



Verspreiding wortelziekten bij chryasant na hergebruik van niet-ontsmet drainagewater

Inventarisatie: *Verticillium* en wortelaaltjes

Project 433154

H.A.E. de Werd, J.J. Amsing en P.H.J. Korsten

© 2003 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.

PPO Publicatienr. 568; € 22,-

Afbeelding omslag: afbeelding van de vraag of *Verticillium* en wortelaaltjes in de teelt van chrysanthe met drainagewater verspreid worden.

Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw

Projectnummer: 433154

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Glastuinbouw

Adres : Linnaeuslaan 2a
: 1431 JV Aalsmeer
Tel. : 0297 - 35 25 25
Fax : 0297 - 35 22 70
E-mail : infoglastuinbouw@ppo.dlo.nl
Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING	4
1 INLEIDING	5
1.1 Recirculatie en verspreiding ziekteverwekkers	5
1.1.1 <i>Verticillium dahliae</i>	5
1.1.2 Aaltjes	8
1.2 Doelstellingen	8
2 MATERIAAL EN METHODEN	9
2.1 Inventarisatie en monstername	9
2.2 Laboratoriumanalyses grondmonsters en drainagewater	9
2.2.1 <i>Verticillium</i>	9
2.2.2 Wortelaaltjes	10
2.3 Kasproef	11
2.4 Overleving microconidiën <i>Verticillium</i> in drainagewater	13
3 RESULTATEN	14
3.1 Inventarisatie en monstername	14
3.2 Laboratoriumanalyses grondmonsters en drainagewater	15
3.2.1 <i>Verticillium</i>	15
3.2.2 Wortelaaltjes	17
3.3 Kasproef	19
3.3.1 <i>Verticillium</i>	19
3.3.2 Wortelaaltjes	20
3.4 Overleving microconidiën <i>Verticillium</i> in drainagewater	22
4 CONCLUSIES EN DISCUSSIE	24
LITERATUUR	27

Samenvatting

In de grondteelt van chrysant wordt veel gebruik gemaakt van drainage. Van meerdere combinaties van teelten en ziekteverwekkers is bekend, dat hergebruik van niet-ontsmet drain- of drainagewater een bijdrage kan leveren aan de verspreiding van bodemschimmels en aaltjes binnen bedrijven. Omdat in de chrysantenteelt de bodemgebonden ziekteverwekkers *Verticillium* (de veroorzaker van slaapziekte) en wortelaaltjes (wortelknobbelaaltjes en wortellesie-aaltjes) veel schade veroorzaken en drainagewater veelal zonder ontsmetting wordt hergebruikt, is onderzocht of deze ziekteverwekkers in drainagewater van besmette percelen voorkomen en wat de gevolgen zijn indien besmet water wordt hergebruikt zonder het te ontsmetten.

Bij telers is informatie verzameld omtrent de verspreiding van aantasting binnen hun bedrijf en factoren die hiermee samenhangen. Door analyse van verzamelde grond- en drainagewatermonsters met behulp van laboratoriumtechnieken en een kasproef is bepaald, of deze ziekteverwekkers tot op de diepte van drainage-buizen in de grond voorkomen en of ze in drainagewater van besmette percelen aan zijn te tonen. Daarnaast is in een laboratoriumproef kort gekeken naar overleving van *Verticillium* in drainagewater. Hierop volgend zijn de resultaten uit de proeven en analyses, gecombineerd met op bedrijven verzamelde informatie, verwerkt tot handvatten voor het inschatten van het risico dat hergebruik van drainagewater zonder te ontsmetten met zich meebrengt.

De analyses hebben aangetoond dat zowel *Verticillium* als wortelaaltjes tot op de diepte van drainagebuizen in grond voor kunnen komen, zelfs in concentraties die hoog genoeg zijn om een vatbaar cultivar aan te tasten. In drainagewater werden herhaaldelijk lage dichtheden wortelknobbelaaltjes aangetoond. *Verticillium* werd één-maal direct en éénmaal indirect in een lage dichtheid in drainagewater gevonden. Dat *Verticillium* in drainage-water van besmette bedrijven voor kan komen is hiermee wel aangetoond, maar het bewijs is zeer gering. Uit de laboratoriumproef bleek dat als conidiën (één van de soorten sporen die *Verticillium* produceert) van *Verticillium* in drainagewater terecht komen er minimaal drie weken lang levende *Verticillium*-deeltjes in het water aanwezig kunnen blijven, wat verspreiding ook meer waarschijnlijk maakt indien deze deeltjes in het drainagewater terecht komen.

Wortelaaltjes en waarschijnlijk ook *Verticillium* komen in drainagewater voor en kunnen hierdoor, bij hergebruik zonder ontsmetting door de hele kas verspreid worden. Daardoor zouden tot dan toe schone plekken besmet kunnen raken. Afhankelijk van de bedrijfssituatie, met name de ruimtelijke spreiding van de ziekteverwekkers over het bedrijf, zal het niet-ontsmette drainagewater wel of niet een rol van belang spelen. Andere vormen van verspreiding kunnen in bepaalde gevallen verspreiding door drainagewater verwaarlozen. Bij het inschatten van het risico is het dus nodig de bedrijfsspecifieke situatie goed te kennen, omdat deze de mogelijke rol van het drainagewater voor verspreiding sterk kan beïnvloeden. Risico's zijn met de huidige kennis en techniek niet kwantitatief te bepalen, wel worden adviezen gegeven om tot een goede afweging te kunnen komen.

1 Inleiding

In de grondteelt van chrysant wordt op vrijwel alle bedrijven gebruik gemaakt van een drainagesysteem om overtollig water uit de kasgrond af te voeren. Het opgevangen water kan in meer of mindere mate meststoffen, bestrijdingsmiddelen en andere stoffen bevatten die de kwaliteit van oppervlakte- of grondwater negatief zouden kunnen beïnvloeden. Om deze reden, maar ook om te besparen op de aankoop van meststoffen en waterverbruik, is het wenselijk en in veel gevallen ook wettelijk verplicht het drainagewater opnieuw te gebruiken. De wettelijke regelingen omtrent het hergebruiken van drainagewater zijn opgenomen in het Besluit Glas-tuinbouw 2002 van het Ministerie van LNV dat op 1 april 2002 in werking getreden is.

1.1 Recirculatie en verspreiding ziekteverwekkers

De toenemende recirculatie van drain- en drainagewater heeft als nadeel dat het risico op verspreiding van ziekten over het algemeen groter is dan in systemen zonder hergebruik. Uit eerder onderzoek is al gebleken dat o.a. de schimmelziektes *Cylindrocladium spathiphylli* en *Fusarium oxysporum* zich door een gewas kunnen verspreiden bij recirculatie in een eb/vloedsysteem. Ook *Pythium* en *Phytophthora* kunnen zich door de productie van zoosporen (zwemsporen) makkelijk door waterige systemen verspreiden. Daarnaast laat lopend onderzoek bij Praktijkonderzoek Plant & Omgeving zien dat drainwater een besmettingsbron van plantpathogene aaltjes is in de teelt van roos op substraat (Amsing, pers. mededeling). Uit voorgaand onderzoek zijn diverse ontsmettingsmethoden naar voren gekomen, waarmee aaltjes en schimmel(sporen) gedood kunnen worden voordat het water hergebruikt wordt (Amsing en Runia, 2000).

In de chrysantenteelt veroorzaken drie wortelziektes (wortelpathogenen) aanzienlijke problemen. Dit zijn slaapziekte veroorzaakt door de bodemschimmel *Verticillium dahliae* en twee soorten wortelaaltjes (aaltje = nematode), namelijk het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne* en het wortellesie-aaltje *Pratylenchus penetrans*. Omdat in de chrysantenteelt water doorgaans hergebruikt wordt zonder het eerst te ontsmetten, is het van belang te weten welk risico dit met zich meebrengt met betrekking tot de verspreiding van bovengenoemde pathogenen.

Hazendonk (2000) trok na een literatuurstudie naar de verspreiding van wortellesie-aaltjes en *Verticillium* bij chrysantenteelt in de vollegrond o.a. de volgende conclusies: "Over het verspreiden van wortellesie-aaltjes en *Verticillium dahliae* na het hergebruik van drainagewater bij een chrysantenteelt in de vollegrond zijn in de literatuur geen gegevens gevonden. Op basis van algemene literatuur en literatuur over andere gewassen lijkt het mogelijk dat aaltjes bij teelten in de vollegrond via besmet drainagewater verspreid kunnen worden. Voor verspreiding van *Verticillium dahliae* in de vollegrond door besmet drainagewater zijn in de literatuur geen aanwijzingen gevonden; over verspreiding met besmet drainwater in de substraatenteelt wel. Mogelijk kunnen conidiën (schimmelsporen) in het drainwater terecht komen en bij hergebruik planten infecteren. Het uitdrainen van microsclerotien (overlevingsstructuren van de schimmel) is zeer onwaarschijnlijk (pers. med. Paternotte). Proeven zullen moeten uitwijzen of in de chrysantenteelt in de vollegrond verspreiding van wortellesie-aaltjes en *Verticillium* door hergebruik van drainagewater wel of niet kan plaatsvinden."

In het verslag van bovengenoemde literatuurstudie door Hazendonk is uitgebreide informatie over wortellesie-aaltjes en *Verticillium dahliae* te vinden. Onder andere wordt ingegaan op bestaande kennis over verspreiding van deze pathogenen. Hieronder zeer beknopt nog de belangrijkste informatie over de verspreiding van *Verticillium dahliae*, wortellesie- en ook wortelknobbelaaltjes.

1.1.1 *Verticillium dahliae*

De schimmel *V. dahliae* kan alleen passief verspreid worden, bijvoorbeeld door menselijk handelen, bodeminsecten, wind en in bewegend water en gebruik van besmet (plant-)materiaal. De levenscyclus van *Verticillium dahliae* is weergegeven in **Figuur 1**. De schimmel produceert met name twee soorten structuren voor verspreiding: conidiën en microsclerotien. Conidiën zijn éencellige dunwandige sporen, die waarschijnlijk slechts korte tijd kunnen overleven in grond of water. Conidiën zijn elipsvormig en variëren in lengte van 2½ tot 8 µm (1 µm = 1/1000 mm). Ze spelen een belangrijke rol in de verspreiding van de schimmel in de plant na een eerste infectie.

Voor overleving buiten de plant, wanneer geen geschikte waardplanten aanwezig zijn, worden microsclerotiën geproduceerd (Figuur 2). Ze worden voornamelijk gevormd in afstervend geïnfecteerd plantmateriaal. Het zijn zwartkleurige klompjes cellen met stevige wanden variërend in grootte van 25 tot 130 μ m. Ze kunnen jaren lang in grond overleven zonder hun infectievermogen te verliezen.

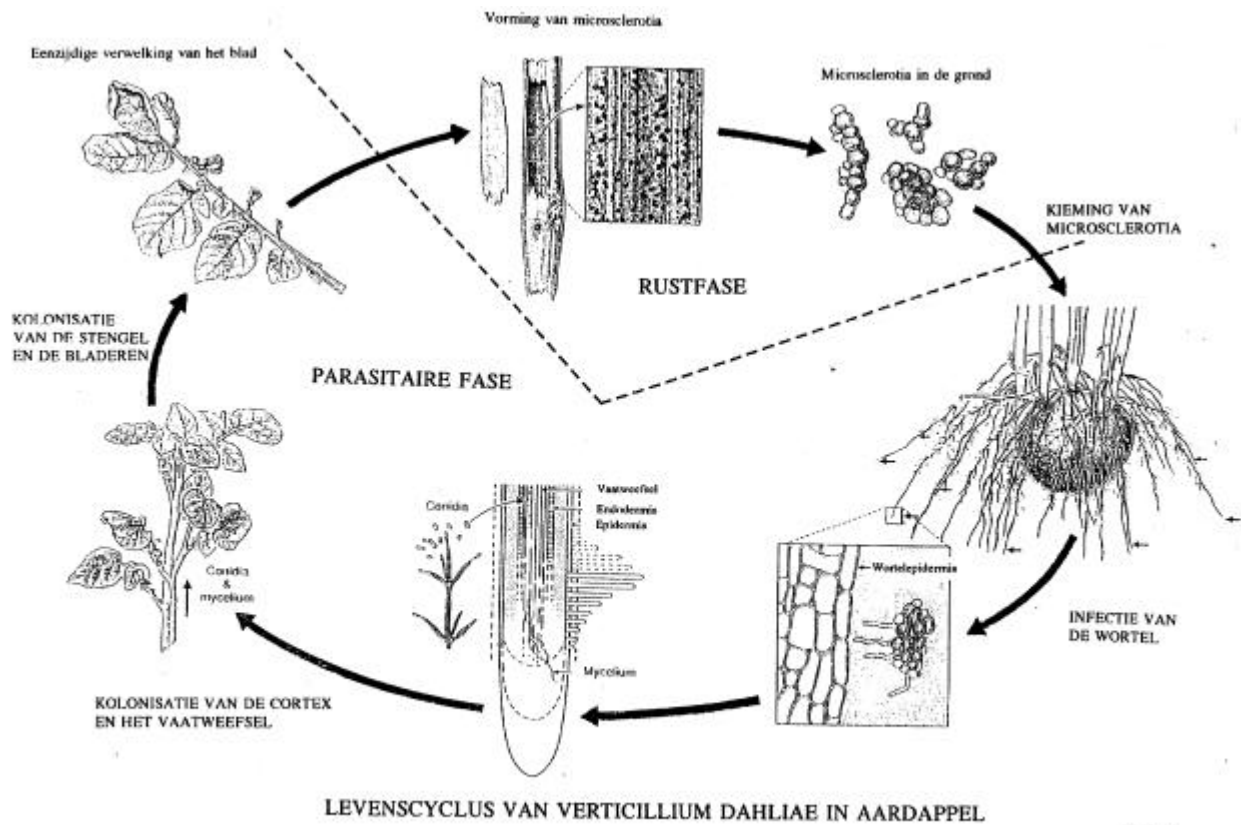


Fig.1. De levenscyclus van *Verticillium dahliae* in aardappel; vergelijkbaar met die in chrysant.
Bron: Gecombineerde Diensten, Binnenhaven, Wageningen

Het is aannemelijk, dat wanneer microsclerotiën in drainagewater terecht zouden komen en via recirculatie weer in het gewas, ze hun infecterend vermogen niet verloren hebben. Het staat echter niet vast dat microsclerotiën de enige *Verticillium*-structuren zijn die in de grond voorkomen en dus in drainagewater terecht zouden kunnen komen. Microsclerotiën kunnen ondergronds conidiën vormen (Termorshuizen, pers. med.) en daar-naast is het ook mogelijk, dat als geïnfecteerde plantresten (bijv. in perskluitjes) na beëindiging van een teelt door de grond gefreesd worden, hiermee behalve microsclerotiën ook conidiën of andere cellen van *Verticillium* in de grond vrij komen. Het is onbekend of deze hun kiemkracht snel zouden verliezen in drainagewater. De overleving van conidiën in drainagewater is daarom in een aanvullend experiment onderzocht.

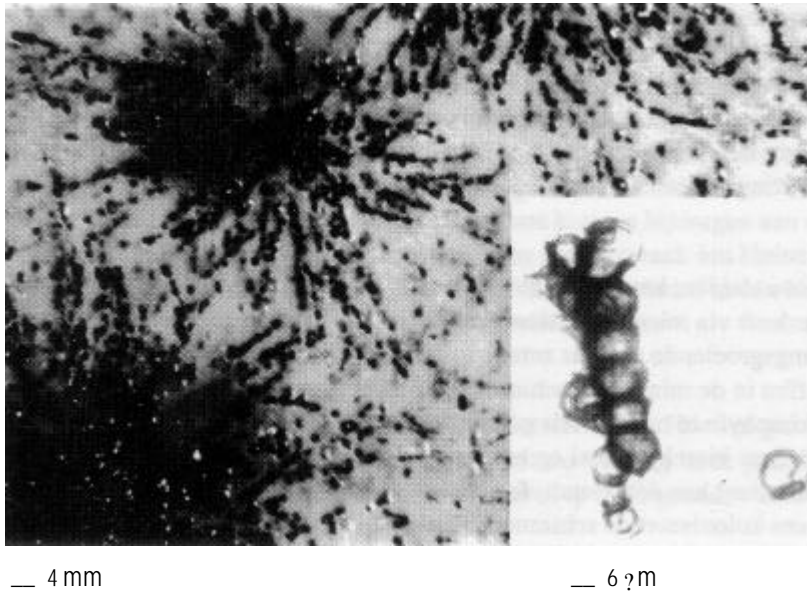


Fig.2. Microsclerotiën: de overlevingsstructuren van *Verticillium dahliae*.
Foto: A.J. Termorshuizen, Wageningen Universiteit

1.1.2 Aaltjes

De wortelknobbelaaltjes *Pratylenchus penetrans* leven vrij in de grond. Ze zijn tussen de 0,3 en 0,9 mm lang en hebben een diameter van 12 tot 25 μ m afhankelijk van het ontwikkelingsstadium. De aaltjes dringen de wortels binnen, veroorzaken de typische roodbruine symptomen op de wortel (lesies) en leggen hierin hun eieren. De eieren ontwikkelen zich via vier larvestadia tot nieuwe volwassenen. Alle stadia zijn in staat nieuwe planten te infecteren.

De levenscyclus van wortelknobbelaaltjes wijkt hier enigszins van af. Naast volwassen mannetjes, welke maar sporadisch voorkomen, is alleen het tweede larvale stadium (J2) van belang voor verspreiding en nieuwe infecties. De ontwikkeling van J2 tot volwassen vrouwtjes en nieuwe eieren speelt zich volledig in de plantenwortels af. De J2 larve heeft een diameter van 12 tot 15 μ m en is 300-400 μ m lang. Blijft een volwassen wortelknobbelaaltje aalvormig, een volwassen vrouwtje van het wortelknobbelaaltjeis ovaal- tot bolvormig en melkwit van kleur. Wortelknobbelaaltjes zetten de plant aan tot het vormen van wortelknobbels. De grootte kan variëren en is afhankelijk van de soort plant en wortelknobbelaaltje.

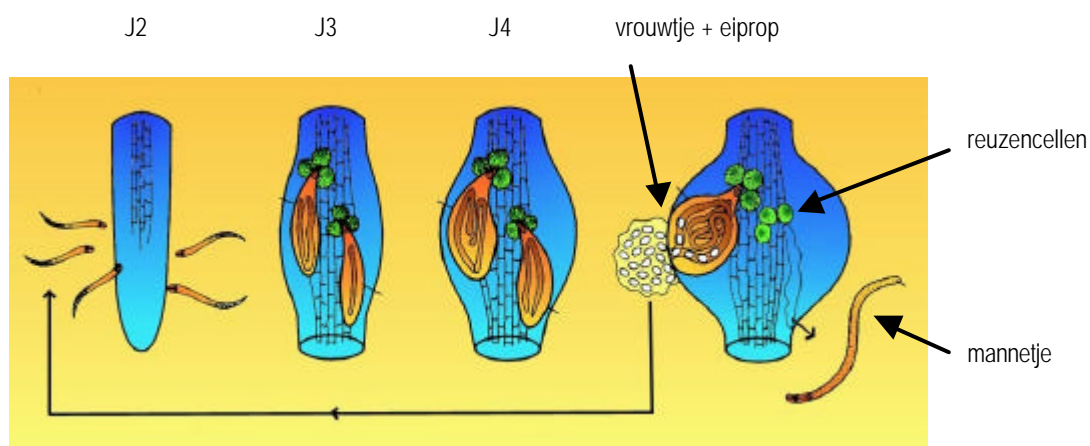


Fig.3. Levenscyclus van het wortelknobbelaaltje, *Meloidogyne*

Aaltjes kunnen zich in tegenstelling tot *Verticillium*-sporen wel actief verplaatsen. J2's van het wortelknobbelaaltje kunnen onder gunstige omstandigheden per dag een afstand van 3 tot 4 cm door de bodem afleggen (Dickson, 2002). Dit lijkt weinig, maar zou wel een verklaring kunnen zijn voor snelle herbesmetting van de bovenste grondlaag na het stomen. Verspreiding over grote afstanden vind waarschijnlijk vooral passief plaats, zoals voor *Verticillium* het geval is.

1.2 Doelstellingen

De hoofddoelstelling van dit project is vaststellen of *Verticillium* en wortelaaltjes in drainagewater van besmette percelen aanwezig zijn en wat de gevolgen zijn indien besmet water wordt hergebruikt zonder te ontsmetten.

Zowel voor het inschatten van de kans op besmetting van drainagewater, als voor het inschatten van het risico na hergebruik van besmet drainagewater op verspreiding, is het ook wenselijk informatie te verzamelen over de spreiding van deze pathogenen binnen een bedrijf.

2 Materiaal en Methoden

Om de doelstelling te bereiken is naar antwoord op de volgende vragen gezocht:

- Komen *Verticillium*-structuren en wortelaaltjes tot op de diepte van de drainagebuizen in de grond voor?
- Zijn *Verticillium*-structuren en wortelaaltjes in drainagewater aanwezig?
- Indien drainagewater besmet zou zijn: wat zou, relatief gezien, de bijdrage van hergebruik van besmet drainagewater zijn aan de totale verspreiding van de aantasting over een bedrijf?

2.1 Inventarisatie en monsternamen

Via diverse kanalen zijn chrysantentelers gezocht welke op hun bedrijf problemen hebben met *Verticillium*, wortelaaltjes, of een combinatie van beide. Van deze bedrijven is aan de hand van een vragenlijst de nodige informatie verzameld, voornamelijk betreffende het spreidingspatroon van de aantasting, de genomen bestrijdingsmaatregelen (onder meer de manier en frequentie van stomen), de geteelde cultivars en de opslag en het hergebruik van drainagewater. Op basis van de verzamelde gegevens is een verdere selectie van bedrijven gemaakt om te bemonsteren. Hierbij waren een belangrijke criteria dat de te bemonsteren grond niet recent gestoomd was en dat drainagewater opgevangen werd.

Op alle bezochte bedrijven zijn in het voorjaar zowel plant-, grond- als drainagewatermonsters verzameld. De plantmonsters werden onderzocht om zeker te zijn van de identiteit van de aanwezige ziekteverwekkers. De grondmonsters werden, waar mogelijk, genomen op dieptes van 0-30, 30-60 en 60-90 cm onder het teeltoppervlak (drainagebuizen liggen doorgaans op een diepte van 70 tot 90 cm). Het bleek in een aantal gevallen niet uitvoerbaar een grondmonster te nemen van de laag 60-90 cm door de aanwezigheid van bloemengaas. In het voorjaar en de zomer werden op meerdere tijdstippen drainagewatermonsters genomen. Drainagewater werd zoveel mogelijk bemonsterd in de drainagewaterputten.

2.2 Laboratoriumanalyses grondmonsters en drainagewater

Grond- en drainagewatermonsters werden in een kasproef en met behulp van diverse laboratoriumtechnieken onderzocht op de aanwezigheid van wortelaaltjes en *Verticillium*. Er is gekozen beide methodieken te gebruiken, omdat naar verwachting met de kasproef lagere dichtheden aantoonbaar zijn dan met behulp van laboratoriumtechnieken. Daarnaast wordt bij detectie door middel van de kasproef direct zichtbaar of eventueel gevonden besmettingen hoog genoeg zijn om schade aan het gewas te kunnen veroorzaken.

2.2.1 *Verticillium*

Grond

Verticillium vormt verschillende infectieuze structuren. Met de huidige stand van techniek was het alleen mogelijk microsclerotien (ms) aan te tonen in grondmonsters. Deze techniek bestaat kort samengevat uit de volgende stappen: grondmonster zeven, drogen, intensief over twee zeven spoelen, waarvan de laatste een poriegrootte heeft kleiner dan de afmeting van ms, de suspensie met eventueel ms uitplaten op een semi-selectieve voedingsbodem. Het drogen, zeven en de specifieke voedingsbodem dienen ervoor eventueel aanwezige sclerotien te concentreren, en tegelijkertijd andere micro-organismen die detectie kunnen verstoren zoveel mogelijk kwijt te raken. Dezelfde methode wordt ook gebruikt door Wageningen Universiteit en NAK-Tuinbouw voor detectie van *Verticillium dahliae* in grond. Van al de genomen grondmonsters werd de ms-dichtheid bepaald om de verticale verdeling te bepalen. Na afloop van de kasproef werd dezelfde methode nogmaals gebruikt om de aanwezigheid van ms in de grond waaraan drainagewater van bedrijven met *Verticillium* was toegevoegd te onderzoeken.

Drainagewater

Bij de analyse van drainagewater op de aanwezigheid van *Verticillium* zijn verschillende methoden gebruikt. Alle detectiemethoden worden beperkt door een detectielimiet: de minimale concentratie of hoeveelheid van het te detecteren pathogeen die nodig is om de aanwezigheid ervan aan te kunnen tonen. Hoe lager de detectielimiet des te beter. In eerste instantie werd gewerkt met concentreren van eventueel aanwezige *Verticillium* door een combinatie van bezinken en centrifugeren, gevolgd door uitplaten op semi-selectieve voedingsbodems (*methode a*). Hiermee zouden al de verschillende structuren van *Verticillium* aan te tonen moeten zijn waarmee de schimmel zich zou kunnen verspreiden. Deze worden in dit

geval weergegeven als kolonievormende eenheden (colony forming units: cfu's). De twee voedingsbodems die in eerste instantie gebruikt werden, bleken niet selectief genoeg te zijn voor sterk geconcentreerd drainagewater. Andere schimmels groeiden hierop zo snel dat eventueel aanwezige *Verticillium* (een langzame groeier) mogelijk niet zichtbaar werd. Om deze reden kon alleen minder geconcentreerd drainagewater gebruik worden, waardoor de gevoeligheid van de methode minder werd. Om deze reden werd een derde voedingsbodem ingezet voor de rest van de bedrijven die wel selectief genoeg bleek (b). Helaas was het niet meer mogelijk deze methode toe te passen op monsters van alle bemonsterde bedrijven. Later is aanvullend op voorafgaande voor klein aantal monsters gebruik gemaakt van een experimentele methode waarbij drainagewater, al dan niet geconcentreerd, over zeven werd gespoeld zoals met de grond-monsters gedaan werd (c respectievelijk d). Dit gaf een gunstige, zeer lage, detectielimiet, maar heeft als beperking dat er alleen microsclerotien mee gedetecteerd kunnen worden en dus niet alle structuren die *Verticillium* kan vormen. **Tabel 1** geeft een overzicht van de gebruikte methoden met bijbehorende detectie-limieten. Het was wellicht duidelijker geweest als voor alle monsters dezelfde methode gebruikt was, maar omdat gaandeweg het onderzoek gewerkt werd aan optimalisatie van de detectie was dit niet mogelijk.

Tabel 1. Analysemethoden met bijbehorende detectielimieten voor extractie van *Verticillium* uit drainagewater.

Code ¹⁾	Methode gebaseerd op	Detectie van ²⁾	Detectielimiet	Monsters onderzocht van bedrijven:
a	concentratie en uitplaten op selectieve voedingsbodems	alle cfu's	1000 cfu/L	7, 16 en 23
b	concentratie en uitplaten op selectieve voedingsbodems	alle cfu's	75 cfu/L	1, 17 en 18
c	concentratie, zeven en uitplaten op selectieve voedingsbodems	ms	14 ms/L	7, 16, 17 en 18
d	zeven en uitplaten op selectieve voedingsbodems	ms	1,3 ms/L	1 en 16

¹⁾ De letters a t/m d verwijzen naar uitleg methoden in voorgaande tekst

²⁾ cfu = colony forming unit; ms = microsclerotien

2.2.2 Wortelaaltjes

Grondmonsters werden onderzocht met behulp van een gestandaardiseerde methode, namelijk de omgekeerde melkflessenmethode (Bezooijen, 1999) in combinatie met opschoning door incubatie op filters. Extractie uit wortelmonsters werd uitbesteed aan de Plantenziektenkundige Dienst in Wageningen. Voor extractie uit drainagewater zijn verschillende methodes ingezet, waarbij combinaties van zeven, bezinken en opschoning door nematodenfilters werden gebruikt. Het gebruik van filters heeft als voordeel dat bij een relatief vuil monster de aaltjes nauwkeuriger geteld kunnen worden. Een nadeel is dat hierbij een gedeelte van eventueel aanwezige aaltjes verloren gaat waardoor de detectielimiet hoger wordt.

2.3 Kasproef

In de kasproef werden van veertien bedrijven grondmonsters en drainagewater onderzocht. Hierbij waren acht bedrijven met *Verticillium*, drie met worteltesieaaltjes en zeven bedrijven met wortelknobbelaaltjes. In meerdere gevallen kwam een combinatie van beide soorten wortelaaltjes of *Verticillium* en wortelaaltjes voor. De proef was opgedeeld in een *Verticillium*- (Tabel 2) en een aaltjesgedeelte (Tabel 3). Er werd een volledige teelt uit-gevoerd met respectievelijk een *Verticillium*-gevoelig (*Green Peas*) en een voor aaltjes vatbaar cultivar (*Reagan White Elite Arie*).

Verticillium-behandelingen (V)

- V1. 0-30 cm, onbehandeld grondmonster
- V2. 60-90 cm, onbehandeld grondmonster (indien verzameld)
- V3. 0-30 cm, gestoomde grond + drainagewater
- V4. 0-30 cm, gestoomde grond (controle)
- V5. 0-30 cm, gestoomde grond + *Verticillium*-suspensie (controle)

Aaltjes-behandelingen (A):

- A1. 0-30 cm, onbehandeld grondmonster
- A2. 60-90 cm, onbehandeld grondmonster (indien verzameld)
- A3. 0-30 cm, gestoomde grond + drainagewater
- A4. 0-30 cm, gestoomde grond (controle)

Behandelingen V1, V2, A1 en A2 waren bedoeld om een beeld te krijgen van de hoeveelheid *Verticillium* en aaltjes in de bovenlaag en op diepte van de drainagebuizen. Voor behandelingen V3 en A3 werd 100 liter drainagewater gefilterd met een zeef met een poriegrootte van 25 µm. Wat achter bleef op de zeef werd geresuspendeerd in 2 liter drainagewater en gelijk verdeeld over beide gedeelten van de kasproef. Deze behandelingen zouden een besmetting van drainagewater met *Verticillium* of aaltjes zichtbaar moeten maken. V4 en A4 waren controle-behandelingen om eventuele herbesmetting vanuit andere bronnen of behandelingen aan te tonen en V5 was bedoeld om de symptoomontwikkeling van *Verticillium* op chrysant vanaf de begin-aantasting te kunnen volgen als vergelijkingsmateriaal voor de andere *Verticillium*-behandelingen. Voor deze kunstmatige besmettingen werden telkens 10⁹ conidiën van het *Verticillium*-isolaat van het bijbehorende bedrijf gebruikt.

'Gestoomde grond' was grond die 1 uur op 115 °C werd gehouden in een stoomketel bij PPO. Dit zou ruim voldoende moeten zijn om aaltjes en *Verticillium* te doden. Alle behandelingen werden in drievoud uitgevoerd, namelijk drie containers (17 cm) met elk één chrysantenplant. Voedingsoplossing werd gegeven m.b.v. druppelleidingen.

Tabel 2. *Verticillium*-behandelingen in kasproef

Bedrijf	Pathogenen ¹⁾	Grondsoort	Behandeling ²⁾
1	V, P	lichte klei	V1 0-30
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd
7	V, P, M	zand	V1 0-30
			V2 60-90
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd
8	V	zavel	V1 0-30
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd
12	V	klei	V1 0-30
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd
15	V	klei	V1 0-30
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd
16	V	klei	V1 0-30
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd
17	V	zavel/klei	V1 0-30
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd
18	V	zavel	V1 0-30
			V2 60-90
			V3 drainagewater
			V4 onbesmet
			V5 conidiën toegevoegd

¹⁾ V = *Verticillium*, M = *Meloidogyne*, P = *Pratylenchus*

²⁾ Grond voor de behandelingen V3, V4 en V5 is gedurende 1 uur geautoclaveerd bij 115°C

De chrysantenstekken werden in week 18 geplant. In week 20 werd waar nodig drainagewater en *Verticillium*-inoculum toegevoegd. Vanaf week 22 werd het gewas wekelijks bovengronds beoordeeld op ziektesymptomen. Om wortelrot door *Pythium* tegen te gaan werd elke container enkele dagen na het planten aangegoten met ca. 80 ml oplossing AAterra (2 g/L) en vervolgens met water licht na gebroest om bladverbranding te voorkomen. Verder zijn geen fungiciden toegevoegd en zijn insecten en mijten zoveel mogelijk biologisch bestreden. De ingestelde temperatuur was 19 °C overdag en 20 °C 's nachts wat een gemiddelde etmaaltemperatuur gaf van 21.6 graden en een RV van 68%. Er werd een voedingsoplossing gebruikt met pH 5.2 en EC 2.3. Aan het eind van de teelt (week 30) werden zowel de bovengrondse plantdelen als het wortelstelsel van alle planten beoordeeld. Ter controle werden van een aantal planten met *Verticillium*-symptomen plantdelen uitgelegd op voedingsbodems om te kijken of daadwerkelijk *Verticillium* in de plant aanwezig was en werden aaltjes geextra-heerd uit wortels van planten uit het aaltjesgedeelte van de proef. Van de grond van de aaltjesbehandelingen werd ook de einddichtheid (Pf) van de aaltjespopulatie in de grond bepaald. Voor het *Verticillium*-gedeelte werd de grond uit de kasproef waaraan drainagewater was toegevoegd onderzocht op aanwezigheid van microscle-rotiën.

Tabel 3. Aaltjes-behandelingen in kasproef

Bedrijf	Pathogenen ¹⁾	Grondsoort	Behandeling ²⁾
1	P, V	lichte klei	A1 0-30 A3 drainagewater A4 onbesmet
2	M	zand	A1 0-30 A3 drainagewater A4 onbesmet
7	P, M, V	zand	A1 0-30 A2 60-90 A3 drainagewater A4 onbesmet
11	M	zware klei	A1 0-30 A2 60-90 A3 drainagewater A4 onbesmet
13	M	zand	A1 0-30 A2 60-90 A3 drainagewater A4 onbesmet
14	M	zand	A1 0-30 A3 drainagewater A4 onbesmet
19	M	zand	A1 0-30 A3 drainagewater ³⁾ A4 onbesmet
20	M	zand/zavel	A1 0-30 A2 60-90 A3 drainagewater A4 onbesmet
21	P	zand	A3 drainagewater

¹⁾ V = *Verticillium*, M = *Meloidogyne*, P= *Pratylenchus*

²⁾ Grond voor de behandelingen A3 en A4 werd gedurende 1 uur gestoomd bij 115°C.

Bij de overige behandelingen is grond verzameld uit de grondlagen 0-30 cm en 60-90 cm.

³⁾ Niet uitgevoerd omdat in de 0-30 cm bovenlaag geen aaltjes werden gevonden

2.4 Overleving microconidiën *Verticillium* in drainagewater

Voor het bepalen van het verloop van de kiemkracht van conidiën in drainagewater werd aan erlenmeijers met ieder 200 ml drainagewater van een chrysantenbedrijf concentratiereeksen conidiën aangebracht (0, 10⁵ 10⁶ en 10⁷ conidiën per liter, allen in duplo). De erlemeijers werden geïncubeerd bij 20 °C op een langzaam draai-end schudplateau (40 rpm). Het draaien diende om de zuurstoftoevoer die in de praktijk plaatsvindt door het binnenkomen van water en het weggepompt worden van water uit de drainageput zo goed mogelijk na te bootsen. Op dag 0, 1, 3, 7, 14 en 21 na de start van de incubatie werden monsters genomen en in duplo uitgeplaat op selectieve voedingsbodems (Ethanol-agar- en MSEA-medium) om op deze manier de hoeveelheid kolonievormende eenheden (cfu's) te kunnen volgen.

3 Resultaten

3.1 Inventarisatie en monstername

De belangrijkste feiten die uit de interviews met telers naar voren kwamen waren de volgende:

De spreiding van zowel *Verticillium* als wortelaaltjes verschilt sterk tussen bedrijven. Sommige telers vertelden dat aantasting door *Verticillium* ofwel wortelaaltjes over het hele bedrijf aanwezig was, anderen gaven aan dat het duidelijk om een beperkt aantal plekken ging. Bij pleksgewijze aantasting was soms sprake van plekken over het hele bedrijf verspreid, andere keren waren de plekken geconcentreerd in een gedeelte van het bedrijf (bijvoorbeeld een aantal tralies). Bij meerdere telers kwam aantasting vooral voor op specifieke plekken, zoals langs het pad of rondom de palen van de kasconstructie. Dit laatste wijst op herkolonisatie van de teeltlaag vanuit plekken die bij het stomen niet goed bereikt worden.

Stomen werd op vrijwel alle bij dit onderzoek betrokken bedrijven toegepast. De frequentie varieerde van één tot drie keer per jaar. Een krappe meerderheid maakte hierbij gebruik van afzuigdrainage. Hiervoor liggen dan buizen op een diepte van 50-80 cm waardoor lucht afgezogen wordt tijdens het stomen met de bedoeling dat de stoom zo de grond beter doordringt. De duur van stomen varieerde behoorlijk en zo ook de tijd dat het stomen aantasting tegenging. In sommige gevallen kwam zelfs in de ronde na het stomen nog aantasting voor (*Verticillium*), in andere gevallen bleven de problemen langer dan een half jaar uit. De oorzaak van deze verschillen is niet onderzocht, maar het kan te maken hebben met o.a. de grondsoort, duur van het stomen, manier van stomen, ernst van de besmetting, spreiding van de populatie ziekteverwekkers in de diepte, de gebruikte cultivars, etc.

De geplande bemonstering van grond tot 90 cm diep bleek op een aantal bedrijven niet uitvoerbaar doordat de bloemengas nog boven of op de grond aanwezig was. Gebruik van een grondboor (palenboor i.v.m. de benodigde volumes) zou dit gedeeltelijk kunnen ondervangen, maar deze methode van monstername moest zoveel mogelijk vermeden worden omdat dit een hoger risico geeft op vermenging van grond van de verschillende lagen dan het gebruik van een spade. Slechts bij uitzondering is daarom een palenboor gebruikt.

Analyse van verzamelde planten met *Verticillium*-symptomen liet zien dat het in alle gevallen *Verticillium dahliae* in de plant aanwezig was.

3.2 Laboratoriumanalyses grondmonsters en drainagewater

3.2.1 *Verticillium*

Grond

Uit de metingen (**Tabel 4**) blijkt dat de microsclerotiën tot op een diepte van 90 cm voor kunnen komen. De verdeling over de diepte varieert tussen de bedrijven. Het is in ieder geval niet zo dat steeds geldt dat dieper minder microsclerotiën voorkomen dan in de toplaag van 30 cm. Het valt op dat in veel gevallen niets is aan-getoond. Dit heeft ten eerste te maken met de gevoeligheid van de methode: uit ervaring met andere gewassen is bekend dat aantasting in het gewas niet altijd betekent dat de dichtheid microsclerotiën op een detecteerbaar niveau ligt. Ten tweede is slechts op één of twee plekken per bedrijf bemonsterd.

Tabel 4. *Verticillium*. Microsclerotiën in grond van besmette bedrijven op verschillende dieptes

Bedrijf	Grondsoort	Diepte (cm)	Microsclerotiën per gram grond
1 (plek a)	lichte klei	0-30	< 0.9 ¹⁾
		30-60	< 0.9
1 (plek b)	lichte klei	0-30	< 0.9
		30-60	< 0.9
		30-60	< 0.9
7 (plek a)	zand	0-30	2
		30-60	< 0.9
		60-90	< 0.9
7 (plek b)	zand	0-30	17
		30-60	< 0.9
		60-80	< 0.9
8	zavel	0-30	2
		30-60	< 0.9
12	klei	0-30	< 0.9
		30-60	1
		60-70	< 0.9
15	klei	0-30	2
		30-60	< 0.9
		60-90	2
16	klei	0-30	2
		30-60	28
		60-90	1
17 (plek a)	zavel/klei	0-30	< 0.9
		30-60	< 0.9
		60-90	< 0.9
17 (plek b)	zavel/klei	0-30	< 0.9
		30-60	2
18	zavel	0-30	2
		30-60	< 0.9
		60-80	< 0.9
		80-90	< 0.9

¹⁾ Een waarde < 0.9 betekent dat geen microsclerotiën aangetoond zijn, dus dat de dichtheid lager is dan de detectielimiet van 0.9 microsclerotiën per gram grond.

Drainagewater

Tabel 5. *Verticillium* in drainagewatermonsters, resultaten gegroepeerd per analysemethode

Methode	Methode gebaseerd op ¹⁾	Detectie van	Detectielimiet	Bedrijf	Resultaat (cfu/L óf ms/L) ²⁾
a	concentratie en uitplaten op selectieve voedingsbodems	alle cfu's	1000 cfu/L	7	< 1000 cfu/L
				16	< 1000 cfu/L
				23	< 1000 cfu/L
b	concentratie en uitplaten op selectieve voedingsbodems	alle cfu's	75 cfu/L	1	< 75 cfu/L
				17	< 75 cfu/L
				18	< 75 cfu/L
c	concentratie, zeven en uitplaten op selectieve voedingsbodems	ms	14 ms/L	7	< 14 ms/L
				16	< 14 ms/L
				17	71 ms/L
				18	< 14 ms/L
d	zeven en uitplaten op selectieve voedingsbodems	ms	1,3 ms/L	1	< 1,3 ms/L
				16	< 1,3 ms/L

¹⁾ Meer uitleg over de methoden is te vinden in paragraaf 2.2.1.

²⁾ cfu = colony forming unit = totaal van infectieuze *Verticillium*-sporen/-structuren; ms = microsclerotien. Een waarde met aanduiding < betekent dat er geen *Verticillium* is aangetoond en er dus minder dan de geldende detectielimiet in het monster aanwezig was.

Tabel 6. *Verticillium* in drainagewatermonsters, resultaten gegroepeerd per bedrijf

Bedrijf	Methoden ¹⁾	Resultaat (cfu/L óf ms/L) ²⁾
1	b	< 75 cfu/L
	d	< 1,3 ms/L
7	a	< 1000 cfu/L
	c	< 14 ms/L
16	a	< 1000 cfu/L
	c d	< 1,3 ms/L
17	b	< 75 cfu/L
	c	71 ms/L
18	b	< 75 cfu/L
	c	< 14 ms/L
23	a	< 1000 cfu/L

¹⁾ Meer uitleg over de methoden is te vinden in paragraaf 2.2.1.

²⁾ cfu = colony forming unit = totaal van infectieuze *Verticillium*-sporen/-structuren; ms = microsclerotien. Een waarde met aanduiding < betekent dat er geen *Verticillium* is aangetoond en er dus minder dan de geldende detectielimiet in het monster aanwezig was.

Met deze analyses (tabel 5 en 6) is alleen bij bedrijf 17 éénmaal *Verticillium* aangetoond in het drainagewater. Als op de andere bedrijven *Verticillium* in het drainagewater aanwezig zou zijn, zouden de concentraties in ieder geval onder de in de tabel aangegeven detectielimieten liggen.

3.2.2 Wortelaaltjes

Grond

Vrijwel overal waar aaltjes verwacht werden, werden deze in de grond gevonden (**Tabel 7**). Zoals ook voor *Verticillium* gevonden werd, komen wortelaaltjes herhaald voor tot op de diepte van de drainagebuizen (60 – 90 cm). De dichtheden waren hier vergeleken met de bovenste 30 cm relatief laag. De gevonden dichtheden wortelknobbelaaltjes op bedrijven 11, 14 en 20 zijn opvallend hoog te noemen. Dit geldt voor geen van de gevonden dichtheden wortellesie-aaltjes.

Tabel 7. Wortelaaltjes. Dichtheden in grond op verschillende diepten van bedrijven met problemen met wortelaaltjes en/of *Verticillium*.

Bedrijf	Pathogeen ¹⁾	Grondsoort	Diepte (cm)	Aantal wortelaaltjes per 100 ml grond	
				<i>Meloidogyne</i>	<i>Pratylenchus</i>
1 (plek a)	P + V	lichte klei	0-30	0	10
			30-60	0	0
1 (plek b)	P + V	lichte klei	0-30	0	60
			30-60	0	10
2	M	zand	0-30	45	0
7 (plek a)	P	zand	0-30	5	45
			30-60	0	20
			60-90	0	20
7 (plek b)	V	zand	0-30	25	10
8	V	zand	0-30	0	0
11	M	zware klei	0-30	2010	0
			30-60	25	0
			60-90	5	0
12	V	klei	0-30	0	0
13	M	zand	0-30	385	0
			30-60	0	0
			60-90	5	0
14	M	zand	0-30	820	0
15	V	klei	0-30	0	0
16	V	klei	0-30	0	0
17	V	klei/zavel	0-30	0	0
18	V	zavel	0-30	0	0
19	M ²⁾	zand	0-30	0	0
			30-60	0	0
20	M	zand	0-30	935	0
			30-60	20	0
			60-90	0	0

¹⁾ Verwachting teler; M = *Meloidogyne* (wortelknobbelaaltje); P = *Pratylenchus* (wortellesieaaltje), V= *Verticillium*

²⁾ Op het moment van monsternamen geen bovengrondse symptomen gevonden

Drainagewater

In het drainagewater van drie bedrijven zijn wortelknobbelaaltjes gevonden (**Tabel 8**). Op twee bedrijven waren dit dode aaltjes en op het derde bedrijf (nr.7) werden twee maal levende wortelknobbelaaltjes gevonden. De aangetoonde aantallen levende aaltjes in het drainagewater zijn erg laag, maar tonen wel aan dat wortelaaltjes in drainagewater voor kunnen komen.

Tabel 8. Wortelaaltjes. Hoeveelheden in drainagewater van bedrijven met aantasting door wortelaaltjes

Onderzocht volume:	2 liter ¹⁾	100 liter ²⁾	10 liter ³⁾
Bedrijf	M of P ⁴⁾	M of P	M of P
1	0	0	0
2	0	0	-
7	0	3 M	4 M
11	40 dode M	0	0
13	0	0	-
14	10 dode M	0	-
19	0	-	-
20	0	0	0
21	- ⁵⁾	0	-

¹⁾ Verzameld in april 2002

²⁾ Verzameld in mei 2002

³⁾ Verzameld in augustus 2002

⁴⁾ M = *Meloidogyne* spp. (wortelknobbelaaltjes); P = *Pratylenchus* spp. (wortellesieaaltjes)

⁵⁾ -- betekent: niet onderzocht

3.3 Kasproef

3.3.1 *Verticillium*

Bij beëindiging van de kasproef werd van alle planten in het *Verticillium*-gedeelte de mate van aantasting bepaald aan de hand van een ziekte-index (Tabel 9).

Tabel 9. *Verticillium*. Aantasting aan het einde van de teelt.

Bedrijf	Grondsoort	Behandeling ¹⁾	ziekte-indexcijfer ²⁾		
			plant 1	plant 2	plant 3
1	lichte klei	V1 0-30	2	2	2
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	0
		V5 conidiën toegevoegd	3	3	3
7	zand	V1 0-30	3	3	3
		V2 60-90	0	0	0
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	0
8	zavel	V1 0-30	3	3	3
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	0
		V5 conidiën toegevoegd	3	3	3
12	klei	V1 0-30	2	2	1
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	0
		V5 conidiën toegevoegd	2	2	1
15	klei	V1 0-30	3	3	3
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	1
		V5 conidiën toegevoegd	2	2	3
16	klei	V1 0-30	3	3	3
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	0
		V5 conidiën toegevoegd	3	3	3
17	zavel/klei	V1 0-30	3	3	3
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	0
		V5 conidiën toegevoegd	3	3	3
18	zavel	V1 0-30	3	3	3
		V2 60-90	2	2	3
		V3 drainagewater	0	0	0
		V4 onbesmet	0	0	0
		V5 conidiën toegevoegd	3	3	2

¹⁾ V1: 0-30 cm, onbehandeld grondmonster, V2: 60-90 cm, onbehandeld grondmonster (indien verzameld), V3: 0-30 cm, gestoomde grond + drainagewater, V4: 0-30 cm, gestoomde grond (controle), V5: 0-30 cm, gestoomde grond + *Verticillium*-suspensie (controle).

²⁾ Betekenis indexcijfers: 0 = gezond, 1 = zeer licht aangetast of aantasting niet duidelijk, 2 = aangetast, tot 50% verwelking of afsterving, 3 = zwaar aangetast, > 50% verwelking of afsterving.

Over het geheel genomen verliep de symptomontwikkeling als volgt. Aantasting werd het eerst zichtbaar in behandeling V5, ofwel de kunstmatig besmette containers. Dit was gemiddeld 2-3 weken na besmetting (besmetting werd twee weken na oppotten uitgevoerd). Ongeveer vier weken later volgden de planten in onbehandelde grond van de laag 0-30 cm. Chrysanten in grond van de laag 60-90 cm van bedrijf 7 vertoonden geen symptomen. Op grond van dezelfde diepte, maar dan van bedrijf 18

ontstonden wel symptomen van *Verticillium*, maar pas in week 29-30, de laatste weken van de teelt.

In de controlebehandeling met gestoomde grond (V4) kwam één besmette plant voor. De oorzaak van deze enkele aantasting is onbekend. In de behandelingen met mogelijk besmet drainagewater werd geen enkele aangetaste plant gevonden.

Omdat in geen van de behandelingen met drainagewater aantasting is gevonden, werd de grond uit deze behandelingen nader onderzocht op aanwezigheid van microsclerotien. Deze werden alleen in de grond van bedrijf 15 in een lage dichtheid (1.8 ms/gram grond) aangetroffen. Dit kan betekenen dat het toegevoegde drainagewater besmet geweest is, maar in zo een lage dichtheid dat er geen zichtbare aantasting door veroorzaakt werd.

3.3.2 Wortelaaltjes

Bij het beoordelen van de wortelstelsel (**Tabel 10**) werd duidelijk dat veel meer planten aangetast waren, dan wat aan de hand van bovengrondse symptomen werd vermoed. In de grond van 0-30 cm van alle meegenomen bedrijven, behalve bedrijf 19, waren wortels geïnfecteerd met aaltjes. Ook de wortels in de grond van 60-90 cm raakten geïnfecteerd, wat aantoont dat tot op de diepte van drainagebuizen ook aaltjesdichtheden voorkomen die voldoende hoog zijn voor infectie. Op één bedrijf (20) was er op de betreffende diepte zelfs geen beginbesmetting aangetoond. Nagenoeg in alle behandelingen met aaltjes was de eindbesmetting hoger dan de beginbesmetting. De chrysanten op grond 0-30 cm van bedrijf 20 vormden hierop een uitzondering. Hier was de eindbesmetting bijna vijf maal lager dan de beginbesmetting. Dit is te verklaren door het snelle afsterven van de wortels van deze planten. Door voedselgebrek hebben onvoldoende aaltjes zich kunnen vermeerderen en/of is een groot deel van de aaltjes afgestorven voor het einde van de teelt.

Op sommige wortelstelsels kwamen wortellessies voor, terwijl er in deze grond geen wortellessie-aaltjes verwacht werden. In deze gevallen werden ook geen aaltjes in de wortels aangetoond. Dit wijst erop dat hier de lesies door een andere oorzaak ontstaan zijn, mogelijk door *Pythium*.

Eénmalig toevoegen van drainagewater leidde in geen geval tot infectie van de wortels, wat bevestigt dat hierin geen grote hoeveelheden aaltjes aanwezig waren. In de controlebehandeling met gestoomde grond werd geen enkele aantasting gevonden.

Tabel 10. Wortelaaltjes. Besmetting in wortels en wortelsymptomen aan het einde van de teelt.

Bedrijf	Grondsoort	Grond ¹⁾	Beginbesmetting Pi ³⁾		Eindbesmetting Pf ⁴⁾		Wortelsymptomen	
			Melo	Praty	Melo	Praty	Specifiek	Beworteling
1	lichte klei	A1 0-30	0	10	0	1875	lesies	slecht
		A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
2	zand	A1 0-30	45	0	10	0	lesies	matig
		A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
7	zand	A1 0-30	5	45	0	6504	lesies	slecht
		A2 60-90	0	20	0	7752	lesies	goed
		A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
11	zware klei	A1 0-30	2010	0	11.900	0	knobbels + lesies ⁵⁾	matig
		A2 60-90	5	0	468	0	knobbels	redelijk-goed
		A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
13	zand	A1 0-30	385	0	1880	0	knobbels	slecht
		A2 60-90	5	0	45	0	geen	redelijk
		A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	redelijk-goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
14	zand	A1 0-30	820	0	975	0	knobbels	matig
		A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
19	zand	A1 0-30	0	0	0	0	geen	matig
		A3 drainagewater	- ⁵⁾	-	-	-	geen	goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
20	zand/zavel	A1 0-30	935	0	193	0	knobbels	erg slecht
		A2 60-90	0	0	430	0	lesies ²⁾	redelijk-goed
		A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	goed
		A4 onbesmet	0	0	0	0	geen	goed
21 ⁶⁾	zand	A3 drainagewater	0	0	0	0	geen	goed

¹⁾ Grond voor de behandelingen A3 en A4 is gedurende 1 uur geautoclaveerd bij 115°C. Bij de overige behandelingen is besmette grond verzameld uit de grondlagen 0-30 cm en 60-90 cm.

²⁾ Geen *Pratylenchus* d.m.v. wortelextractie gevonden, dus zeer waarschijnlijk lesies veroorzaakt door ander pathogeen

³⁾ Pi = aantal aaltjes/100 ml grond tijdens oppotten (2/5/2002) of aantal aaltjes/plant via drainwater toegediend (17/5/2002).
Melo = *Meloidogyne* spp.; Praty = *Pratylenchus* spp.

⁴⁾ Pf = aantal aaltjes/10 g wortels

⁵⁾ Niet uitgevoerd omdat in 0-30 cm bovenlaag geen aaltjes werden gevonden.

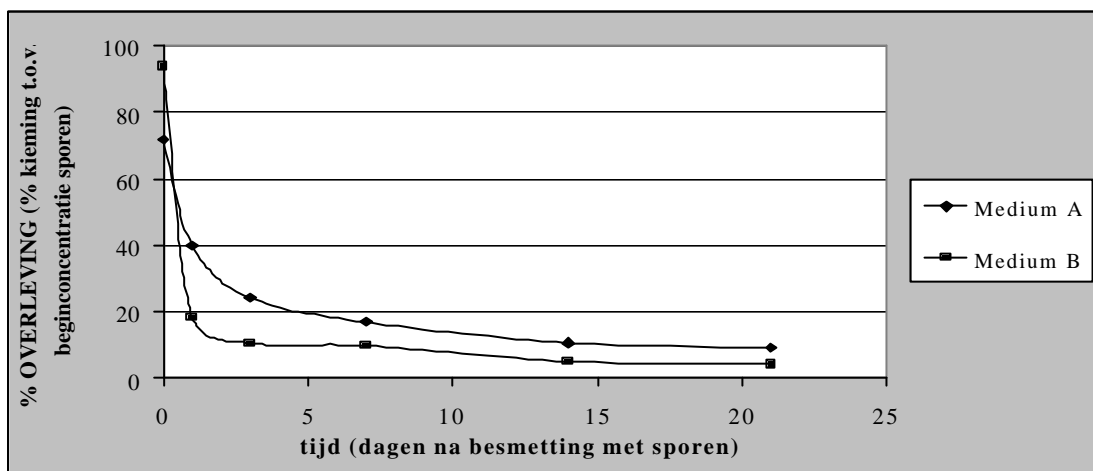
⁶⁾ Alleen grond omdat dit bedrijf pas op het laatste moment toegevoegd is. Hierdoor ontbrak de mogelijkheid tot grondmonsternamen

De eerste bovengrondse symptomen van aantasting werden zichtbaar in de zwaar met wortelknobbelaaltjes besmette grond van bedrijf 20. Eén van de drie planten in grond van 0-30 cm ging halverwege de teelt al dood, de andere twee bleven zeer sterk achter in groei en waren zeer licht van kleur. In de grond van 60-90 cm van hetzelfde bedrijf bleef een chrysant achter in bloei. De enige andere behandeling waarbij bovengrondse symptomen ontstonden was die met grond van 0-30 cm van bedrijf 7. Hierop vergeelden 1-2 weken voor de oogst twee planten.

3.4 Overleving microconidiën *Verticillium* in drainagewater

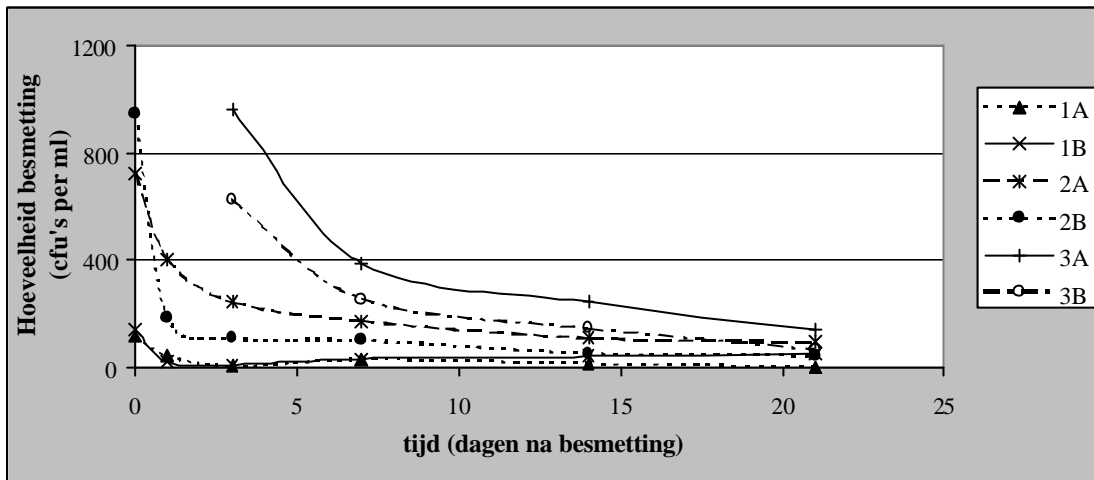
De concentratie kolonievormende eenheden (cfu's) nam de eerste drie dagen na besmetting af met 80% tot 90% van het aantal toegevoegde sporen. Hierna zette de afname langzaam door en na 21 dagen was de hoeveelheid cfu's t.o.v. de beginbesmetting nog maar 4 respectievelijk 9%, afhankelijk van de gebruikte methode. **Figuur 4** geeft de overleving van *Verticillium* conidiën weer. Hiervoor werd de hoeveelheid kiem-krachtige *Verticillium*-structuren (cfu's) gemeten.

Fig. 4. *Verticillium*. Verloop van de hoeveelheid kolonievormende eenheden (cfu's) bij uitplaten op twee semi-selectieve voedingsbodems (A = Ethanolagarmedium, B = MSEA medium) als percentage van de hoeveelheid toegevoegde conidiën bij een beginbesmetting van 1000 conidiën per ml.



Bij alle drie concentraties toegevoegde conidiën (**Figuur 5**) vindt in de eerste drie dagen een sterke afname van de kieming plaats en na drie weken lijken ze op eenzelfde niveau uit te komen. Er lijkt ofwel een stabiel laag niveau bereikt te worden, onafhankelijk van de hoeveelheid toegevoegde conidiën ofwel een langzame afname tot nul plaats te gaan vinden. In ieder geval bleven onder de proefomstandigheden tot drie weken na besmetten kiemkrachtige sporen of andere kiemkrachtige structuren aanwezig wat de kans op verspreiding door drainage-water in geval van besmetting met conidiën vergroot.

Fig. 5. *Verticillium*. Verloop van het aantal kolonievormende eenheden (cfu's) per ml drainagewater op twee semi-selectieve voedingsbodems (A = Ethanolagarmedium, B = MSEA medium), na toevoeging van verschillende concentraties conidiën (100 (1), 1000 (2) en 10.000 (3) per ml). Bij besmetting met de hoogste dichtheid (10.000 cfu per ml) was op de dagen 0 en 1 de concentratie cfu's nog te hoog om te tellen.



4 Conclusies en Discussie

Grond

Verticillium-structuren en aaltjes kwamen op een aantal van de onderzochte bedrijven tot op de diepte van de drainagebuizen (60-90 cm) voor. De verdeling van beide over de verschillende lagen verschilt sterk tussen bedrijven. Bij *Verticillium* is soms de dichtheid in de bovenlaag het hoogst, soms juist in diepere lagen. Bij wortelaaltjes zijn de dichtheden op 60-90 cm doorgaans erg laag (0-5 per 100 ml grond) t.o.v. de bovenste 30 cm (10 tot 2010 per 100 ml grond). Toch waren de dichtheden van zowel *Verticillium* als aaltjes op 60-90 cm diepte in een aantal gevallen hoog genoeg om aantasting te veroorzaken wanneer het gewas in deze grond geplant werd. De ernst van de aantasting was dan doorgaans wel minder dan in grond van 0-30 cm. Het voorkomen van de ziekteverwekkers op deze diepte geeft aan dat er een risico bestaat, dat de gevonden structuren in drainagewater terecht komen. Voor aaltjes lijkt dit risico groter dan voor *Verticillium*, omdat aaltjes actief door de grond bewegen. Ten tweede geeft het voorkomen van de pathogenen op deze diepten ook aan dat herkolonisatie van de bovenlaag van onderuit na een stoombeurt bij een aantal bedrijven wel eens een grote rol zou kunnen spelen. Dit is binnen dit project echter niet nader onderzocht.

Dat soms niets werd gevonden in grond waarop wel aantasting voorkwam laat zien dat de detectielimiet, de gevoeligheid, van de gebruikte methode niet laag genoeg is om de minimale dichtheid microsclerotien die aantasting kan veroorzaken aan te tonen, of (maar onwaarschijnlijk) dat andere *Verticillium*-structuren een belangrijke rol spelen in de grond. Ook voor aaltjes geldt dat in grond waarin deze niet aangetoond werden, meerdere keren wel aantasting voorkwam. Dit wijst erop dat de detectielimiet hoger ligt dan de minimale dichtheid nodig voor aantasting. Dit betekent, dat om alle dichtheden aaltjes of *Verticillium* in grond die aantasting kunnen veroorzaken aan te tonen er gevoeligere detectiemethoden nodig zijn. Als met de huidige technieken er niets aangetoond wordt, wil dat dus niet altijd zeggen dat de populatie *Verticillium* of aaltjes niet groot genoeg is voor het veroorzaken van aantasting.

Wil men weten of er schade (aantastin geeft niet altijd schade) verwacht kan worden van wortelknobbelaaltjes die aan het begin van de teelt in de bovenlaag aanwezig zijn, dan is monsternamen meer betrouwbaar. Uit re-cent onderzoek is gebleken dat een beginpopulatie tussen 41 en 145 aaltjes per 100 ml grond genoeg is om in een gevoelig cultivar schade aan te richten (Amsing *et al*, 2002). Wel moet hierbij bedacht worden dat gedurende de teelt een niet-schadelijke populatie zich kan vermenigvuldigen tot een populatie die wel schade kan veroorzaken in een volgende teelt.

Drainagewater

Verticillium zou voornamelijk passief, met waterstromen, vanuit de grond in drainagebuizen terecht kunnen komen. Wortelaaltjes zowel passief als actief, wat de kans groter maakt. Er werden twee maal levende wortelaaltjes in drainagewater gevonden. Hiermee kan met zekerheid gezegd worden dat ze op sommige bedrijven in drainagewater voorkomen. De gevonden dichtheden waren echter laag (3 in 100 liter en 4 in 10 liter). Eénmalig toevoegen van drainagewater van bedrijven met besmette grond leidde in geen geval tot aantasting in het gewas. *Verticillium* werd éénmaal in het drainagewater van één van de onderzochte bedrijven gevonden en éénmaal in gestoomde grond waaraan in de kasproef drainagewater van een besmet bedrijf was toegevoegd (de planten op deze grond waren gezond). Het lijkt er dus op dat ook *Verticillium* in lage dichtheden in drainagewater voor kan komen, maar het bewijs hiervoor is zeer minimaal. Uit de overlevingstest met conidiën van *Verticillium* bleek dat als conidiën in drainagewater terecht komen dat het water minimaal drie weken lang besmet kan blijven, wat langer is dan verwacht werd en daarmee de kans op verspreiding zou vergroten.

Verspreiding met drainagewater

Drainagewater wordt over de hele kas verspreid. Daarom kan besmet drainagewater 'schone' plekken besmetten met aaltjes of *Verticillium*. Theoretisch kan één aaltje of één microsclerotium al voldoende zijn om een nieuwe besmette plek te veroorzaken, maar in proeven met diverse gewassen moeten bij een éénmalige besmetting vaak tot duizenden sporen of tientallen tot honderden aaltjes per plant worden toegevoegd om binnen een teelt of teeltseizoen aantasting te veroorzaken. Zijn er grote stukken grond binnen het bedrijf waar geen besmetting aanwezig is, dan kan het hergebruik dus nieuwe plekken besmetten. Is echter al over het hele bedrijf verspreid besmetting aanwezig (al dan niet pleksgevijs) dan zal waarschijnlijk de hoeveelheid *Verticillium* of aaltjes die eventueel met drainagewater verspreid wordt, niet van betekenis zijn t.o.v. de besmetting door andere

oorzaken.

Direct na stomen zou besmet drainagewater kunnen bijdragen aan de eerste herbesmetting van de bovenlaag. Herkolonisatie van onderuit speelt echter zeer waarschijnlijk een veel grotere rol, die een korte tijd na het stomen, de rol van eventuele besmetting door drainagewater ver zal overtreffen. Hoe snel herkolonisatie van onderaf plaatsvindt is niet onderzocht, maar het zal afhankelijk van o.a. de dichtheden in de diepere lagen en de manier van stomen waarschijnlijk een kwestie van maanden zijn. In onderzoek betreffende de grondteelt van rozen werd aangetoond dat een half jaar na stomen de eerste aaltjes weer in de grondlaag 0-30 cm aanwezig waren (Amsing, 1984). Drainagewater lijkt in veel gevallen niet het grootste risico voor de totale verspreiding van *Verticillium* of aaltjes binnen een bedrijf. Versleping van grond door schoeisel, gereedschappen, machines etc. lijkt in veel gevallen een groter risico met zich mee te brengen, omdat in de bovenste grondlaag de dichtheid van ziekteverwekkers vaak erg hoog is.

Inschatten risico

Concluderend blijkt dat niet-onstmet drainagewater wel bij kan dragen aan verspreiding van *Verticillium* en aaltjes, maar hierin gezien de lage gevonden dichtheden geen overheersende rol lijkt te kunnen spelen. Omdat preciese kennis omtrent de relatie tussen dichtheid van *Verticillium* en aaltjes in water (of grond) en aantasting van chrysant ontbreekt en omdat huidige detectietechnieken niet in alle gevallen schadelijke dichtheden *Verticillium* aan kunnen tonen, is helaas niet in getallen of percentages weer te geven bij welke dichtheden in drainage-water of grond van diepere lagen, welk risico op aantasting na hergebruik van drainagewater gelopen wordt.

Om toch zo goed mogelijk een bedrijfsspecifieke inschatting van het risico te kunnen maken, is goede kennis van spreiding over het betreffende bedrijf (zowel wat diepte en het bedrijfsoppervlak betreft) nodig. Hierbij is het laten onderzoeken van grondmonsters van verschillende diepten, zoals ook in dit onderzoek gedaan is, een goed hulpmiddel. Onderzoek van drainagewater is technisch gezien ook mogelijk, maar een eventuele besmetting zal (voornamelijk in het geval van *Verticillium*) gezien de verwachte lage dichtheden en de beperkte gevoeligheid van de detectietechnieken in veel gevallen niet aangetoond kunnen worden.

Op basis van kennis over de spreiding en met de informatie uit dit verslag moet het dan mogelijk zijn een bedrijfsspecifieke afweging te maken. Wat geen onderdeel was van dit onderzoek, maar dan ook bekeken zou moeten worden is een kosten-baten analyse van de verschillende opties. Wordt de conclusie getrokken dat ontsmetting van drainagewater gewenst is, dan zijn verschillende ontsmettingsmethoden voor handen om zonder risico op verspreiding van schimmels en aaltjes drainagewater te hergebruiken. Om elk risico uit te sluiten is het niet hergebruiken van drainagewater zonder ontsmetten natuurlijk nog steeds de enige optie. Over ontsmettingsmethoden zal door PPO-Glastuinbouw binnen een half jaar na verschijnen van dit rapport een brochure uitgebracht worden.

Op de **volgende pagina** staat nog kort samengevat weergegeven in welke gevallen verspreiding door drainagewater van besmette percelen wel of niet relevant is of lijkt.

Gevallen waarin verspreiding van *Verticillium* en wortelaaltjes door drainagewater van besmette percelen wel of juist niet relevant is of lijkt.

Verspreiding *Verticillium* en wortelaaltjes door niet-ontsmet drainagewater wél relevant

- ~~///~~ Grote niet-besmette stukken op het bedrijf
- ~~///~~ Eerste maanden na stomen
- ~~///~~ Aantoonbare dichtheden ziekteverwekkers tot op diepte van drainagebuizen

Verspreiding *Verticillium* en wortelaaltjes door niet-ontsmet drainagewater niet relevant

- ~~///~~ Besmetting al verspreid over hele bedrijf
- ~~///~~ Stomen meer dan half jaar geleden (inschatting op basis van eerder onderzoek)
- ~~///~~ Er vindt veel versleping van grond plaats met machines, schoeisel e.d.
- ~~///~~ Ziekteverwekkers zijn op diepte van drainagebuizen niet aantoonbaar*

*niet volledig hard te maken vanwege ontbrekende informatie dichtheid-schaderelaties en beperkte gevoeligheid detectiemethoden

Literatuur

- Amsing, J.J.** (1984). Bestrijding van het wortellesieaaltje *Pratylenchus vulnus* in roos. In: *Bloemisterijonderzoek in Nederland over 1983*, pp 277-280
- Amsing, J.J. en W.Th. Runia** (2000). Verhitting en UV-straling fnuikend voor aaltjes: manieren van waterontsmetting tegen aaltjes onderzocht. *Vakblad voor de Bloemisterij* **3**, 46-47
- Amsing, J.J., H.A.E. de Werd, L. Stapel, M.A. de Jongh en P.H.J. Korsten** (2002). *Wortelknobbelaaltjes in chrysanth.* *Inventarisatie, schadelijkheid en bestrijding*. In druk, Praktijkonderzoek Plant en Omgeving, Aalsmeer, 46 pp
- Bezooijen, J. van** (1999). Erlemeijer of (melk-)flessenmethode. In: *Methoden en Technieken voor Nematologie*, herziene versie 1999, pp 38-41, Vakgroep Nematologie, Wageningen Universiteit, Wageningen
- Dickson, D.W.** (2002). Do Nematodes Move in Soil? <http://www.imok.ufl.edu/liv/groups/cultural/pests/nemamove.htm> ,30-10-2002, University of Florida, USA
- Hazendonk, A.** (2000). Verspreiding van wortellesie-aaltjes en *Verticillium dahliae* bij chrysanth in de vollegrond door hergebruik van drainwater. Literatuurstudie. Rapport 301. Proefstation voor de Bloemisterij en Glasgroente, Aalsmeer, 13 pp