

Beheersing en detectie van wortelbederf, veroorzaakt door Fusarium-soorten in broeitulpen

Onderzoek, uitgevoerd van 1 jan. 2003 tot 1 december 2004

Auteur(s) Joop van Doorn, Peter Vink en Trees Hollinger

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen
Maart 2005
PPO nr.320834

© 2005 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, 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.



PT Projectnummer: 11190
PPO Projectnummer: 320834

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Cluster Bollen en Bomen, Lisse
Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 83 00
Fax : 0317 - 47 83 01
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
2 INFECTIE-EXPERIMENTEN MET <i>FUSARIUM</i> SPP. 2002, 2003 EN 2004	9
2.1 Infectie-experiment 2002 (pilot).....	9
2.2 Infectie-experiment 2003.....	12
2.3 Infectie-experiment 2004.....	17
3 ONTWIKKELING VAN PCR VOOR <i>FUSARIUM CULMORUM</i> EN <i>FUSARIUM AVENACEUM</i> T.B.V. EEN GEVOELIGE EN SPECIFIEKE TOETSMETHODE	21
4 HET AANTONEN VAN <i>FUSARIUM</i> SPP. OP NEDERLANDSE TULPENBOLLEN, STROMONSTERS EN SCANDINAVISCH GRONDMONSTERS.....	23
5 EINDCONCLUSIES EN VRAGEN VOOR VERDER ONDERZOEK	27
6 LITERATUUR.....	29
BIJLAGE	31

Samenvatting

Bij de broeierij van tulpen op potten en bakken met potgrond ontstaat vaak op en onder de bodem een dikke laag wortels. Deze wortels zijn meestal niet omsloten door grond en kunnen onder bepaalde omstandigheden worden aangetast door schimmels als *Trichoderma*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* en *Fusarium avenaceum*.

Enkele jaren geleden was plotseling sprake van veel problemen met een wortelbederf veroorzaakt door een schimmel waardoor de tulpen te kort bleven en op de bladeren grijze bladvlekken ontstonden. Deze symptomen konden niet worden verklaard met de hierboven genoemde schimmels.

Isolaties uit aangetaste wortels bracht aan het licht dat het om een *Fusarium*-schimmel ging, maar in hoeverre deze schimmel nu werkelijk verantwoordelijk was voor de aantasting bleef onduidelijk.

Daarom is binnen dit project onderzoek gedaan om na te gaan of de gevonden *Fusarium*-schimmels verantwoordelijk zijn voor een wortelbederf bij broeitulpen waardoor de tulpen te kort blijven en grijze bladvlekken kunnen ontstaan. Tevens is geprobeerd om aan te tonen dat andere substraten dan potgrond wortelbederf op de bodem van potten en bakken kan beperken.

Uit het onderzoek is gebleken dat naast schimmels als *Trichoderma* en *Fusarium avenaceum* ook de schimmel *Fusarium culmorum* een wortelbederf bij tulpen kan veroorzaken.

Als gevolg van een aantasting door deze schimmel ontwikkelen de tulpen zich trager en blijven daardoor te kort. Bovendien ontstaan soms symptomen in het blad die sterke verwantschap hebben met dat van *Trichoderma*-bladtopyverdorrings.

Ook is gebleken uit de infectieproeven dat wortelbederf veroorzaakt door de schimmel *Fusarium avenaceum* juist langere en slappere tulpen veroorzaakt.

Wanneer een ander substraat dan potgrond, zoals zand of perlite op de bodem van potten werd aangebracht kon wortelbederf door *Fusarium culmorum* iets worden beperkt.

De beheersbaarheid van wortelbederf op de bodem van potten en bakken berust voornamelijk op teeltmaatregelen die bekend zijn bij wortelbederf door *Trichoderma* en *Botrytis cinerea*.

Een artikel over wortelbederf in broeitulpen is verschenen en hierin is een inventarisatie gemaakt, deels berustend op al eerder uitgevoerd onderzoek bij Diagnostiek van PPO, over beheersmaatregelen om wortelbederf in tulp te voorkomen.

Dit artikel is later vertaald en ter beschikking gesteld aan buitenlandse broeiers.

Er is tevens onderzoek gedaan om zowel *Fusarium avenaceum* als *Fusarium culmorum* middels DNA-technieken aan te kunnen tonen. Met de ontwikkelde PCR-toets bleken beide *Fusarium*-soorten te kunnen worden aangetoond en tevens werd het mogelijk om beide soorten van elkaar te onderscheiden.

Praktijkmonsters kunnen nu geanalyseerd worden op aanwezigheid van deze schimmels.

Met het beschikbaar komen van een specifieke DNA-toets voor het aantonen van *Fusarium avenaceum* en *Fusarium culmorum* werd het ook mogelijk om na te gaan waar en hoe een besmetting in het broeisysteem terecht zou kunnen komen.

Daarom is in dit deel van het onderzoek nagegaan of *Fusarium culmorum* op Nederlandse tulpenbollen, op afdekstro of in grond waarop in Scandinavië de tulpenbollen worden geplant kon worden aangetoond. Op Nederlandse tulpenbollen en in Scandinavische grondmonsters werd geen *Fusarium culmorum* gevonden.

Op Nederlands stro werd deze schimmel wel aangetoond. Dat is ook niet verbazend, want *Fusarium culmorum* is een bekende pathogeen in granen. Toch is hiermee niet duidelijk geworden via welke route de wortels van tulpen besmet kunnen raken met *Fusarium culmorum* waardoor wortelbederf kan ontstaan.

Tijdens bijeenkomsten met de begeleidingscommissie (leden Scandinavië-groep KBGBB) op 23 oktober 2003 en 5 oktober 2004 is verslag gedaan van de uitgevoerde proeven en resultaten.

1 Inleiding

In het broeiseizoen van 2001-2002 bleek dat met name in de noordelijke landen zoals Zweden, Noorwegen, Finland en Estland, maar ook wel elders bij de broeierij van tulpen op potten en bakken met potgrond veel problemen werden geconstateerd van te korte planten. Aanvankelijk werd gedacht aan een tekort aan koude, maar al snel bleek dat steeds sprake was van een wortelbederf. Omdat vaak ook sprake was van bladtopverdrogging en grijze bladvlekken langs de bladranden werd eerst gedacht aan een aantasting van de wortels door de schimmel *Trichoderma*. De wortels echter waren onder en op de bodem van de potten en broeibakken aangetast door een schimmel waardoor ze wijnrood verkleurden. Een dergelijk type wortelbederf was van *Trichoderma* niet bekend.

Uit oriënterend diagnostisch onderzoek was eerder naar voren gekomen dat *Fusarium avenaceum* een wortelbederf kan veroorzaken waardoor de wortels wijnrood kunnen verkleuren en de tulpen langer worden en soms vreemd gedraaid zijn.

Isolaties uit de aangetaste wortels van de te korte tulpen met grijze bladvlekken leverden ook uitgroei op van *Fusarium*-schimmels, maar het bleef onduidelijk of daarbij ook sprake was van een aantasting door *Fusarium avenaceum*.

Doel van het onderzoek binnen dit project was om na te gaan of de gevonden *Fusarium*-schimmels in de te korte tulpen ook werkelijk verantwoordelijk zijn geweest voor een wortelbederf. Daarom zijn een aantal infectieproeven gedaan waarvan in hoofdstuk 2 verslag is gedaan. Omdat het vermoeden bestond dat mogelijk de schimmel *Fusarium culmorum* een rol zou kunnen spelen bij wortelbederf en de te korte tulpen is in de infectieproeven ook een gevalideerde *Fusarium culmorum*-isolaat gebruikt evenals een gevalideerde *Fusarium avenaceum*-isolaat om het verschil in bovengrondse symptomen duidelijk te krijgen.

Tevens zijn DNA-toetsen ontwikkeld om aan te tonen welke *Fusarium*-soorten voor welk bovengronds symptoom verantwoordelijk zijn waarvan in hoofdstuk 3 verslag is gedaan.

Om aan te tonen waar en hoe *Fusarium culmorum* in een broeisysteem van tulpen terecht kan komen is met de ontwikkelde DNA-toets geprobeerd om in praktijkmonsters tulpenbollen, afdekstro en grondmonsters de aanwezigheid van *Fusarium culmorum* aan te tonen. Daarvan is verslag gedaan in hoofdstuk 4.

2 Infectie-experimenten met *Fusarium* spp. 2002, 2003 en 2004

Er is drie jaar onderzoek gedaan waarvan het eerste jaar een pilotstudy om inzicht te krijgen in de organismen die een rol spelen bij wortelbederf in tulpen.

De volgende hypothesen zijn daarbij onderzocht:

- speelt *Fusarium* een rol bij wortelbederf?
- welke *Fusarium* spp. spelen een rol bij wortelbederf?
- is de keuze van het substraat van invloed op de wortelmassa bij tulpen en daardoor de kans op het ontstaan van wortelbederf door *Fusarium culmorum*?

2.1 Infectie-experiment 2002 (pilot)

Naar aanleiding van problemen met een wortelbederf in broeitulpen in o.a. Scandinavië, gesignaleerd door DiagnostiekService, zijn isolaties gemaakt uit tulpenwortels. Met de gevonden schimmels is in 2002 een beperkte infectieproef (pilot) gedaan om aanwijzingen te verkrijgen over de rol van de gevonden schimmels. Voor de volledigheid is deze infectieproef opgenomen in dit verslag.

Materiaal en methode

Tulpenbollen van cultivar Prominence zijn geplant op potten met potgrond en afgedekt met grond om opgroeien te voorkomen. Voor het planten zijn de tulpenbollen "kaalgemaakt" en ontsmet in 0,5% Sumico + 1% captan om andere versturende ziekten te voorkomen. De geplante tulpen zijn beworteld in een bewortelingscel bij 9°C.

Na voldoende koeling van de tulpen is *Fusarium*-schimmel in de potjes aangebracht en zijn de tulpen in een kas afgebroeid.

Rond de bloei bleek dat de tulpenplanten per object sterk verschilden in lengte en gewicht. Daarom zijn de tulpen afgesneden en is de gemiddelde lengte (tabel 1, figuur 1 en 3) en gewicht (tabel 1 en figuur 2) bepaald.

Resultaten

Uit het onderzoek is gebleken dat een aantasting van de wortels door *Fusarium culmorum* (object 6) heeft geleid tot kortere planten ten opzichte van de controle met gezonde wortels (figuur 3).

Ook bleek dat een aantasting van de wortels door *Fusarium avenaceum* (object 7) leidt tot langere planten ten opzichte van de controle met gezonde wortels.

De *Fusarium*-isolaten die vanuit de praktijk zijn verzameld hebben in deze infectieproef steeds een wortelbederf veroorzaakt waarbij de wortels wijnrood verkleurden (figuur 8), maar het effect op de lengte en gewicht van de tulpen was soms wisselend.

Zo gaven de *Fusarium*-isolaten 35570, 35523 35658 (objecten 3, 5 en 9) gemiddeld een kortere plant met een lager gewicht dan in de controles met gezonde wortels. Daarmee waren de resultaten vergelijkbaar met die van object 6 (controle-isolaat van *Fusarium culmorum*).

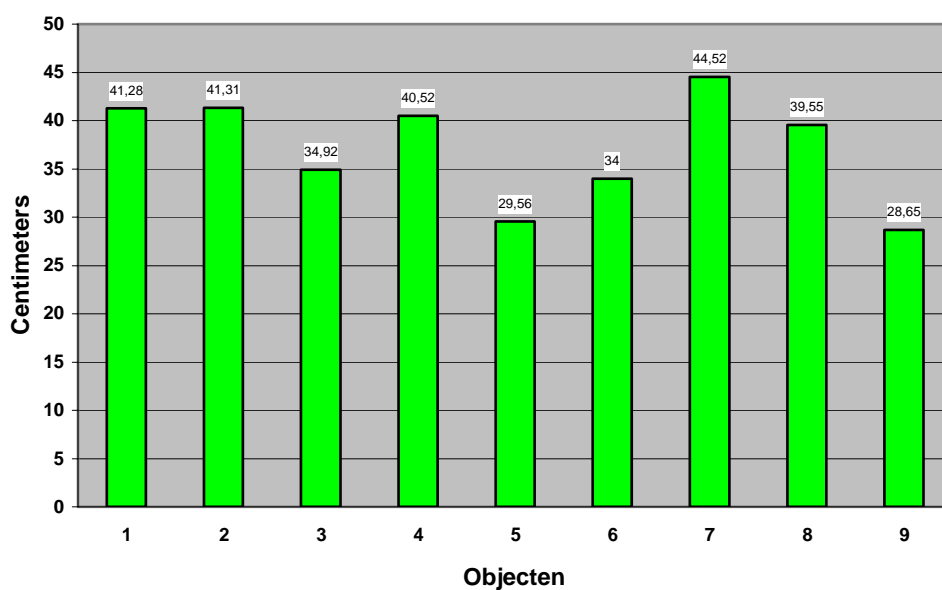
Alleen in object 4 (isolaat 35574 Nysäter Zweden) gaf het wortelbederf door *Fusarium* geen betrouwbare effect op de lengte en gewicht t.o.v. de controles.

Middels de intussen ontwikkelde PCR-methode voor detectie van *Fusarium culmorum* en *Fusarium avenaceum* is bevestigd dat de *Fusarium*-isolaten uit de praktijk (objecten 3, 4, 5 en 9) vergelijkbaar zijn met *Fusarium culmorum*.

Tabel 1. Gemiddelde lengte- en gewichtbepalingen van de tulpen

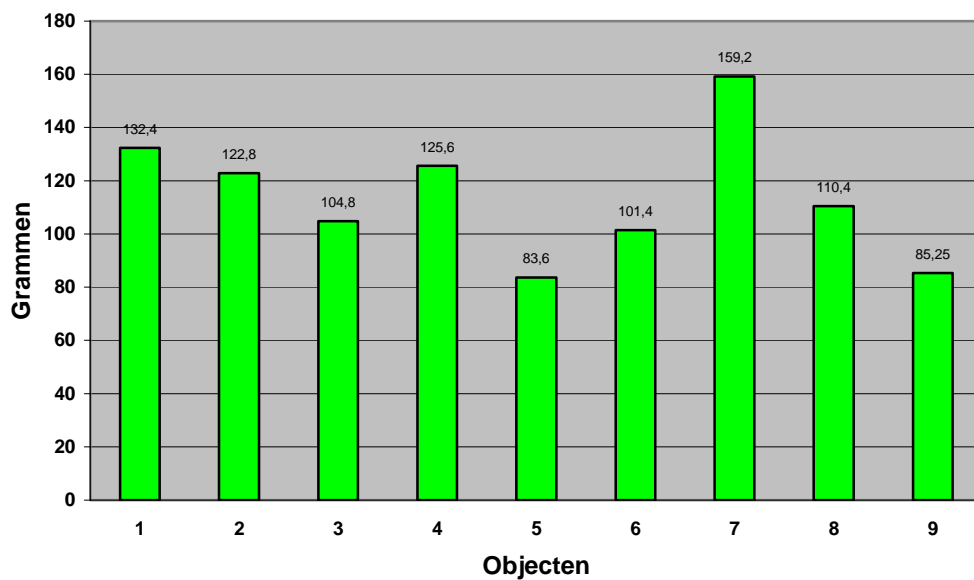
Objecten:	Gemiddelde lengte per plant:	Gemiddeld gewicht per plant:
1 = niet besmet	41,28	132,4
2 = niet besmet	41,31	122,8
3 = <i>Fusarium</i> sp. isolaat 35570	34,92	104,8
4 = <i>Fusarium</i> sp. isolaat 35574	40,52	125,6
5 = <i>Fusarium</i> sp. isolaat 35523	29,56	83,6
6 = <i>Fusarium culmorum</i> isolaat 970213	34,00	101,4
7 = <i>Fusarium avenaceum</i> isolaat 3084B	44,52	159,2
8 = <i>Trichoderma</i> sp. isolaat 35523	39,55	110,4
9 = <i>Fusarium</i> sp. isolaat 35658	28,65	85,3

Figuur 1. Gemiddelde lengte in centimeters per object



- 1 = controle niet besmet
- 2 = controle niet besmet + onbegroeide voedingsbodem
- 3 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35570 (Lagergren Zweden)
- 4 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35574 (Nysäter Zweden)
- 5 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35523 (Västbär Zweden/Estland)
- 6 = besmet met *Fusarium culmorum* isolaat 970213
- 7 = besmet met *Fusarium avenaceum* isolaat 3084B
- 8 = besmet met *Trichoderma* sp. isolaat 35523 (Västbär Zweden/Estland)
- 9 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35658 (U.S.A.)

Figuur 2. Gemiddeld gewicht in grammen per object



**Figuur 3. Overzicht van de infectieproef met tulpen cv. Prominence
Van links naar rechts de objecten 1 t/m 9**



Conclusies experiment 2002 (pilot)

Het is in deze infectieproef duidelijk geworden dat *Fusarium culmorum* een wortelbederf bij tulpen kan veroorzaken waardoor de planten korter blijven dan normaal.

Ook is duidelijk geworden dat *Fusarium avenaceum* een wortelbederf bij tulpen kan veroorzaken waardoor de planten juist langer worden dan normaal en gedraaid blad ontwikkelen.

De symptomen van wortelbederf veroorzaakt door beide *Fusarium*-soorten is aan de wortelsymptomen visueel niet betrouwbaar van elkaar te onderscheiden.

2.2 Infectie-experiment 2003

Uit het onderzoek in 2002 is gebleken dat zowel *Fusarium avenaceum* als *Fusarium culmorum* een wortelbederf bij broeitulpen kan veroorzaken. Een aantasting door *Fusarium avenaceum* gaf over het algemeen langere planten met gedraaid blad en een aantasting door *Fusarium culmorum* gaf juist kortere planten.

Om echter meer duidelijkheid over deze ziekte te krijgen is dit onderzoek binnen het kader van dit project in het broeiseizoen 2002-2003 herhaald.

Materiaal en methode

Tulpenbollen van de cultivars Prominence en Monte Carlo zijn geplant op potjes met potgrond. Vlak voor het planten zijn alle bollen "kaalgemaakt" bij de wortelkrans en gedurende 15 minuten ontsmet in 1% captan + 0,25% Sumico + 0,25% Scala. De geplante bollen zijn afgedekt met een laag rivierzand om opgroeien te voorkomen.

Alle geplante tulpenbollen zijn gekoeld bij 9°C en na voldoende beworteling verder gekoeld bij 5 en 2°C.

Na voldoende koeling van de tulpenbollen zijn de tulpen in een kas afgebroeid.

Per cultivar is de helft van de potten op moment van planten en de helft op moment van in de kas brengen besmet volgens het objectenschema.

Rond de bloei bleek dat de tulpenplanten per object sterk verschilden in lengte en gewicht. Daarom zijn de tulpen afgesneden en is de gemiddelde lengte in centimeters en gewicht in grammen bepaald.

Resultaten

Uit het onderzoek is wederom gebleken dat een aantasting van de wortels door *Fusarium culmorum* (object 3) leidt tot kortere planten ten opzichte van de controle met gezonde wortels (tabel 2 en 3 en figuur 4 en 6). De kortere tulpen veroorzaakten ook lichtere planten (tabel 2 en 3 en figuur 5 en 7).

Ook bleek weer dat een aantasting van de wortels door *Fusarium avenaceum* (object 4) leidt tot langere planten ten opzichte van de controle met gezonde wortels (tabel 2 en 3 en figuur 4 en 6). Dit veroorzaakte zwaardere planten (tabel 2 en 3 en figuur 5 en 7).

De *Fusarium*-isolaten die vanuit de praktijk zijn verzameld en in deze infectieproef aantasting hebben gegeven hebben in een aantal gevallen (object 6 en object 7) geleid tot kortere tulpen ten opzichte van de controle met gezonde wortels (tabel 2 en 3 en figuur 4 en 6).

Daarmee hebben de *Fusarium*-isolaten eenzelfde effect bij tulpen veroorzaakt als *Fusarium culmorum*.

Middels PCR is weer bevestigd dat beide *Fusarium*-isolaten vergelijkbaar zijn met *Fusarium culmorum*.

Bij één isolaat (object 5) gaf een wortelaantasting niet veel reductie in lengte en gewicht van de tulpen ten opzichte van de controle met gezonde wortels.

Middels PCR is wel gebleken dat het om de schimmel *Fusarium culmorum* gaat; blijkbaar is dit isolaat minder agressief of pathogeen dan de andere isolaten.

Tabel 2. Gemiddelde lengte- en gewichtbepalingen van tulpen cultivar Prominence

Objecten:	Gemiddelde lengte per plant:	Gemiddeld gewicht per plant:
1A	21,7	10,4
1B	18,9	8,6
2A	28,5	16,5
2B	26,0	14,8
3A	11,4	5,0
3B	9,1	2,9
4A	35,7	23,2
4B	32,6	23,1
5A	22,0	13,2
5B	24,9	13,7
6A	12,7	6,1
6B	10,2	3,9
7A	20,2	10,5
7B	10,8	5,3
	LSD lengte = 2,68	LSD gewicht = 1,93

1 = controle niet besmet

2 = controle niet besmet + onbegroeide voedingsbodem

3 = besmet met *Fusarium culmorum* isolaat 970213

4 = besmet met *Fusarium avenaceum* isolaat 3084B

5 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35570 (Lagergren Zweden)

6 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35523 (Västbär Zweden/Estland)

7 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35658 (U.S.A.)

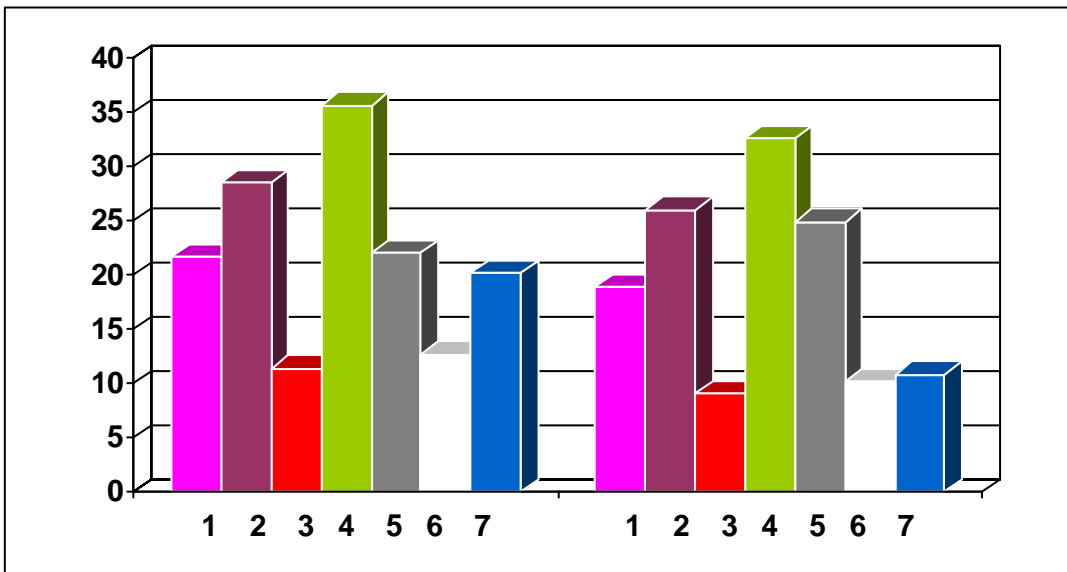
A = besmet bij het planten

B = besmet bij het in de kas brengen

Tabel 3. Gemiddelde lengte- en gewichtbepalingen van tulpen cultivar Monte Carlo

Objecten:	Gemiddelde lengte per plant:	Gemiddeld gewicht per plant:
1A	26,1	16,1
1B	27,7	16,7
2A	25,2	15,2
2B	23,8	14,1
3A	20,9	11,2
3B	14,1	7,3
4A	28,6	16,1
4B	28,4	17,0
5A	24,6	14,7
5B	24,1	14,2
6A	24,0	12,6
6B	17,4	9,5
7A	26,1	15,2
7B	18,9	11,5
	LSD lengte = 2,1	LSD gewicht = 1,53

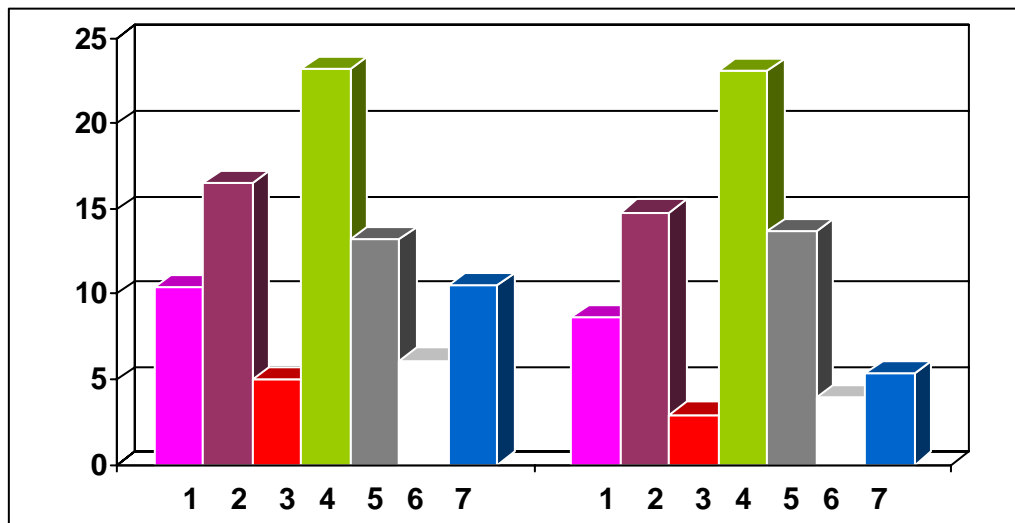
Figuur 4. Gemiddelde lengte in centimeters per plant bij cultivar Prominence



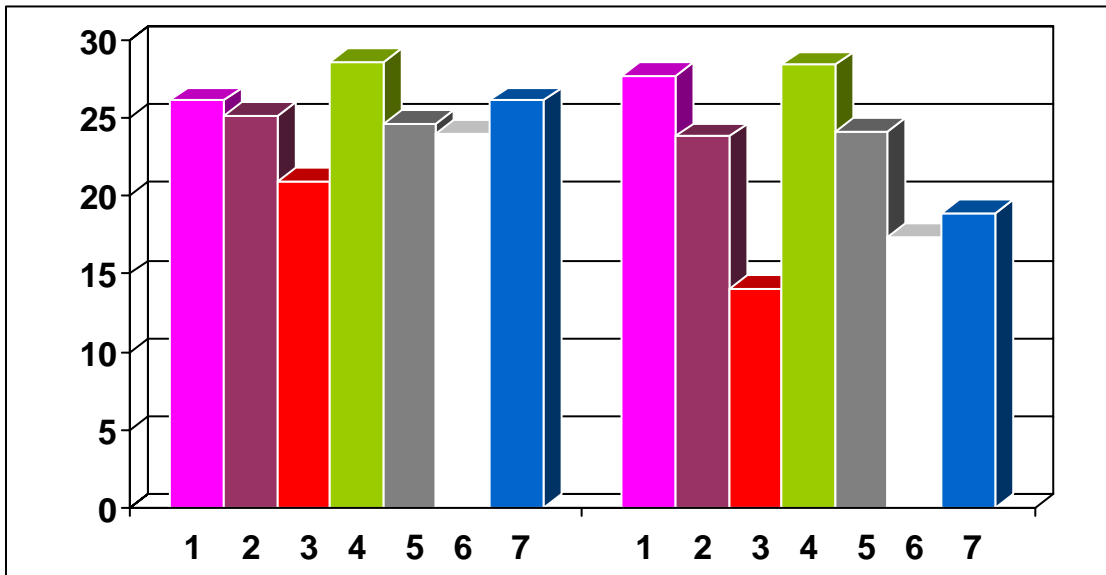
- 1 = controle niet besmet
- 2 = controle niet besmet + onbegroeide voedingsbodem
- 3 = besmet met *Fusarium culmorum* isolaat 970213
- 4 = besmet met *Fusarium avenaceum* isolaat 3084B
- 5 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35570 (Lagergren Zweden)
- 6 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35523 (Västbär Zweden/Estland)
- 7 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35658 (U.S.A.)

Linker kolommen = besmet bij planten
 Rechter kolommen = besmet bij het in de kas brengen

Figuur 5. Gemiddeld gewicht in grammen per plant bij cultivar Prominence



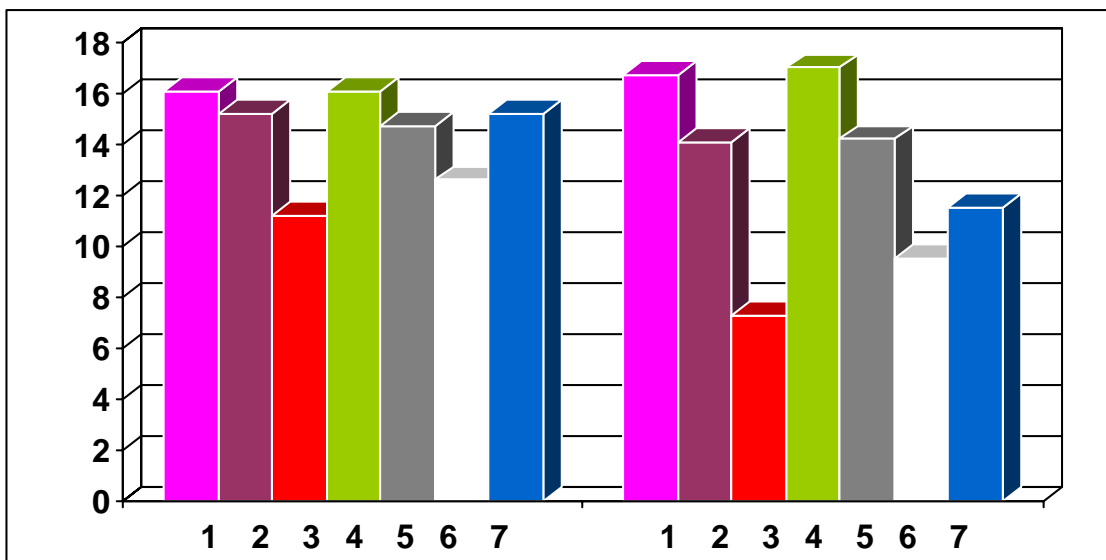
Figuur 6. Gemiddelde lengte in centimeters per plant bij cultivar Monte Carlo



- 1 = controle niet besmet
- 2 = controle niet besmet + onbegroeide voedingsbodem
- 3 = besmet met *Fusarium culmorum* isolaat 970213
- 4 = besmet met *Fusarium avenaceum* isolaat 3084B
- 5 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35570 (Lagergren Zweden)
- 6 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35523 (Västbär Zweden/Estland)
- 7 = besmet met *Fusarium* sp. isolaat 35658 (U.S.A.)

Linker kolommen = besmet bij planten
 Rechter kolommen = besmet bij het in de kas brengen

Figuur 7. Gemiddeld gewicht in grammen per plant bij cultivar Monte Carlo



Conclusies experiment 2003

In deze infectieproef is weer gebleken dat wortelbederf bij tulpen kan worden veroorzaakt door *Fusarium culmorum* en *Fusarium avenaceum*.

Bij een aantasting van de wortels door *Fusarium culmorum* bleek dat de tulpenplanten korter bleven dan bij gezonde tulpen.

Bij een aantasting van de wortels door *Fusarium avenaceum* bleek dat de tulpenplanten langer werden dan bij gezonde tulpen.

Door het korter of langer worden van de planten werd het gewicht per plant ook sterk beïnvloed.

In dit infectie-experiment is daarmee voldoende bewezen dat de problemen, zoals enkele jaren geleden gesignaleerd in broeitulpen bij Scandinavische broeiers, is veroorzaakt door een wortelbederf door *Fusarium culmorum* waardoor de tulpen te kort bleven.

Daarmee is dit aspect binnen dit project voldoende uitgezocht.

Figuur 8. Tulpenwortels uit een pot met de karakteristieke roodverkleuring a.g.v. aantasting door *Fusarium culmorum*.



2.3 Infectie-experiment 2004

Uit onderzoek in 2002 en 2003 is bekend geworden dat zowel *Fusarium avenaceum* als *Fusarium culmorum* een wortelbederf bij broeitulpen kan veroorzaken. Een aantasting door *Fusarium avenaceum* gaf over het algemeen langere planten met gedraaid blad en een aantasting door *Fusarium culmorum* gaf juist planten die korter bleven.

Bij een aantasting door *Fusarium culmorum* ontstonden eveneens soms bladvlekken aan de top en zijanten van de bladeren die sterke overeenkomst hadden met symptomen veroorzaakt door een wortelaantasting door de schimmel *Trichoderma*.

Uit ervaringen bij DiagnostiekService en onderzoek aan wortelbederf door de schimmel *Trichoderma* is bekend dat de keuze van het substraat van invloed kan zijn op het ontstaan van wortelbederf. Om na te gaan of dit ook een rol speelt bij wortelbederf door *Fusarium*-schimmels is in 2004 een experiment gedaan waarbij het substraat is gevarieerd.

Materiaal en methode

Tulpenbollen van cultivar White Dream zijn geplant op potjes met verschillende substraten. Vlak voor het planten zijn alle bollen "kaalgemaakt" bij de wortelkrans en gedurende 15 minuten ontsmet in 1% captan + 0,25% Sumico + 0,25% Scala.

De geplante bollen zijn afgedekt met een laag rivierzand om opgroei te voorkomen.

Alle beplante potjes weggezet bij 9°C om de bollen te laten bewortelen.

Nadat de wortels onder in de potten voldoende waren ontwikkeld en de bollen voldoende koude hadden gehad zijn de potten volgens objectenschema besmet en in een kasafdeling afgebroeid.

Rond de bloei zijn per plant de lengte en per herhaling het gewicht bepaald.

Resultaten

In dit experiment is gebleken dat de reducerende werking op de wortelmasse door andere substraten niet waarneembaar is waardoor zich toch nog veel wortelmasse op de bodem van de potjes ontwikkelde.

Daarmee werden ook situaties gecreëerd waarbij de aangebrachte *Fusarium*-schimmel tot aantasting kon overgaan en korte tulpen ontstonden (tabel 4 en figuur 9).

Alleen bij gebruik van perlite werd een licht reducerende werking op de wortelmasse vastgesteld waardoor de tulpen op de bodem van de potten iets minder ernstig werden aangetast door de *Fusarium culmorum*.

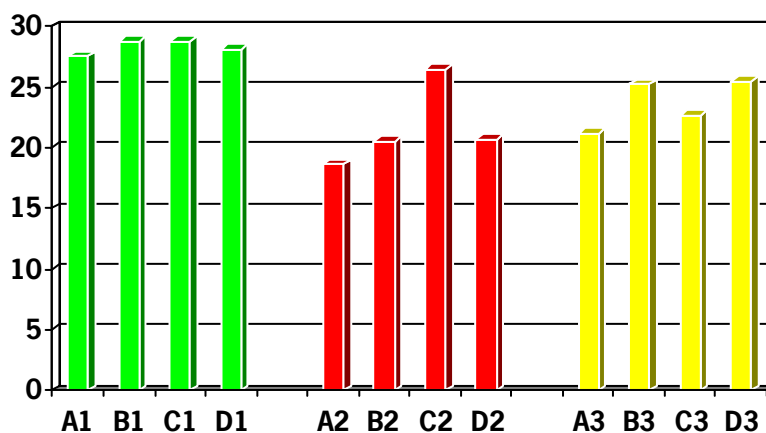
Tabel 4. Gemiddelde lengte- en gewichtbepalingen van de tulpen

Objecten:	Gemiddelde lengte per plant:	Gemiddeld gewicht per plant:
A1	27.5	14.6
A2	18.6	9.5
A3	21.2	10.5
B1	28.7	15.9
B2	20.5	8.5
B3	25.2	10.6
C1	28.7	14.1
C2	26.4	10.7
C3	22.7	11.3
D1	28.1	12.3
D2	20.7	8.2
D3	25.4	10.5

1 = controle niet besmet
 2 = besmet met *Fusarium culmorum*-agarcultuur
 3 = besmet met *Fusarium*-sporensuspensie

A = standaard potgrond
 B = rivierzand + standaard potgrond
 C = perlite + standaard potgrond
 D = vermiculiet + standaard potgrond

Figuur 9. Gemiddelde plantlengte in cm. per substraat (A, B, C of D)



1 = controle niet besmet
 2 = besmet met *Fusarium culmorum*-agarcultuur
 3 = besmet met *Fusarium*-sporensuspensie

A = standaard potgrond
 B = rivierzand + standaard potgrond
 C = perlite + standaard potgrond
 D = vermiculiet + standaard potgrond

Conclusies experiment 2004

Bij potgrond, zand en vermiculiet is een onvoldoende reducerende werking op het wortelvolumen op de bodem van potten waargenomen, waardoor volop *Fusarium*-wortelbederf is ontstaan, met als gevolg te korte tulpen.

Bij perlite is een licht positief reducerende werking op wortelvolumen op de bodem van potten (C2) vastgesteld waardoor de wortels minder door *Fusarium* werden aangetast, met als gevolg minder korte tulpen.

3 Ontwikkeling van PCR voor *Fusarium culmorum* en *Fusarium avenaceum* t.b.v. een gevoelige en specifieke toetsmethode

In bol- en knolgewassen speelt meestal de schimmel *Fusarium oxysporum formae speciales* (= subsoorten) een rol bij verschillende ziekten. (Roebroeck *et al* 2000). Zo is een belangrijke ziekteverwekker in iridaceae *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (De Haan *et al* 2000), en in liliaceae bij tulp *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae*. Omdat vanuit de infectie-experimenten duidelijk werd dat ook andere *Fusarium*-soorten ziekten bij tulp kunnen veroorzaken bestond er behoefte om een techniek te ontwikkelen waarbij op een snelle en doelmatige manier onderscheid tussen bepaalde *Fusarium*-sp. kan worden gemaakt.

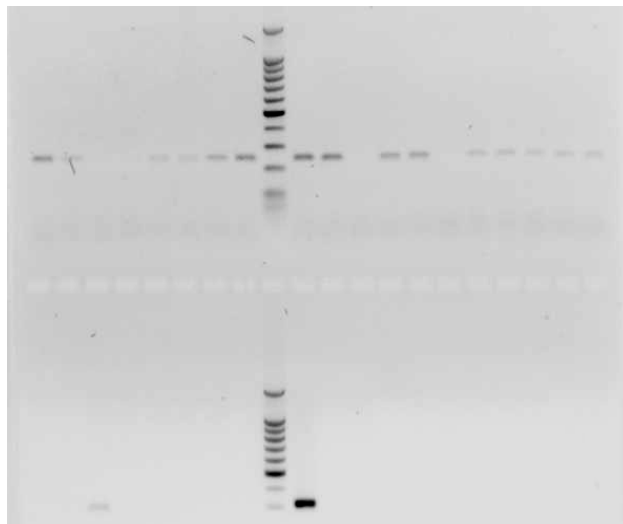
Aangezien serologische technieken voor het aantonen van schimmels in het algemeen niet beschikbaar zijn, is een DNA-methode de beste techniek om snel en duidelijk aan te tonen met welke Fusaria men van doen heeft. Dit is anders alleen mogelijk middels microscopische, morfologische karakterisering van de schimmels. Daarom is een zogenaamde DNA-toets specifiek voor *Fusarium culmorum* en *Fusarium avenaceum* ontwikkeld omdat deze beide schimmels een rol bleken te spelen bij een wortelbederf in tulpen. Op soortniveau zijn bepaalde stukken van het DNA geschikt om tussen soorten (in dit geval *Fusarium culmorum* en *Fusarium avenaceum*) van elkaar te onderscheiden. Om deze merkers, specifiek voor deze schimmels zichtbaar te maken, is gebruik gemaakt van PCR, een enzymreactie bij verschillende temperaturen die stukjes DNA miljoenen malen kan vermenigvuldigen en aldus meetbaar maken. Als controles zijn gezuiverde DNA-monsters van gevalideerde *Fusarium avenaceum* en *Fusarium culmorum*-isolaten genomen.

Op grond van DNA-sequenties uit databases (GenBank) en primers, genoemd in de literatuur (P.K.Mishra *et al*, 2003) zijn zgn. primers ontwikkeld. Van referentie-isolaten van *Fusarium culmorum* en *Fusarium avenaceum* is DNA geïsoleerd, evenals uit andere *Fusarium*-soorten zoals *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* en *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae*. Deze laatste zijn ook gebruikt als negatieve controle in de detectie-experimenten. Er zijn verschillende protocollen gebruikt om te zien hoe het beste DNA uit plantenmonsters (tulpenbollen) gehaald kon worden. Ook is een protocol gemaakt om grondmonsters, verdacht van *Fusarium*, zodanig te bewerken dat er toetsbaar DNA uit geëxtraheerd kon worden.

Figuur 10. Specifieke DNA-fragmenten van *Fusarium avenaceum* (boven), en enkele van *Fusarium culmorum* (onder).

De "ladder" is gebruikt om de grootte van de DNA-fragmenten te schatten.

Het betreft de analyse van geïnfecteerde tulpen uit het infectie-experiment in 2003.



Fusarium culmorum en *Fusarium avenaceum* zijn bekende pathogenen uit de graansector. Zij zijn vooral berucht voor de productie van mycotoxinen, stoffen die via graanproducten schadelijk zijn voor consument (mens en dier). Naast genoemde fusaria vormt *Fusarium graminearum* een groot probleem. Als bestrijding heeft men in de graansector zowel fungiciden als de ontwikkeling van resistente cultivars (Dardis and walsh, 2002) ter hand genomen. Ook past men wisselteelt toe, evenals het verwijderen van onkruid. Als chemische bestrijdingsmiddelen past men middelen toe, die voor bloembollen niet toegelaten zijn. Wereldwijd gaat het in de graansector om *Fusarium culmorum* in de gematigde streken, en *Fusarium graminearum* in de warmere gebieden. Middelen zoals azoxystrobin (preventief) en metconazole (curatief) worden genoemd. Ook wordt carbendazim aangemerkt als werkzaam middel tegen beide *Fusarium*-soorten. Binnen Nederland is o.a. prochloraz (Sportak) toegelaten.

Conclusies

Er werd geen reactie met de ontwikkelde DNA-toets gevonden met andere *Fusarium*-soorten (zoals *Fusarium* uit tulp en gladiool) en andere schimmel-soorten (zoals *Botrytis*, *Pythium*). Dit is belangrijk omdat anders vals-positieve uitslagen te verwachten zijn. De toetsmethode is erg afhankelijk van de kwaliteit van het DNA, dat uit het monster geïsoleerd wordt. Diverse extractiemethodes zijn getest, zoals gemeld in het volgende hoofdstuk.

4 Het aantonen van *Fusarium* spp. op Nederlandse tulpenbollen, stromonsters en Scandinavische grondmonsters

Inleiding

Bij het constateren van wortelbederf in broeitulpen door zowel *Fusarium avenaceum* als *Fusarium culmorum* is steeds de vraag gesteld waar een *Fusarium*-besmetting vandaan komt. Met het beschikbaar komen van een specifieke DNA-toets voor het aantonen van *Fusarium avenaceum* en *Fusarium culmorum* werd het ook mogelijk om na te gaan waar en hoe een besmetting in het broeisysteem terecht zou kunnen komen (Er is onderzoek uitgevoerd naar aar-*Fusarium* in tarwestro bij de champignonsteelt (Desrumaux, 2002).

In enkele gevallen vond men mycelium van *Fusarium*, maar niet in compost waar stro ook in terecht komt) Daarom is het doel van dit deel van het onderzoek om na te gaan of *Fusarium culmorum* op Nederlandse tulpenbollen, op afdekstro of in grond waarop in Scandinavië de tulpenbollen worden geplant kan worden aangetoond.

Daartoe zijn monsters Nederlandse tulpenbollen van een tweetal Nederlandse bloembollen-exporteurs ontvangen evenals enkele monsters stro waarmee de tulpen worden afgedekt tijdens de bollenteelt. Ook zijn een aantal grondmonsters uit Scandinavië ontvangen om na te gaan of in dergelijke substraten één van beide *Fusarium*-soorten kan worden aangetoond.

Het aantonen van *Fusarium* op tulpenbollen, stro en in grondmonsters is in twee fasen uitgevoerd waarbij ten eerste isolaties zijn gemaakt en is geprobeerd om aan te tonen of specifiek roodverkleurende *Fusarium*-schimmels konden worden gevonden. Ten tweede is middels de ontwikkelde PCR-techniek geprobeerd om *Fusarium culmorum* als belangrijkste veroorzaker van *Fusarium*-wortelbederf aan te tonen.

Materiaal en methode

Eerste serie monsters (tulpenbollen)

Cultivar	partij nummer
1. Blenda	1621
2. Jazell	3401
3. Prominence	9711
4. Peer Gynt	12440
5. Wibo	3530
6. Yellow King	6380
7. Leen v.d.Mark	2071
8. Pallada	1451
9. Rococo	6461
10 Monte Carlo	3880
11. Controle	wortels met <i>Fusarium</i>

Tweede serie monsters (tulpenbollen, grond en stro)

Cultivar	partijnummer
12. Purple Lady	50313
13. Monte Carlo	50513
14. Abba	50115
15. Monsella	50454
16. Wh. Dream	50439
17. Grond	
18. Afdekstro Nederland	
19. Controle: wortels met <i>Fusarium culmorum</i>	

Derde serie monsters (grond uit Scandinavië)

Monsters	Gewicht wortel
20. Arne Larsson	3.1 g
21. Lennartssons	3.1 g
22. Rutbo	3.2 g
23. (onbekend monster)	2.6 g
24. Hällnäs	3.1 g
25. Controle monster (bevat wortels die zijn aangetast door <i>Fusarium culmorum</i> . (29,9 gram potgrond + 0,1 gram wortels)	

Isolatie van Fusarium uit tulpenbollen, stro of grond

10 tulpenbollen per monster zijn in klein volume water overnacht geschud bij kamertemperatuur. Het spoelwater is gefilterd. In een plastic bakje met 5 ml bufferoplossing is de helft van het filter 1,5 uur geschud om de schimmels los te maken van het filter. Daaruit zijn op twee voedingsmedia, te weten Komada en MGA (Roebroek et al, 2000), per petrischaal 50 µl mogelijke schimmelsuspensie gebracht en uitgestreken. De beënte petrischalen zijn geïncubeerd in een donkere stoof bij 24°C gedurende 7 dagen.

Stro en door *Fusarium culmorum* aangetaste wortels zijn uitgelegd op petrischalen met twee verschillende media (algemeen groeimedium MGA en het specifieke groeimedium AGA). De beënte petrischalen zijn geïncubeerd in een donkere stoof bij 24°C gedurende 7 dagen.

Van de grondmonsters zijn suspensies gemaakt m.b.v. steriel water. De suspensies zijn gefilterd en verder uitgeplaat op een algemeen groeimedium MGA en het specifieke groeimedium AGA. De beënte petrischalen zijn geïncubeerd in een donkere stoof bij 24°C gedurende 7 dagen.

Isolatie van DNA vanuit gefilterd spoelwater en geïsoleerde Fusarium-schimmels uit stro en grond

Hiervoor is gebruik gemaakt van een speciale isolatiekit (Gentra-systems, Minneapolis, U.S.A.)

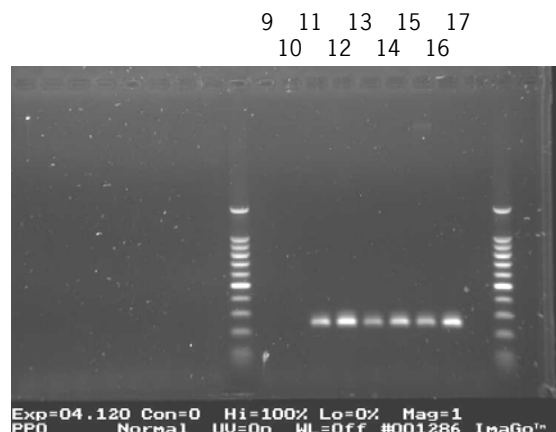
Toetsing middels PCR, specifiek voor Fusarium culmorum

Van alle monsters tulpenbollen uit de eerste serie is de helft van het filter gebruikt voor PCR (DNA-toets) met *Fusarium culmorum*-specifieke primers. Gecontroleerd is, of er bruikbaar DNA is geïsoleerd. De monsters zijn verder volgens de standaard DNA-toets (PCR) afgewerkt (zie hoofdstuk 3).

Resultaten eerste, tweede en derde serie monsters

Via telling van het aantal *Fusarium*-sporen per plaat op Komada en MGA zijn bij monster 3 veel *Fusarium*-sporen aangetoond. Monster 3 vertoonde de symptomen en had de geur van een aantasting door *Fusarium oxysporum* oftewel "zuur". Dit klopt want er bleek veel *Fusarium oxysporum* in dit monster aanwezig. In monster 9 zijn slechts weinig sporen van *Fusarium oxysporum* aangetoond. In de DNA-toets werd in geen van de monsters een positieve reactie gezien die wijzen op een besmetting met *Fusarium culmorum*. Monster 11 bestaande uit wortels met *Fusarium culmorum* is gebruikt als positieve controle. Eveneens werden in de controle nr. 19 *Fusarium*-sporen aangetoond, in de andere petrischalen veel niet-pathogene schimmels zoals *Mucor*, *Alternaria* en *Penicillium*. Ondanks het aanwezige antibioticum was ook sprake van veel bacteriegroei. Op AGA groeiden uit het stro (monsters nr. 18) en uit het *Fusarium*-wortelmonster (monster nr. 19) roodgekleurde schimmels en dus mogelijk *Fusarium culmorum*. Met voor *Fusarium culmorum*-specifieke DNA-toets (PCR) is bepaald of de roodgekleurde kolonies op het AGA medium *Fusarium culmorum* was. (zie figuur 11, slotjes 12,13 en 14) De extracten gemaakt uit de grondmonsters zijn onderzocht op *Fusarium culmorum* met behulp van een DNA-toets (PCR). Deze waren allemaal negatief waaruit is te concluderen dat in geen van de grondmonsters *Fusarium culmorum* is aangetroffen.

Figuur 11. DNA-toets, specifiek voor *Fusarium culmorum*. De witte bandjes onder nrs. 11 t/m 16 geven aan, dat er in de stromonsters (inclusief positieve controle) *Fusarium culmorum* aanwezig is.



Conclusies

In de tulpenmonsters bleek geen *Fusarium culmorum* aanwezig te zijn. Wel was er in twee monsters *Fusarium oxysporum* aanwezig (hoogstwaarschijnlijk *Fusarium oxysporum* sp. *tulipae* oftewel “zuur”). De typische geur van “zuur” was ook te ruiken.

Uit de stromonsters en uit een controle-monster werd een roodgekleurde *Fusarium* geïsoleerd.

Aansluitend is met behulp van de ontwikkelde DNA-toets aangetoond dat sprake was van *Fusarium culmorum*.

Dit is niet verwonderlijk, omdat deze *Fusarium* een bekende pathogeen uit granen is. Of er een kans is dat *Fusarium culmorum* uit dekstro over kan gaan op tulpenbollen, is niet zeker. Daartoe is nader onderzoek nodig.

De toegepaste DNA-toetsen kunnen onderscheid maken tussen *Fusarium oxysporum* en *Fusarium culmorum*. Dit kan niet alleen door de specifieke DNA-toets (PCR), maar ook door het gebruikte groeimedium. Voordeel van de DNA-toets is de snelheid waarmee *Fusarium* kan worden aangetoond. Dit kan binnen 24 uur worden gerealiseerd terwijl de klassieke methode op een groeimedium al gauw één week in beslag neemt en bovendien minder specifiek is.

Er zijn mogelijkheden om nog sneller en gevoeliger verschillende *Fusarium*-soorten te kunnen aantonen.

Dit kan met een DNA vermenigvuldigingsmethode, die positieve reacties (dus *Fusarium* aanwezig) zichtbaar maakt middels fluorescentie (licht), en tevens hoeveelheden schimmel kan meten. Deze kwantitatieve of Real Time PCR wordt o.a. bij PRI en PPO uitgevoerd (Waalwijk et al. 2004).

5 Eindconclusies en vragen voor verder onderzoek

Uit het onderzoek binnen dit project is bekend geworden dat wortels van tulpen kunnen worden aangetast door zowel *Fusarium avenaceum* als *Fusarium culmorum*.

Beide schimmels geven karakteristieke symptomen aan de wortels waarbij deze typisch wijnrood verkleuren (figuur 8).

Bij een aantasting door *Fusarium avenaceum* worden tulpen langer dan normaal en is het blad bleker van kleur. Bij een aantasting door *Fusarium culmorum* blijven tulpen korter dan normaal en ontstaan op de bladeren soms grijze bladplekken zoals we dit kennen van een aantasting van tulpenwortels door de schimmel *Trichoderma*.

Er zijn aanwijzingen gevonden dat de keuze van een dubbel-substraat van invloed kan zijn op de mate van beworteling van de tulpen en daarmee de kans op het ontstaan van een wortelaantasting door *Fusarium culmorum*.

Er is voor beide *Fusarium*-schimmels een DNA-toets ontwikkeld zodat beide schimmels goed en specifiek kunnen worden aangetoond. Daardoor was het mogelijk om ook na te gaan of één van de *Fusarium*-schimmels kon worden aangetroffen op Nederlandse tulpenbollen en afdekstro en in grondmonsters afkomstig uit Scandinavië.

Het bleek dat op de Nederlandse tulpenbollen en in de grondmonsters uit Scandinavië geen *Fusarium culmorum* kon worden vastgesteld. In stromonsters echter werd wel *Fusarium culmorum* vastgesteld.

Tijdens de bijeenkomsten van de begeleidingscommissie zijn een aantal vragen naar voren gebracht die aanleiding kunnen zijn voor vervolgonderzoek te weten:

- waar komt een besmetting met *Fusarium avenaceum* en/of *Fusarium culmorum* bij de broei van tulpen vandaan?
- bestaan er verschillen in pathogeniteit binnen de soort *Fusarium culmorum* of *Fusarium avenaceum*?
- kan de herkomst (binnen of buitenland) van verschillende *Fusarium*-isolaten worden vastgesteld?
- zijn er nog snellere toetsmethoden voor *Fusarium*-schimmels beschikbaar?
- kunnen er kwantitatieve toetsmethoden voor *Fusarium*-schimmels worden ontwikkeld?
- kan wortelbederf door *Fusarium culmorum* ook een rol spelen bij o.a. waterbroei van tulpen?
- zijn er naast teeltmaatregelen ook mogelijkheden om met behulp van chemische ontsmettingsmiddelen wortelbederf door *Fusarium*-schimmels te beperken of te voorkomen?

6 Literatuur

Diverse medewerkers van het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek (2000). Ziekten en afwijkingen bij bolgewassen deel 1: 147-148

Ziekten en onkruiden in tulpen (Uitgave door BASF 2000)

Persoonlijke aantekeningen van diagnostisch onderzoek aan wortelbederf bij tulpen door Peter Vink

Dardis JV, and Walsh EJ (2002). Control of *Fusarium* head blight in wheat under Irish growing conditions: current situation and future prospects. *Biology and Environment: proceedings of the Royal Irish Academy* vol. 102B, n.2, 93-102.

De Haan, LAM, Numansen A, Roebroek EJA and Van Doorn, J (2000). PCR detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* race 1, causal agent of Gladiolus yellows disease, from infected corms. *Plant Pathology* 49: 89-100.

Desrumeaux, B (2002). Aar-*Fusarium* en Fusariotoxines in tarwestro en compost. *Champignonberichten* 200: 3-6.

HGCA 2002. Topic Sheet no.5: wheat ear (*Fusarium* ear light) sprays for disease and mycotoxin control. <http://www.hgca.com/research/topicsheet58.html>

Mishra PK, Fo RT, and Culham A (2003). Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiol. Letters* 218:329-332

Waalwijk C, van der Heide R, de Vries I, van der Lee T, Schoen, C, Costrel-de Corainville G, Hauser-Hanh I, Kastelein P, Kohl J, Lonnet P, Demarquet T, and Kema G (2004). Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European J. Plant Pathol.* 110: 481-494.

Roebroek, EJA. 2000. *Fusarium oxysporum* from iridaceous crops, analysis of genetic diversity and host specialisation. Dissertation, Universiteit van Amsterdam.

Bijlage

Wortelbederf bij broeitulpen door een *Fusarium*-schimmel

De laatste jaren ondervindt men in de tulpenbroei in m.n. Scandinavische landen problemen met kort blijvende tulpen en soms bladtopverdrogging. Onderzoek bij de afdeling diagnostiek van het Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (PPO) in Nederland leerde dat sprake is van wortelbederf door een *Fusarium*-schimmel, vermoedelijk *Fusarium culmorum*. De wortels worden natrot, enigszins smeerbaar en bruin tot wijnrood (rood-wortelrot). Bovengronds blijven de tulpenplanten veel te kort; de bladtoppen en zijkanten van de oudste bladeren verkleuren grijs en verdrogen. Bovendien kleuren de vaatbundels in de bolbasis en voet van de stengel bruin met soms wit voos weefsel en kleine holtes.

De wortelrotsymptomen zijn daarmee identiek aan die welke bekend zijn van een aantasting door *Fusarium avenaceum*, maar de bovengrondse verschijnselen verschillen en lijken meer op de gevolgen van een *Trichoderma*-aantasting. Er werd daarom vermoed dat sprake is van aantasting door een andere schimmel.

In enkele kleine experimenten van PPO is aangetoond dat met name *Fusarium culmorum* een rol kan spelen in de aantasting. Dat is dit jaar bevestigd in een eenvoudige infectieproef met *Fusarium*-isolaten uit tulpenwortels afkomstig uit de Scandinavische landen en de USA. Daarmee is bewezen dat de geïsoleerde schimmel verantwoordelijk is voor de ziekteverschijnselen zoals vastgesteld in de Scandinavische landen. Morfologisch moet echter nog aangetoond worden dat het om *Fusarium culmorum* gaat.

Deze *Fusarium* is een merkwaardige niet op tulpen gespecialiseerde schimmel waarover, wat de tulpenbroei betreft, nog lang niet alles bekend is. Zo weet men op dit moment niet waar de schimmel precies vandaan komt en onder welke omstandigheden hij de tulpenwortels kan aantasten. Gezien de gelijkenis qua wortelrotsymptomen en morfologie van de schimmel met *Fusarium avenaceum*, is het niet mogelijk om de schimmels goed van elkaar te onderscheiden. Vervolgonderzoek zal daar wellicht meer duidelijkheid over kunnen verschaffen.

Andere schimmels

Bij de broeierij van tulpen ontstaan vaker problemen met schimmels op de dikke laag wortels op en onder de bodem van broeibakken. De oorzaak is dat de wortels in het dikke pakket onderin en onder de broeibakken niet omsloten zijn door grond, waardoor ze vroeg of laat gedurende de koel- en broeiperiode in kwaliteit achteruit zullen gaan. Dan kunnen ze begroeid raken met schimmels. Deze schimmelgroei treedt altijd op in de kas, en soms zelfs al in de bewortelingscel.

De schimmels hebben gemeen dat ze alleen afstervende tulpenwortels, die niet in de grond groeien, kunnen aantasten. Ze zijn niet gespecialiseerd op bloembollen en komen alom in de natuur voor.

Onder omstandigheden waarbij de wortels onder de bak snel opdrogen en droog blijven, raken ze meestal begroeid met een onschuldige witte, later grijsgroene *Penicillium*-schimmel die niet schadelijk is voor de planten. Wanneer de wortels echter onder minder droge omstandigheden langzaam afsterven, kunnen ze begroeid raken door *Botrytis cinerea*, *Trichoderma*-soorten of *Fusarium avenaceum*. Deze schimmelsoorten kunnen ieder op hun eigen karakteristieke manier wel schadelijk zijn voor de planten. Ze zijn niet in staat om vitale in grond groeiende wortels aan te tasten.

Voorkomen van aantasting door *Fusarium culmorum*

Ervan uitgaande dat een aantasting door *Fusarium culmorum* op dezelfde manier en onder dezelfde omstandigheden ontstaat als die van de andere genoemde schimmels, gaat PPO ervan uit dat een aantasting alleen is te voorkomen door het uitvoeren resp. nalaten van bepaalde cultuurmaatregelen. Daarbij zal men rekening moeten houden met de volgende factoren:

1) keuze broeifust:

gebruik broeibakken met een zoveel mogelijk geperforeerde bodem, opdat zich zo min mogelijk wortels ophopen op de bodem van de bakken. Het gebruik van bijna dichte broeibakken en inlegvellen houdt risico's in en wordt dus afgeraden.

2) keuze substraat:

kies een goede kwaliteit turfsubstraat en meng daar minstens 20-25% zand doorheen. Zorg ook voor een voldoende dikke laag van 4-5 cm substraat onder de geplante tulpenbollen, opdat de wortels ruimte hebben om in de grond te groeien en zich niet direct in een dikke laag ophopen op de bodem van de broeibakken of in een te dikke laag onder de broeibakken gaan groeien.

3) keuze bolmateriaal:

gebruik gave en gezonde tulpenbollen en ontsmet deze eventueel vlak voor het planten volgens de geldende adviezen om de eventueel aanwezige schimmels op de bollen te remmen in hun ontwikkeling.

4) omstandigheden in de koelcel:

probeer te voorkomen dat de wortels onder de broeibakken tijdens de koeling te lang worden. Ideaal is om een zo egaal mogelijke doorworteling van de broeibakken te krijgen, waarbij de wortels maximaal 1 à 2 cm onder de bak uitsteken en niet verdrogen.

Dit kan men realiseren door:

- a) iets droog te koelen en periodiek te zorgen voor enige luchtcirculatie tussen de bakken, zonder dat de grond in de bakken uitdroogt;
- b) de temperatuur in de koelcel desnoods op een vroeger moment te verlagen, opdat de wortelgroei wat wordt afgeremd;
- c) geplante tulpenbollen na oktober niet bij hogere temperaturen dan 5°C te laten bewortelen.

5) omstandigheden na het uit de koelcel halen:

houd de wortels onder de bakken na het inhalen vitaal, bijvoorbeeld door gebruik te maken van broeifafels met een eb/vloed-systeem.

Is het niet mogelijk de wortels vitaal te houden, laat ze dan zo snel mogelijk opdrogen, zodat de wortels begroeid raken met de onschuldige *Penicillium*-schimmel. Waar deze *Penicillium*-schimmel groeit, wordt aantasting door andere schimmels voorkomen.

Snel drogen kan men realiseren door de bakken buiten op de wind of in een droogruimte te plaatsen alvorens ze uit te zetten in de kas. Ook kan men de bakken direct op een voldoende hoog en open rabat plaatsen zodat de wortels onder de bakken kunnen verdrogen. Teveel wortels onder de bakken kan men verwijderen door de bakken over een rollenbaan te rollen. Plaats de bakken daarna wel op een open rabat opdat de wortelrestanten voldoende kunnen aandrogen.

Het neerzetten van de bakken op afgebroeide volle bakken of op de grond, etc. houdt risico's in, ongeacht of de wortels nu al dan niet voorgedroogd zijn. Wanneer de broeibakken toch op de kasgrond worden weggezet, zorg dan voor doorfrozen of rotoeggen tussen de verschillende "zetten" door, zodat oude wortelresten niet of minder in contact komen met de nieuwe wortels.

6) watergift:

regelmatig kleine beetjes water geven met druppelslangen is een prima methode om de grond voortdurend handvochtig te houden, waardoor de planten de wortels onder de bakken niet nodig hebben voor hun groei. Een goede methode om de juiste vochtigheid van de grond te bepalen is een beetje grond uit te knijpen in de hand. Er moet dan net een beetje vocht (water) tussen de vingers te zien zijn.

7) ontsmetting koelcellen en kassen/rabatten:

als eenmaal een aantasting met *Fusarium*-wortelrot op een bedrijf is opgetreden, zullen zich gemakkelijk massaal sporen van de *Fusarium*-schimmel kunnen verspreiden via broeibakken, oude potgrond, koelcellen, tafels en rabatten in de kas.

Om te voorkomen dat deze besmetting in een volgend seizoen weer een infectie geeft van tulpenwortels is het aan te bevelen om:

- de broeibakken voor gebruik te ontsmetten
- geen oude besmette potgrond te gebruiken;
- de vloeren en wanden van de koelcel(len) schoon te spuiten (hogedrukspuit);
- de tafels en rabatten in de kas schoon te spuiten (hogedrukspuit).