



Systemaanpak bodemgebonden ziekten en plagen

Marta A. Streminska, Petra Hollander, Astrid de Boer en Ariyati Ayik
Tweede rij namen

Rapport WPR-861

Referaat

In de bodemgebonden teelten onder glas zijn wortelziekten een belangrijk knelpunt. Met name wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne* sp.) en plantpathogene bodemschimmels en oomyceten zoals *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* en *Verticillium dahliae* zorgen voor problemen in de teelt.

Gebruik van compost en antagonistische micro-organismen als bodemweerbaarheidmaatregelen kan bijdragen aan beheersing van wortelziekten in grondgebonden teelten onder glas. Uit afgerond onderzoek is gebleken dat compost, alleen of in combinatie met biopesticiden op basis van bacteriën, effectief is tegen wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne* sp.) infectie in tomaat, maar heeft geen effect op primaire infectie van wortelknobbelaaltjes in chrysant. Compost was wel effectief in voorkomen van ontwikkeling van tweede generatie van aaltjes in geïnfecteerde chrysantenwortels.

Abstract

Root diseases are an important bottleneck in soil based greenhouse cultivation in the Netherlands. Particularly root knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) and plant pathogenic soil fungi and oomycetes such as *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* can cause significant crop losses.

Improving soil disease suppression, by using compost and antagonistic microorganisms, can contribute significantly to root disease control in soil based cultivation. In this project, use of compost, alone or in combination with biopesticides based on bacteria, proved effective against root knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) infection in tomato, but had no effect on primary infection of root knot nematodes in chrysanthemum. However, compost inhibited egg hatching, and therefore emergence of second generation of nematodes, in the infected roots of chrysanthemum.

Rapportgegevens

Rapport WPR-861

Projectnummer: 3742224600

DOI nummer: 10.18174/474501

Thema: Gewasbescherming

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Stichting Programmafonds Glastuinbouw, Stichting Chrysant NL telers van biogroente onder glas en Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

Disclaimer

© 2019 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden 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 Stichting Wageningen Research.

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

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
2	Materialen en methoden	9
2.1	Onderzoek naar <i>in vitro</i> antagonisme tegen juvenilen (J2) van wortelknobbelaaltje (<i>Meloidogyne</i> sp.)	9
2.2	Kasproef met compost en antagonistische micro-organismen tegen wortelknobbelaaltjes (<i>Meloidogyne</i> sp.) in tomaat en chrysant	9
2.3	Kasproef met champost en antagonistische micro-organismen tegen wortelknobbelaaltjes (<i>Meloidogyne</i> sp.) in chrysant	10
2.4	Kasproef met antagonistische micro-organisme tegen <i>Pythium</i> en <i>Fusarium</i> in chrysant	11
2.5	Onderzoek naar aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de gronden van teelt onder glas	12
2.5.1	Uitplaat methode	12
2.5.2	Insect bait methode	12
2.5.3	Identificatie van entomopathogene schimmels	13
2.5.4	Effect van geïsoleerde schimmels op overleving van trips	13
2.5.5	Analyse van bodemfauna uit Tullgren	13
3	Resultaten	15
3.1	Directe antagonisme van bacteriën en schimmels tegen juvenilen (J2) van <i>Meloidogyne incognita</i>	15
3.2	Invloed van organische toevoegingen aan de grond en micro-organismen op wortelinfectie door wortelknobbelaaltje	16
3.2.1	Aanwezigheid van plantpathogene aaltjes in onderzochte gronden van chrysanten- en biogroenteteelt onder glas	16
3.2.2	Invloed van organische toevoegingen aan grond en micro-organismen op groeiparameters in tomaat en infectie van de wortels door wortelknobbelaaltje <i>Meloidogyne incognita</i>	17
3.2.3	Invloed van organische toevoegingen aan de grond en micro-organismen op groeiparameters in chrysant en infectie van de wortels door wortelknobbelaaltje <i>Meloidogyne incognita</i>	24
3.2.4	Invloed van champost toevoeging aan grond en Serenade of Mycostop op groeiparameters in chrysant en infectie van de wortels door wortelknobbelaaltje <i>Meloidogyne incognita</i>	30
3.3	Invloed van Mycostop op infectie van <i>Pythium</i> en <i>Fusarium</i> in chrysant	34
3.4	Aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de gronden van teelt onder glas	37
3.4.1	Isolatie van entomopathogene schimmels uit grond via uitplaat methode	37
3.4.2	Isolatie van entomopathogene schimmels uit grond via insect bait	39
3.5	Overleving van trips na inoculatie met entomopathogene schimmels	40
3.6	Analyse bodemfauna in grond chrysantteelt en biogroente onder glas	42
4	Discussie en conclusies	45
4.1	Onderdrukking van infectie van <i>Meloidogyne incognita</i> door compost en micro-organismen	45
4.2	Aanwezigheid van entomopathogene schimmels in gronden van chrysantenteelt en bioteelt onder glas	46

Literatuur	47
Bijlage 1 Plattegrond kasproef zomer 2017	49
Bijlage 2 Wortelknobbel index kaart	51
Bijlage 3 Grondanalyse kasproef zomer 2017 (1:2 water extract)	53

Samenvatting

In de bodemgebonden teelten onder glas zijn wortelziekten een belangrijk knelpunt. Met name wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne* sp.) en plantpathogene oomyceten en bodemschimmels, zoals *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* en *Verticillium dahliae* kunnen significante productieverliezen veroorzaken.

Doel van het project was het verhogen van bodemweerbaarheid, voornamelijk tegen wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita*, door het stapelen van maatregelen, zoals toevoeging van compost en antagonistische micro-organismen, waardoor gewassen beter bestand zouden zijn tegen o.a. wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita* en oomyceet *Pythium ultimum*.

Als modelgewassen zijn tomaat (bioteelt) en chrysant gekozen, omdat in beide teelten de problematiek van wortelknobbelaaltjes steeds groter wordt door een beperkt aantal beschikbare (of in het geval bioteelt in inputlijst opgenomen) nematiciden en niet altijd voldoende werking van de beschikbare middelen.

Uit onderzoek is gebleken dat er een synergistisch, positief effect is van toepassing van compost in combinatie met micro-organismen (*Bacillus* of *Streptomyces*) in bestrijding van wortelknobbelaaltjes. Uit uitgevoerde proeven blijkt dat effecten van de behandeling gewasafhankelijk zijn. Toepassing van champost en micro-organismen lijkt beter te werken op primaire infectie van wortelknobbelaaltjes in tomaat dan in chrysant. Champost is een compost met hoog zoutgehalte en toepassing daarvan had een significant effect op EC van de grond. Het kan daarom niet uitgesloten worden dat zoutgehalte in de grond na champost toepassing een negatief effect had op chrysant, terwijl er geen effect was op de groei van tomaat.

Bovendien is binnen dit project onderzoek uitgevoerd naar aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de bodem, die een rol zouden kunnen spelen in onderdrukking van insectenplagen zoals trips.

1 Inleiding

In de bodemgebonden teelten is er veel aandacht voor plantuitval en ziekte symptomen die veroorzaakt worden door oomyceten zoals *Pythium* en *Phytophthora*, schimmels zoals *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium* en plagen zoals wortelknobbelaaltjes en trips. In de biologische teelt en chrysantenteelt zijn wortelknobbelaaltjes een belangrijk knelpunt. In de grondgebonden teelten speelt daarnaast de combinatie van verschillende pathogenen een rol. De aanwezigheid van bijvoorbeeld wortelknobbelaaltjes, kan de gevoeligheid voor *Pythium* of *Fusarium* vergroten. Verder zijn er ook andere plagen, zoals sommige levensstadia van trips, aanwezig in de grond.

Tegelijkertijd wordt chemische bestrijding van deze ziekten en plagen steeds moeilijker. Enerzijds door ontwikkeling van resistentie tegen pesticiden, anderzijds door steeds beperkter pakket van beschikbare middelen. Zo werd de toelating van een aantal middelen niet verlengd voor grondgebonden teelten in verband met emissienormen, zoals Aaterra in chrysant (tegen *Pythium*).

Een alternatief beheersmaatregel tegen bodemgebonden ziekten is het sturen op een weerbare bodem. In voorafgaande onderzoek van Andre van der Wurff (2014) is er samen met telers van chrysant en biologische vruchtgroenten een bodemweerbaarheidsmodel ontwikkeld. De weerbaarheid tegen wortelknobbelaaltjes en *Pythium* wordt bepaald door structuur (porievolume), microbiële activiteit, plantversterkers zoals calcium en silicium, identiteit van het organische stof en de samenstelling van klei. De weerbaarheid is het resultaat van verschillende factoren en vereist dus een systeem aanpak. Daarnaast kun je met het stapelen van factoren de weerbaarheid verhogen, door het zoeken naar een synergistische werking van a. compost type, b. plantversterkers en c. antagonisten.

Doel van het project was het verhogen van bodemweerbaarheid door het stapelen van maatregelen, zoals toevoeging van compost en antagonistische micro-organismen, waardoor gewassen beter bestand zijn tegen o.a. *Pythium ultimum* en het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita*.

Bovendien is binnen dit project onderzoek uitgevoerd naar aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de bodem, die rol zouden kunnen spelen in onderdrukking van insecten plagen zoals trips.

Aanpak van het project

Bodemweerbaarheid

Ziektewerendheid van de bodems was voor het eerst waargenomen meer dan honderd jaar geleden. Bodems die weerbaar zijn tegen ziekten, zijn bodems waarin weinig of geen aantasting optreedt in een vatbaar gewas, ondanks de aanwezigheid van een ziekteverwekker (van Elsas en Postma, 2007). Uit onderzoek is gebleken dat bodemweerbaarheid is afhankelijk van verschillenden abiotische en biotische factoren (Mazzola, 2002). Chemische en fysieke eigenschappen van grond, inclusief pH, organische stof gehalte en klei gehalte, kunnen de plantenziekten op directe of indirecte manier onderdrukken.

Vaak wordt bodemweerbaarheid gekoppeld aan microbiële activiteit in de bodems (o.a.: Mazzola, 2002; Wurff *et al.* 2011). Bij voorbeeld in onderzoek van Wurff *et al.* (2011) is er aangetoond, aan de hand van analyse van meer dan zestig bodemfactoren (biologisch als fysisch-chemisch), dat de totale bacteriële biomassa en hun activiteit belangrijk is voor *Pythium* en wortelknobbelaaltjes onderdrukking. Dat betekent dat om bodem ziektewerend te maken zij er maatregelen nodig die diversiteit en activiteit van micro-organismen in de bodem stimuleren.

Stapelring

Uit afgerond onderzoek (KV1309084BO4 Bodemziekten kasteelt bio) i.s.m. de leerstoelgroep *Farming Systems Ecology* (Van der Kolk & Van der Wurff, 2015), bleek dat het stapelen van meerdere factoren kan bijdragen aan een grotere onderdrukking van aaltjes en ziekten. Het onderzoek richtte zich op a. composten, b. plantversterkers en c. antagonisten van het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita*, *Verticillium dahliae* en *Pythium ultimum*. De maatregelen werden afzonderlijk getoetst en in combinatie met elkaar om te zien of er een extra sterk effect kon worden bereikt. Vooral houtachtig compost en champost met silicium bleken het aantal wortelknobbels op de wortels te verminderen. Houtachtig compost resulteerde daarnaast ook in het verminderen van het aantal nakomelingen. De combinatie van champost en silicium gaf ook een vermindering van de wortelknobbels. Een combinatie van beide werkte zelfs beter dan elk afzonderlijk. Gebruik van champost gaf ook nog eens een grotere (zwaardere) planten.

Compost

Toepassing van compost kan een grote impact op de bodem hebben, door invloed op structuur en mineralenhuishouding en de activiteit van het microleven. De keuze voor de juiste compost is heel erg belangrijk omdat niet alle composten zijn in staat verschillende ziekten te onderdrukken (van Elsas en Postma, 2007). Resultaten uit KV1309084BO4 Bodemziekten kasteelt bio laten lieten zien dat vooral houtachtige compost en champost de weerbaarheid verhogen tegen wortelknobbelaaltjes. Positieve effecten van gebruik van organische toevoegingen, onder andere champost, in de grond tegen wortelknobbelaaltjes zijn al in het verleden aangetoond (D'Addabbo *et al.* 2011). Oka (2010) heeft een uitgebreid overzicht gepubliceerd over verschillende organische toevoegingen en hun (hypothetische) werkingsmechanisme tegen wortelknobbelaaltjes.

Antagonisten

In voorgaand onderzoek is een inventarisatie uitgevoerd naar mogelijke antagonisten van *Meloidogyne incognita*, *Verticillium dahliae* en *Pythium ultimum* die van nature aanwezig zijn in de gronden van teelt onder glas. Biologische bestrijding van schimmelziekten en plagen (zoals aaltjes) gebruikmakend van natuurlijke, antagonistische bacteriën en schimmels, biedt veel perspectief voor duurzame gewasbescherming (Berg, 2009; Raaijmakers *et al.* 2009). Veelal zijn de interacties tussen pathogeen en antagonist heel specifiek en er zijn weinig micro-organismen bekend die een breed scala aan pathogenen (ziekten en plagen) kunnen onderdrukken (Hartmann *et al.* 2009). Niettemin zijn afgelopen decennia micro-organismen ontdekt die zowel schimmel pathogenen als aaltjes en soms ook insecten kunnen onderdrukken. Grampositieve bacteriën (zoals *Bacillus* en *Streptomyces*) worden vaak toegepast als biologische fungicide of nematocide (Schisler *et al.* 2004; Berg, 2009). Hun vermogen om een overlevingsstructuren te produceren (endosporen) maakt het mogelijk om op een eenvoudige manier ze te formuleren in verschillende producten met lange gebruikstermijn (soms zelfs jaren) (Emmert & Handelsman, 1999;). Recentelijk is er ook een nieuwe bacteriële soort uit grond geïsoleerd, *Chryseobacterium nematophagum*, die verschillende soorten aaltjes kan doden (Page *et al.* 2019).

Binnen dit project is onderzoek uitgevoerd naar mogelijke antagonisten (bacteriën en schimmels) van wortelknobbelaaltjes. Voor het onderzoek zijn er aantal bacteriële of schimmel isolaten uitgekozen die al beschikbaar zijn als commercieel product, bijvoorbeeld als biologische fungicide of entomopathogene schimmel, op de markt in Nederland (en wanneer mogelijk ook op SKAL inputlijst staan). In eerste instantie is er *in vitro* antagonistische werking van deze micro-organismen op *Meloidogyne incognita* onderzocht. Vier micro-organismen die effect hadden op overleving van *Meloidogyne incognita* in *in vitro* toets zijn vervolgens onderzocht in potten kasproef in combinatie met toevoegingen van organische stof aan de grond met tomaat en chrysant.

Bovendien is binnen dit project onderzoek uitgevoerd naar aanwezigheid van entomopathogene schimmelsoorten (antagonisten van insecten) in de gronden van biologische groenteteelt onder glas en chrysantenteelt onder glas. Ook hun effect op overleving van trips is onderzocht in *in vitro* kweek proeven.

Mogelijk entomopathogene schimmelsoorten zijn geïsoleerd zowel uit gronden van chrysantenteelt als uit gronden van biogroente teelt. Vier geïsoleerde soorten (*Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium* en *Isaria*) zijn algemeen bekend als entomopathogene schimmels. Ook andere soorten, van wat minder bekende entomopathogene schimmels zijn geïsoleerd, zoals: *Simplicillium*, *Clonostachys*, *Geotrichum* and *Penicillium*.

2 Materialen en methoden

2.1 Onderzoek naar *in vitro* antagonisme tegen juvenilen (J2) van wortelknobbelaaltje (*Meloidogyne* sp.)

Zeven bacteriële isolaten en vier schimmels isolaten zijn getoetst *in vitro* op hun antagonisme tegen juvenilen (J2) van *Meloidogyne incognita*. Afkomst van isolaten staat vermeld in Tabel 1.

Tabel 1

Bacteriële en schimmel isolaten voor in vitro antagonisme toets tegen M. incognita.

Isolaat	Afkomst/ Product	Producent
Bacteriën		
Isolaat 23	isolatie uit tomaat bij WUR BU Glastuinbouw	
Isolaat 24	isolatie uit tomaat bij WUR BU Glastuinbouw	
Isolaat 26	isolatie uit tomaat bij WUR BU Glastuinbouw	
Isolaat 28	isolatie uit tomaat bij WUR BU Glastuinbouw	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	Serenade®	Bayer BV
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	Rhizovital®42	ABiTEP GmbH
<i>Streptomyces griseoviridis</i> k61	Mycostop	Verdera Oy
Schimmels		
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bio1020®	Bayer BV
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	DSMZ Type strain no. DSM-846	
<i>Trichoderma harzianum</i> T22	Trianium	Koppert BV
<i>Beauveria bassiana</i> GHA	Botanigard®	Certis Europe BV

Bacteriestammen zijn opgekweekt in erlenmeyers op vloeibare nutrient broth medium in 25°C in het donker (op schudapparaat bij 180 rpm) voor 24 uur.

Schimmel isolaten zijn opgekweekt in vloeibaar aardappel dextrose medium in 25°C in het donker (op schudapparaat bij 180 rpm) voor 48 uur. Vervolgens zijn vloeibare kweken gecentrifugeerd voor 15 min bij 5000g, en het supernatant werd opgeslagen voor het gebruik in experimenten.

Juvenilen (J2) van *Meloidogyne incognita* voor het *in vitro* onderzoek zijn geleverd door laboratorium van HZPC.

In vitro toets is uitgevoerd in 96 well-plate met steenwol filters erin. Om het effect van extracellulaire metabolieten op J2-mortaliteit te bepalen, is in elke well 200 ml van de bacteriële/schimmelkweek supernatant aangebracht op het filter. Vervolgens zijn er 75 juvenilen (J2) van *Meloidogyne incognita* bovenop elk filter geplaatst. Aantallen levende juvenilen (J2) onderin het filter zijn geteld na 24 en 48 uur incubatie bij 25°C in het donker. Voor elk isolaat is deze toets uitgevoerd in 32 herhalingen. Als controle is steriele medium gebruikt (nutrient broth of aardappel dextrose, respectievelijk voor bacteriën en schimmels).

2.2 Kasproef met compost en antagonistische micro-organismen tegen wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne* sp.) in tomaat en chrysant

In juli 2017 is een kasproef uitgevoerd met als doel bestrijding van wortelknobbelaaltjes in tomaat en chrysant door gebruik van compost/mulch met of zonder toevoegingen van bacteriën of schimmels.

Een kas van 144 m² met veertien tafels werd gebruikt (zie Bijlage I). De zeven tafels aan de linkerzijde van de kas zijn gebruikt voor de teelt van tomaat in 1L potten met grond afkomstig van drie bioteelt bedrijven: bedrijf A, bedrijf B en bedrijf C. De zeven tafels aan de rechterzijde van de kas zijn gebruikt voor de teelt van chrysant in 1L potten met grond afkomstig van drie chrysantenteelt bedrijven: bedrijf D, bedrijf E en bedrijf F. Zie Bijlage 1 voor kasplattegrond.

Voor tomatenteelt zijn zaden van cv Cappricia (Rijk Zwaan) gezaaid in vermiculiet. Bij een deel van de zaden is op het moment van het zaaien Serenade (*Bacillus amyloliquefaciens* QST713, Bayer) of Mycostop (*Streptomyces griseoviridis* k61, Verdera) toegepast. (eindconcentratie: 10⁶ sporen/zaad) Voor de chrysanten teelt zijn chrysanten stekken 10 dagen lang beworteld in potgrond onder folie (cv Bacardi, *Dümmen Orange*). Bij een deel van de planten is op het moment van het bewortelen Botaniguard (*Beauveria bassiana* GHA, Certis Europe) of *Purpureocillium lilacinum* (oudenaam: *Paecilomyces lilacinum*) toegepast (eindconcentratie: 10⁵ sporen/stek). Er zijn in totaal zeven behandelingen uitgevoerd in elk van de praktijkgronden, inclusief de onbehandelde controle. Elke behandeling lag in vier herhalingen in de kas (met 10 potten per herhaling). In Tabel 2 zijn de behandelingen in tomatenteelt en chrysantenteelt samengevat.

Tabel 2

Behandelingen tegen wortelknobbelaaltje in de kasproef met tomatenteelt en chrysantenteelt.

Behandeling	tomaat	chrysant
1	onbehandeld	onbehandeld
2	champost (20% volume)	champost (20% volume)
3	champost+ Serenade	champost+ Botaniguard
4	champost+ Mycostop	champost+ <i>Purpureocillium</i>
5	mulch (15% volume)	mulch (15% volume)
6	mulch+ Serenade	mulch+ Botaniguard
7	mulch+ Mycostop	mulch+ <i>Purpureocillium</i>

Voor de behandelingen aan de grond is er 1) champost met de grond vermengd (20% v/v) of 2) schimmeldominante mulch (15% v/v) met de grond vermengd één week voordat er werd geplant. Voor behandelingen met stapeling compost/mulch+micro-organismen zijn er micro-organismen toegevoegd aan de grond tot eindconcentratie 10⁶ sporen/cm³ grond (bacteriën; Serenade en Mycostop) of 10⁵ sporen/cm³ grond (Botaniguard en *Purpureocillium lilacinum*).

Er is geen kunstmatige grondbesmetting uitgevoerd met *Meloidogyne incognita*. In de grond aanwezige wortelknobbelaaltjes zijn gebruikt als inoculum voor de infectie. In alle zes praktijkgronden, die gebruikt zijn voor de proef, zijn aantallen van nature aanwezige *Meloidogyne* sp. bepaald, samen met mogelijke andere plantpathogene aaltjes.

Na 7 weken en 9 weken teelt, respectievelijk voor tomaat en chrysant, zijn er plantlengte en vers gewicht van bovengrondse delen bepaald in alle behandelingen. Vervolgens zijn wortels beoordeelt op infectie van wortelknobbelaaltjes volgens wortelknobbindex (WKI, van 0-gezond tot 10- wortel afgestorven door wortelknobbels) (Bijlage 2).

Wortels van vier planten per behandeling zijn vervolgens grondig schoongemaakt en in de mistkamer geplaatst om te bepalen of behandelingen effect hebben gehad op aantal nakomelingen van *Meloidogyne* sp. die uit geïnfecteerde wortels uitkomen. Na vier weken incubatie in de mistkamer is de aantal van nakomelingen (juvenielen-J2 van *Meloidogyne incognita*) bepaald en omgerekend per g/wortel.

2.3 Kasproef met champost en antagonistische micro-organismen tegen wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne* sp.) in chrysant

In mei 2018 is een kasproef uitgevoerd met als doel bestrijding van wortelknobbelaaltjes in chrysant door gebruik van champost, bacteriën (Serenade of Mycostop) of combinatie daarvan.

Een kas van 20 m² met drie tafels werd gebruikt voor de proef. Grond van twee praktijkbedrijven was onderzocht in deze proef (Grond A en Grond B). Voor chrysanten teelt zijn er chrysanten stekken 10 dagen lang beworteld in potgrond onder folie (cv Bacardi, *Dümmen Orange*). Bij een deel van de planten is op het moment van het bewortelen Serenade (*Bacillus amyloliquefaciens* QST713, Bayer) of Mycostop (*Streptomyces griseoviridis* k61, Verdera) toegepast (eindconcentratie: 10⁶ sporen/stek).

Er zijn in totaal zes behandelingen uitgevoerd, inclusief de onbehandelde controle. Elk behandeling lag in 20 herhalingen in de kas (met 1 pot per herhaling). In Tabel 3 zijn de behandelingen in deze proef samengevat.

Tabel 3

Behandelingen tegen wortelknobbelaaltje in de kasproef met chrysant in mei 2018.

Behandeling	chrysant
1	onbehandeld
2	champost (20% volume)
3	champost+ Serenade
4	champost+ Mycostop
5	Serenade
6	Mycostop

Voor behandelingen met stappeling champost+micro-organismen en met alleen micro-organismen zijn er bacteriën toegevoegd aan de grond tot eindconcentratie 10⁶ sporen/cm³ grond (Serenade of Mycostop). Er is geen kunstmatige grond besmetting uitgevoerd met *Meloidogyne incognita*. In de grond aanwezige wortelknobbelaaltjes zijn gebruikt als inoculum voor de infectie. In beide praktijkgronden, die gebruikt zijn voor de proef, zijn de aantallen van nature aanwezige *Meloidogyne* sp. bepaald, samen met mogelijke andere plantpathogene aaltjes.

Na 9 weken teelt zijn er plantlengte, vers gewicht en stengeldikte van bovengrondse delen bepaald in alle behandelingen. Vervolgens zijn wortels beoordeelt op infectie van wortelknobbelaaltjes volgens systematiek van wortelknobbindex (zogenaamd WKI, van 0-gezond tot 10- wortel afgestorven door wortelknobbels) (Bijlage 2). Grondanalyse (plant beschikbare mineralen in 1:2 waterextract) is uitgevoerd voor het planten voor alle zes gronden en combinaties van organische toevoegingen. Resultaten van deze analyse zijn samengevat in Bijlage 3.

2.4 Kasproef met antagonistische micro-organisme tegen *Pythium* en *Fusarium* in chrysant

In november 2018 is een kasproef uitgevoerd met als doel bestrijding van *Pythium ultimum* en *Fusarium oxysporum* in chrysant door gebruik van bacteriën (Mycostop).

Een kas van 20 m² met drie tafels werd gebruikt voor de proef (zie Bijlage 4). In totaal zijn er vijf behandelingen uitgevoerd in 27 herhalingen (Tabel 4). Deel van de grond is voorbehandeld met Mycostop (eindconcentratie 10⁵ sporen/cm³ grond). Een dag later zijn er plantpathogene schimmels toegevoegd aan de grond: *Pythium ultimum* (50000 oösporen/pot) of *Fusarium oxysporum* (eindconcentratie 10⁵ sporen/cm³ grond). De week daarna zijn chrysantenstekken (cv Baltica, Deliflor) geplant in potten met grond (eindconcentratie 10⁵ sporen/cm³ grond). Deel van deze stekken is ook voorbehandeld met Mycostop (eindconcentratie 10⁶ sporen/stek).

Tabel 4

Behandelingen in de kasproef *Pythium* en *Fusarium* in chrysant in november 2018.

Behandeling	Pythium	Fusarium	Mycostop
Onbehandelde controle	-	-	-
<i>Pythium</i> infectie	+	-	-
<i>Pythium</i> infectie+ Mycostop	+	-	+
<i>Fusarium</i> infectie	-	+	-
<i>Fusarium</i> infectie+ Mycostop	-	+	+

Na 9 weken teelt zijn er plantlengte, vers gewicht en stengeldikte van bovengrondse delen bepaald in alle behandelingen.

2.5 Onderzoek naar aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de gronden van teelt onder glas

Grond van zes glastuinbouwbedrijven (drie gangbare teelt chrysant en drie bioteelt) is eind 2016 bemonsterd voor analyse van aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de grond. Grond bij elk van de zes bedrijven, is steekproefsgewijs bemonsterd in top grondlaag (0-20 cm). Elk grondmonster had totale volume van 20L. Grondmonsters waren gehomogeniseerd en bewaard bij 4°C in het donker tot verdere analyse. Alleen een van de chrysantenbedrijven had gebruik gemaakt van commercieel verkrijgbaar product op basis van entomopathogene schimmels tijdens de teelt.

Twee verschillende methoden waren gebruikt om entomopathogene schimmels uit de grond te isoleren namelijk: uitplaat methode en insect bait methode.

Vervolgens is er nog additionele grondbemonstering geweest bij zes chrysant teeltbedrijven (januari 2017). Uit deze monsters zijn ook (vermoedelijk) entomopathogene schimmels geïsoleerd (grond uitplaat methode).

2.5.1 Uitplaat methode

Dankzij de grond uitplaat methode kunnen entomopathogene schimmels uit de grond geïsoleerd worden die *in vitro* op het kunstmatig groeimedium in petrischaal kunnen groeien (Goettel & Inglis, 1989). Voor schimmelisolatie, was 5g van de grond gehomogeniseerd met 25 ml van Tween 20 oplossing (0.05% in demiwater). Na 30 minuten schudden (bij 80 rpm), was 0.1mL van de oplossing uitgeplaat op semi-selectief groeimedium: aardappel dextrose agar (PDA) met 0.50 g l⁻¹ chloramphenicol (een antibioticum tegen bacteriën), 0.25 g l⁻¹ cycloheximide en 0.05 g l⁻¹ dodine (beide fungiciden om snel groeiende schimmelsoorten te remmen) (Veen & Ferron, 1966). Groeimedium was vervolgens geïncubeerd bij 25°C in het donker. Aantal kolonie vormende eenheden (kve's) van schimmels was na ongeveer één week incubatietijd beoordeeld.

2.5.2 Insect bait methode

Terwijl de grond uitplaat methode gebruik maakt van de saprotrofe eigenschappen van entomopathogene schimmels om ze te isoleren van bodemonsters, is het succes van insect bait methode afhankelijk van de vermogen van entomopathogene schimmels om aasinsecten (bijvoorbeeld meelwormen, larven van *Tenebrio molitor*) te infecteren. (Zimmermann, 1986; Meyling, 2007). Vochtgehalte van de grondmonsters werd aangepast tot 60% van de watervasthoudend vermogen van de onderzochte grond. Plastic bakjes (79 mm diameter, 565 ml volume) zijn gevuld met 500 ml grond en 20 meelwormen per bakje. Voor elke grond is deze test in tienvoud uitgevoerd (met positieve, n=3 en negatieve controle, n=3). Voor positieve controle waren 20 meelwormen geplaatst in grond waaraan sporen van *Metarhizium anisopliae* (BIO 1020®) waren toegevoegd.

Negatieve controle bestond uit meelwormen die geplaatst waren in bakjes met gesteriliseerde grond. Gronden zijn gesteriliseerd door ze te autoclavieren bij 120°C gedurende 20 minuten. Containers werden afgesloten met geperforeerde deksels om luchtcirculatie mogelijk te maken en geïncubeerd in een klimaatkamer (24°C, 70% relatieve luchtvochtigheid, 16L: 8D-fotoperiode) gedurende drie weken.

Tijdens de eerste week van incubatie zijn de containers dagelijks omgekeerd om ervoor te zorgen dat de meelwormen in de grond bleven bewegen. Na 7, 14 en 21 dagen werden de meelwormen onderzocht op schimmelinfectie. Meelwormen die tekenen van schimmelinfectie vertoonden, werden uit de container verwijderd en op een schimmel groeimedium geplaatst zoals beschreven in paragraaf 2.5.1, om verdere groei en identificatie van de schimmels die voorlopig als entomopathogeen geïdentificeerd waren. Voor elk bodem monster werd het aantal door entomopathogene schimmels geïnfecteerde larven evenals de geslachten van de geïsoleerde schimmelsoorten geregistreerd.

2.5.3 Identificatie van entomopathogene schimmels

Om rein schimmelculturen uit meelwormen te verkrijgen, zijn alle schimmelkolonies, die morfologisch van elkaar verschillend waren, overgezet naar verse kweekmedium. Eerste onderscheid tussen de schimmel isolaten werd gemaakt op basis van morfologische kenmerken van de kolonies.

Vervolgens is er identificatie van schimmel isolaten uitgevoerd met behulp van PCR techniek.

Schimmel DNA was geëxtraheerd met Plant DNeasy kit (Qiagen) volgens het protocol zoals beschreven door de fabrikant.

Primer set ITS-5 (forward; 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') en ITS-4 (reverse; 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') was gebruikt om fragment van ITS van schimmels te amplificeren. PCR was uitgevoerd in 25 µl volume, met 12.5 µl Taq Polymerase Master Mix, 1 µl forward primer (10mM), 1 µl reverse primer (10mM), 1 µl of the DNA monster en 9.5 µl nuclease-vrij water. PCR programma was als volgt: 3min op 95°C voor initiële denaturatie, daarna 39 cycli van 10s op 95°C voor denaturatie, 30s op 52°C voor hybridisatie en 30s op 72°C voor DNA strang **verlenging**. Productie van gewenste PCR product werd bevestigd door agarose gel electrophorese. PCR product was gezuiverd met beulp van QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) en opgestuurd naar BaseClear BV (Leiden, Netherlands) voor sequenzen. De verkregen sequenties van schimmel DNA werden vergeleken met andere bekende sequenties van schimmels in de NCBI-database met behulp van de BLAST-zoektool.

2.5.4 Effect van geïsoleerde schimmels op overleving van trips

De entomopathogeniciteit van de schimmels en hun antagonistische activiteit tegen trips werd getest door het behandelen van volwassen trips (gekweekt op potchrysanthemumplanten cv Miramar) met schimmelsporen. Vrouwelijke tripsen waren behandeld met sporensuspensies (10⁸/mL schimmelsporen in 0,01% Triton). De controlebehandeling bestond uit tripsen die alleen met 0,01% Triton behandeld waren. Vijf tripsen werden geplaatst in plastic container (500 ml) met paprikabladschijf op wateragar. Toets is uitgevoerd in viervoud voor elk schimmelsoort. Containers werden afgesloten met luchtdoorlatende deksels, bevochtigd en bewaard in een plastic zak in een klimaatkast (24°C, 70% relatieve luchtvochtigheid, 16L:8D fotoperiode) gedurende twee weken. Overleving van trips en symptomen van schimmelinfecties zijn drie keer per week gecontroleerd.

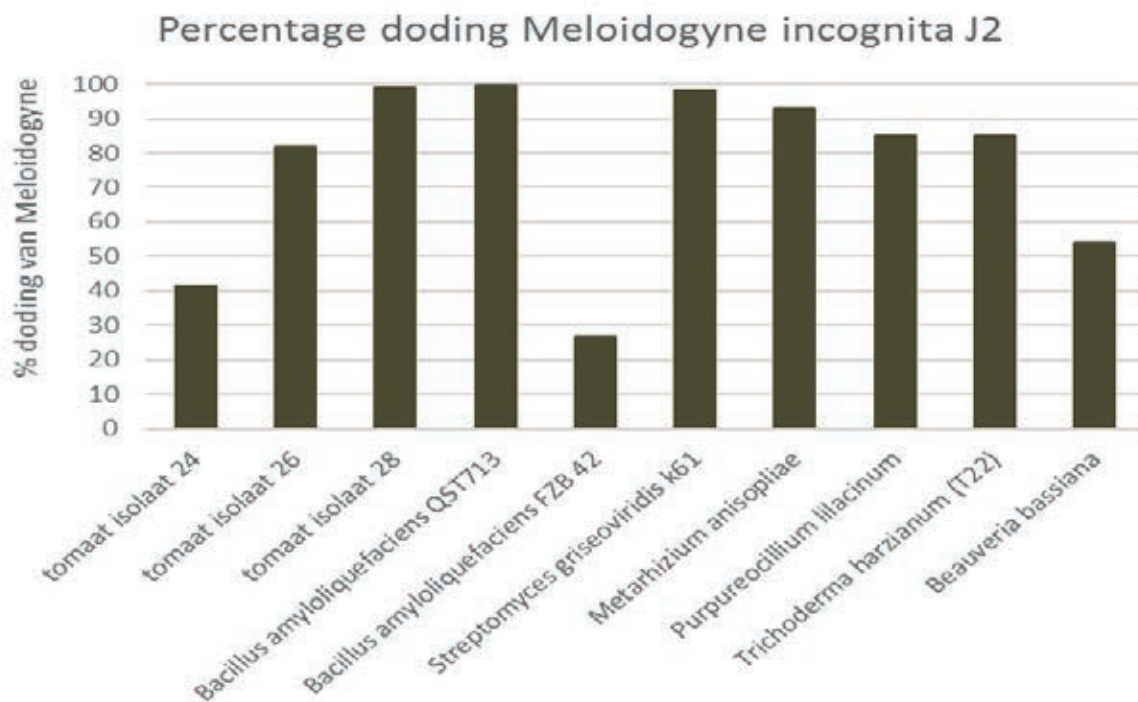
2.5.5 Analyse van bodemfauna uit Tullgren

500 g grondmonsters zijn onderzocht in Tullgrenapparatuur op aanwezige bodemfauna. Bodemfauna werd geclassificeerd volgens de volgende taxa: *Coleoptera* (kevers), *Collembola* (springstaarten), *Chilopoda* (duizendpoten), *Diplopoda* (duizendpoten), *Diptera* (muggen en vliegen) en *Acaria* (mijten). In geval van *Acaria* werd verder onderscheid gemaakt in *Prostigmata*, *Oribatida* en *Mesostigmata*. Elk bodemmonster werd in drievoud onderzocht.

3 Resultaten

3.1 Directe antagonisme van bacteriën en schimmels tegen juvenilen (J2) van *Meloidogyne incognita*

Uit de resultaten van *in vitro* toets blijkt dat extracellulaire metabolieten van bacteriën en schimmels potentie hebben om juvenilen (J2) van *Meloidogyne incognita* te doden (Figuur 3.1). Juvenilen (J2) waren dood of niet meer actief aan het migreren door steenwolfilters na de blootstelling aan supernatants van bacteriële kweken. Zowel isolaten van commercieel beschikbare producten (Serenade, Mycostop) als isolaten verkregen uit grond bioteelt waren in staat om tussen 27% en 99% van juvenilen (J2) van *Meloidogyne incognita* op die manier te beïnvloeden (Figuur 3.1). Extracellulaire metabolieten van *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 (Serenade), *Streptomyces griseoviridis* k61 (Mycostop) en tomaat isolaat 28 (*Peanibacillus illinoisensis*) bleken het meest effectief te zijn tegen juvenilen van *Meloidogyne incognita* met doding/inactivatie percentage boven 98%. Extracellulaire metabolieten van schimmels bleken ook effectief te zijn in afdoding/inactivatie van juvenilen van *Meloidogyne incognita* (Figuur 3.1). Supernatant van *Metarhizium anisopliae* kweek bleek het meeste effect te hebben, met 92% afdoding/inactivatie van juvenilen. *Beauveria bassiana* was het minst effectief tegen *Meloidogyne* juvenilen met 52% afdoding.



Figuur 3.1 Percentage doding/inactivatie van juvenilen (J2) van *Meloidogyne incognita* na 48 uur blootstelling aan extracellulaire metabolieten van bacteriën of schimmels.

3.2 Invloed van organische toevoegingen aan de grond en micro-organismen op wortelinfectie door wortelknobbelaaltje

3.2.1 Aanwezigheid van plantpathogene aaltjes in onderzochte gronden van chrysanten- en biogroenteteelt onder glas

Praktijkbedrijven, voor grondbemonstering voor de kasproef bij Wageningen Plant Research, waren gekozen op basis van inventarisatie van problematiek met wortelknobbelaaltjes in de teelt. Gekozen drie chrysantenteelt bedrijven en gekozen drie bioteelt bedrijven hebben aangegeven dat zij last hebben van wortelknobbelaaltjes.

Alle gronden zijn onderzocht op aanwezigheid van plantpathogene en saprotrofe aaltjes voor het inzetten van de proef. Uit dit onderzoek is gebleken dat er grote verschillen zijn tussen bedrijven wat betreft aantallen wortelknobbelaaltjes in de grond (Tabel 5). Het hoogste aantal wortelknobbelaaltjes was gevonden in grond van bedrijf E (chrysant). In verdere analyse, op basis van morfologische kenmerken, waren wortelknobbelaaltjes in alle gronden geïdentificeerd als *Meloidogyne incognita*.

Tabel 5

Aantallen *Meloidogyne sp.* (per 100g grond) in gronden van zes praktijkbedrijven.

	A			B			C		
	spoel	incubatie (4 weken)	som	spoel	incubatie (4 weken)	som	spoel	incubatie (4 weken)	som
onbehandeld	1255	20	1275	390	105	495	37	10	47
+champost	935	5	940	275	55	330	8	0	8
+mulch	1085	40	1125	395	20	415	20	5	25
	D			E			F		
	spoel	incubatie (4 weken)	som	spoel	incubatie (4 weken)	som	spoel	incubatie (4 weken)	som
onbehandeld	290	50	340	1265	995	2260	75	5	80
+champost	95	20	115	285	970	1255	2	10	12
+mulch	675	25	700	2855	7850	10705	16	0	16

Spoel- aantal aaltjes na eerste grondspoeling; incubatie- aantal aaltjes die geteld is in grond na 4 weken incubatie (tijd nodig voor uitkomen van nakomelingen uit eieren die in de grond mogelijk aanwezig waren)

Tijdens uitgebreide aaltjesanalyse zijn er nog andere, mogelijk plantpathogene aaltjes gevonden in de onderzochte gronden (Tabel 6). In de grond van bedrijven B (bioteelt), D, E en F (chrysant) zijn *Paratylenchus* aaltjes (speldaaftjes) gevonden. In de grond van bedrijven B (bioteelt), D en F (chrysant) zijn *Pratylenchus* aaltjes (wortellesieaaltjes) gevonden. In de grond van bedrijf B zijn er ook significante aantallen van *Tylenchorynchus* aaltje gevonden.

Het grootste aantallen saprotrofe aaltjes, die van dood organisch materiaal leven, waren gevonden in de gronden van bedrijf A en B (bioteelt) (Tabel 6).

Toevoeging van champost heeft in het algemeen geresulteerd in afname van aantallen wortelknobbelaaltjes en hogere aantallen van saprotrofe aaltjes in de grond.

Tabel 6

Aantallen aaltjes (per 100mL grond) in gronden van zes praktijkbedrijven bij aanvang van de proef.

	Aantallen aaltjes per 100mL grond (spoel+incubatie)				
	<i>Meloidogyne</i>	Overige saprotrofen	<i>Paratylenchus</i>	<i>Pratylenchus</i>	<i>Tylenchorynchus</i>
Bedrijf A					
onbehandeld	1275	1555	0	0	0
+champost	940	1775	0	0	0
+mulch	1125	2130	0	0	0
Bedrijf B					
onbehandeld	495	1965	5	115	205
+champost	330	2075	0	85	335
+mulch	415	1525	0	20	120
Bedrijf C					
onbehandeld	47	800	0	0	0
+champost	8	1535	0	0	0
+mulch	25	915	0	0	5
Bedrijf D					
onbehandeld	340	950	130	65	0
+champost	115	680	205	110	0
+mulch	700	595	145	20	0
Bedrijf E					
onbehandeld	2260	980	30	0	0
+champost	1255	1405	45	0	0
+mulch	10705	650	55	0	0
Bedrijf F					
onbehandeld	80	330	60	10	0
+champost	12	670	30	20	0
+mulch	16	250	30	0	0

3.2.2 Invloed van organische toevoegingen aan grond en micro-organismen op groeiparameters in tomaat en infectie van de wortels door wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita*

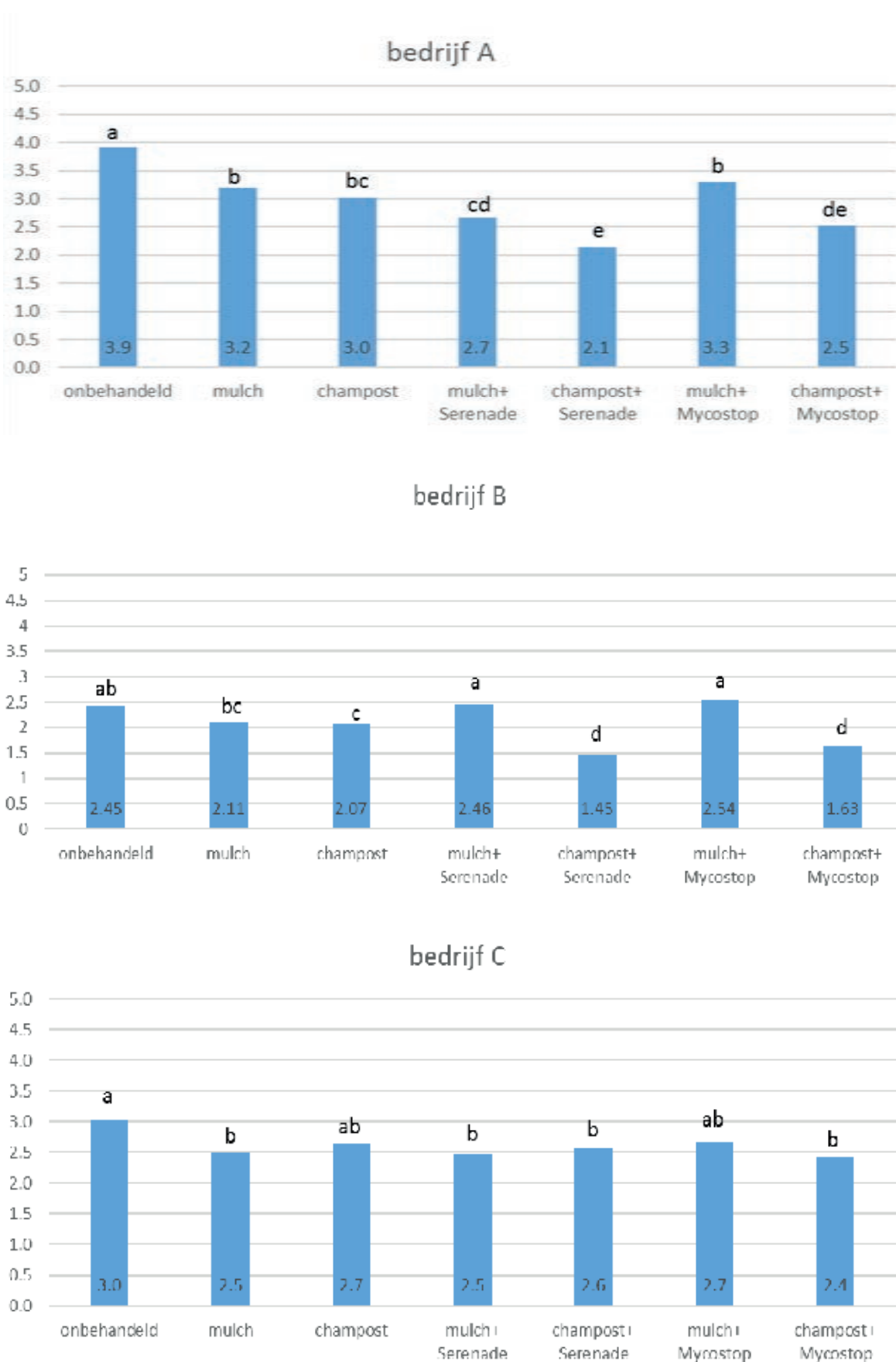
Toevoeging van mulch en champost aan de grond heeft een significant effect gehad op ontwikkeling van wortelknobbels in tomaat in alle drie onderzochte bioteelt gronden (Figuur 3.2). Beoordeling van wortelknobbels is zeven weken na het planten uitgevoerd. De meest significante afname van wortelknobbelindex is waargenomen in de grond van bedrijf A. Toepassing van Serenade of Mycostop heeft een additioneel effect gehad op verdere vermindering van symptomen (gemeten als wortelknobbelindex) in twee van drie onderzochte gronden (Figuur 3.2).

Toepassing van champost/mulch resulteerde in hogere percentages van planten met laag wortelknobbelindex (WKI van 1 of 2). Toepassing van Serenade of Mycostop heeft dit effect nog verder versterkt (Figuur 3.3).

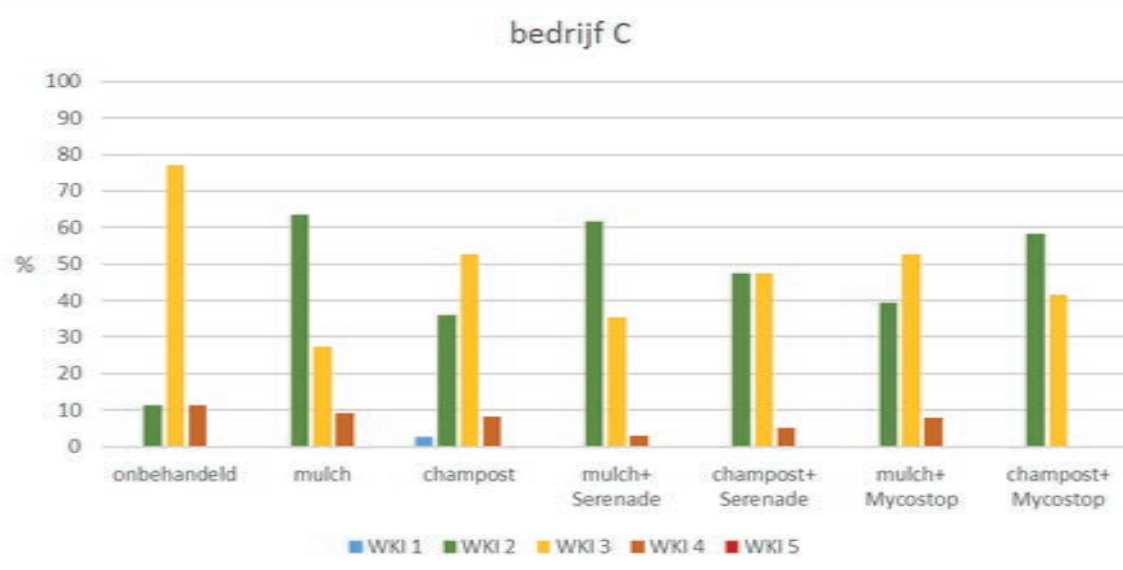
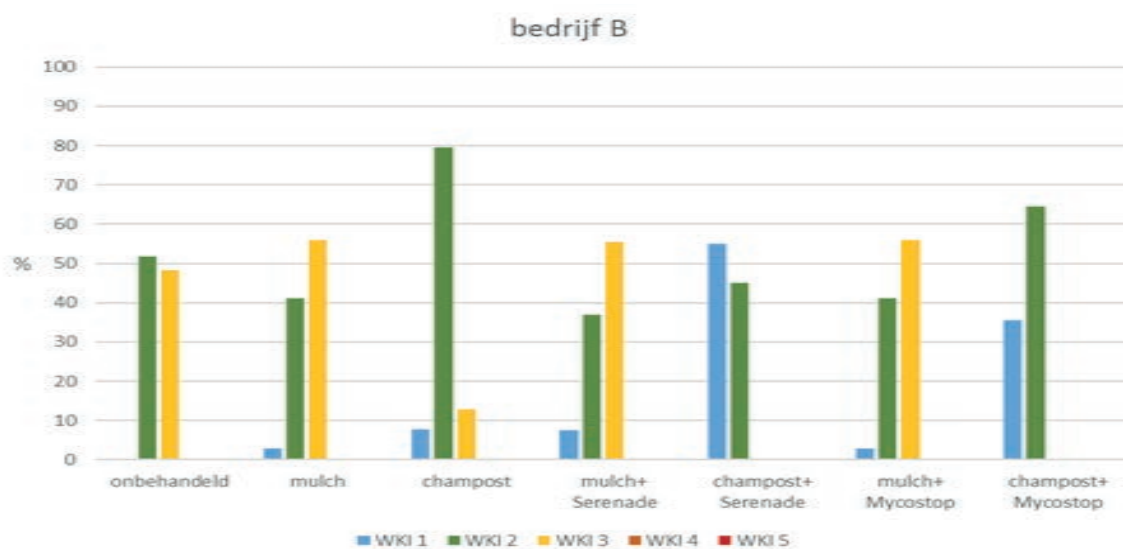
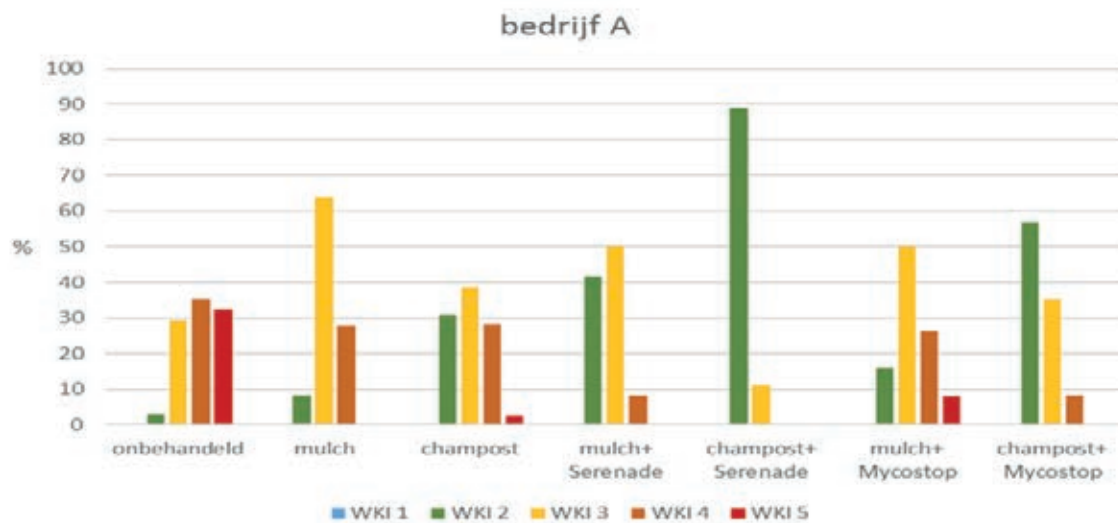
Aantal nakomelingen (J2)/ g tomaatwortel, na vier weken incubatie in de mistkamer, was relatief laag voor alle behandelingen (Figuur 3.4). Het is daarom niet mogelijk om vast te stellen of gebruik van champost/mulch in combinatie met biofungiciden effect heeft gehad op ontwikkeling van tweede generatie van aaltjes uit de eieren die zijn gelegd aan het buitenkant van de wortels van planten in de proef.

Toepassing van champost/mulch in combinatie met biofungiciden had geen significant effect op lengte (Figuur 3.5) en versgewicht (Figuur 3.6) van tomatenplanten in de proef. Geen productie gegevens zijn gemeten tijdens de proef (in verband met proef duur).

Champost behandeling had een significant effect op verhoging van de EC in vijf van zes onderzochte gronden (gemiddeld EC verhoging tussen 2-3 mS/cm) (Bijlage 3). Champost behandeling resulteerde bovendien in hogere concentraties van plantbeschikbare K, Ca, Mg, NO₃, Na en SO₄ in substraat (Bijlage 3).

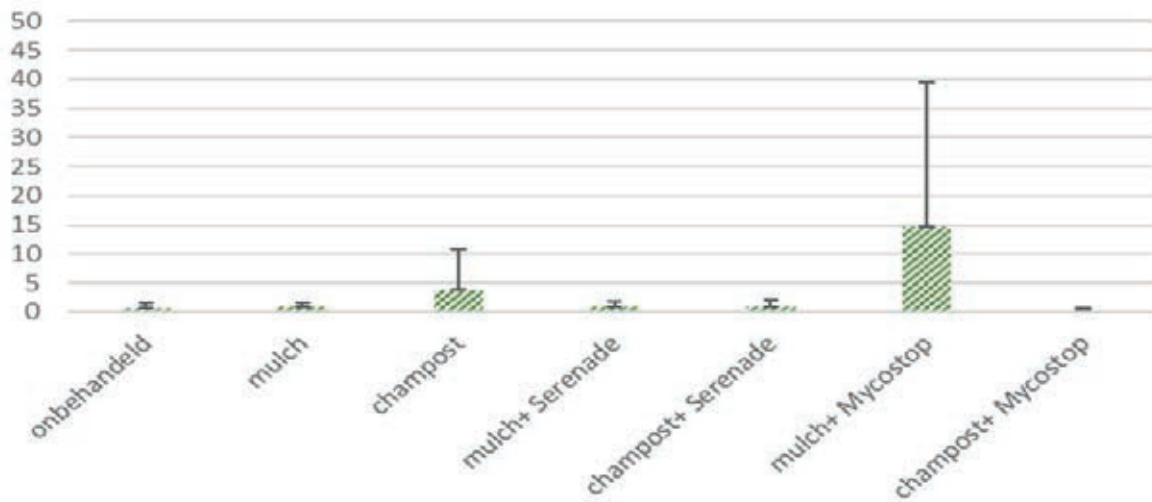


Figuur 3.2 Infectie van de tomatenwortels in verschillende behandelingen als WKI-Wortelknobbel index.

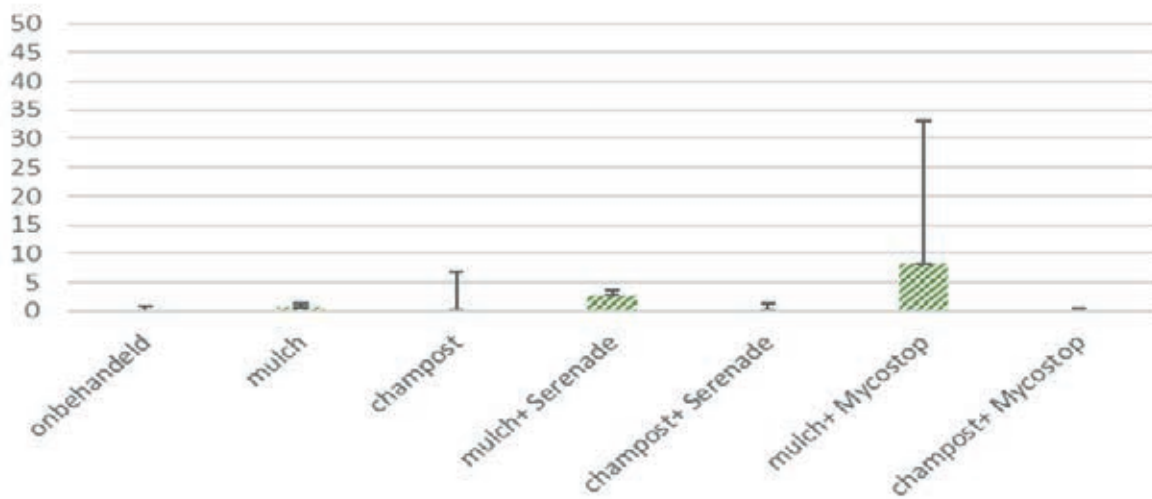


Figuur 3.3 Verschillende klassen van wortelinfectie in tomaat door wortelknobbelaaltje in verschillende behandelingen (WKI- wortelknobbelaaltje index).

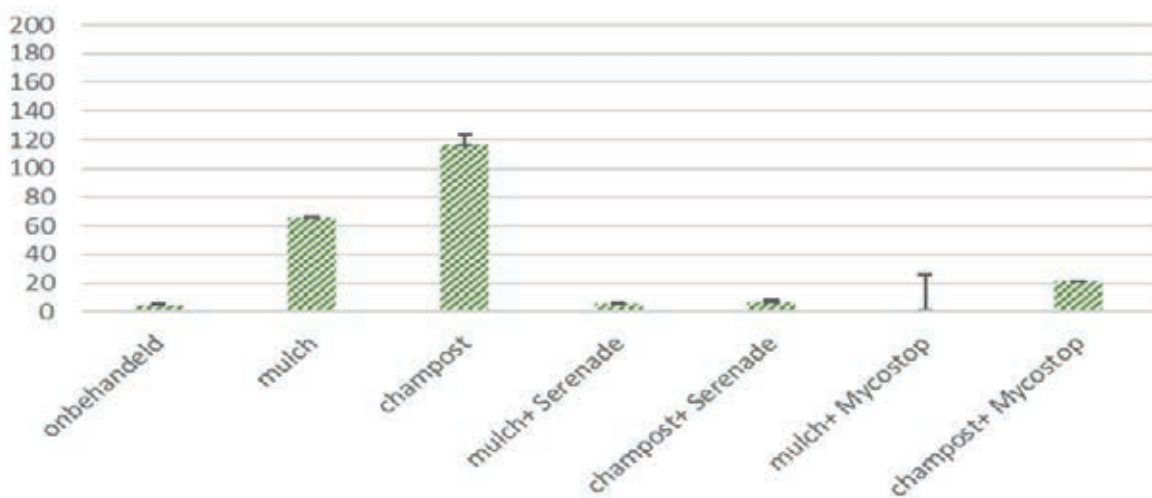
Bedrijf A Aantal Meloidogyne J2/g tomaat wortel



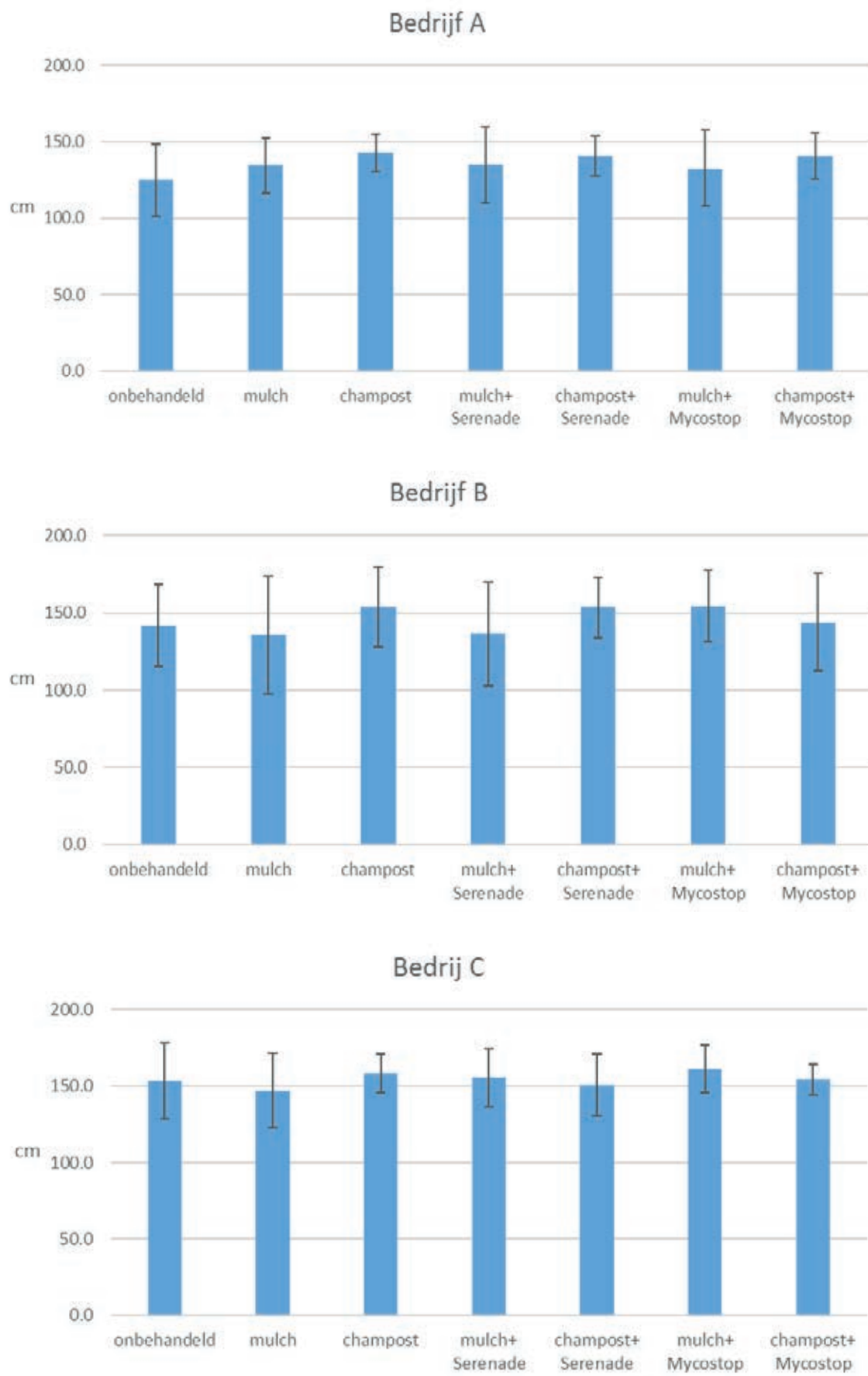
Bedrijf B Aantal Meloidogyne J2/g tomaat wortel



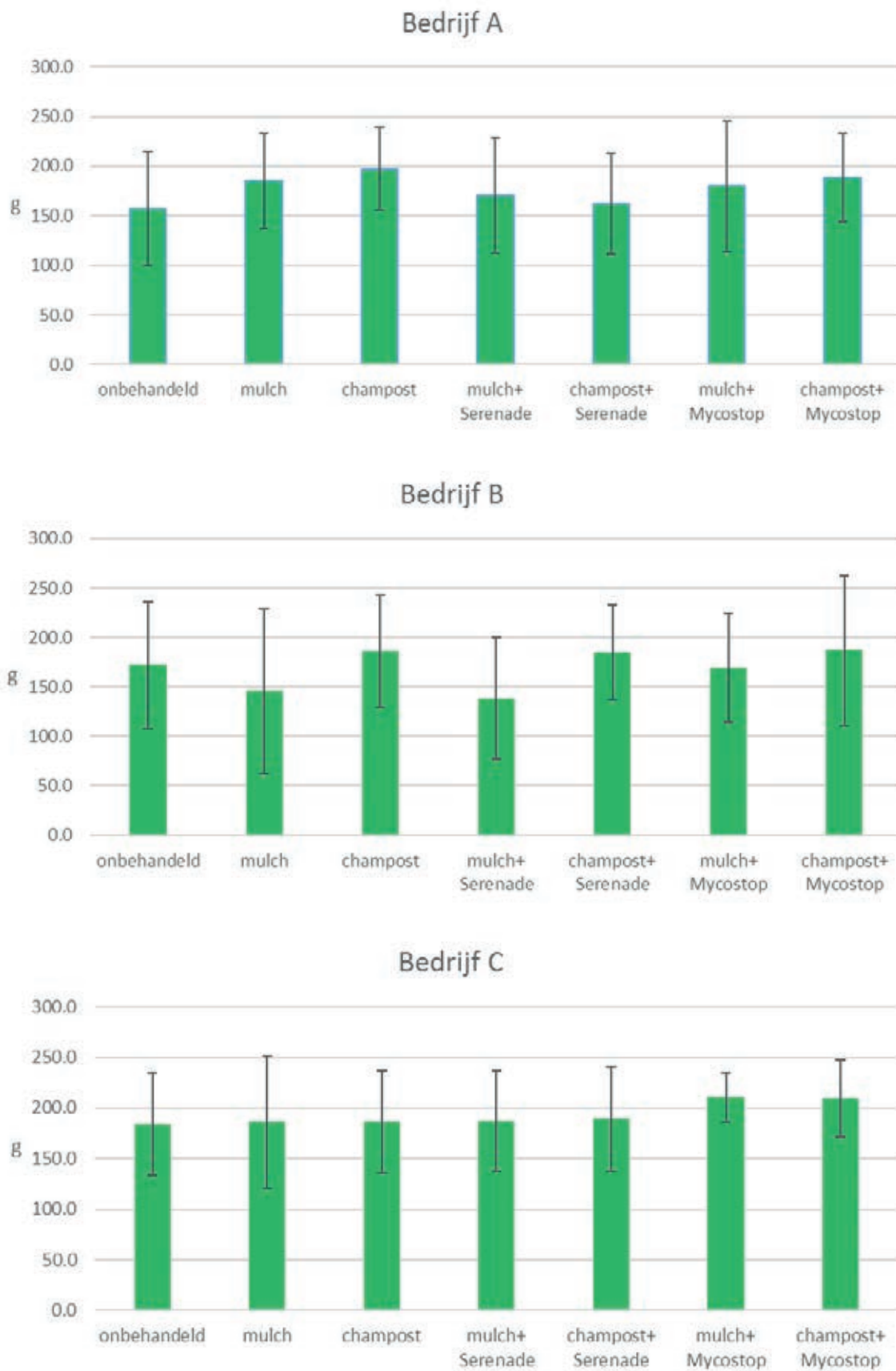
Bedrijf C Aantal Meloidogyne J2/g tomaat wortel



Figuur 3.4 Aantal nakomelingen (J2) van *Meloidogyne incognita* per 1g tomaat wortel na 4 weken incubatie in de mistkamer



Figuur 3.5 Gemiddelde plantlengte tomaat na 7 weken teelt in potten.



Figuur 3.6 Gemiddelde versgewicht tomatenplant na 7 weken teelt in potten.

3.2.3 Invloed van organische toevoegingen aan de grond en micro-organismen op groeiparameters in chrysanthe en infectie van de wortels door wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita*

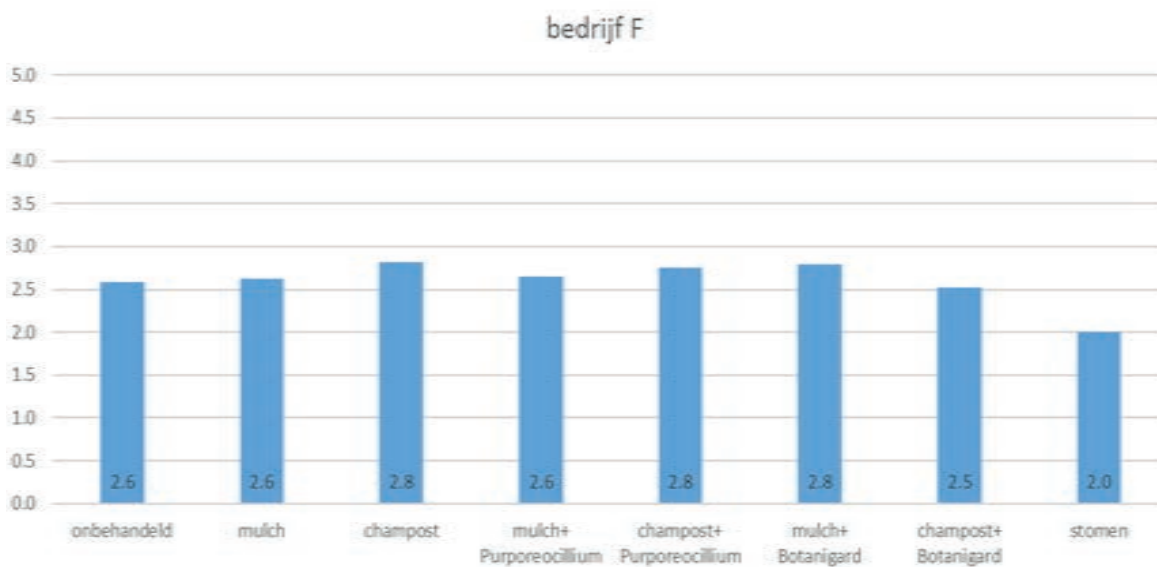
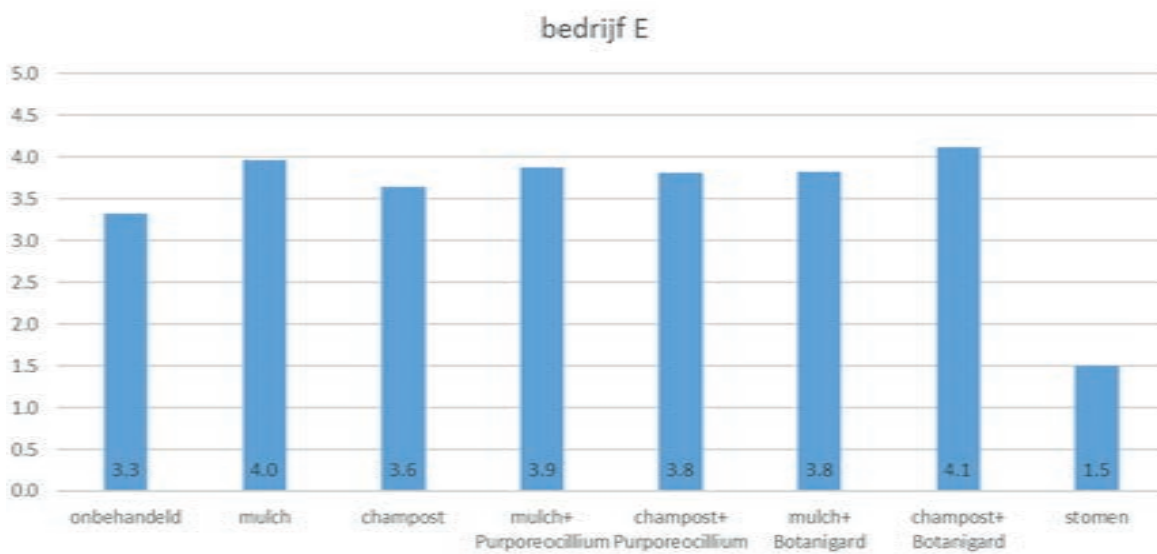
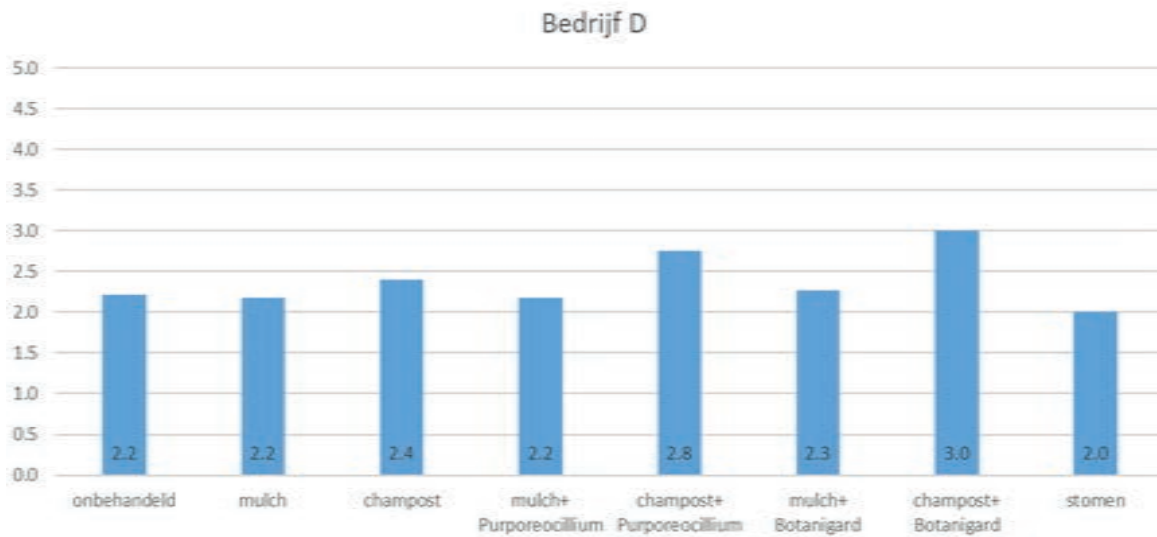
Toevoeging van mulch en champost aan de grond heeft geen significant effect gehad op ontwikkeling van wortelknobbels in chrysanthe in alle drie onderzochte gronden van chrysanthe (Figuur 3.7). Beoordeling van wortelknobbels is negen weken na het planten uitgevoerd.

Toepassing van Botanigard of *Purpureocillium lilacinum* hebben ook geen significant effect gehad op wortelknobbeldindex (WKI) (Figuur 3.7). Percentage planten met lagere wortelknobbeldindex (WKI van 1 of 2) is niet significant veranderd als gevolg van behandelingen (Figuur 3.8). In de grond van bedrijf E lijken de behandelingen zelfs averechts te werken, met als resultaat hogere gemiddelde wortelknobbeldindex (WKI) (Figuur 3.7) en hogere percentage van planten met hoog wortelknobbeldindex (WKI van 5) (Figuur 3.8).

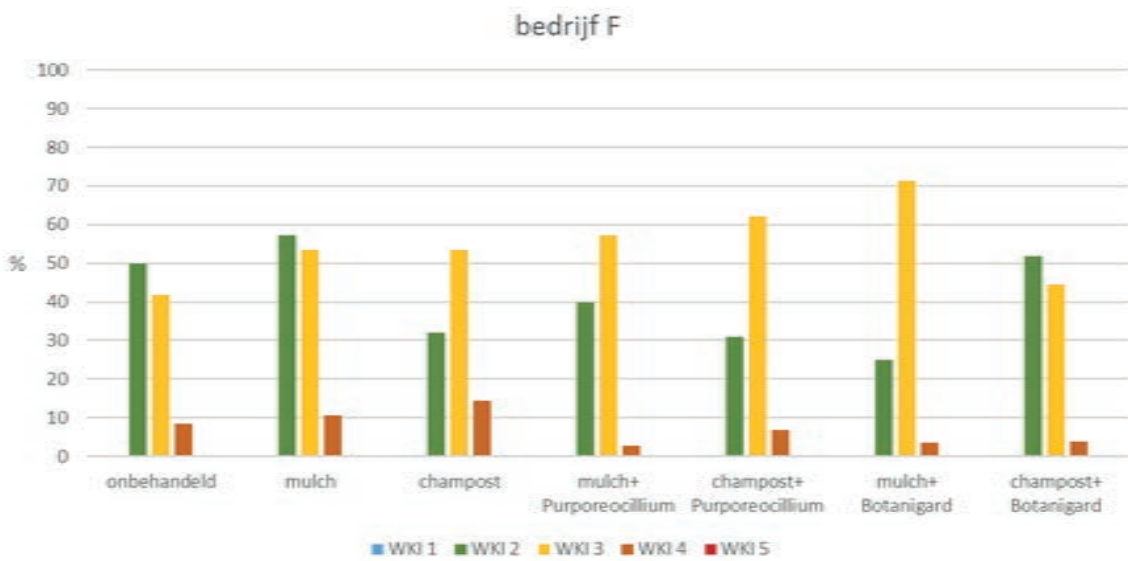
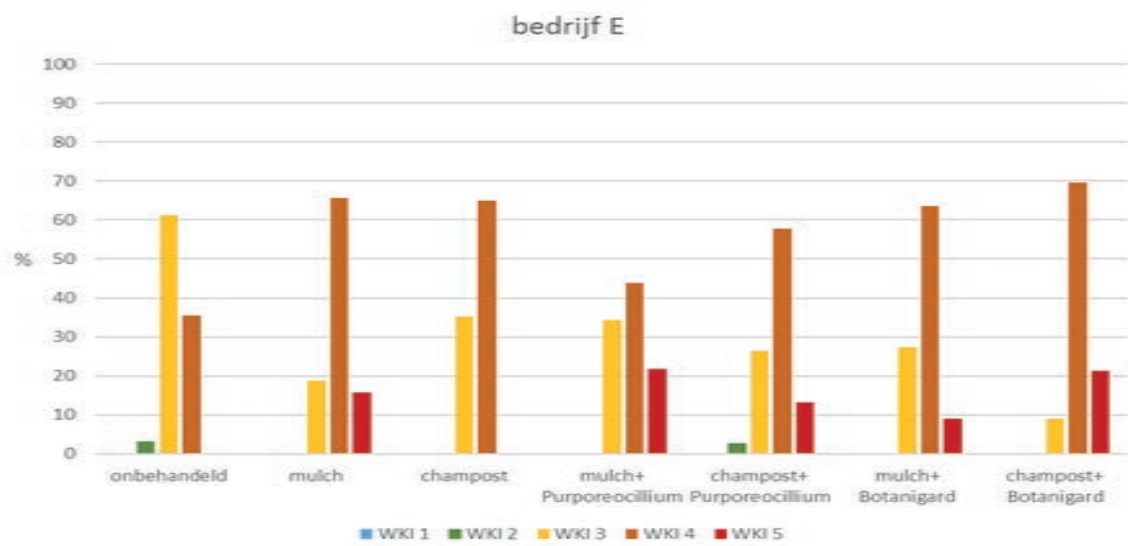
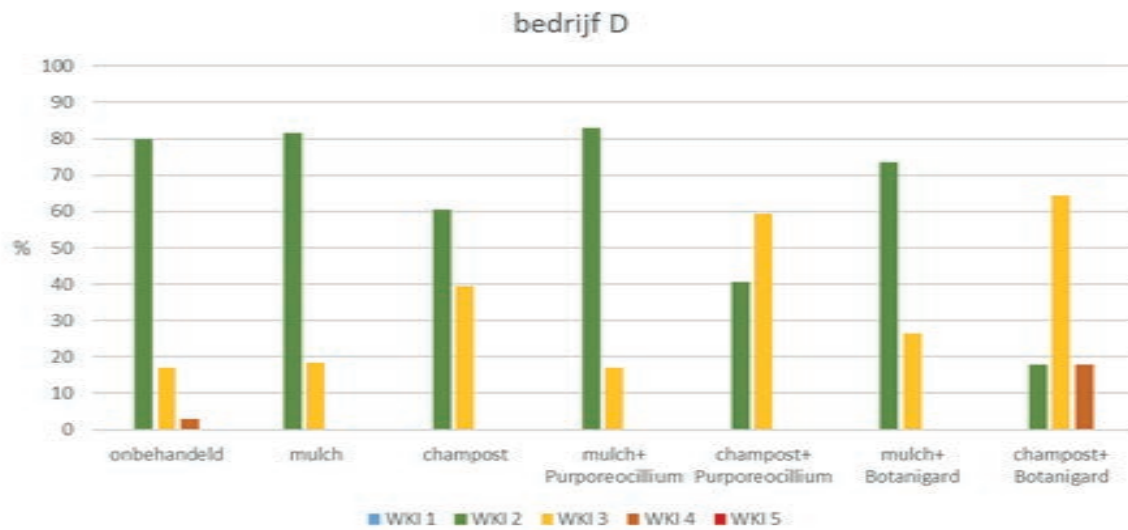
Aantal nakomelingen (J2)/ g chrysanthewortel, na vier weken incubatie in de mistkamer, was significant hoger dan in tomaatwortels (Figuur 3.4 en Figuur 3.9). Toepassing van champost/ heeft wel significant effect op aantal nakomelingen (J2) per gram wortel in twee uit drie gronden (Bedrijf D en Bedrijf F). Toepassing van champost resulteerde in significant lagere aantallen van nakomelingen (J2) per gram wortel (Figuur 3.9).

Toepassing van champost/mulch had geen significant effect op plantlengte (Figuur 3.10). en versgewicht (Figuur 3.11) van chrysanthen in de proef, behalve grond van bedrijf F waar er significant negatief effect van champost/mulch toepassing op versgewicht van chrysanthe was waargenomen (Figuur 3.11). Ongeacht statistische significantie, was er duidelijk trend te zien dat toevoeging van champost/mulch licht negatief effect zou kunnen hebben op lengte en gewicht van chrysanthe.

Dit effect was waarschijnlijk mede veroorzaakt door optreden van andere ziekten, zoals *Pythium* en *Fusarium*. Gronden zijn niet gestoomd geweest voor de proef, daarom behalve wortelknobbelaaltjes zouden ook andere ziekten, die in de grond aanwezig waren, invloed kunnen hebben op chrysanthegroei.

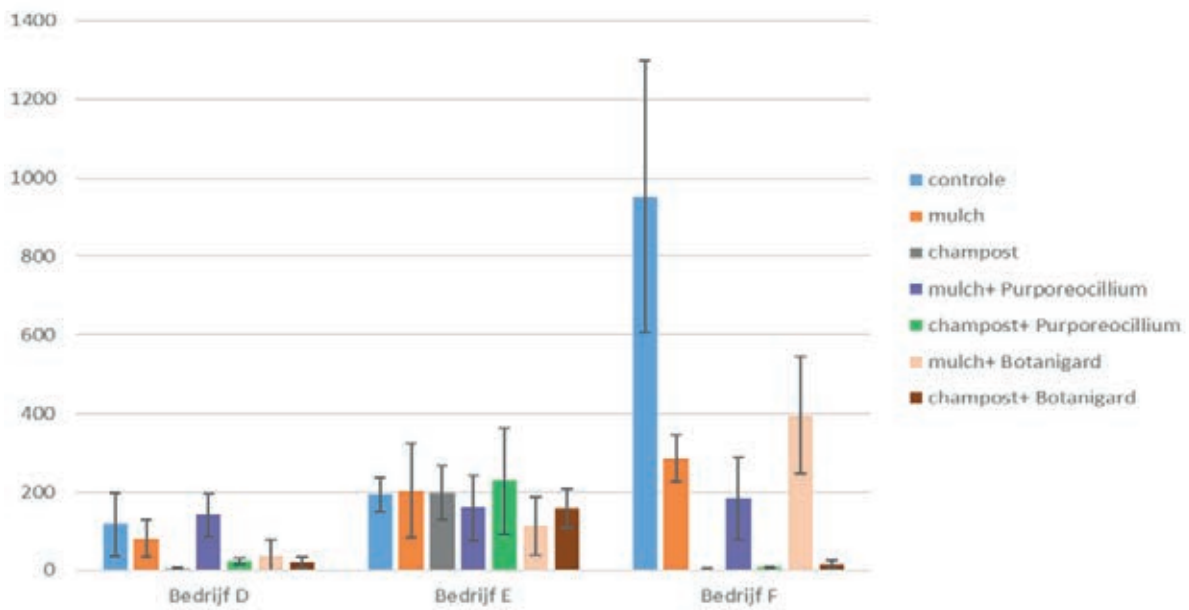


Figuur 3.7 Infectie van de chrysantenwortels in verschillende behandelingen als WKI- Wortelknobbel index.

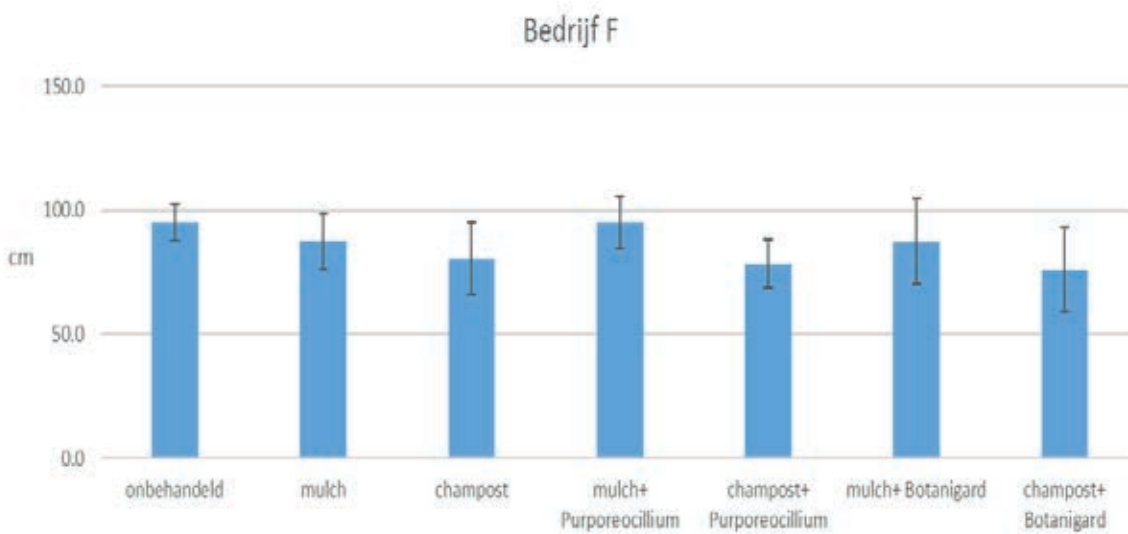
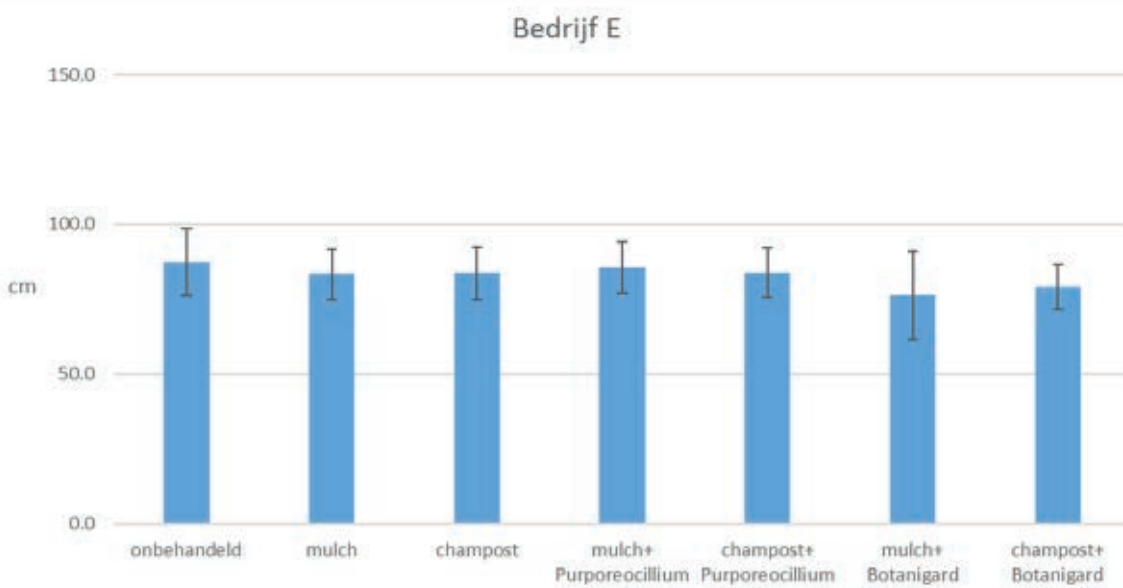
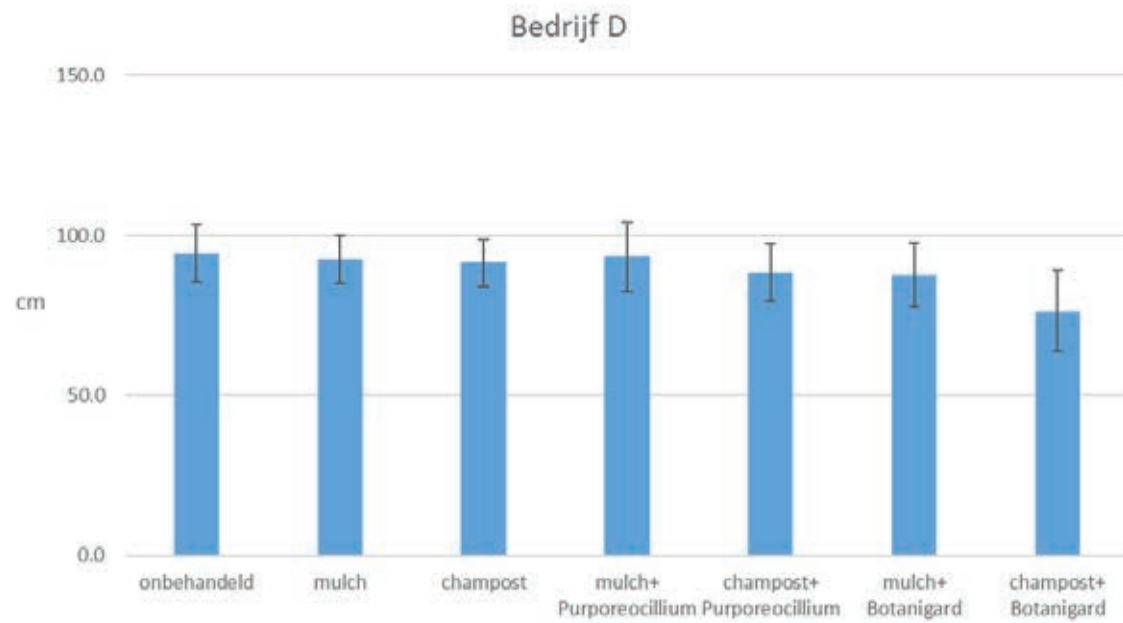


Figuur 3.8 Verschillende klassen van wortelinfectie in chrysant door wortelknobbelaaltje in verschillende behandelingen.

Aantal Meloidogyne J2/ g chrysant wortel



Figuur 3.9 Aantal nakomelingen (J2) van *Meloidogyne incognita* per 1g chrysantwortel na 4 weken incubatie in de mistkamer.



Figuur 3.10 Gemiddelde plantlengte chrysant na 9 weken teelt in potten.



Figuur 3.11 Gemiddelde versgewicht chrysant na 9 weken teelt in potten.

3.2.4 Invloed van champost toevoeging aan grond en Serenade of Mycostop op groeiparameters in chrysant en infectie van de wortels door wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita*

Beide gronden (Grond A en Grond B) zijn onderzocht op aanwezigheid van plantpathogene en saprotrofe aaltjes voor het inzetten van de proef. Uit dit onderzoek is gebleken dat er grote verschillen zijn tussen de twee bedrijven wat betreft aantallen wortelknobbelaaltjes in de grond (Tabel 7), met vier keer zo veel wortelknobbelaaltjes in grond B dan in grond A. Wortelknobbelaaltjes in beide gronden waren geïdentificeerd als *Meloidogyne incognita* op basis van morfologische kenmerken. Behalve wortelknobbelaaltjes, waren er in grond A ook *Paratylenchus* aaltjes gevonden in relatief grote aantallen (tussen 285 en 380 aaltjes per 100mL grond). Toevoeging van champost aan de grond resulteerde in verdunning van natuurlijke inoculum van wortelknobbelaaltjes in beide gronden (Tabel 7).

Tabel 7

Aantallen aaltjes (per 100mL grond) in gronden van twee praktijkbedrijven bij aanvang van de proef.

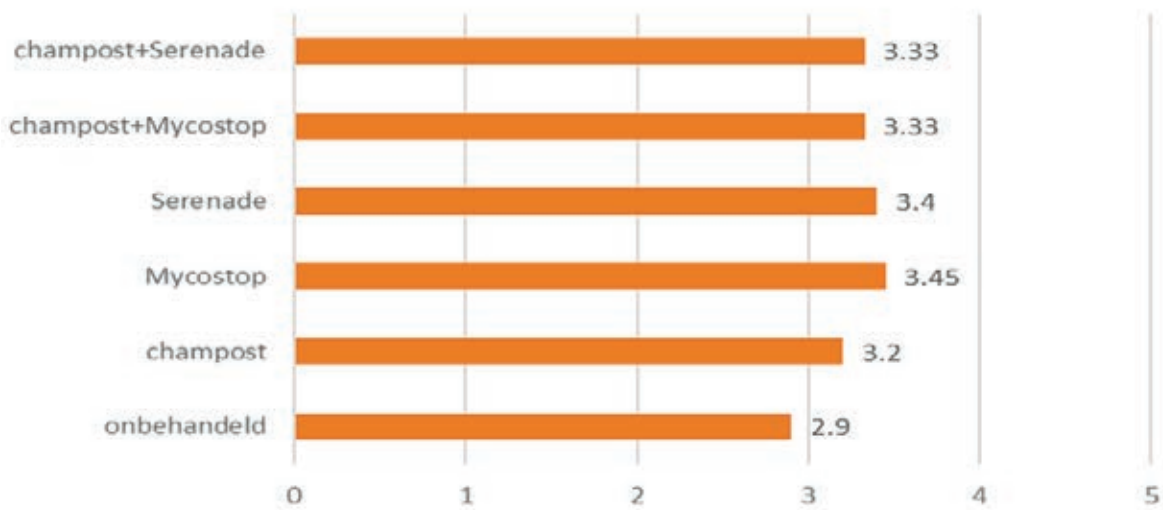
	Aantallen aaltjes per 100mL grond (spoel+incubatie)				
	<i>Meloidogyne</i>	Overige saprotrofen	<i>Paratylenchus</i>	<i>Pratylenchus</i>	<i>Tylenchorynchus</i>
Grond A					
onbehandeld	610	3505	285	65	10
+champost	570	4835	380	0	0
Grond B					
onbehandeld	2505	2440	35	20	0
+champost	1785	1650	30	0	0

Toepassing van champost heeft geen significant effect gehad op ontwikkeling van wortelknobbels (Figuur 3.12). In grond B, toevoeging van champost heeft geresulteerd in significant hogere infectie door wortelknobbelaaltjes (met verhoging van wortelknobbel index van gemiddeld 3.3 naar 4.3) (Figuur 3.12).

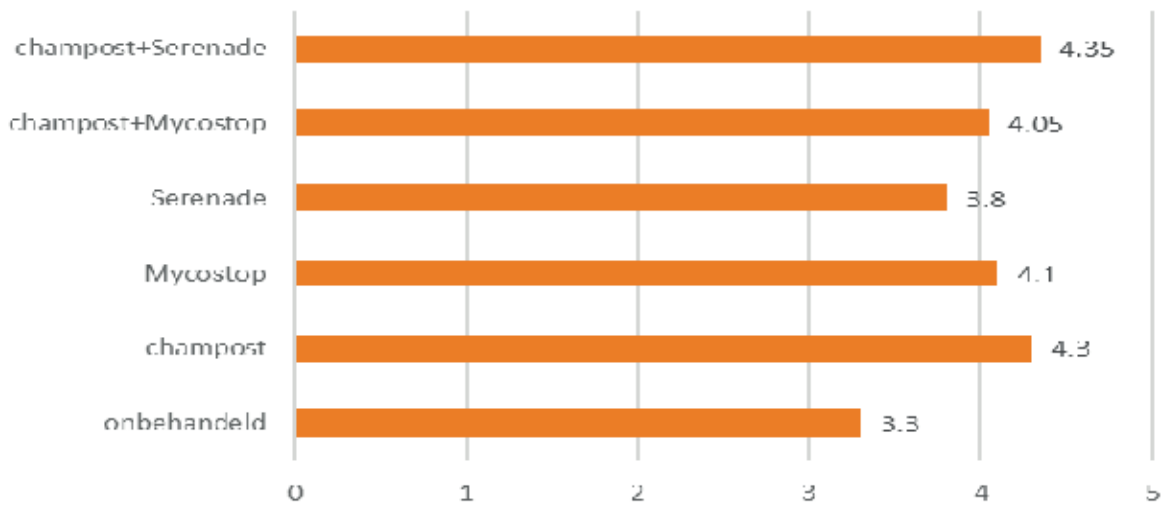
Toepassing van Serenade of Mycostop met of zonder champost heeft significant effect gehad op lengte (Figuur 3.13) en versgewicht (Figuur 3.14) van chrysantenplanten die groeiden in grond A. In grond B was geen positief effect van biofungiciden op chrysantgroei (lengte of versgewicht) waargenomen.

Effect van champost en biofungiciden op stengeldikte was verschillend in beide gronden. Toevoeging van champost in grond A had geen effect op stengeldikte of resulteerde in dikkere stengels (in behandeling met champost alleen), terwijl in de grond B stengeldikte juist lager was dan in behandelingen met champost (Figuur 3.15)

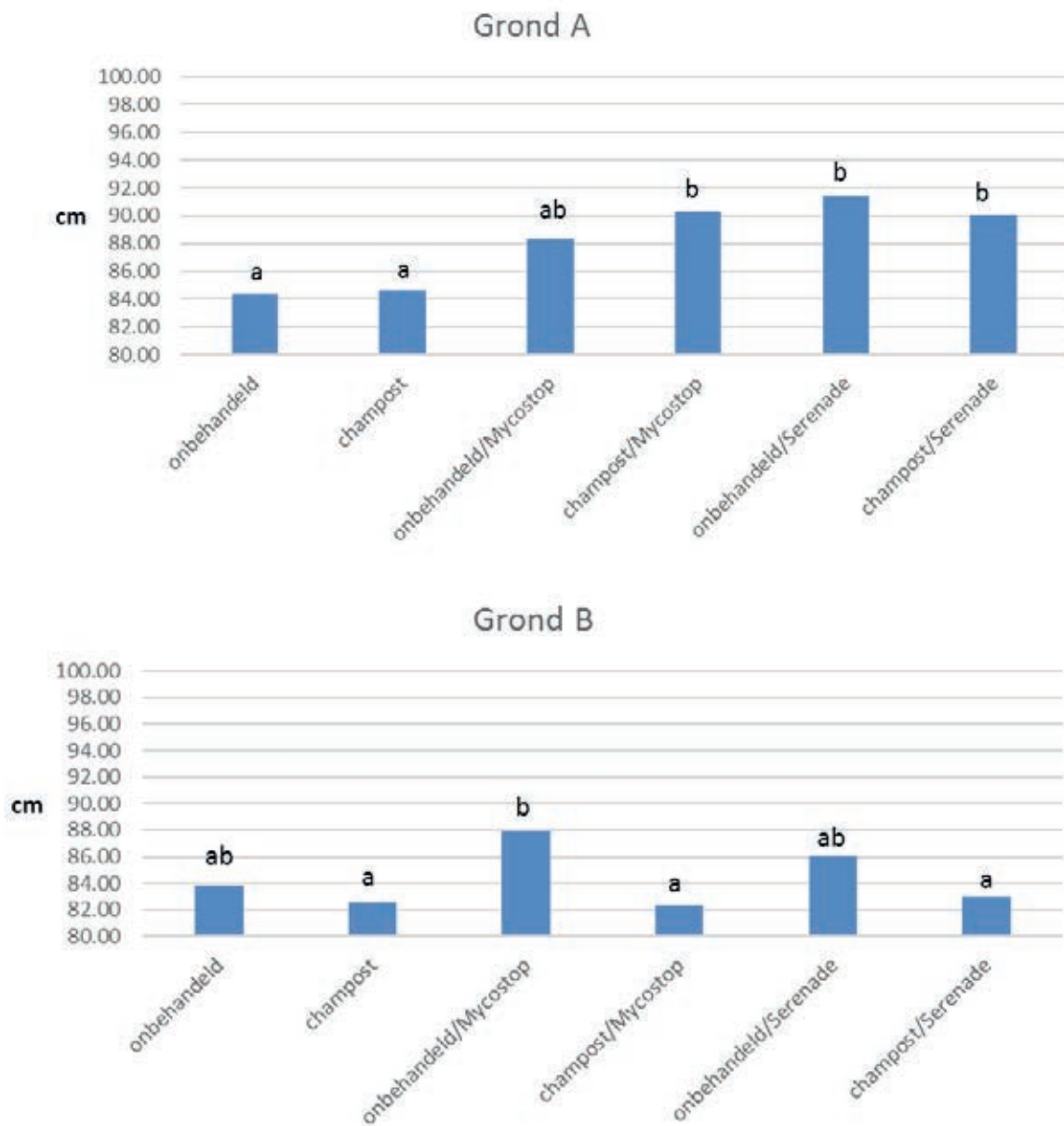
Grond A- Gemiddelde Wortelknobbel index (WKI)



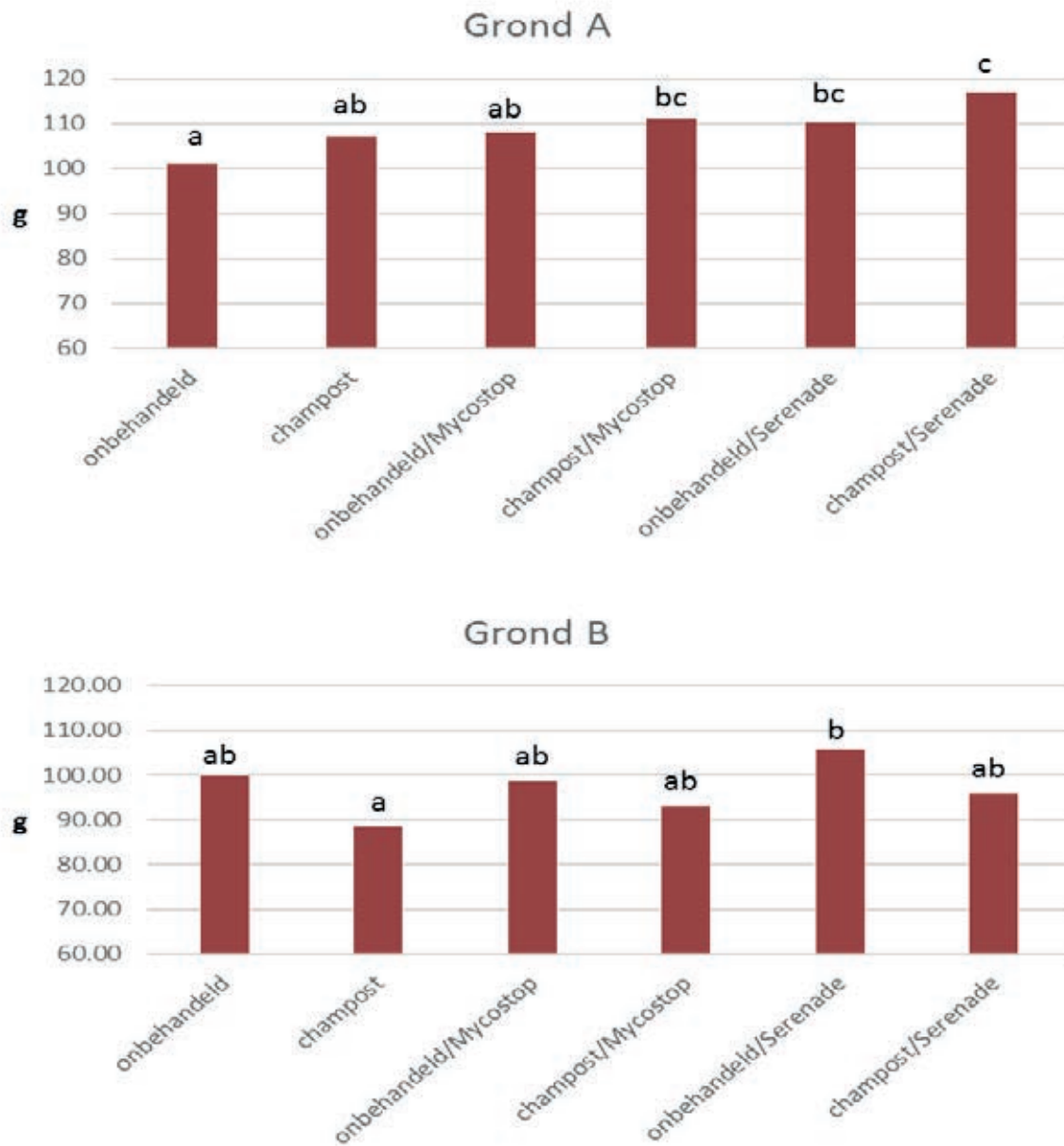
Grond B- Gemiddelde Wortelknobbel index (WKI)



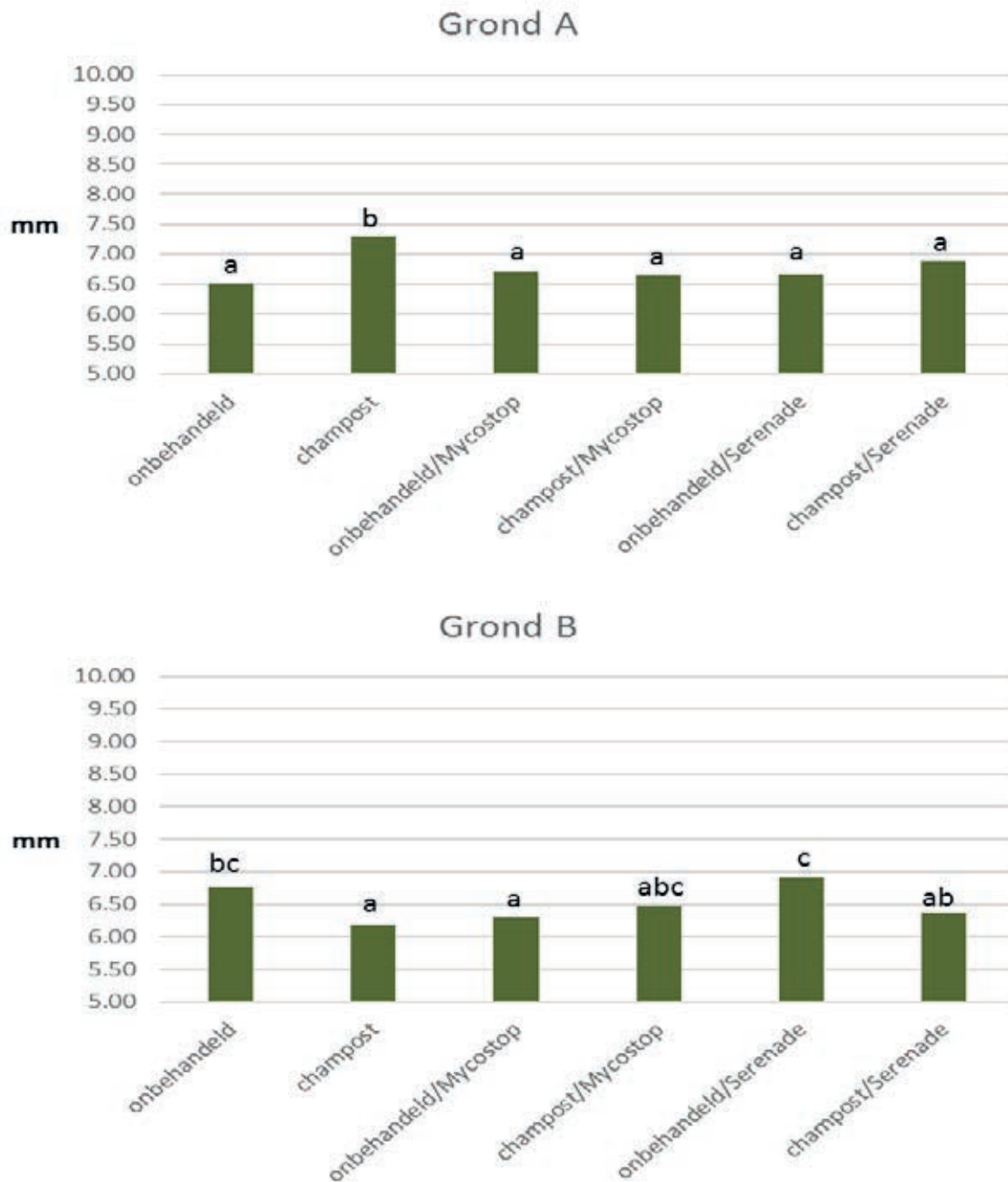
Figuur 3.12 Infectie van de chrysantenwortels in verschillende behandelingen als WKI- Wortelknobbel index.



Figuur 3.13 Gemiddelde plantlengte chrysant na 9 weken teelt in potten.



Figuur 3.14 Gemiddelde vers gewicht chrysant na 9 weken teelt in potten.



Figuur 3.15 Gemiddelde stengeldikte chrysant na 9 weken teelt in potten.

3.3 Invloed van Mycostop op infectie van *Pythium* en *Fusarium* in chrysant

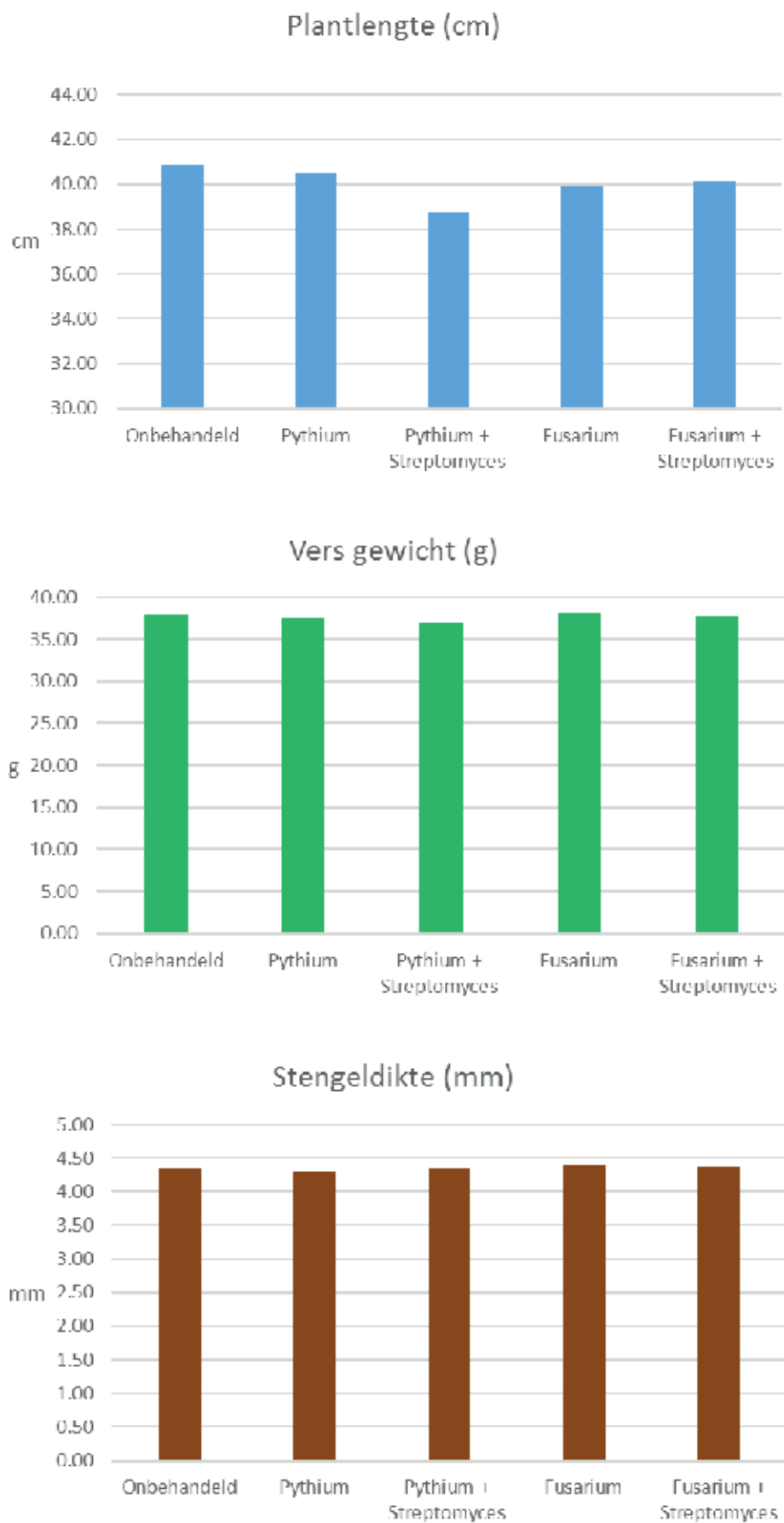
Effectiviteit van Mycostop tegen twee bodempathogenen van chrysant, *Pythium ultimum* en *Fusarium oxysporum*, was getoetst in een kleine proef.

Omdat er bovengronds geen effecten van *Pythium* of *Fusarium* infectie zichtbaar waren, zijn de wortels van de planten bekeken onder microscoop om vast te stellen of pathogenen aanwezig waren in het wortelstelsel. Toen bleek dat *Pythium ultimum* was aanwezig in alle wortels (ook bij controle planten) (Figuur 3.16). Na uitplaten op synthetisch groeimedium (in petrischalen) is er ook aanwezigheid van *Fusarium* geconstateerd in de wortels die geïnoculeerd waren met *Fusarium oxysporum*.



Figuur 3.16 Voorbeelden van door *Pythium* aangetast wortelstelsel van chrysant: A-visuele beoordeling; B-beoordeling onder lichtmicroscop.

Aanwezigheid van *Pythium* en *Fusarium* in de wortels heeft niet geresulteerd in symptomen bovengronds, zoals verwelking of dood van de planten. Er waren ook geen significante verschillen waargenomen in groei van chrysanten bovengronds na inoculatie met *Pythium* of *Fusarium* (versgewicht, lengte of stengeldikte) (Figuur 3.17). Toepassing van Mycostop had ook geen significant effect op chrysantengroei in deze proef (Figuur 3.17).

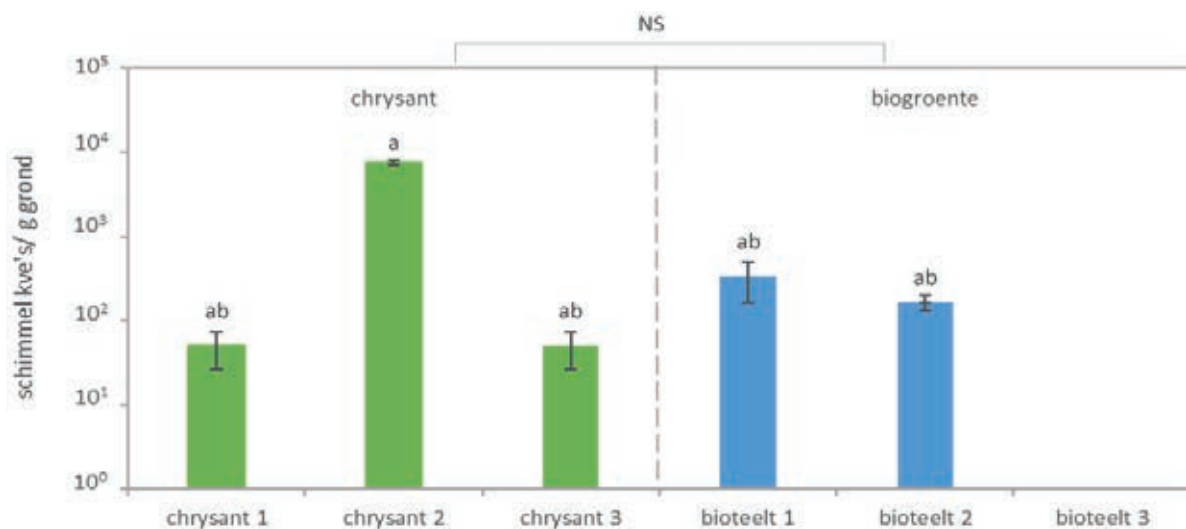


Figuur 3.17 Gemiddelde plantlengte, vers gewicht en stengeldikte van chrysanten die geïnfecteerd zijn met *Pythium* of *Fusarium* en met/zonder behandeling met Mycostop na 8 weken teelt.

3.4 Aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de gronden van teelt onder glas

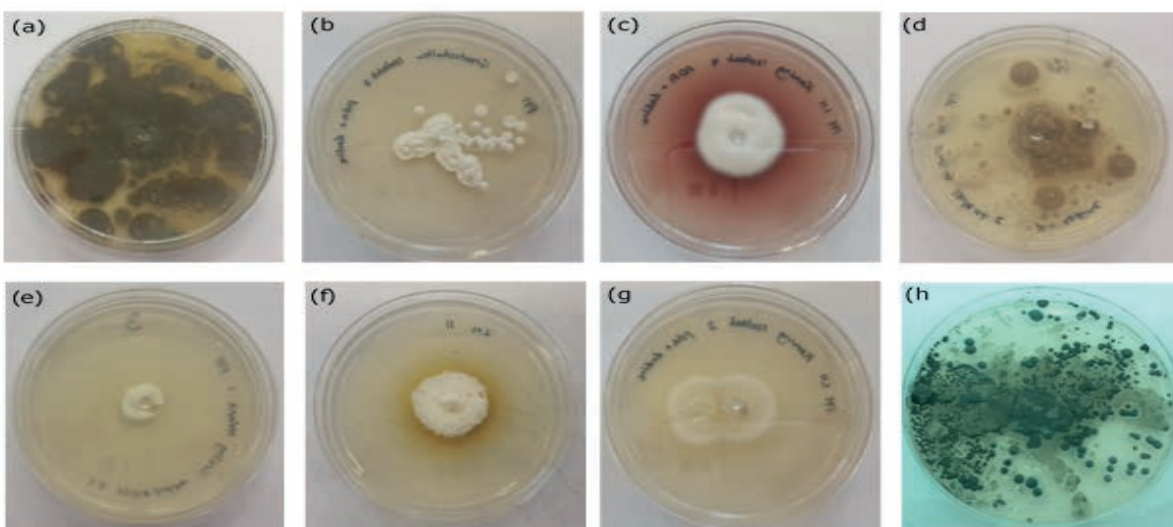
3.4.1 Isolatie van entomopathogene schimmels uit grond via uitplaat methode

In November 2016 zijn gronden bij zes praktijkbedrijven onder glas bemonsterd voor analyse van entomopathogene schimmels. Aanwezigheid van mogelijk entomopathogene schimmels in de onderzochte gronden (3 gronden chrysantenteelt; 3 gronden bioteelt) was eerst bevestigd met uitplaat methode. Entomopathogene schimmels waren geïsoleerd uit vijf van zes gronden (Figuur 3.18). Dichtheden van schimmels in de grond lagen tussen 10^1 and 10^3 kve/s/ g grond (Figuur 3.18). Er was geen significant verschil in schimmel dichtheden waargenomen tussen chrysant en bioteelt gronden.



Figuur 3.18 Dichtheden van mogelijk entomopathogene schimmels per gram grond in verschillende gronden van teelt onder glas.

Acht verschillende soorten mogelijke entomopathogene schimmels waren geïsoleerd met de grond uitplaat methode (Figuur 3.19). Deze soorten zijn vervolgens geïdentificeerd op basis van sequensen van ITS fragment. Overzicht soorten die geïsoleerd zijn uit elk grond is te vinden in Tabel 8.



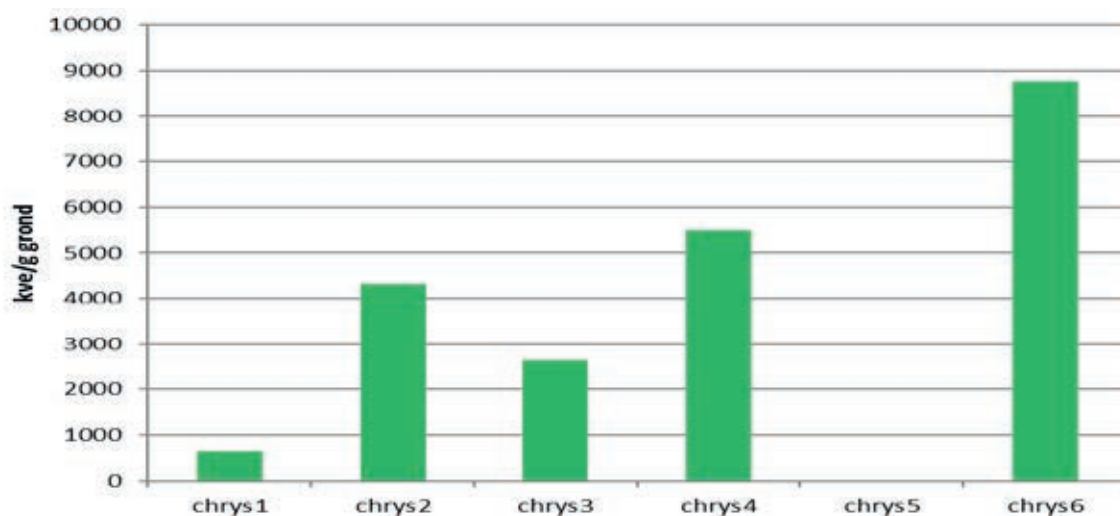
Figuur 3.19 Verschillende mogelijk entomopathogene schimmels geïsoleerd uit gronden chrysant en biogroente teelt onder glas: (a) *Metarhizium*, (b) *Beauveria*, (c) *Lecanicillium*, (d) *Isaria*, (e) *Simplicillium*, (f) *Clonostachys*, (g) *Geotrichum*, (h) *Penicillium*.

Tabel 8

Mogelijk entomopathogene schimmels geïsoleerd uit gronden chrysanten en bioteelt (uitplaat methode) in november 2016.

	Chrysant 1	Chrysant 2	Chrysant 3	Bioteelt 1	Bioteelt 2	Bioteelt 3
<i>Metarhizium</i>	x	x	x			
<i>Beauveria</i>	x	x				
<i>Lecanicillium</i>	x	x			x	
<i>Isaria</i>		x	x	x	x	
<i>Simplicillium</i>			x			
<i>Clonostachys</i>	x	x	x	x		
<i>Geotrichum</i>				x	x	
<i>Penicillium</i>	x					
som	5	5	4	3	3	0

In Januari 2017 zijn gronden van zes additionele chrysantenteelt bedrijven bemonsterd voor onderzoek naar aanwezigheid van entomopathogene schimmels. Dichtheden van mogelijk entomopathogene schimmels in die gronden waren verschillend, van geen tot bijna 10⁴ kve's per gram grond (Figuur 3.20). Deze schimmels waren ook geïdentificeerd op basis van morfologie en DNA sequenties (Tabel 9). Voorbeelden van schimmelgroei op petrischalen met selectieve medium zijn weergegeven in Figuur 3.21.



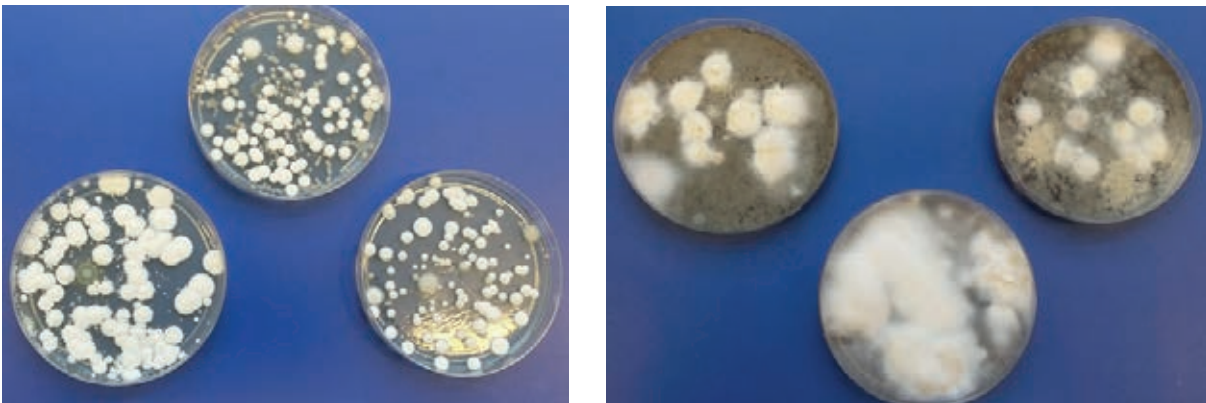
Figuur 3.20 Aantallen mogelijk entomopathogene schimmels in de gronden van zes chrysantenteelt bedrijven in januari 2017. Chrys1, Chrys2, Chrys3, Chrys4, Chrys5 en Chrys6- praktijkbedrijven teelt chrysant.

Tabel 9

Mogelijk entomopathogene schimmels geïsoleerd uit gronden chrysantenteelt (uitplaat methode) in januari 2017.

	Chrys1	Chrys2	Chrys3	Chrys4	Chrys5	Chrys6
<i>Metarhizium</i>	x			x		x
<i>Beauveria</i>	x	x	x			x
<i>Lecanicillium</i>						x
<i>Isaria</i>			x	x		x
<i>Simplicillium</i>						
<i>Clonostachys</i>				x		x
<i>Geotrichum</i>						
<i>Penicillium</i>						
som	2	1	2	3	0	5

Chrys1, Chrys2, Chrys3, Chrys4, Chrys5 en Chrys6- praktijkbedrijven teelt chrysant.



Figuur 3.21 Isolatie van mogelijk entomopathogene schimmels uit grond chrysantenteelt.

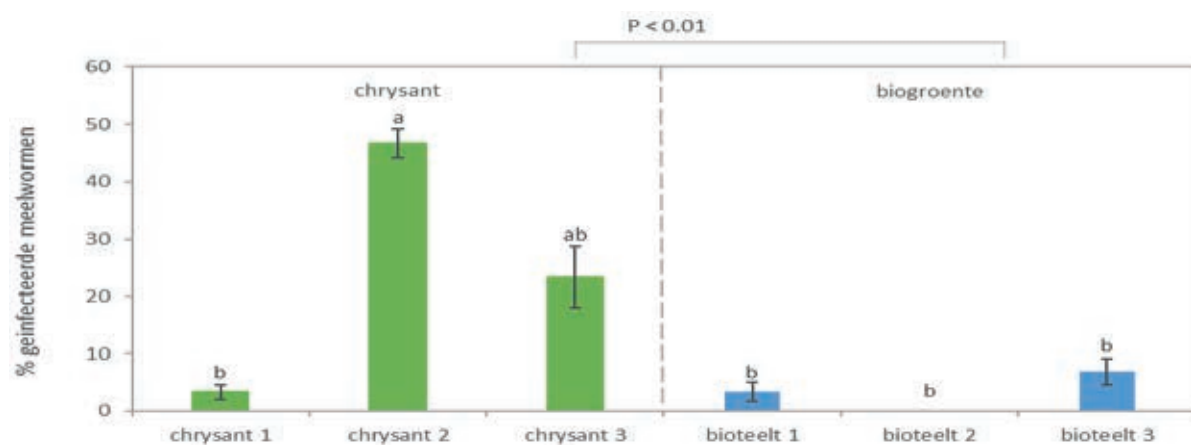
3.4.2 Isolatie van entomopathogene schimmels uit grond via insect bait

Mogelijk entomopathogene schimmels zijn ook met de tweede methode geïsoleerd uit zes gronden, zogenaamd insect bait methode met gebruik van meelwormen (larven van *T. molitor*). In totaal, zeven verschillende schimmelsoorten zijn geïsoleerd uit geïnfecteerde meelwormen (Tabel 10). Geen *Isaria* isolaten waren verkregen uit onderzochte monsters. Andere schimmelsoorten, die bekend staan als entomopathogenen, waren wel geïsoleerd uit meelwormen, zoals *Clonostachys*, *Geotrichum*, *Penicillium* en *Aspergillus*. Percentage van meelwormen die geïnfecteerd waren met schimmel na incubatie in verschillende gronden is weergegeven in Figuur 3.22.

Tabel 10

Mogelijk entomopathogene schimmels geïsoleerd uit gronden chrysanten via insect bait (*T. molitor*).

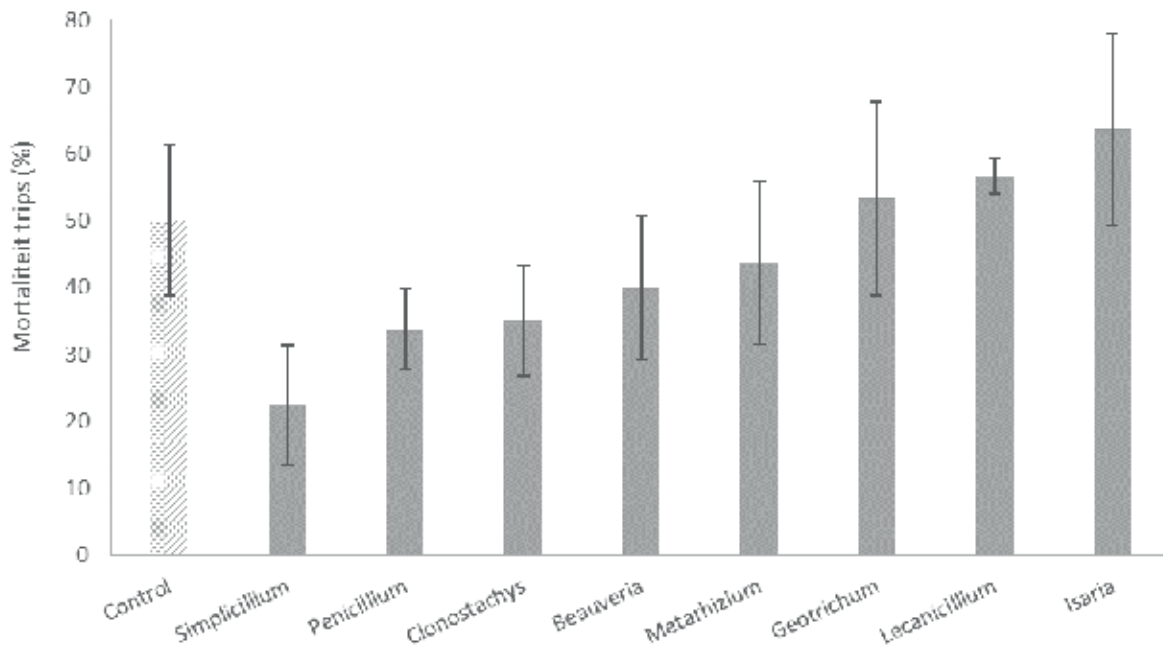
	Chrysant 1	Chrysant 2	Chrysant 3	Bioteelt 1	Bioteelt 2	Bioteelt 3
<i>Metarhizium</i>	x	x	x	x		x
<i>Beauveria</i>	x	x	x			x
<i>Lecanicillium</i>		x	x			
<i>Clonostachys</i>			x	x		
<i>Geotrichum</i>				x		
<i>Penicillium</i>	x	x	x			
<i>Aspergillus</i>			x			x
som	3	4	6	3	0	3



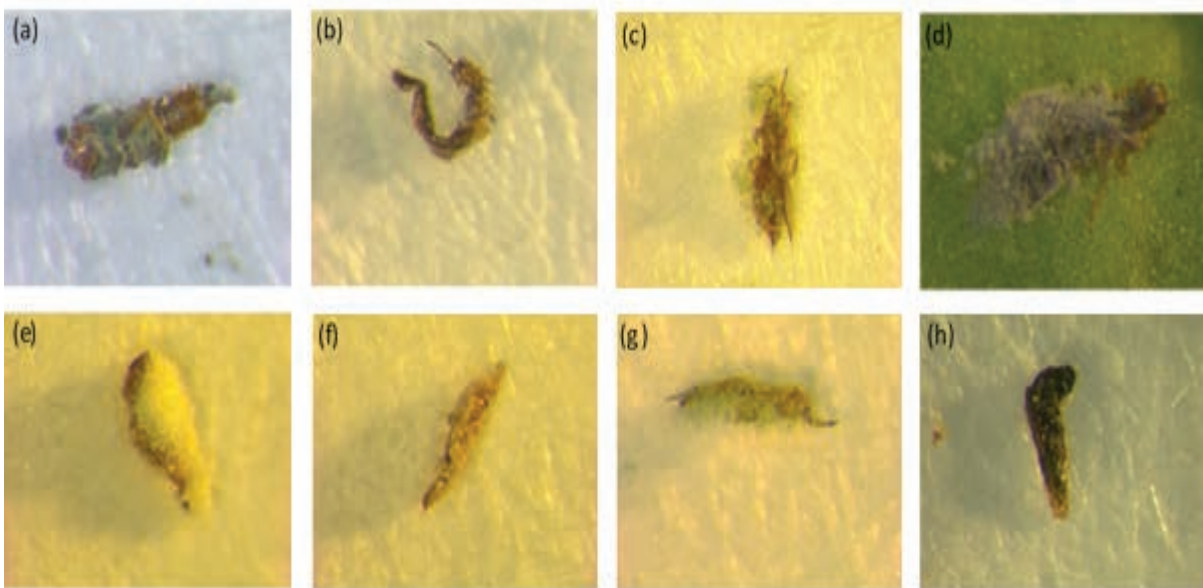
Figuur 3.22 Percentage meelwormen geïnfecteerd met schimmels na incubatie in verschillende gronden.

3.5 Overleving van trips na inoculatie met entomopathogene schimmels

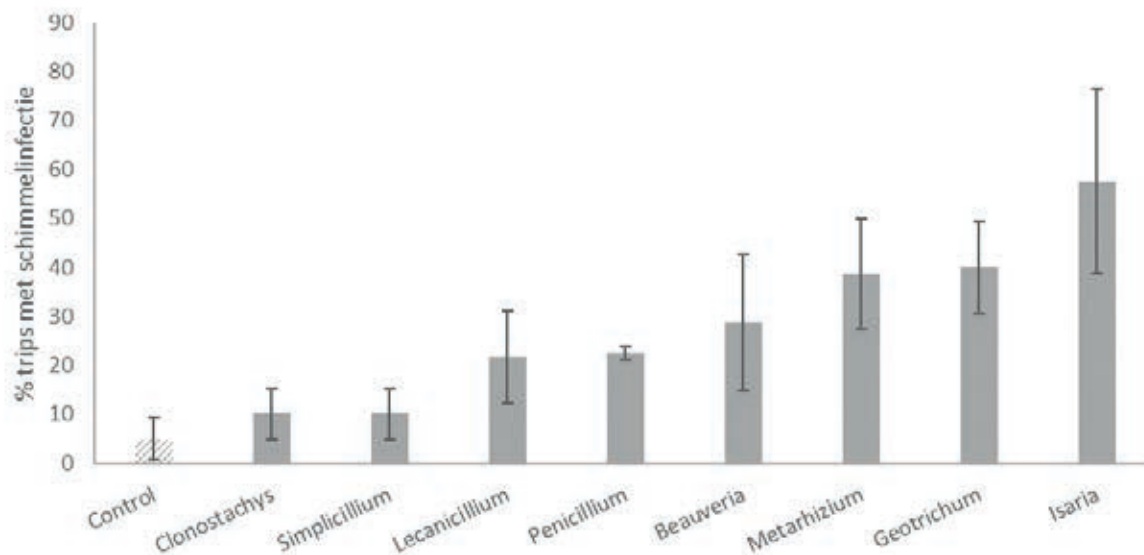
In Figuur 3.23 is een overzicht gegeven van mortaliteit van volwassene trips na infectie met verschillende schimmels. Het hoogste percentage trips wordt gedood in de behandeling met *Isaria* sporen ($63.8 \pm 14.3\%$), terwijl behandeling met *Simplicillium* sporen heeft maar $22.5\% (\pm 8.9\%)$ mortaliteit veroorzaakt. Helaas, door niet helemaal bekende oorzaken, was trips mortaliteit ook hoog. Uit verdere analyse is wel gebleken dat dode tripsen, uit controle behandeling, hadden geen tekenen van schimmelinfecties. Terwijl dode tripsen, die behandeld waren met schimmelsporen suspensies, wel zichtbare tekenen hadden van schimmel infecties (Figuur 3.24).



Figuur 3.23 Trips mortaliteit na behandeling met verschillende entomopathogene schimmels.



Figuur 3.24 Voorbeelden van trips geïnfecteerd met schimmels: (a) *Metarhizium*, (b) *Beauveria*, (c) *Lecanicillium*, (d) *Isaria*, (e) *Simplicillium*, (f) *Clonostachys*, (g) *Geotrichum*, (h) *Penicillium*.

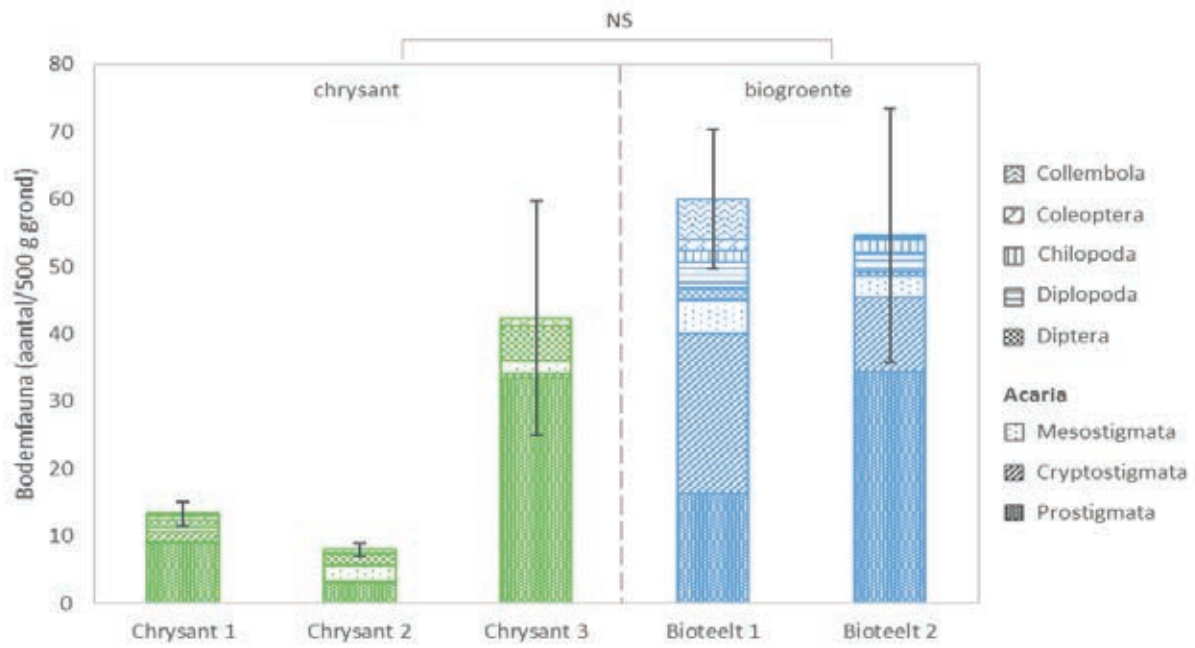


Figuur 3.25 Percentage trips geïnfecteerd met schimmel in verschillende behandelingen.

Percentage trips met zichtbare schimmelinfectie was tussen 5% en 57.5% (Figuur 3.25). Hoogste percentage van schimmelinfectie in trips was waargenomen in behandelingen met *Isaria* schimmel. Schimmels, die groeiden uit van dode trips, waren niet altijd alleen de schimmels die in bepaalde behandeling geïnoculeerd waren (behalve behandeling met *Isaria* en *Metarhizium*). Het is dus niet helemaal zeker dat trips mortaliteit door deze infecties is veroorzaakt. Er bestaat mogelijkheid dat deze infecties als secundair beschouwd zouden moeten worden.

3.6 Analyse bodemfauna in grond chrysantteelt en biogroente onder glas

Aantallen en samenstelling van bodemfauna in onderzochte gronden van drie chrysantbedrijven en twee bioteelt bedrijven zijn weergegeven in Figuur 3.26. Er was meer bodemfauna aanwezig in de gronden van bioteelt bedrijven ten opzichte van chrysantenteelt bedrijven. Significante verschillen waren gevonden wat betreft aantallen mijten (*Acaria*). Ook aanwezigheid van *Oribatida* (Mann-Whitney U, $U = 54.0$, $P < 0.001$) en *Mesostigmata* (Mann-Whitney U, $U = 48.0$, $P = 0.012$) was significant hoger in gronden van bioteelt.



Figuur 3.26 Bodemfauna in verschillende grondmonsters.

4 Discussie en conclusies

4.1 Onderdrukking van infectie van *Meloidogyne incognita* door compost en micro-organismen

Composten zijn belangrijk in het creëren van de gezonde, vruchtbare bodem. Composten worden gebruikt voor verbetering van bodemstructuur en verhoging van organische stof gehalte in de bodem en dragen bij betere waterhuishouding in verschillende gronden (van Elsas en Postma, 2007; Oka, 2010). Toepassing van sommige composten kan ook invloed hebben op onderdrukking van plantenziekten en plagen, zoals aaltjes (Hoitink *et al.* 1997; van Elsas en Postma, 2007; Oka, 2010). Tijdens de composteringsproces ontstaat in de compost een specifieke microbiële gemeenschap (Streminska en Raviv, 2016), die belangrijk rol kan spelen in onderdrukking van plantenziekten en zelfs een bron kan zijn van nuttige organismen die vervolgens bodem kunnen koloniseren (Antoniou *et al.* 2017).

Één van de typen compost die potentie heeft om wortelknobbelaaltjes te onderdrukken is champost. Binnen dit onderzoek is er het positief effect van champost aangetoond op infectie van wortelknobbelaaltjes in tomaat. Positief effect van champost op infectie van *Meloidogyne* sp. werd al eerder vermeld in verschillende onderzoeken (D'Addabbo *et al.* 2011; van der Kolk en van der Wurff, 2015). Champost bestaat uit een mengsel van stro, paardenmest, kippenmest, kalk, veen en schuimaarde. Het is een restproduct van champignonenteelt en bevat daarom aanzienlijke hoeveelheden van schimmel hyphae, dus ook chitine. Toevoeging van champost veroorzaakt daarom vaak verhoogde activiteit van chitine afbrekende micro-organismen in de grond (Montanari *et al.* 2004). Deze micro-organismen zijn belangrijk in biologische controle van schimmelziekten en wortelknobbelaaltjes, omdat ze chitine, afkomstig uit celwanden van schimmels en uit eieren van aaltjes, kunnen afbreken.

Toevoeging van mulch had ook effect op ontwikkeling van infectie van wortelknobbelaaltjes in tomaat, maar het effect was minder groot in vergelijking met champost. In dit onderzoek is mulch vermengd met de grond. Standaard toepassing van mulch is de grond bedekken. Positieve effecten van standaard mulch toepassing voor bestrijding van *Meloidogyne incognita* waren waargenomen in het onderzoek van o.a. McSorley (2011

Om effectiviteit van compost tegen ziekten en plagen te verhogen word er soms een verrijking met nuttige micro-organismen toegepast (Montanari *et al.* 2004). Nuttige micro-organismen zoals *Bacillus* of *Trichoderma* zouden zich beter kunnen vestigen in de grond als compost gebruikt wordt als een drager en voedingsbron (Malusa *et al.* 2012).

Bacteriën zoals *Pseudomonas*, *Streptomyces* of *Bacillus* zijn vaak in staat om chitine af te breken (Berg, 2009). Bovendien kunnen veel van deze micro-organismen geïnduceerde resistentie van de plant (eng. Induced Systemic Resistance) aanschakelen en daardoor plant (gedeeltelijk) beschermen tegen pathogenen en plagen (Adam *et al.* 2014). Champost is ook de bron van veel micro-organismen die antagonistisch tegen bodemgebonden schimmelziekten zoals *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* of *Phytophthora* (Kavroulakis *et al.* 2010).

Ook binnen dit onderzoek is er synergistisch, positief effect aangetoond van toepassing van combinatie compost+ micro-organismen in bestrijding van bodemziekten. Uit uitgevoerde proeven blijkt dat effecten van de behandeling gewasafhankelijk zijn. Toepassing van champost en micro-organismen lijkt beter te werken in tomaat dan in chryasant. Champost is een compost met hoge zoutgehalte en toepassing daarvan had een significant effect op EC van de grond. Het kan daarom niet uitgesloten worden dat zoutgehalte in de grond na champost toepassing een negatief effect had op chryasant, terwijl er geen effect was op de groei van tomaat.

In de proeven binnen dit onderzoek is champost dosering relatief hoog geweest (20% v/v). Resultaten van andere onderzoeken laten zien dat het is mogelijk champost dosering te verlagen (naar bijvoorbeeld 5-10% volume), zonder verlies van de ziekte onderdrukkende werking (Montanari *et al.* 2004). Problemen met de eventuele effecten van zout op plantgroei zouden dan vermeden kunnen worden.

4.2 Aanwezigheid van entomopathogene schimmels in gronden van chrysantenteelt en bioteelt onder glas

Entomopathogene schimmels kunnen zowel larven als volwassen insecten infecteren. Meeste entomopathogene schimmels behoren tot *Zygomycota* (class Entomophthorales) and *Ascomycota* (class Hyphomycetes) fyla (Sinha *et al.* 2016). In totaal zijn er rond 750 soorten van entomopathogene schimmels bekend, maar tot nu toe alleen beperkt aantal soorten wordt gebruikt in producten die commercieel beschikbaar zijn (Faria & Wraight, 2007). Entomopathogene schimmels die het meest vaak gebruikt worden als biopesticide zijn *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Isaria* en *Purpureocillium* (oude naam: *Paecilomyces*) (Faria & Wraight, 2007;), van *Hyphomycetes*, in fylum *Ascomycota*.

Op dit moment zijn er vier producten met entomopathogene schimmels beschikbaar op de markt in Nederland: *Metarhizium anisopliae* (Bio1020®, Bayer CropScience), *Beauveria bassiana* (Botanigard®, Certis Europe), *Lecanicillium lecanii* (formerly known as *Verticillium lecanii*) (Mycotal®, Koppert Biological Systems) and *Isaria fumosorosea* (formerly known as *Paecilomyces fumosoroseus*) (PreFeRal®, Biobest).

In het algemeen zijn deze entomopathogene schimmels minder effectief tegen larven en poppen dan tegen volwassen trips (Vestergaard *et al.* 1995; Messelink & Holstein-Saj, 2012). Bijvoorbeeld, Messelink & Holstein-Saj (2012), hebben geen effect gevonden van *M. anisopliae* en *B. bassiana* op overleving van de trips poppen. Op dit moment is er nog relatief weinig informatie beschikbaar over natuurlijke aanwezigheid van entomopathogene schimmels in de gronden van teelt onder glas, evenmin over verschillen in aanwezigheid tussen gangbaar en biologisch teelt. Uit wetenschappelijke literatuur blijkt dat in gronden van biologische teelt wordt in het algemeen hogere microbiële biomassa en activiteit gemeten evenals hogere aantallen schimmels (Lenc *et al.* 2016). Het onderzoek van Clifton *et al.* (2015) heeft aangetoond dat entomopathogene schimmels in grotere aantallen aanwezig waren in de velden van biologische openteelten dan in gangbare teelten. In tegendeel, in dit onderzoek en resultaten van o.a. Meyling *et al.* (2011) waren er geen significante verschillen gevonden tussen biologische en gangbare teelt wat betreft aanwezigheid van entomopathogene schimmels. In voorafgaand onderzoek bij Wageningen University & Research in Bleiswijk is er geen effect van entomopathogene schimmels geconstateerd op trips poppen (Messelink & Holstein-Saj, 2012). Daarom onderzoek binnen dit project richtte zich op effecten van entomopathogene schimmels op overleving van volwassen trips.

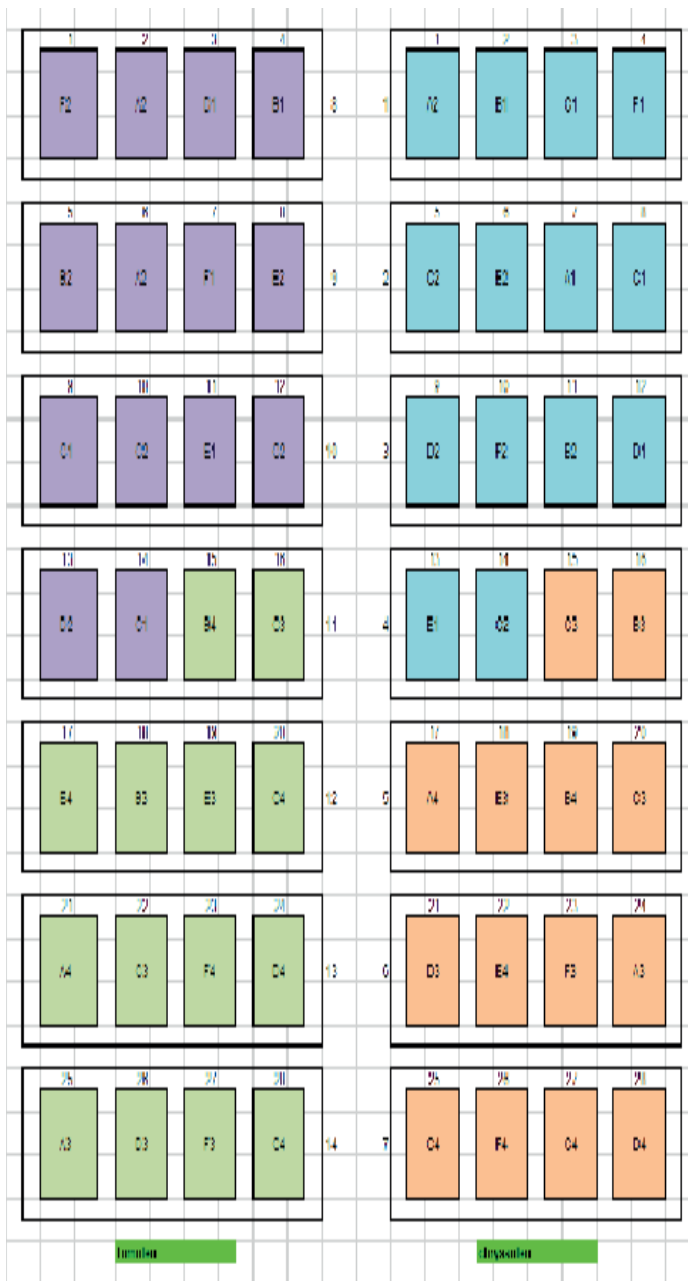
Aantallen van geïsoleerd mogelijk entomopathogene schimmelsoorten, maar ook hoeveelheid soorten, was hoger in gronden van chrysantenteelt dan in biogroente teelt. Vier soorten (*Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium* and *Isaria*) zijn algemeen bekend als entomopathogene schimmels (Faria & Wraight, 2007). Andere soorten, zoals *Simplicillium*, *Clonostachys*, *Geotrichum* and *Penicillium*, zijn minder bekend als entomopathogenen en literatuur daarover is beperkt beschikbaar. *Simplicillium* soorten zijn bijvoorbeeld entomopathogenen van zijderups (Lim *et al.* 2014). *Clonostachys* soorten zijn bekend als mycoparasiten en saprophyten, maar sommige soorten zijn ook entomopathogenen van cicaden (Toledo *et al.* 2006) en kevers (Vega *et al.* 2008).

Literatuur

- Adam, M., Heuer, H., Hallmann, J. 2014.
Bacterial Antagonists of Fungal Pathogens Also Control Root-Knot Nematodes by Induced Systemic Resistance of Tomato Plants. *PLoS ONE* 9(2): e90402. doi:10.1371/journal.pone.0090402
- Antoniou, A., Tsolakidou, M.D., Stringlis, I.A., Pantelides, I.S. 2017.
Rhizosphere Microbiome Recruited from a Suppressive Compost Improves Plant Fitness and Increases Protection against Vascular Wilt Pathogens of Tomato. *Front Plant Sci.* 29:2022
- Berg, G. 2009.
Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 11–18
- Clifton, E.H., Jaronski, S.T., Hodgson, E.W., & Gassmann, A. 2015.
Abundance of soil-borne entomopathogenic fungi in organic and conventional fields in the midwestern USA with an emphasis on the effect of herbicides and fungicides on fungal persistence. *PLOS One*, 10 (7): 1-17.
- Cuijpers, W., Jaanmaat, L. 2012.
Biowisselkaas: bredere vruchtwisseling voor gezonde bodem.
- D'Addabbo, T., Papajová, I., Sasanelli, N., Radicci, V., Renčo, M. 2011.
Suppression of root-knot nematodes in potting mixes amended with different composted biowastes *Helminthologia* 48: 278.
- Emmert, E.A., Handelsman, J. 1999.
Biocontrol of plant diseases: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett* 171: 1–9.
- Faria, M.R., & Wraight, S.P. 2007.
Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256.
- Goettel, M.S., Inglis, G.D. 1997
Fungi: Hyphomycetes. In L.A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology*, pp. 213-249. London (UK): Academic Press.
- Hartmann, A., Schmid M., van Tuinen, D., Berg G. 2009.
Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321: 235–257
- Hoitink, H.A.J., Stone, A.G., Han, D.Y. 1997.
Suppression of diseases by composts. *HortScience* 32, 184–187.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Besi, M.I., Katsou, P., Damaskinou, A., Ehalotis, C., Zervakis, G.I., Papadopoulou, K.K. 2010
Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* *Plant Soil* 333: 233. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0338-x>
- Kolk, J.P. van der, van der Wurff, A.W.G. 2015.
Improving disease resistance against root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic greenhouse systems in the Netherlands via integrated approaches with compost, soil additives and bio-organisms. Report master thesis WUR FSE-80436.
- Lenc, L., Kwasna H., Jeske, M., Jonczyk, K., Sadowski, C. 2016.
Fungal pathogens and antagonists in root-soil zone in organic and integrated systems of potato production. *Journal of Plant Protection Research*, 56(2): 1-11.
- Lim, S.Y., Lee, S., Kong, H.G., & Lee, J. 2014.
Entomopathogenicity of *Simplicillium lanosoniveaum* isolated in Korea. *Mycobiology*, 42(4): 317
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. 2012.
Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, 491206.
- Mazzola, M. 2002.
Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 557. <https://doi.org/10.1023/A:1020557523557>
- McSorley, R. 2011.
Overview of organic amendments for management of plant-parasitic nematodes, with case studies from Florida. *Journal of Nematology*, 43(2): 69-81.

- Messelink, G.J. & Van Holstein-Saj, R. 2012.
Optimalisatie toepassing entomopathogene schimmels tegen trips in chrysant. Wageningen UR Glastuinbouw. Rapport GTB-1142.
- Meyling, N.V. 2007.
Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual.
- Meyling, N.V., Thorup-Kristensen, K., Eilenberg, J. 2011.
Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping. *Biological Control*, 59: 180-186.
- Montanari, M., Ventura, M., Innocenti, G. 2004.
Exploitation of spent mushroom compost in biological control against *Fusarium* wilt disease. *IOBC/WPRS Bull.* 27: 247-250.
- Oka, Y. 2010.
Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments—A review. *Applied Soil Ecology* 44: 101-115
- Page, A.P., Roberts, M., Félix, M.A., Pickard, D., Page, A., Weir W. 2019.
The golden death bacillus *Chryseobacterium nematophagum* is a novel matrix digesting pathogen of nematodes. *BMC Biol.* 17(1): 10
- Raijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moëgne-Loccoz, Y. 2009.
The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341-361
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., Jackson, M.A. 2004.
Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94: 1267-1271
- Sinha, K.K., Choudhary, A.K., Kumari, P. 2016.
Entomopathogenic fungi. In: Omkar (Ed.), *Ecofriendly pest management for food security*, pp. 475-505. London (UK): Academic Prints.
- Streminska M.A., Raviv M. 2016.
Microbiology of the composting process. In Van der Wurff, A.W.G., Fuchs, J.G., Raviv, M., Termorshuizen, A.J. (Editors) 2016. *Handbook for Composting and Compost Use in Organic Horticulture*, BioGreenhouse COST Action FA 1105, www.biogreenhouse.org.
- Toledo, A.V., Virla, E., Humber, R.A., Paradell, S.L. & López Lastra, C.C. 2006.
First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(1): 7-10
- Van Elsas, J. D., Postma, J. 2007.
Suppression of soil-borne phytopathogens by compost. Pages 201-214 in L. F. Diaz, M. de Bertoldi, W. Bidlingmaier, and E. Stentiford, editors. *Compost science and technology*. Volume 8. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Veen, K.H. & Ferron, P. 1966.
A selective medium for the isolation of *Beauveria tenella* and of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8(2): 268-269.
- Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S.A. 2008.
Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, 46: 72-82.
- Vestergaard, S., Gillespie, A.T., Butt, T.M., Schreiter, G., & Eilenberg, J. 1995.
Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the Western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 185-192.
- Wurff, A.W.G. van der, Slooten, M.A. van, Hamelink, R., Bohne, S., Wensveen, W. van 2011.
Soil suppressiveness towards *Meloidogyne* *Verticillium* or *Pythium* in greenhouse horticulture. In: 1 International Conference on Organic Greenhouse Horticulture. - *Acta Horticulturae* 915 .ISHS, 2010-10-11/2010-10-14 - p. 141 - 149.
- Wurff, A.W.G. van der, Streminska, M.A., Corsten, R., Sloten, M. 2014.
Biostimulatoren, middelen en ziekteonderdrukking van *Pythium* in chrysant : indicatoren voor ziekteonderdrukking in de bodem. Bleiswijk : Wageningen UR Glastuinbouw, (Rapport / Wageningen UR Glastuinbouw 1314) - p. 51.
- Zimmermann, G. 1986.
The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102: 213-215.

Bijlage 1 Plattegrond kasproef zomer 2017



Behandelingen:						
Tomaat			Chrysant			
A	champost		A	champost		
B	champost+Serenade		B	champost+Purporeocillium		
C	champost+Mycostop		C	champost+Beauveria		
D	mulch		D	mulch		
E	mulch+Serenade		E	mulch+Purporeocillium		
F	mulch+Mycostop		F	mulch+Beauveria		
G	positieve controle		G	positieve controle		

Bijlage 2 Wortelknobbel index kaart



0. Geen knobbels.



1. Weinig & kleine knobbeltjes, moeilijk te vinden



2. Alleen kleine knobbeltjes; duidelijk zichtbaar. De hoofdwortels zijn schoon.



3. Een paar grotere knobbels zichtbaar. De hoofdwortels zijn schoon.



4. Overwegend grotere knobbels zichtbaar. De hoofdwortels zijn schoon.



5. Knobbels op 25% van de wortels. Een gedeelte van de hoofdwortels heeft knobbels. Het wortelstelsel is verkleind.



6. Knobbels op 50% van de wortels. Een groot gedeelte van de hoofdwortels heeft knobbels.



7. Knobbels op 75% van de wortels. Het grootste gedeelte van de hoofdwortels heeft knobbels.



8. Knobbels op 90% van de wortels. Alle hoofdwortels hebben knobbels. Weinig schone wortels zichtbaar.



9. Knobbels op 100% van de wortels. De plant is aan het afsterven.



10. Alle wortels hebben knobbels. Er is nauwelijks een wortelstelsel meer. De plant is dood.

Bron: W. Cuijpers, L. Jaanmaat (2012) *Biowisselkaas: bredere vruchtwisseling voor gezonde bodem.*

Bijlage 3 Grondanalyse kasproef zomer 2017 (1:2 water extract)

	pH	EC mS/cm	K	Na	Ca	Mg	mmol/l					Zn	B	Cu	Mo		
							Si	NO ₃	Cl	SO ₄	HCO ₃					P	Fe
Bedrijf A																	
onbehandeld	7.0	1.80	6.8	2.7	3.2	1.3	0.3	7.1	0.4	4.5	0.7	0.30	1.0	0.2	16	0.4	0.24
+champost	6.9	4.40	19.9	5.3	9.6	3.3	0.4	10.7	6.5	14.9	1.1	0.45	1.0	0.4	16	0.5	0.24
+mulch	7.0	1.80	7.6	2.5	2.8	1.1	0.3	6.6	0.6	3.9	0.8	0.35	1.3	0.3	16	0.4	0.20
Bedrijf B																	
onbehandeld	7.4	0.91	2.5	3.0	1.2	0.8	0.2	3.0	0.3	2.2	1.0	0.10	2.5	0.4	52	0.3	0.44
+champost	7.2	4.40	19.0	6.8	8.3	3.7	0.4	7.2	8.3	15.9	1.4	0.20	1.3	0.8	41	0.4	0.56
+mulch	7.0	1.50	4.7	4.0	2.5	1.4	0.3	3.7	1.1	4.6	0.9	0.15	3.1	0.8	80	0.4	0.57
Bedrijf C																	
onbehandeld	6.6	4.40	4.1	8.8	17.5	6.7	0.4	21.6	5.7	15.9	0.3	0.20	0.6	1.0	41	0.3	0.46
+champost	6.7	5.60	12.7	9.4	17.6	6.8	0.4	21.6	10.2	18.2	0.5	0.25	0.7	0.9	32	0.4	0.50
+mulch	6.5	4.20	4.7	7.5	14.8	5.7	0.3	18.9	5.6	13.3	0.4	0.20	0.6	0.9	38	0.3	0.42
Bedrijf D																	
onbehandeld	6.8	2.10	2.7	1.9	6.7	2.9	0.3	10.4	1.3	4.8	0.4	0.30	2.1	0.5	19	0.2	0.44
+champost	6.9	4.40	12.3	4.9	13.5	5.2	0.4	13.4	8.7	14.6	0.8	0.35	2.0	0.6	19	0.4	0.50
+mulch	6.8	2.20	3.0	2.2	7.0	3.1	0.3	11.3	1.6	5.1	0.4	0.30	2.5	0.6	22	0.3	0.47
Bedrijf E																	
onbehandeld	7.4	1.70	0.8	6.7	4.2	2.6	0.2	1.2	1.5	8.1	0.6	0.15	2.3	1.6	12	0.3	0.63
+champost	7.2	5.20	18.4	10.8	11.9	6.2	0.3	6.8	12.4	20.3	1.0	0.25	2.2	1.5	13	0.5	0.55
+mulch	7.3	1.90	1.4	7.2	4.9	3.0	0.3	1.2	2.4	8.9	0.7	0.15	2.4	1.7	12	0.4	0.62

	pH	EC	EC	K	Na	Ca	Mg	Si	NO ₃	Cl	SO ₄	HCO ₃	P	Fe	Zn	B	Cu	Mo	
	mmol/l																		
	mmol/l																		
	mS/cm																		
Bedrijf F																			
onbehandeld	6.8	0.95		2.2	0.6	2.6	1.0	0.2	6.5	0.3	0.8	0.4	0.15	1.3	0.5	12	0.3	0.38	
+champost	6.8	3.00		10.3	3.1	8.3	3.1	0.3	9.3	6.1	8.8	0.6	0.25	1.0	0.7	12	0.5	0.41	
+mulch	6.7	1.00		2.5	0.7	2.7	1.1	0.2	6.0	0.6	1.2	0.3	0.20	1.2	0.4	12	0.4	0.32	

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



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
F +31 (0) 10 522 51 93
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-861

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 5.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.