natuurlijke omgeving van zandgrond.

Aanbevelingen

Telers moeten erop bedacht zijn dat op een perceel dat is besmet met *Fusarium* van een bepaald gewas niet nogmaals datzelfde gewas op dat stuk perceel wordt geplant. Verder zal erop gelet moeten worden dat bij het planten van krokussen op een perceel besmet met de gewasspecifieke Fusaria van de gewassen krokus, narcis, hyacint en tulp de *Fusarium* populatie nog een jaar extra in stand blijft.

Bij de overige gewassen zal de populatie *Fusarium* sporen op een besmet perceel niet in stand blijven.

Waar mogelijk is het aan te bevelen dat er in de vruchtwisseling zoveel mogelijk rekening met bovenstaand wordt gehouden om zeker te zijn van een zo laag mogelijke *Fusarium* besmetting op het perceel.

Via een vakbladartikel zullen deze resultaten naar de voorlichters en telers toe kenbaar gemaakt worden.

4 Producten

Vakbladartikel

S. Breeuwsma en M. de Boer (2003): Elk bolgewas zijn eigen *Fusarium*soort en -isolaten.
Bloembollenvisie 11; pagina 20 en 21.

Lezingen

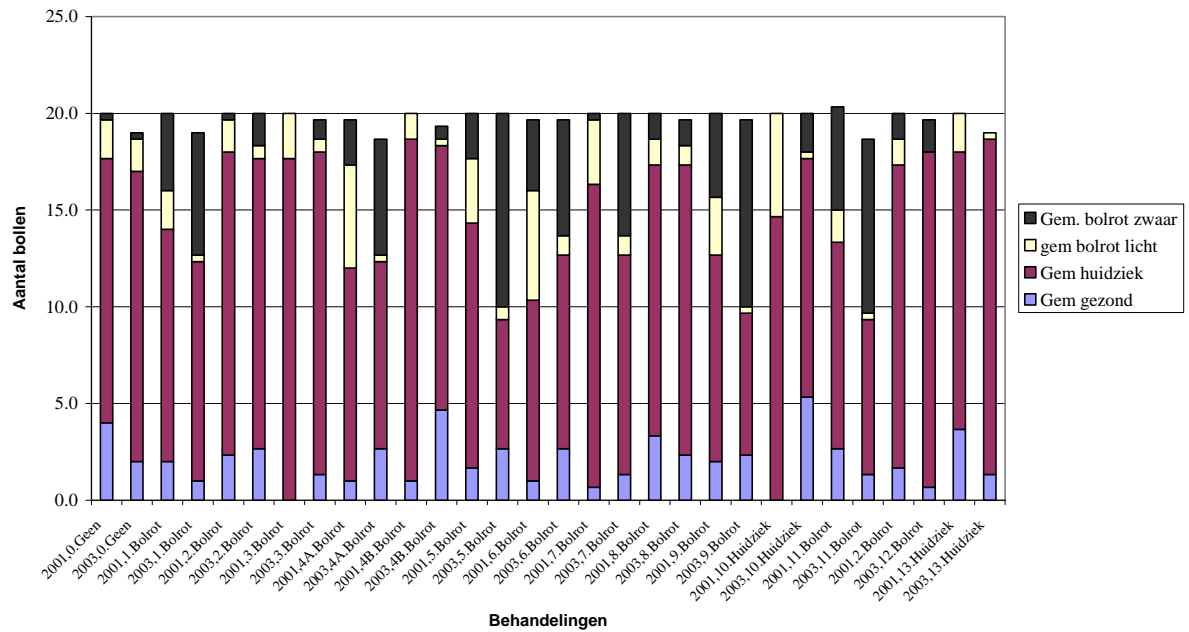
S. Breeuwsma en M. de Boer. Variatie in *Fusarium* isolaten afkomstig van diverse bolgewassen.
Gewasbeschermingsmanifestatie, Ede, 7 februari 2002; samenvatting in *Gewasbescherming* nr. 1,
jaargang 33, 2002.

R. de Werd, S. Breeuwsma, M. de Boer, M. van Dam. *Fusarium* in Bloembollen, Vergadering *Fusarium*
werkgroep, Koninklijke Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging ,februari 2004.

Bijlage 1 Veldpathogeniteitstoets narcis

Proefjaren 2001 en 2003.

Veldpathogeniteitstoets. Fusarium in Narcis. 2001 en 2003



Bijlage 2 Veldpathogeniteitstoets hyacint

Proefjaren 2001 en 2002.

Veldpathogeniteitstoets. Fusarium in Hyacint. 2001 en 2002

