

**DIE BIOLOGIESE BEHEER VAN *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *DIANTHI* OP
ANGELIERE**

Arthurita Venter, B.Sc. Honns.

Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad Magister Scientiae in die Departement Plant- en Bodemwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Leier: Prof. W.J. Jooste

Potchefstroom

1994

VOORWOORD.

By voltooiing van die verhandeling is dit vir my 'n besondere voorreg om die volgende persone te bedank:

1. My studieleier Prof. W.J. Jooste vir sy waardevolle hulp en ondersteuning.
2. My man vir sy hulp veral met die tegniese aspekte van die verhandeling.
3. Die SNO vir finansiële ondersteuning.
4. Dr. J.A.G. Henning vir die grondanalises en voedingsaanvullings.
5. Die personeel van die Navorsingsinstituut vir Plantbeskerming vir die identifikasie van die kulture.
6. Geoff Botha kwekery te Weltevrededepark naby Johannesburg vir die gewortelde angeliersteggies, gesteriliseerde grond en die gebruik van 'n kweekhuis vir 'n proef.
7. SAFROPA kwekery naby Brits vir grondmonsters.
8. Kwekery van Dr. Emile Kotze te Boskop vir angelierplant- en grondmonsters.
9. Mev. S. Kotzé vir die taalversorging van die verhandeling.

Aan Hom die eer.

UITTREKSEL.

Biologiese beheer is 'n natuurlike vorm van beheer, waar probeer word om 'n deel van die omgewing te manipuleer om sodoende 'n ander deel te beheer. Die doel van die studie was om 'n biologiese beheeragent vir *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* te vind.

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* is 'n grondfungus wat verwelksiekte van angeliere (*Dianthus caryophyllus*) veroorsaak. Die patogeen penetreer die wortels en dring die vaatweefsels binne vanwaar dit na die res van die plant versprei. Die patogeen is uit plant- en grondmonsters geïsoleer. Een en negentig isolate wat moontlik as antagoniste kan optree, is uit plant- en grondmonsters geïsoleer. Dit sluit bakterieë, aktinomisete en fungusse in. 'n Siftingstoets is *in vitro* gedoen om moontlike antagoniste te vind. Drie patogeen isolate is gebruik. Sewentien van die een en negentig isolate was nie antagonisties *in vitro* nie. 'n Verdere toets vir antagonisme is gedoen deur die groeitempo van die organismes te bepaal, waar die toetsorganisme en die patogeen teenoor mekaar op 'n agar medium in 'n spesiale glasbuis geplaas word.

Organismes wat die groeitempo van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* *in vitro* geïnhibeer het, of 'n hoër groeitempo as die patogeen gehad het, is: *Aspergillus* sp., *F. moniliforme*, *F. proliferatum* (3 isolate), *Trichoderma harzianum* (7 isolate), *T. fasciculatum*, *Pseudomonas* sp. (4 isolate) en *P. aeruginosa*. Die organismes is *in vivo* getoets deur gewortelde angeliersteggies in gesteriliseerde grond, waarin die toetsorganisme en die patogeen gemeng is, te plant. Vier angelier kultivars is gebruik.

Drie angelier kultivars wat in die *in vivo* toets gebruik is, se vatbaarheid vir die patogeen is bepaal deur gewortelde steggies van die kultivars in gesteriliseerde grond waarin die patogeen gemeng is, te plant. Kultivar 1 was die meeste vatbaar vir isolaat 1 van die patogeen. Kultivar 2 het 'n matige weerstand en kultivar 3 die meeste weerstand teen isolaat 1 van die patogeen getoon. Daar was geen betekenisvolle verskil in weerstandbiedendheid tussen kultivars 1, 2 en 3 teen isolaat 2 en 3 van die patogeen waargeneem nie.

Vir toetsing in die praktyk is die volgende organismes as antagoniste gebruik: *Pseudomonas* sp., *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma harzianum* en 'n mengsel van sewe *T. harzianum* isolate. Isolaat 2 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* is gebruik omdat die isolaat

die mees virulente isolaat van die drie patogeen isolate was. Gewortelde steggies van kultivar 1 (die vatbaarste) is in gesteriliseerde grond waarin die patogeen en toetsorganisme gemeng is, geplant. Isolate van *T. harzianum* het die beste resultate gelewer. Na 100 dae het 76% van die plante wat met 'n isolaat van *T. harzianum* behandel is, geen siektesimptome getoon nie, terwyl 47% van die kontrole plante gevorderde simptome getoon het.

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* se groei word deur *Trichoderma harzianum* geïnhibeer. Meer navorsing is egter nodig om geskikte metodes te vind vir implementering in die praktyk. Dit is ook belangrik om te bepaal of die biologiese beheer van plantpatogene met mikroörganismes 'n ekonomies uitvoerbare onderneming sal wees.

ABSTRACT.

Biological control is a natural form of control. Man tries to manipulate one part of the environment in such a way as to control another. The aim of this study was to find a biological control agent for *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. This pathogen is a soil inhabitant that causes vascular wilts in carnations (*Dianthus caryophyllus*). It infects the roots, which it penetrates directly or through wounds. Once inside the root, the mycelium reaches the xylem vessels and spreads internally to the rest of the plant.

The pathogen and 91 potential antagonists were isolated from soil and plant samples. An *in vitro* trail run eliminated 17 organisms that didn't inhibit the pathogen. The inhibition of the growth rate was used to test for antagonism. The growth rate of the organisms was determined by culturing the potential antagonist opposite the pathogen in a special glass tube.

Aspergillus sp., *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* (3 isolates), *Trichoderma harzianum* (7 isolates), *T. fasciculatum*, *Pseudomonas* sp. (4 isolates) and *P. aeruginosa* either inhibited the growth of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* or had a higher growth rate than the pathogen. Rooted cuttings of four carnation cultivars were planted in sterile soil. The pathogen and potential antagonist were added to the soil. The resistance of cultivars 1, 2 and 3 were determined by planting rooted cuttings of the cultivars in sterile soil. The pathogen was added to the soil. Cultivar 1 is the most susceptible for isolate 1 of the pathogen and cultivar 3 the least. There is no difference between the susceptibility of the three cultivars for isolate 2 and 3 of the pathogen.

The following organisms were tested in nursery conditions: *Pseudomonas* sp., *Fusarium moniliforme* and *Trichoderma harzianum* and a mixture of the seven *T. harzianum* isolates. Isolate 2 was used because that isolate was the most virulent of the three pathogen isolates. Cultivar 1 was used because that cultivar was the most susceptible. Rooted cuttings of that cultivar were planted in a mixture of the potential antagonist, pathogen and sterile soil. The best results were obtained from *T. harzianum*. After 100 days 76% of the plants treated with an isolate of *T. harzianum* showed no disease symptoms. Forty seven percent of the plants in the control plot showed symptoms.

Trichoderma harzianum inhibits the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. More research is necessary to find a method for implementation in practise. It must also be determined if the biological control of plant pathogens is a viable undertaking.

INHOUDSOPGAWE.

1. INLEIDING	1
2. LITERATUUROORSIG.	3
2.1. Die patogeen <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	3
2.1.1. Lewensiklus.	3
2.2. Beheer van <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	6
2.2.1. Konvensionele metodes.	6
2.2.1.1. Weerstandbiedende angelier kultivars.	6
2.2.1.2. Patogeenvrye voortplantingsmateriaal.	8
2.2.1.3. Chemikalieë.	8
2.2.1.4. Landboumetodes.	9
2.2.2. Biologiese beheer.	9
3. DOELSTELLING	16
4. <i>IN VITRO</i> TOETSING VAN ORGANISMES VIR ANTAGONISME.	17
4.1. Metodes.	17
4.1.1. Versameling van plant- en grondmonsters.	17
4.1.2. Isolاسie van <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	17
4.1.2.1. Isolاسie van patogeen uit plant	17
4.1.2.2. Isolاسie van patogeen uit die grond	17
4.1.3. Isolاسie van moontlike antagoniste	18
4.1.3.1. Isolاسie van bakterieë uit die grond	18
4.1.3.2. Isolاسie van bakterieë uit plantwortels	18
4.1.3.3. Isolاسie van aktinomisetes uit die grond	18
4.1.3.4. Isolاسie van fungusse uit die grond	19
4.1.4. Uitplaat van <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate	19
4.1.5. <i>In vitro</i> toetsing van isolate vir moontlike antagonisme	19
4.2. Resultate van <i>in vitro</i> toetsing van isolate	20
5. <i>IN VIVO</i> TOETSING VAN ORGANISMES VIR ANTAGONISME.	33
5.1. Metodes.	33

5.1.1. Materiaal.	33
5.1.2. Metode van eerste <i>in vivo</i> toetsing van elf antagonistte	33
5.1.2.1. Toets vir vatbaarheid van drie kultivars vir <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> en bepaling van die virulensie van die patogeen isolate	33
5.1.2.2. Toets vir antagonisme	34
5.1.3. Metode van verdere <i>in vivo</i> toetsing van veertien antagonistte.	35
5.2. Resultate van toets vir vatbaarheid van drie kultivars vir <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> en die bepaling van die virulensie van die patogeen isolate . .	36
5.3. Resultate van eerste <i>in vivo</i> toetsing van elf antagonistte	37
5.4. Resultate van verdere <i>in vivo</i> toetsing van veertien antagonistte	51
 6. TOETSING VAN SUKSESVOLLE ANTAGONISTE IN 'n KOMMERSIËLE KWEKKHUIS	60
6.1. Materiaal en metodes.	60
6.2. Resultate van toetsing van suksesvolle antagonistte in 'n kommersiële kweekhuis.	61
 7. BESPREKING	63
 8. LITERATUURLYS	70

1. INLEIDING.

Gedurende die afgelope twee dekades was verwelksiekte verantwoordelik vir groot verliese in die angelierbedryf regoor die wêreld. Verwelksiekte by angeliere word veroorsaak deur *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en word uitwendig gekenmerk deur verwelking van plante en inwendig deur verkleuring van die vaatweefsel.

Fusarium spp. kom algemeen voor as saprotrofe fungusse en patogene wat wortelvrot, vrugtevrot, kankers en verwelksiekte by plante veroorsaak. Die belangrikste hiervan is verwelksiekte wat veroorsaak word deur variante van *F. oxysporum*. Die patogeen infekteer 'n verskeidenheid gewasse soos tamaties, kool, piesangs, patats, tabak en katoen. Verskeie snyblomme soos angeliere, tulpe en asters word ook deur die patogeen geïnfekteer. *F. oxysporum* het nie 'n teleomorf stadium nie. Die anamorf stadium produseer drie tipes ongeslagtelike spore naamlik mikrokonidiums, makrokonidiums en chlamydospore. Chlamydospore ontkiem as toestande gunstig is. Die kiembuisie penetreer die gasheer deur die wortels en groei tot in die vaatweefsels. In die xileem produseer die patogeen mikrokonidiums wat na die res van die plant versprei word deur die transpirasiestroom. Meersellige makrokonidiums word op die oppervlakte van die plant gevorm en kan direk ontkiem, of chlamydospore vorm. *F. oxysporum* kan in die afwesigheid van 'n geskikte gasheer saprotrofies, of in 'n dormante fase (chlamydospore) oorleef. Die fungus word geklassifiseer as 'n pioniersfungus omdat dit net organiese materiaal wat nog nie deur ander organismes gekoloniseer is nie, kan binnedring. *F. oxysporum* is van die eerste organismes wat grond wat met breë spektrum swamdoders behandel is, herkoloniseer (Marois, 1990; Nelson, 1990).

Beheer van verwelksiekte deur chemiese doders, stoom sterilisering en chemiese beroking van gekontamineerde grond is nie baie suksesvol nie. Beter resultate word verkry met die gebruik van patogeenvrye voortplantingsmateriaal en die gebruik van weerstandbiedende kultivars. Albei die metodes is egter tydrowend, duur en die kwaliteit van die plante is nie altyd kommersieel aanvaarbaar nie (Baayen, 1988a). Die toenemende gebruik van potensieel gevaarlike chemiese doders in die landbou en die stygende koste verbonde aan die ontwikkeling van sulke doders, het daartoe gelei dat navorsers na alternatiewe metodes kyk om siektes en plaë op gewasse te beheer.

Biologiese beheer is 'n stadige, langwerkende beheermetode met geen negatiewe effek op die omgewing nie. Volgens Baker en Cook (1974) is biologiese beheer die gebruik van hoër plante en mikroörganismes om plant patogene te beheer. Die definisie sluit beheermetodes van wisselbou tot genetiese ingenieurswese in. Volgens Cook (1985) is siekte die gevolg van interaksies tussen die plant, patogene en nie-patogene organismes. Nie-patogene organismes het die potensiaal om patogeen-aktiwiteite te bevoordeel of te inhibeer. 'n Antagonis kan die aktiwiteite van 'n organisme inhibeer deur die produksie van antibiotiese stowwe, lise van selle, kompetisie, parasitisme en predatisme. Antagonisme kan gebruik word om patogeen inokulum te verminder of om te keer dat dit gevorm word, so kan die voorkoms van kankers by kastaiingbome verminder word deur die kankers met hipovirulente *Endothia parasitica* te inokuleer. Antagonisme kan ook gebruik word om plantoppervlaktes te beskerm teen patogene, byvoorbeeld die beheer van *Heterobasidion annosum* deur *Peniophora gigantea* op afgesaagde denneboom-stompe te smeer. Virusse en patogene in vaatweefsels van plante kan beheer word deur geïnduseerde weerstandbiedendheid en kruisbeskerming. *Pseudomonas* sp. ras WC417r induseer weerstandbiedendheid in angelierplante teen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Van Peer en Schippers, 1992). In Japan word verwelksiekte in patats beheer deur steggies te inokuleer met 'n nie-patogene *F. oxysporum* (Cook, 1985).

Intensiewe navorsing is gedoen oor biologiese beheer van siektes wat veroorsaak word deur patogene *Fusarium oxysporum*. Tog bestaan daar nog nie 'n metode wat op groot skaal kommersieel gebruik kan word nie (Marois, 1990).

2. LITERATUUROORSIG.

2.1. Die patogeen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Volgens Booth (1970) groepeer *Fusarium oxysporum* Schlecht. onder die groep *Elegans* vanweë die terminale of interkalêre chlamydospore en die patogeen se vermoë om verwelksiekte te veroorsaak. Verskeie formae speciales van *F. oxysporum* word beskryf op grond van die gasheer wat die patogeen infekteer en gepaardgaande simptome. Armstrong en Armstrong (1968) het nege en sestig formae speciales van *F. oxysporum* beskryf.

Volgens Baayen (1988a) het Prillieux en Delacroix in 1899 *Fusarium*, wat verwelksiekte in angeliere veroorsaak, beskryf. Wollenweber en Reinking het in 1935 die patogeen *Fusarium dianthi* Prill. & Del. in die afdeling *Elegans*, onderafdeling *Oxysporum*, geplaas. Snyder en Hansen het in 1940 die hele afdeling *Elegans* gereduseer na 'n enkele spesie *Fusarium oxysporum* met verskeie formae. Die erkende naam van *Fusarium oxysporum* wat verwelking in angeliere veroorsaak is *F. oxysporum* Schlecht. **emend. Snyder & Hansen** f. sp. *dianthi* (Prill. & Del.) Snyder & Hansen (Nelson et al., 1983). Op grond van die patogenisiteit van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* kan verskillende fisiologiese rasse onderskei word (Demmink & Baayen, 1988). Volgens Baayen (1988a) kan daar moontlik tot agt rasse wees.

2.1.1. Lewensiklus.

Fusarium spesies kom algemeen in warmer dele en veral in tropiese gebiede voor. Die fungus kan ook in ekstreme toestande soos arktiese gebiede en woestyne voorkom (Nelson, 1990).

Die patogeen het 'n hialiene miselium wat uit gesepteerde vertakte hifes bestaan (Subramanian, 1971). Op aartappeldekstrose agar word 'n vinnig groeiende wit kolonie met 'n effense pers skynsel en 'n soet reuk gevorm. Die kolonie vertoon blou as 'n groot aantal sklerotiums teenwoordig is en roomkleurig tot bruin as 'n groot aantal sporodokiums teenwoordig is (Nelson et al., 1983).

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* is 'n grondfungus en dring angeliere hoofsaaklik deur die

wortels binne (Baayen, 1988c). Angelierwortels wat beskadig word deur veral nematodes, of ander organismes in die grond wat daaraan vreet, is veral vatbaar. Die fungus dring die beskadigde wortels passief binne. Passiewe indringing kan ook plaasvind by lokusse waar sywortels gevorm word. Penetrasie van epidermisselle van gesonde wortels vind aktief plaas deur die vorming van 'n appressorium op die seloppervlakte. Die fungus groei intersellulêr deur die korteks en dring die houtvate deur 'n stippel binne, vanwaar dit na die res van die plant versprei. Sparnaaij et al. (1988b) het gevind dat passiewe indringing van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* veral by onbedekte houtvate by stingelbasisse van angeliersteggies voorkom. Houtvate word beskadig as stingels afgebreek word vir beworteling.

In die xileem vertak die miselium en vorm kort, vertakte of onvertakte monofialiede waarop eensellige ovaalvormige mikrokonidiums gevorm word. Die mikrokonidiums word na die res van die plant deur die transpirasiestroom versprei. Makrokonidiums kan ook in die xileem gevorm word (Nelson, 1990). Pennypacker en Nelson (1972) het gevind dat die miselium, en nie die mikrokonidiums nie, aanvanklik vir die verspreiding van die patogeen in die xileemvesels van geïnfekteerde angelierplante verantwoordelik is. 'n Groot hoeveelheid mikrokonidiums word gevorm nadat die miselium in die xileemvesels gevestig is. Volgens Baayen (1988a) is die wyse van kolonisering verskillend van wat algemeen beskryf word vir fungusse wat die vaatweefsels van plante infekteer. Kolonisering deur die vorming van spore is vinniger, omdat die verspreiding van spore aangehelp word deur die transpirasiestroom. Angelierstingels se xileemvesels bevat ook eenvoudige perforasieplate, wat verskil van die meeste ander plante. Meervoudig geperforeerde plate wat in ander plante voorkom dien as 'n versperring waardeur die spore moet groei om nuwe spore in die volgende veselement te vorm.

Na sowat 4-6 weke verskyn die eerste uitwendige verwelksiekte-simptome. Van die eerste simptome wat waargeneem word as angelierplante met *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* geïnfekteer is, is die groeipunt van die stingel wat af buig. Verwelksiekte-simptome verskyn gewoonlik eers net aan die een kant van die plant en versprei dan na die res van die plant. Die blare van geïnfekteerde plante verloor turgesensie, verlep, kan opkrul, vertoon geel en kleur dan bruin. Jong stingels kan ook verwelk (Baayen, 1988a).

Verstopping van die vaatweefsels word veroorsaak deur miselium, spore of polisakkariede

wat deur die fungus geproduseer word. Verstopping word vererger deur gomme en afbraakprodukte van die plant. Harling en Taylor (1985) neem xileemvesels wat met jel geblokkeer is en swelling van die stippelmembrane waar. Pennypacker en Nelson (1972) kon geen tilose in die xileemvesels waarneem nie. Die oksidasie en vervoer van die afbraakprodukte veroorsaak 'n bruin verkleuring van die vaatweefsel, wat as 'n bruin ring by 'n dwarsdeursnee van 'n geïnfecteerde stingel waargeneem kan word. Hipertrofie, hiperplasia en veranderinge in die metabolisme van die sitoplasma van die xileem parenchiemselle kom voor. Die dunwandige xileemvesels in jong geïnfecteerde stingels, word maklik platgedruk deur parenchiemselle wat deur patogeensekresies gestimuleer word om te deel. Toksiene wat deur die patogeen geproduseer en opwaarts deur die xileem vervoer word, veroorsaak 'n reduksie in chlorofilsintese langs die are. Dit lei tot 'n afname in fotosintese en versteur membraan permeabiliteit wat lei tot 'n groter verlies van water deur transpirasie (Baayen, 1988b; Rattink, 1988).

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* verkry voedingstowwe deur ensieme te produseer wat die selwande van die plantselle afbreek. Die afbraak van die vaatweefsels veroorsaak 'n verlies aan water, wat verwelking veroorsaak (Baayen, 1988b). Wanneer die beskikbare water te min is vir die blaar om normaal te funksioneer sluit die huidmondjies, die blaar verlep en gaan dood.

Fusarium oxysporum vorm chlamydospore en sekelvormige makrokonidiums op vertikale konidiofore op die oppervlak van die dooie plant. Makrokonidiums is dunwandig met 'n voetsel en 'n gepunte apikale sel. Chlamydospore is dikwandige ongeslagtelike spore wat gevorm word wanneer die inhoud van hifes of konidiums verdik. Chlamydospore kan vir lang tye in die grond oorleef. Verspreiding vind hoofsaaklik deur grondwater, implemente en sade of steggies van die gasheerplant, plaas. Die patogeen oorwinter in die grond of plantreste as chlamydospore en miselium (Nelson, 1990).

2.2. Beheer van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

2.2.1. Konvensionele metodes.

2.2.1.1. Weerstandbiedende angelier kultivars.

In die sewentiger jare is bevind dat *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* 'n belangrike bedreiging vir die angelierbedryf geword het, en die kweking van weerstandbiedende kultivars het heelwat aandag geniet. Alhoewel sukses daarmee behaal is, bestaan daar nog nie 'n kultivar wat 100% weerstandbiedend is teen al die patogene rasse van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* nie (Rattink et al., 1988).

Volgens Sparnaaij et al. (1988a) is daar 'n direkte verband tussen die persentasie plante wat geïnfekteer word en die konsentrasie inokulum in die grond. Die toestand van die plant, veral van die wortelstelsel, is ook 'n faktor.

Dit wil voorkom asof pienk kultivars die meeste vatbaar en rooi kultivars die minste vatbaar vir *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* is. Die weerstandbiedenheid van wit kultivars vir die patogeen varieer (fig. 2.1).

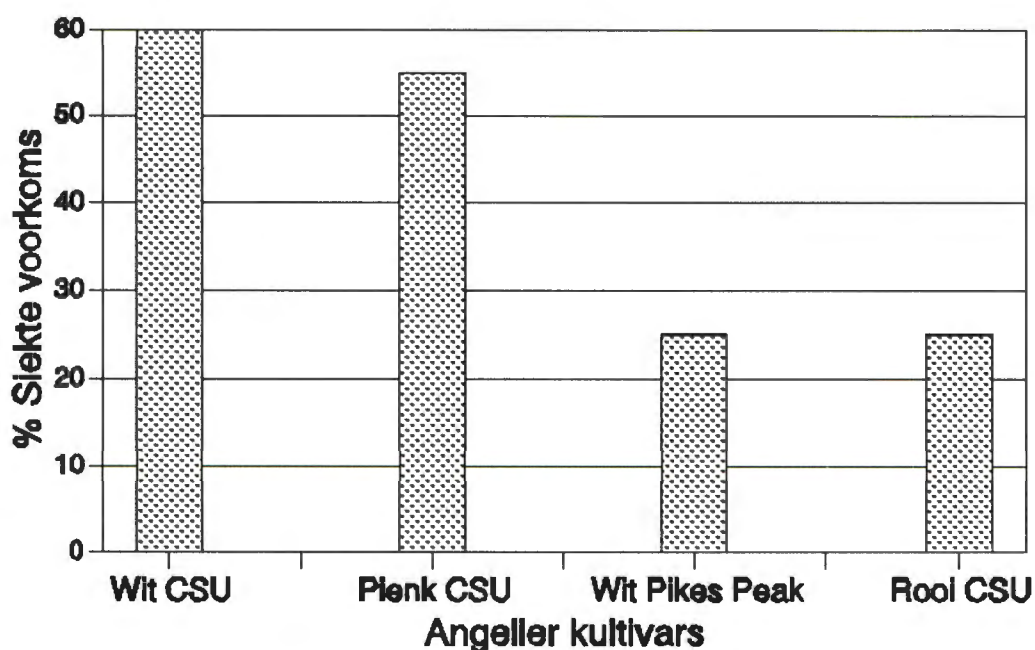


Fig. 2.1. Siekte voorkoms by angelier kultivars 1 jaar nadat die kultivars in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* geïnfesteerde grond geplant is (Baker, 1980:744).

Volgens Baker (1980) is die inkubasietyd van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* langer in rooi kultivars as in pienk en wit kultivars.

Angeliere het hoofsaaklik twee soorte verdedigingsmeganismes. Eerstens is daar sigbare veranderinge aan die vaatweefsels om die fungus indringing te beperk en tweedens word metaboliete, byvoorbeeld fitoaleksiene (Niemann & Baayen, 1988), deur die plant afgeskei om die fungus se groei te belemmer. Sigbare veranderinge aan die vaatweefsels sluit die produksie van wondgom deur aangrensende selle, om 'n houtvat af te sluit en die produksie van 'n kurklage om die verstopte houtvat, in. Intravaskulêre kurkselle kan ook gevorm word deur die differensiasie van hiperplastiese parenchiemselle. Die ontwikkeling van die kurkselle voorkom nie net die verspreiding van die fungus nie, maar kan ook moontlik voorkom dat enige voedingstowwe deurgelaat word na die patogeen. 'n Nuwe houtvat word parallel aan die verstopte houtvat gevorm. Van die parenchiemselle langs die geïnfekteerde vesels kan ook 'n hipersensitiewe reaksie vertoon (Baayen, 1987). Angeliere wat meer weerstand bied teen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* word minder geïnfekteer as die meer vatbare kultivars. Dit kom voor asof kultivars wat meer weerstandbiedend is, 'n beter verdedigingsmeganisme het as die vatbare kultivars (Baayen, 1988c).

Volgens Rattink (1988) kom dit voor asof die mate van patogenisiteit van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* afhang van hoe weerstandbiedend die geïnfekteerde angelierplant is. Hy het gevind dat 'n isolaat uit 'n angelierplant wat byna 100% weerstandbiedend is, nie patogenies is nie, maar 'n isolaat uit 'n vatbare angelierplant wel patogenies was. Rattink (1988) maak die gevolgtrekking dat patogene *F. oxysporum* wel 'n weerstandbiedende angelierplant kan binnedring maar dat die angelierplant die patogenisiteit van die fungus verminder.

Die teling van weerstandbiedende angelier kultivars is 'n tydrowende en duur proses. Die voordeel van die gebruik van weerstandbiedende kultivars is dat daar geen negatiewe invloed op die omgewing is nie. Tog bestaan daar nog geen kultivar wat 100% weerstandbiedend is nie en die kwaliteit van die weerstandbiedende kultivars is ook nie altyd kommersieel aanvaarbaar nie (Sparnaaij et al., 1988b).

Volgens Van Peer en Schippers (1992) is dit moontlik om weerstandbiedenheid in angeliere te induseer. Dit lyk asof komponente van lipopolisakkariede teenwoordig op die

seloppervlakte van *Pseudomonas* sp. ras WC417r, die produksie van fitoaleksiene in angelierplante induseer. Die navorsers het die wortels van Pallas, 'n angelier kultivar wat matig weerstandbiedend is teen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, behandel met *Pseudomonas* sp. ras WC417, 'n week voordat die plante met *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* geïnfekteer is. Na 10 weke was net 31 % van die plante siek.

2.2.1.2. Patogeen-vrye voortplantingsmateriaal.

Volgens Baker (1980) is verliese vanweë *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in die angelierbedryf in die VSA verminder deur van patogeen-vrye voortplantingsmateriaal gebruik te maak. Die voortplantingsmateriaal word geproduseer deur die groeipunte van angelierplante met behulp van weefselkultuur tot bewortelde plante te laat groei. Dit is egter 'n duur metode waarvan die kwaliteit van die plante en blomme nie altyd kommersieel aanvaarbaar is nie. Die metode is ook nie 100% effektief nie omdat die patogeen die wortels enige tyd kan infekteer en die vaatweefselstelsel kan koloniseer sonder dat die plant enige simptome toon (Nelson et al., 1960). Steriele grond kan ook geïnfesteer word deur spore van die patogeen wat in die lug voorkom, asook deur geïnfekteerde oorblyfsels van wortels wat diep in die grond voorkom (Rowe & Farley, 1981; Sneh, 1981).

2.2.1.3. Chemikalieë.

Flechter en Martin (1972) het gevind dat goeie resultate met benomil verkry word as plante direk na planting met die swamdoder behandel word. Locke et al. (1985) het *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* suksesvol beheer deur die grond voor planting met 'n kombinasie van $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NO_3^- en benomil te behandel. Die grond is gekoloniseer deur 'n antagonis vir die patogeen, *Trichoderma viride*, wat bestand is teen benomil. Kwekerie gebruik tans Sporgon met die aktiewe bestanddeel prochloraz mangaanchloried (De Bruin, 1994).

In kweekhuisbeddings is die sterilisasie van grond 'n groot probleem. Metielbromied kan gebruik word, maar broom residu is toksies vir angeliere en moet met groot hoeveelhede water uitgewas word. Die gebruik van metamnatrium (metiolditiokarbamiensuur-natriumsout) gevolg deur stoomsterilisering blyk redelik suksesvol te wees (Baker, 1980). Die gebruik van 'n stoomsteriliseerder met lang penne, sodat die grond in die beddings tot onder gesteriliseer word, is baie effektief. Die grond in die beddings word deur stoom

verhit tot 'n temperatuur van 80 °C - 90 °C. Die metode veroorsaak egter kompaktering van die grond. Alle gereedskap moet gesteriliseer word wanneer die grond voorberei word vir planting (De Bruin, 1994).

Dit neem ongeveer 5 tot 10 jaar en 6 tot 50 miljoen dollar vir die ontwikkeling en vervaardiging van 'n nuwe chemiese dodert (Delp, 1977). Dit is derhalwe 'n baie duur en lang proses en patogeenrasse wat weerstandbiedend teen die middels is, kom voor. In 1974 is in die VSA vasgestel dat *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* bestand is teen benomil (Dekker, 1976).

2.2.1.4. Landboumetodes.

Omploeg, vloedbesproeiing, solarisasie met deurskynende plastiek en braaklê van lande kan help om die populasie van die patogeen te verminder, maar dit elimineer nie die patogeen nie (Jarvis, 1992). Volgens Sequeira (1962) kan verwelksiekte by piesangs beheer word deur die grond vir agt tot tien jaar braak te lê.

Wisselbou is meesal onprakties aangesien *Fusarium* spp. vir jare in die grond kan oorleef as dormante chlamydospore, of deur saprotrofies op plantreste te leef (Marois, 1990).

2.2.2. Biologiese beheer.

In die natuur word patogene fungusse deur ander mikroörganismes in bedwang gehou deur byvoorbeeld hiperparasitisme, kompetisie, die produksie van antibiotiese stowwe of stowwe wat veroorsaak dat 'n patogeen in 'n rusfase gaan (Baker & Cook, 1974).

Volgens Scher en Baker (1980) is reeds in 1892 waargeneem dat die voorkoms van *Fusarium* verwelksiekte varieer in verskillende grondsoorte en dat die voorkoms van die siekte afhang van grondtekstuur en geografiese ligging. Scher en Baker (1980) het ook gevind dat die onderdrukkende effek van sekere grondsoorte 'n vorm van biologiese beheer is, omdat die effek verminder word deur 'n verlaging van die pH en sterilisasie van die grond. Die onderdrukkende effek van grond kan oorgedra word aan gesteriliseerde grond.

Baker en Cook (1974) definieer biologiese beheer as die vermindering van die inokulumdigtheid of enige aktiwiteit van 'n aktiewe of dormante parasiet of patogeen deur een of meer organismes. Dit kan natuurlik geskied of deur manipulasie van die omgewing,

gasheer of antagonis, of deur die toevoeging van 'n massa antagoniste.

'n Patogeen word gewoonlik nie heeltemal uitgewis deur biologiese beheer nie, maar die patogeen se getalle of virulensie word verminder. Indien die patogeen as 'n voedselbron vir die antagonis dien, kan uitwissing van die patogeen lei tot uitwissing van die antagonis. Indien die patogeen weer in die bepaalde gebied ingevoer word, kan die afwesigheid van die antagonis lei tot onbeperke groei van die patogeen. Deur biologiese beheer word probeer om siekte-voorkoms op 'n lae vlak te hou en sodoende verliese te beperk (Baker & Cook, 1974).

Volgens Baker en Cook (1974) kan grond met 'n onderdrukkende effek veroorsaak dat die patogeen nie vestig nie of dat die patogeen wel vestig maar nie siekte veroorsaak nie, of dat die patogeen vestig en siekte veroorsaak maar dat die siekte-voorkoms afneem met verloop van tyd. Volgens Scher en Baker (1980) vestig *Fusarium oxysporum* wel in grond met 'n onderdrukkende effek, maar veroorsaak nie siekte nie. Die lae voorkoms van verwelksiekte by plante wat in grond met 'n onderdrukkende effek groei, ten spyte van die teenwoordigheid van die patogeen, is weens die antagonistiese effek van die mikroflora op die patogeen. Volgens Elad en Baker (1985) word *Fusarium* spp. geïnhibeer as gevolg van kompetisie met die mikroörganismes vir voedingstowwe. 'n Verhoging in die konsentrasie voedingstowwe verminder die onderdrukkende effek van die grond.

In grond met 'n onderdrukkende effek is die verhouding van patogene tot saprotrofe *Fusarium* populasies een tot tien (Alabouvette, 1990). Volgens Cugudda en Garibaldi (1987) kompeteer patogene en saprotrofe *Fusarium* spp. vir voedingstowwe wat lei tot 'n vermindering in siekte. Hulle het ook gevind dat *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* meer geneig is om kolonies op angelierwortels te vorm in die afwesigheid van antagonistiese *Fusarium* spesies. Kompetisie vind dus in die risosfeer plaas, nie net tydens saprotrofiese groei voordat die patogeen op die wortelvlak vestig nie, maar ook op die wortelvlak van die angelierplant.

Biologiese beheer is 'n stadige vorm van beheer, maar is langwerkend, goedkoop en veilig vir die omgewing. Die toevoeging van biologiese beheeragente kan ook lei tot die beheer van meer as een patogeen. Yuen et al. (1985) het gevind dat *Arthrobacter* spp. die *Fusarium* spp., wat verwelking sowel as stingelvrot by angeliere in kweekhuise veroorsaak,

kan beheer.

Sover is in die meeste studies gekonsentreer op die mikrobiologiese komponent van grond terwyl in 'n paar studies aangetoon is dat die fisiese en chemiese eienskappe van grond ook 'n beperkende rol kan speel in die interaksies tussen mikroörganismes, patogene en gashere. Baker en Cook (1974) het gevind dat *Fusarium* optimaal groei in vogtige grond met 'n neutrale pH. As die grond te droog of te nat, te suur of te alkalies is, gaan die patogeen in 'n rusfase. Scher en Baker (1980) het egter gevind dat die onderdrukkende effek van grond verhoog met 'n verhoging in die pH. Park et al. (1988) het gevind dat min biologiese beheer plaasvind by 'n pH van 5,5, maar dat beheer toeneem as die pH van die grond verhoog word. Leemgrond met 'n fyn tekstuur en 'n pH van 8 het 'n onderdrukkende effek, maar daar is 'n betekenisvolle toename in die voorkoms van verwelksiekte by 'n pH van 7. Yuen et al. (1985) het gevind dat grond met 'n fyn tekstuur en 'n neutrale pH die grootste populasies in stand hou.

Kleigrond wat vog langer behou en alkaliese grond bevoordeel die groei van bakterieë, maar sanderige suur grond wat vinnig dreineer bevoordeel *Fusarium* spp. (Baker & Cook, 1974). Yuen et al. (1985) het byvoorbeeld gevind dat *Pseudomonas putida* die beste oorleef in grond met 'n hoë voghoudende vermoë. Ander faktore soos belugting en die koolstof-stikstof verhouding bepaal die aktiwiteit van die totale biomassa, wat direk verband hou met die mate van biologiese beheer (Alabouvette, 1990).

Kruisbeskerming vind plaas indien 'n plant wat geïnfekteer word deur 'n avirulente fungus, beskerm word, teen infeksie deur 'n patogeen (Rattink, 1988). Dit is lank reeds bekend dat weerstandbiedendheid teen sekere siektes deur kruisbeskerming verkry kan word. Verwelking by patats kan beheer word deur inokulasie met *Fusarium solani* f. sp. *batatas* en by tamaties deur inokulasie met *Cephalosporium* spesies. Davis (1967) het gevind dat kruisbeskerming meer effektief is indien die wortelstelsel onbeskadig bly. Die inokulasie van 'n vatbare angelier kultivar met 'n avirulente isolaat van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* verminder die voorkoms van verwelksiekte. Rattink (1988) het egter gevind dat inokulasie met *F. oxysporum* wat uit *Freesia* en *Cyclamen* geïsoleer is, nie dieselfde effek het nie. Die patogene veroorsaak nie verwelksiekte in angelierplante nie en die verdedigingsmeganisme van geïnfekteerde plante tree dus nie in werking nie.

Antagonisme tussen mikroörganismes kan ook aangewend word vir biologiese beheer. Antagonisme is die direkte beskerming van plante deur antagonistiese fungusse of bakterieë wat 'n patogeen inhibeer voor of nadat infeksie plaasgevind het. Volgens Baker (1968) kan antagonisme in drie kategorieë verdeel word, naamlik: produksie van antibiotiese stowwe, kompetisie, en uitbuiting deur òf predatisme òf parasitisme.

Indien 'n antagonis reeds in die grond teenwoordig is, maar nie doeltreffende beheer uitoefen nie, kan die antagonis se aktiwiteite verhoog word deur toestande so te verander dat die antagonis bevoordeel word. Die struktuur van die grond kan verander word deur die toevoeging van kompos en stowwe soos asparagien, glukose en askorbiensuur. Die toevoeging van veengrond kan voordelig wees want dit bevat streptomisete en ander antagoniste, maar dit bevat ook patogene soos *Pythium* spp. en *Fusarium* spesies. Kompos wat ryk is aan chitien, soos gebruikte sampioenkompos, stimuleer die groei van chitienolitiese bakterieë, wat verantwoordelik is vir die lise van hifes. Die kompos kan ook met kalsium en ander voedingstowwe aangevul word om die groei van saprotrofiese organismes te stimuleer (Jarvis, 1992). Die pH en grondvog van die grond kan verander word om die antagonis te bevoordeel. Selektiewe chemiese behandeling kan gebruik word om kompeteerders van antagoniste te verminder of 'n aanvullende antagonis kan bygevoeg word (Baker & Cook, 1974).

Sneh (1981) het vyftien chitinolitiese bakterieë, onder andere 'n *Arthrobacter* sp. en *Serratia liquifasciens*, uit die risosfeer van angeliere geïsoleer. Die bakterieë is in staat om *Fusarium oxysporum* se hifes te laat oopbars. Angelier saailinge se wortels is in *Arthrobacter* sp. selsuspensies gedoop en in natuurlik geïnfesteerde grond in 'n kweekhuis, geplant. Na 150 dae was 21% van die plante siek terwyl 96% van die kontrole plante siek was. Onder veldtoestande is minder sukses behaal. Veertig persent van die plante en 55% van die kontrole plante was siek na 160 dae.

Smith en Snyder (1972) het die vermoë van chlamydospore van 'n patogene *Fusarium oxysporum* isolaat om te ontkiem in grond wat verwelksiekte onderdruk en in grond waar verwelksiekte voorkom, vergelyk met die ontkieming van chlamydospore van 'n saprotrofe *F. oxysporum* isolaat. Glukose en asparagien is in die grond ingewerk. Meer chlamydospore van die saprotrofe *F. oxysporum* het ontkiem in grond met 'n onderdrukkende effek. In grond waar verwelksiekte voorgekom het, was die persentasie ontkieming van die

chlamydospore min of meer dieselfde. Volgens die navorsers is dit moontlik die gevolg van kompetisie met grondorganismes vir voedingstowwe, aangesien daar gevind is dat sekere risosfeer bakterieë vinniger vermeerder in grond wat verwelksiekte onderdruk as in grond waar verwelksiekte voorkom. Indien meer voedingstowwe in die grond toegevoeg word, verhoog die persentasie ontkieming in albei soorte grond. Sequeira (1962) het weer gevind dat die aantal lewensvatbare spore van *F. oxysporum* f. sp. *cubense* in grond gereduseer kan word deur die toevoeging van groot hoeveelhede koolhidrate of gekerfde plantmateriaal. Dit is moontlik vanweë kompetisie met saprotrofe organismes of bakterieë wat hifes en dunwandige spore laat oopbars, en vanweë die feit dat chlamydospore gestimuleer word om in die afwesigheid van die gasheer te ontkiem en geen nuwe chlamydospore gevorm word nie.

Smith (1977) het kolonies van *Arthrobacter* sp. waargeneem op die oopgebarste kiembuisies van chlamydospore van *Fusarium oxysporum*, wat uit grond wat verwelksiekte onderdruk, geïsoleer is. Min of geen kolonies het voorgekom in grond waar verwelksiekte waargeneem is nie. Yuen en Schroth (1983) het wortels van angeliere met 10^8 kolonie-vormende-eenhede (kve) ml^{-1} *Rhizobacterium* sp. ras MFA1 behandel en in grond wat met 10^3 voortplantingstrukture van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* g^{-1} grond geïnfesteer is, geplant. Na drie maande het die behandelde plante 50% minder verwelking getoon as die kontrole plante.

Elad en Baker (1985) vind dat 'n lae konsentrasie yster die persentasie ontkieming van chlamydospore van *Fusarium oxysporum* verminder maar nie van *F. solani* of *F. graminearum* nie. Dit is moontlik dat die groter chlamydospore van *F. solani* meer yster bevat as die kleiner chlamydospore van *F. oxysporum*.

Park et al. (1988) het gevind dat 'n kombinasie van *Pseudomonas putida* en 'n nie-patogene *Fusarium oxysporum* ras in staat is om *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* wat verwelksiekte by komkommers veroorsaak, te onderdruk. Dit kom voor asof die nie-patogene *F. oxysporum* verantwoordelik is vir 'n verhoging in die wortel uitskeidings van die plant, wat lei tot 'n vermeerdering in die populasie van *P. putida*. Die gevolglike kompetisie vir yster, wat noodsaaklik is vir ontkieming en penetrasie van die patogeen, lei tot die inhibering van patogene *F. oxysporum*.

Siderofore is ekstrasellulêre bestanddele met 'n lae molekulêre massa en 'n hoë affiniteit vir Fe^{3+} . Siderofore vorm stabiele keleringsagente met yster in die Fe^{3+} -vorm. 'n Keleringsagent word gevorm as atome in 'n organiese molekule elektrone skenk aan die metaal kation om sodoende 'n oplosbare produk te vorm. Die produk word deur die mikroörganisme opgeneem, waar Fe^{3+} gereduseer word na Fe^{2+} . Mikroörganismes wat siderofore produseer word bevoordeel, veral waar yster 'n beperkende faktor is. Hoofsaaklik twee soorte siderofore kom in die grond voor, naamlik: fenoliese verbindings met twee hidroksielgroepe wat deur bakterieë geproduseer word en peptiede wat deur fungusse geproduseer word (Salisbury & Ross, 1985). Volgens Elad en Baker (1985) verhoog siderofoor die produksie van *Pseudomonas putida* *in vitro* as die koolstof konsentrasie van die kultuur verhoog word.

Yuen en Schroth (1986) het aangetoon dat *Alcaligenes* sp. ras MFA1 wat siderofore produseer, ontkieming van mikrokonidiums en die groei van die kiembuisie van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* inhibeer. Die voorkoms van verwelksiekte is ook verminder deur angeliërsaad met *Alcaligenes* sp. ras MFA1 te behandel. Volgens Scher en Baker (1982) kompeteer *Pseudomonas putida* en *F. roseum* vir yster. Yster is noodsaaklik vir die verlenging van die kiembuis van *F. roseum*. Aangesien *P. putida* se yster stabiliteits-konstantes hoër is as die van siderofore wat deur *F. roseum* geproduseer word, word *Fusarium* se groei geïnhibeer in 'n omgewing waar yster 'n beperkende faktor is. Simeoni et al. (1987) het gevind dat chlamydospore ontkieming van *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* *in vitro* verminder in die teenwoordigheid van *P. putida* wat siderofore produseer. Daarenteen het 'n mutant wat nie siderofore produseer nie, geen invloed op die ontkieming van die chlamydospore gehad nie. Indien yster aan die chlamydospore beskikbaar gestel is, was die persentasie ontkieming 21% hoër as wanneer yster met 'n keleringsagent bind.

Volgens Baker en Cook (1974) kom daar gewoonlik meer as een antagonis in grond wat 'n bepaalde patogeën onderdruk, voor. Bakterieë en aktinomisete is meer effektiewe antagoniste as fungusse, omdat grondfauna en water die organismes beter deur die grond versprei. Fungusse vermeerder ook stadiger as bakterieë of aktinomisete. Fungusse kan egter by 'n laer waterpotensiaal groei as spoorvormende bakterieë. Effektiewe biologiese beheer hang derhalwe af van die seleksie van organismes wat vir 'n bepaalde periode in sekere omgewingstoestande met mekaar kan saam leef en met *Fusarium* spp. kan

kompeteer.

Baayen (1987, 1988) in Nederland en Baker (1968, 1980) en, Yuen en Schroth (1983, 1986) in die VSA het navorsing gedoen op die biologiese beheer van *Fusarium oxysporum* wat verwelksiekte in gewasse veroorsaak. Omgewingstoestande in Suid-Afrika verskil egter van die koue, nat toestande in die noordelike halfrond. Dit kom voor asof ingevoerde kultivars vanaf lande byvoorbeeld Nederland, nie dieselfde weerstand bied teen patogene in die droë, warm toestande wat die plante in Suid-Afrika ondervind nie (De Bruin, 1994). Daarom is dit noodsaaklik om antagoniste te vind wat in die toestande met patogene kan kompeteer.

3. DOELSTELLING.

Die biologiese beheer van verwelksiekte by angeliere wat veroorsaak word deur *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* deur die vestiging van 'n antagonistiese risosfeer populasie wat in staat is om die patogeen sodanig te onderdruk dat die siekte verminder kan word.

Die volgende doelwitte is gestel om die doelstelling te bereik:

1. Isolاسie van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* uit angeliere en grondmonsters.
2. Isolاسie van moontlike antagoniste uit die risosfeer van angelierwortels en uit grondmonsters.
3. *In vitro* toetsing van isolate vir moontlike antagonisme teen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.
4. *In vivo* toetsing van organismes vir die bepaling van die organismes se vermoë om die patogeen te onderdruk.
5. Toetsing van antagoniste om vas te stel hoe effektief die antagoniste *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in beddings in 'n kommersiële kweekhuis onderdruk.

4. *IN VITRO* TOETSING VAN ORGANISMES VIR ANTAGONISME.

4.1. Metodes.

4.1.1. Versameling van plant- en grondmonsters.

Vir die isolasie van organismes wat in die toets vir antagonisme gebruik is, is angelierplante en grondmonsters te Boskop by die angelierkwekery van Dr. Emile Kotze versamel. Daar is ook grondmonsters uit beddings waar geen verwelksiekte voorkom nie, van SAFROPA kwekery naby Brits verkry.

4.1.2. Isolasie van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

4.1.2.1. **Isolasie van patogeen uit plant:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* is direk uit siek angeliere geïsoleer. Stingels waarvan die vaatweefsels bruin verkleur, is afgevee met 3,5% natriumhipochloriet om kontaminasie te verminder. Gedeeltes van die stingels is op 'n Nash-Snyder medium geplaas en geïnkubeer by 24 °C. Die medium bestaan uit 1,5 g Difco peptone, 1,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20,0 g agar, en 1,0 g Pentachloronitrobenseen opgelos in 1000 ml water. Die pH van die medium is 5,5. Na sterilisasie in die outoklaaf vir 20 min by 104 kPa is 250 mg Penbritin en 250 mg Chloromycetin by die afgekoelde medium gevoeg, waarna dit in petribakkies gegiet is. Die medium is gebruik aangesien dit geskik is vir verrotte materiaal wat deur vinnig groeiende kontaminante geïnfekteer is (Nelson et al., 1983).

4.1.2.2. **Isolasie van patogeen uit die grond:** 10 g gesifte (2 mm sif is gebruik) grond is in 'n vylsel fyngemaak en verdun 1:1000 na 1:10 000 in 0,1% water agar. 1 ml van die suspensie word op Komada se medium gepipetteer en geïnkubeer by 24 °C.

Komada se medium word spesifiek vir isolasie van *Fusarium oxysporum* uit grond gebruik (Nelson et al., 1983). Die formule van die medium is soos volg: 1,0 g K_2HPO_4 , 0,5 g KCl, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g Fe-Na-EDTA, 2,0 g L-Asparagien, en 20 g D-Galaktose word opgelos in 1000 ml water. Nadat die medium gesmelt en afgekoel het, is die volgende bygevoeg: 1,0 g Pentachloronitrobenseen, 0,5 g Oxgall, 1,0 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 250 mg Penbritin en 250 mg Chloromycetin. Die pH word met 10% fosforsuur aangepas na 3,8.

4.1.3. Isolasi van moontlike antagoniste.

4.1.3.1. Isolasi van bakterieë uit die grond: 'n Suspensie van 250 ml word met 25 g gesifte (2 mm sif is gebruik) grond gemaak en vir 30 minute meganies geskud. Terwyl die suspensie geskud is, is 10 ml met 'n steriele pipet na 90 ml steriele water oorgedra. Die stap is herhaal totdat die verlangde verdunning bereik is. Verdunnings wat verkry word is 1:10, 1:100 en 1:1000 (Johnson & Curl, 1972). Ongeveer 1 ml van 'n 1:1000 verdunning is op 'n grondekstrak agar gepipetteer en geïnkubeer by 24 °C - 30 °C.

Grondekstrak agar is berei deur 15,0 g agar, 0,2 g K_2HPO_4 in 1000 ml grondekstrak op te los. 0,001 g Actidione is bygevoeg om fungusse te inhibeer. Grondekstrak is berei deur 1000 g grond in 1000 ml water op te los. Die pH van die medium is 6,8. Die suspensie is gesteriliseer in 'n outoklaaf vir 20 minute by 104 kPa en met behulp van 'n Buchner trechter gefiltreer.

4.1.3.2. Isolasi van bakterieë uit plantwortels.

Bakterieë is uit die wortels van gesonde angelierplante geïsoleer. Wortelsegmente van jong plante is afgespoel onder lopende water, waarna dit in 'n vysel met 'n bietjie steriele water geplaas is en met 'n stamper fyngemaak is. Die suspensie is verdun deur 100 ml gedistilleerde water by te voeg. Terwyl die suspensie geroer is, is 1 ml van die suspensie op PCA ('Plate count agar') gepipetteer en geïnkubeer by 24 °C - 30 °C.

PCA is berei deur 19 g PCA in 1000 ml gedistilleerde water op te los en vir 20 minute by 104 kPa in 'n outoklaaf te steriliseer. Een liter PCA is soos volg saamgestel: 5 g Tryptone, 2,5 g gisekstrak, 1 g glukose en 10,5 g bakteriologiese agar. Die pH van die oplossing is 7.

4.1.3.3. Isolasi van aktinomisetes uit die grond.

'n Grondmonster is met fenol behandel om die bakterieë en fungusse in die monster te verminder. Twee druppels van 'n 1:20 grond verdunning is gevoeg by 10 ml 1:140 fenol verdunning. Na 10 minute word een druppel van die fenol-grond verdunning geplaas in 12 ml gesmelte glukose-asparagien agar met natriumpropionaat en geïnkubeer by 24 °C - 30 °C.

Glukose-asparagien agar met natriumpropionaat is berei deur 15 g agar, 10 g glukose, 4 g natrium propionaat, 0,5 g asparagien, en 0,5 g K₂HPO₄, in 1000 ml gedistilleerde water op te los en vir 20 minute by 104 kPa in 'n outoklaaf te steriliseer.

4.1.3.4. Isolasië van fungusse uit die grond.

1 ml van 'n 1:10 000 grond verdunning word op halfsterkte aartappeldekstrose agar gepipetteer en by 24 °C - 30 °C geïnkubeer.

Halfsterkte aartappeldekstrose agar (ADA^{1/2}) is berei deur 19,5 g aartappeldekstrose agar en 7 g agar in 1000 ml gedistilleerde water op te los en vir 20 minute by 104 kPa in die outoklaaf te steriliseer. Nadat die medium afgekoel het, is 250 mg Penbritin en 250 mg Chloromycetin bygevoeg. Een liter ADA^{1/2} bevat 2 g aartappeldekstrose, 10 g dekstrose, 7 g agar en het 'n pH van 5,6.

4.1.4. Uitplaat van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate.

Die isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* is op angelierblaar agar (ABA) (Fisher et al., 1982) uitgeplaat.

ABA is berei deur angelierblare wat met gammastrale gesteriliseer is, in stukkies te sny en op 1,5 - 2 % afgekoelde wateragar te plaas. Die Petribakkies is 'n paar dae by kamertemperatuur gelaat sodat enige kontaminante kan uitgroeï. Angelierblaar agar is gebruik omdat spoorvorming op die medium goed is.

4.1.5. *In vitro* toetsing van isolate vir moontlike antagonisme.

Die groeitempo van die organismes is as toets vir antagonisme gebruik. 'n Siftingsproef is gedoen om moontlike antagoniste te skei van die organismes wat geen invloed op die groeitempo van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* het nie. Die toetsorganisme en *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* is teenoor mekaar in 'n Petribakkie (60 mm in deursnee) op ADA^{1/2} geplaas en geïnkubeer by 25 °C. Sewentien van die toetsorganismes se groeitempo is duidelik deur die patogeen geïnhibeer en is weggelaat. Drie isolate (I1, I2 en I3) van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* is gebruik.

Aangesien dit moeilik is om die tempo van liniêre groei in 'n Petribakkie, waar organismes radiale kan groei, te bepaal, is van spesiale glasbuis (fig. 4.1) gebruik gemaak. Die

glasbuis is ongeveer 110 mm lank, 12 mm in deursnee, oop aan beide kante en die punte is effens opgebuig. Nadat die openinge toegemaak is met watteproppe is die glasbuis vir 10 min by 104 kPa in 'n outoklaaf gesteriliseer. Ongeveer 5 ml ADA½ is in elke buis gegiet. Die toetsorganisme is by die een punt op die agar geplaas en die patogeen isolaat by die ander punt. Vir elke toetsorganisme is vier herhalings gedoen. Die afstand wat elke organisme gegroei het is elke tweede dag gemeet. Die groeitempo van elke patogeen isolaat is vir kontrole doeleindes in die afwesigheid van die toetsorganisme bepaal.

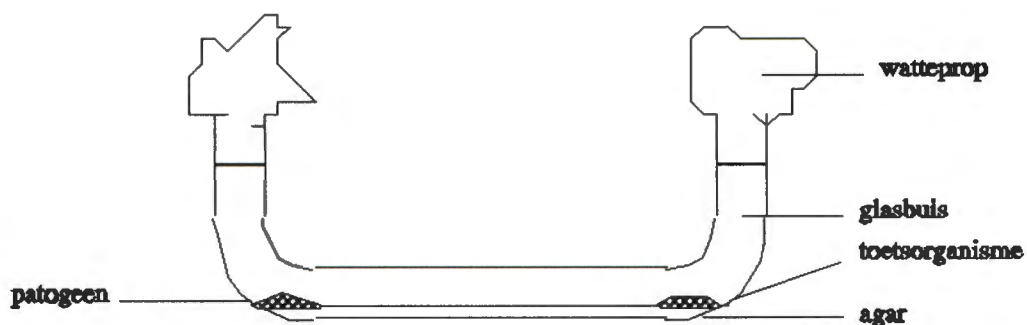


Fig. 4.1. Spesiale glasbuis vir *in vitro* toetsing van moontlike antagoniste.

4.2. Resultate van *in vitro* toetsing van isolate.

Van die oorspronklike 91 isolate is 17 geëlimineer deur die siftingsproef. Deur *in vitro* toetsing is 'n verdere 56 isolate geëlimineer, sodat net 18 van die oorspronklike isolate *in vivo* getoets is. Die resultate van die organismes wat *in vitro* getoets is word grafies in figure 4.2 - 4.11 weergegee. Die resultate van *Fusarium chlamydosporum* (fig. 4.2 a, b en c) teenoor die patogeen word gegee as voorbeeld van 'n organisme wat nie een van die isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teen die einde van die toetsperiode geïnhibeer het nie.

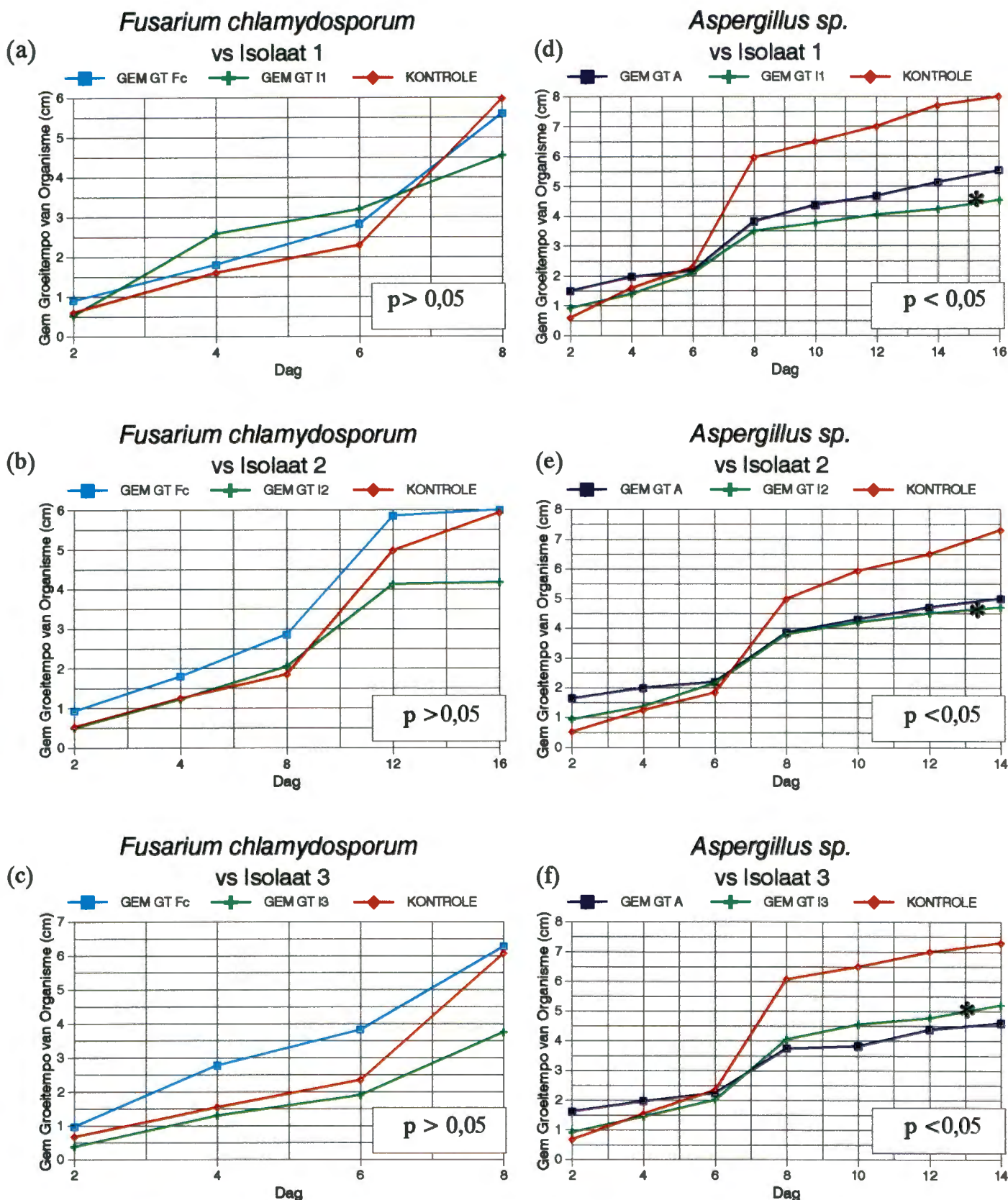
Die gemiddelde groeitempo (GT) van die organismes in sentimeter word gestip teenoor die aantal dae. Die resultate van 'n bepaalde toetsorganisme se toetsing teenoor isolaat 1 (I1), 2 (I2) en 3 (I3) van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* word onder mekaar gegee. Al die resultate is onderwerp aan 'n t-toets om betekenisvolheid van die verskille in die groeitempo te bepaal. Die betekenisvolheidsspeil word as $p < 0,05$ geneem. Indien die patogeen isolaat betekenisvol van die kontrole verskil word die grafiek met 'n asterisk gemerk (Steyn, 1990).

Aspergillus sp. (A) (fig. 4.2. d, e en f) inhibeer die groei van al drie isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Die t-toets wys dat daar 'n betekenisvolle verskil tussen die kontroles en isolate bestaan. *Aspergillus* sp. is net in die eerste *in vivo* toetsing gebruik.

Fusarium moniliforme (Fm) (fig. 4.3. a, b en c) inhibeer die groei van al drie isolate van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. Die t-toets wys dat daar 'n betekenisvolle verskil tussen die kontroles en isolate bestaan. *F. moniliforme* is in verdere proewe gebruik.

Figuur 4.3 (d, e en f) en figuur 4.4 (a - f) gee onderskeidelik die resultate van isolate Fp1, Fp2 en Fp3 van *Fusarium proliferatum* weer. Isolate Fp1 en Fp2 van *F. proliferatum* inhibeer die groei van isolate 1, 2 en 3 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. Die t-toetse wys dat daar 'n betekenisvolle verskil tussen die kontroles en isolate bestaan. Isolaat Fp3 inhibeer die groei van isolaat 3 van die patogeen. Hoewel daar nie 'n betekenisvolle verskil tussen die kontrole en isolaat 1 van die patogeen is nie, het isolaat Fp3 in hierdie geval 'n hoër groeitempo as isolaat 1 van die patogeen. Al drie isolate van *F. proliferatum* is in verdere proewe gebruik.

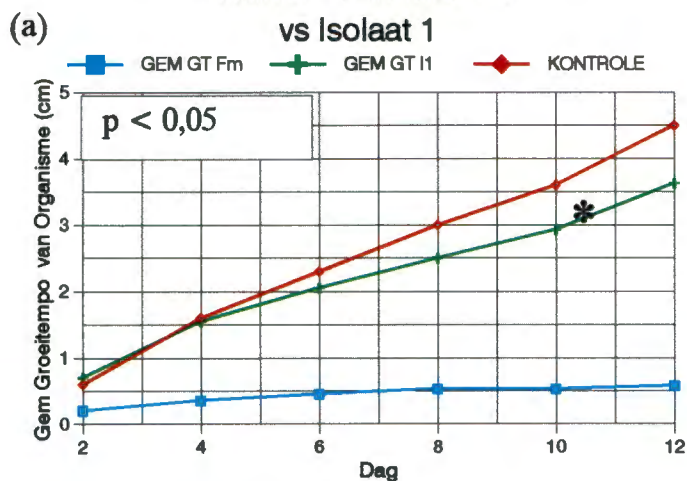
Figure 4.5 (a-f) tot 4.8 (a, b en c) gee die resultate van sewe verskillende isolate van *Trichoderma harzianum* (Th1 - Th7) weer. Th1 (fig. 4.5 a, b en c) en Th2 (fig. 4.5 d, e en f) inhibeer nie die groei van enige van die isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* nie. Th1 en Th2 se groeitempo is baie hoër as isolate 1, 2 en 3 van die patogeen en kan dus met die patogeen kompeteer. Th3 (fig. 4.6 a, b en c) inhibeer die groei van isolaat 2 en 3 van die patogeen betekenisvol. Die isolaat het ook 'n hoër groeitempo as isolate 1, 2 en 3 van die patogeen. Th4 (fig. 4.6 d, e en f) inhibeer die groei van isolate 1, 2 en 3 van die patogeen, betekenisvol. Die isolaat se groeitempo is ook hoër as die van die patogeen. Alhoewel Th5 (fig. 4.7 a, b en c) en Th6 (fig. 4.7 d, e en f) laer groeitempo's as die patogeen het, inhibeer die Th-isolate die groei van isolate 1, 2 en 3 van die patogeen betekenisvol.



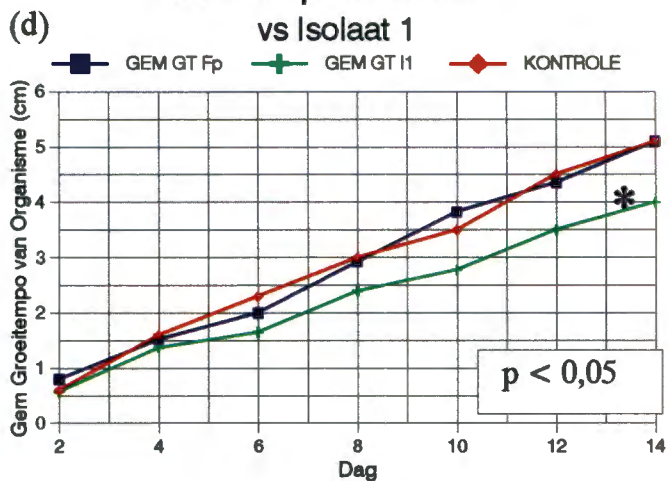
* Die groeitempo van die isolaat van die patogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.2 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *F. chlamydosporum* (Fc) (a, b en c) en *Aspergillus* sp. (A) (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

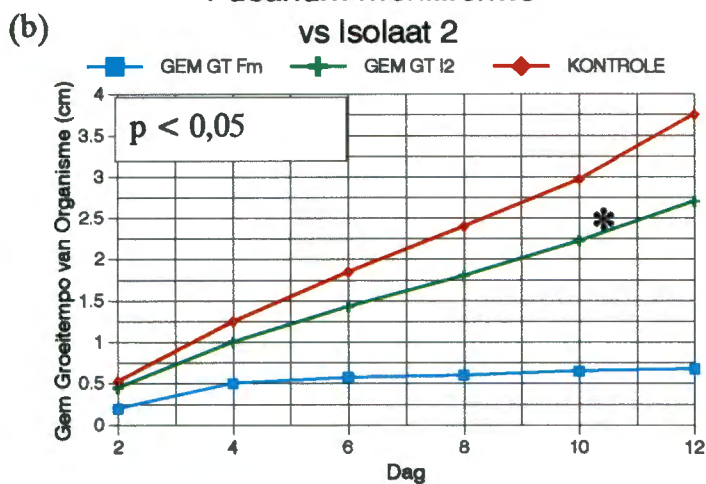
Fusarium moniliforme



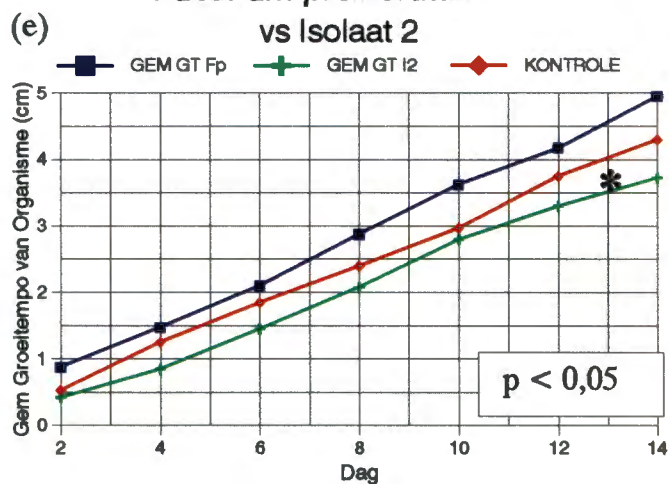
Fusarium proliferatum 1



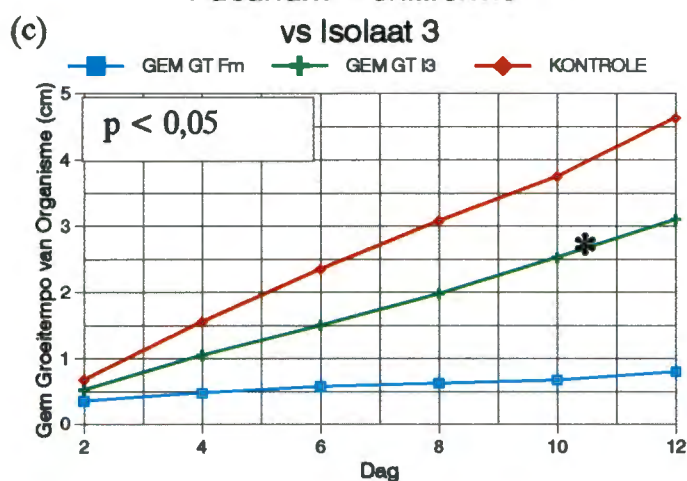
Fusarium moniliforme



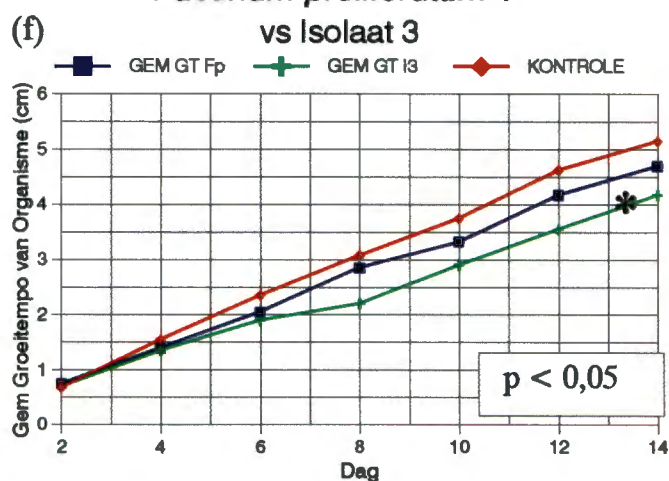
Fusarium proliferatum 1



Fusarium moniliforme



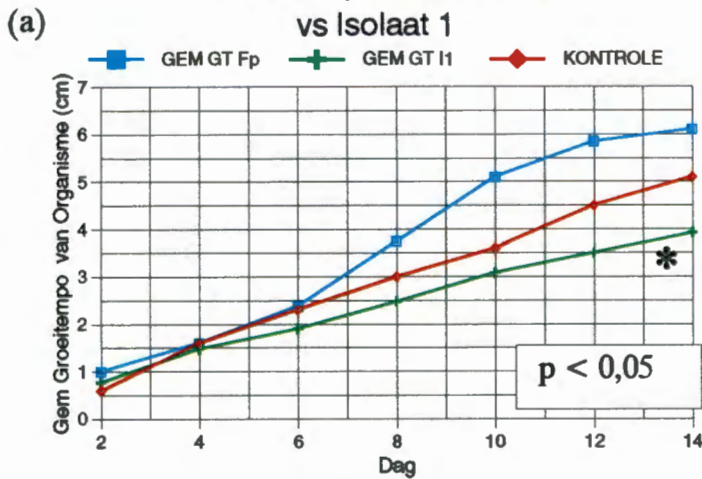
Fusarium proliferatum 1



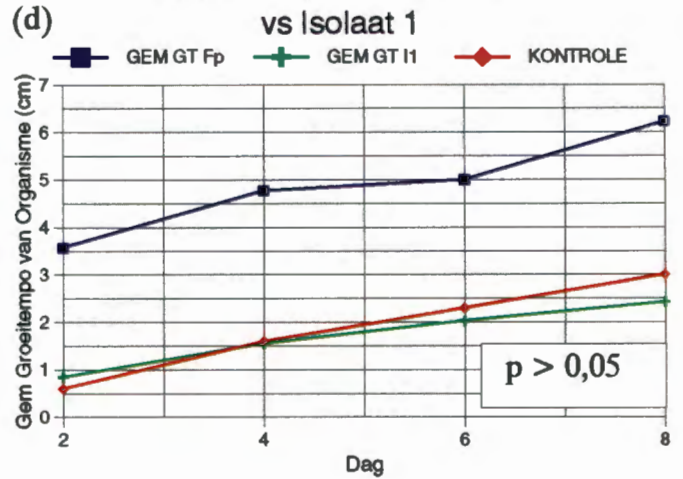
* Die groeitempo van die isolaat van die patoogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.3 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *F. moniliforme* (Fm) (a, b en c) en *F. proliferatum* (Fp) isolaat 1 (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patoogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

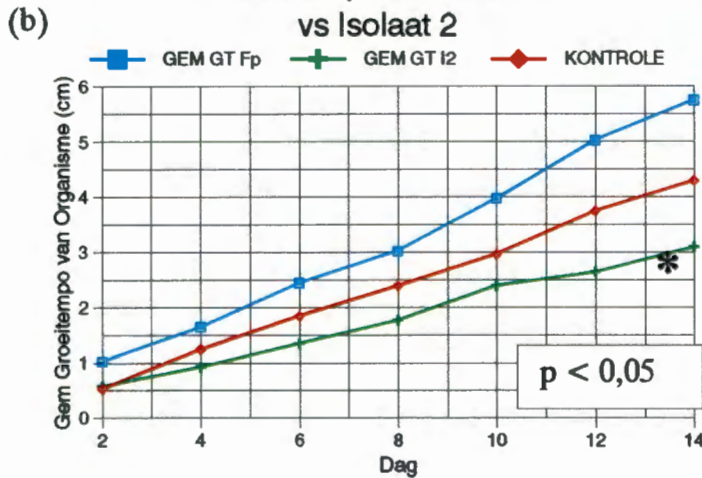
Fusarium proliferatum 2



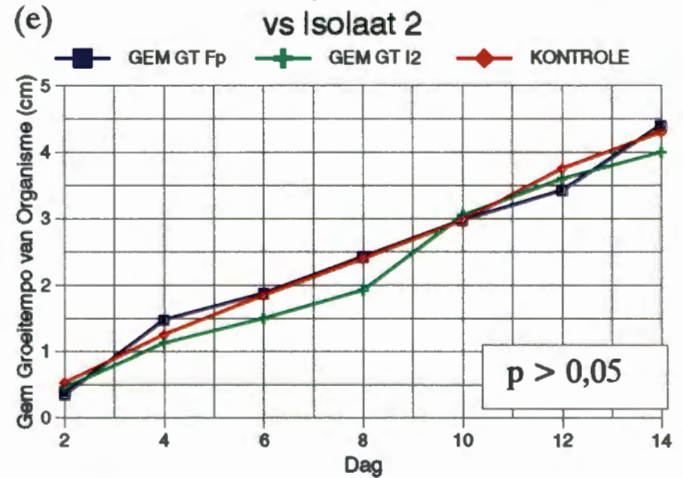
Fusarium proliferatum 3



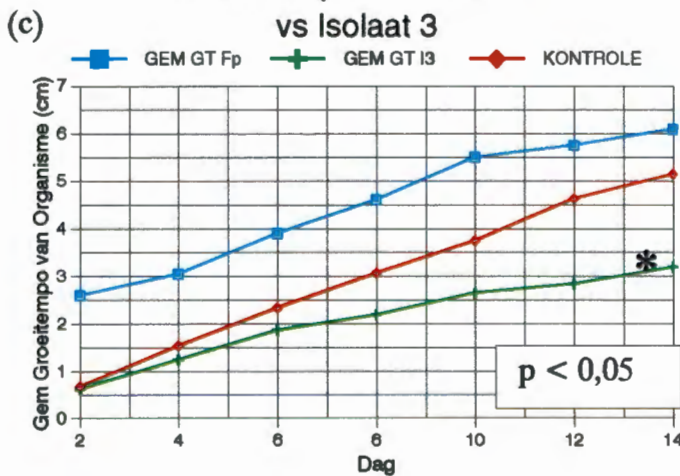
Fusarium proliferatum 2



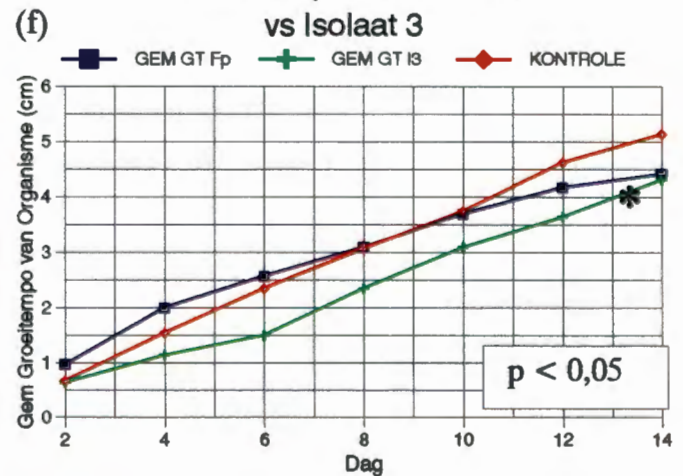
Fusarium proliferatum 3



Fusarium proliferatum 2



Fusarium proliferatum 3



* Die groeitempo van die isolaat van die patoogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.4 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *F. proliferatum* (Fp) isolaat 2 (a, b en c) en isolaat 3 (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patoogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

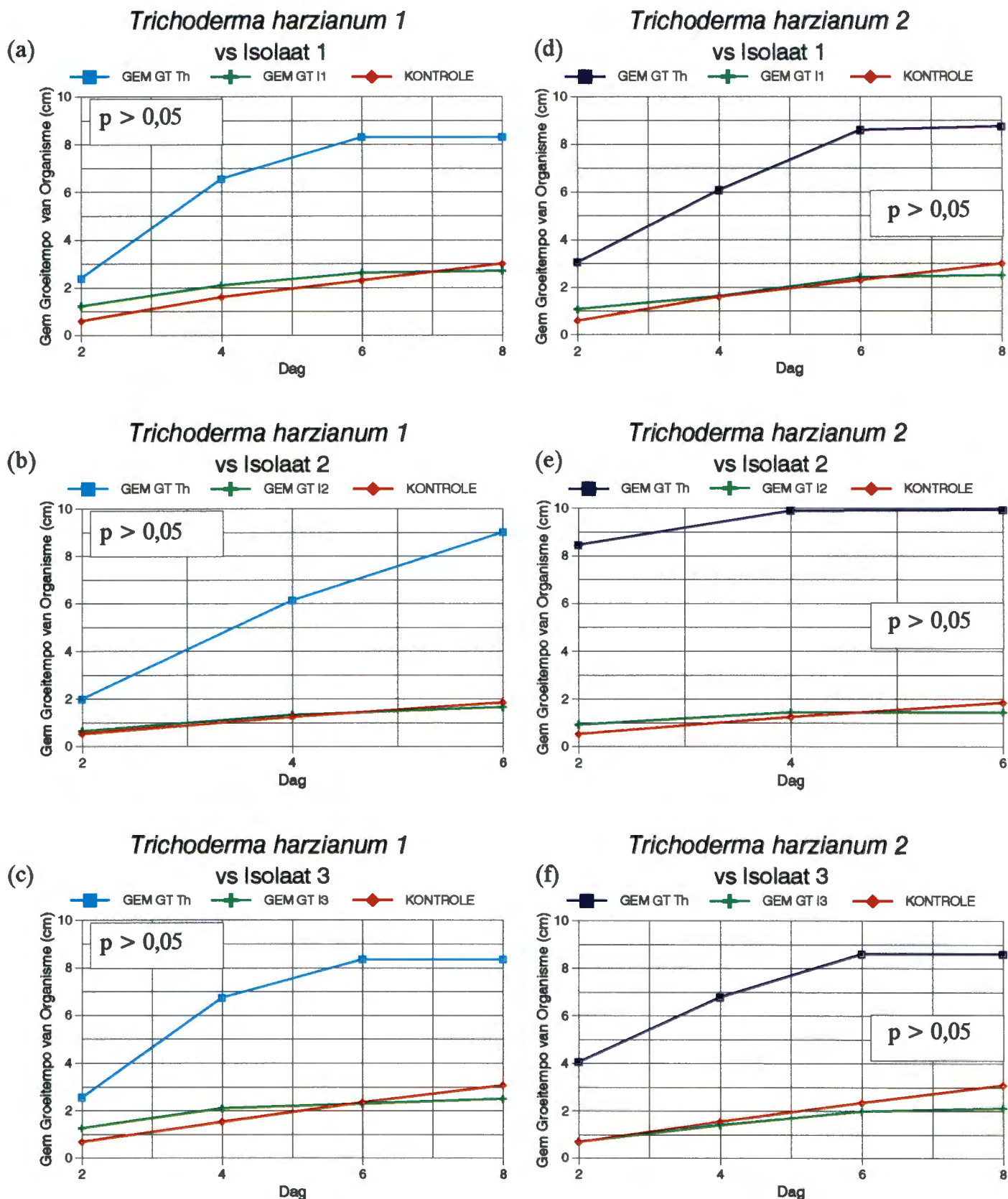
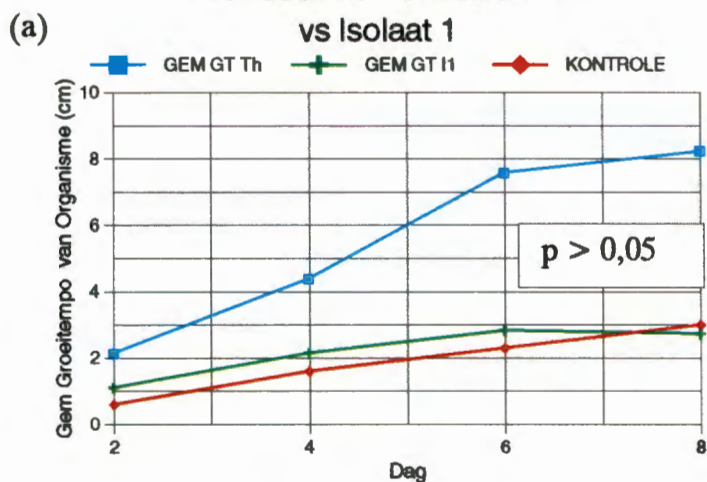
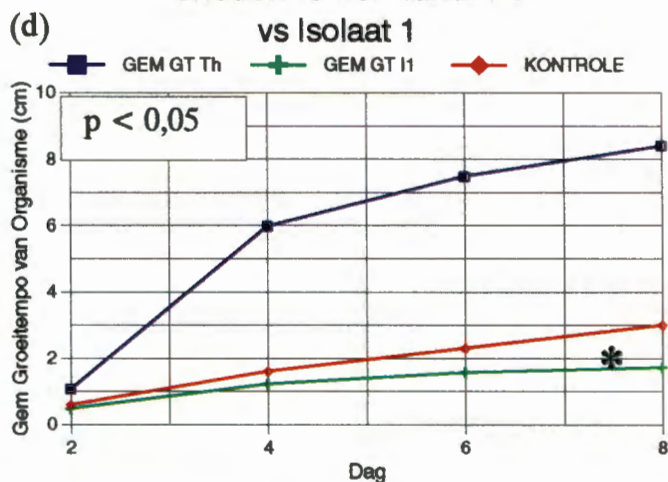


Fig. 4.5 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *Trichoderma harzianum* (Th) isolaat 1 (a, b en c) en isolaat 2 (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patoogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

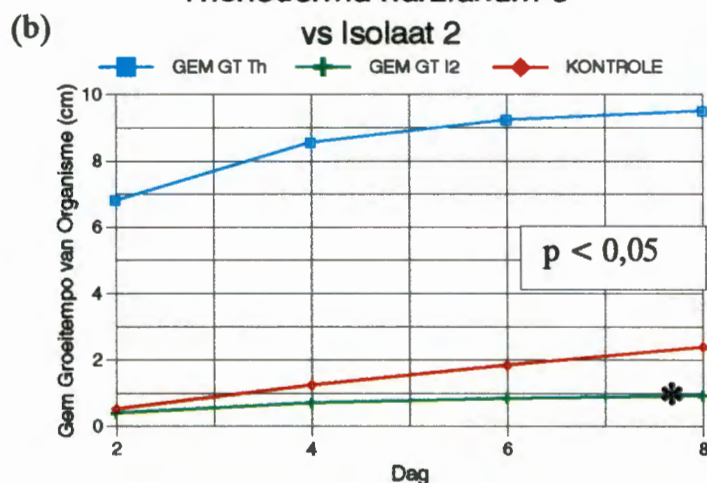
Trichoderma harzianum 3



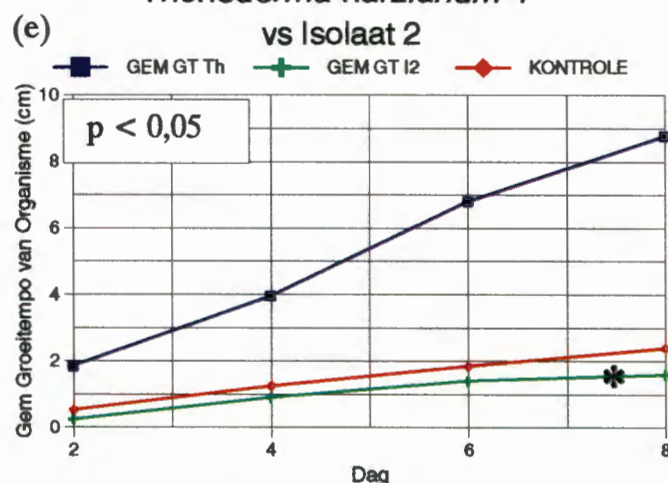
Trichoderma harzianum 4



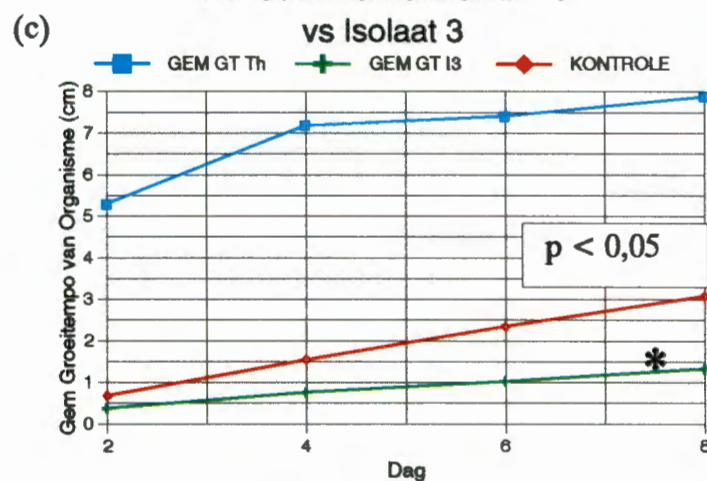
Trichoderma harzianum 3



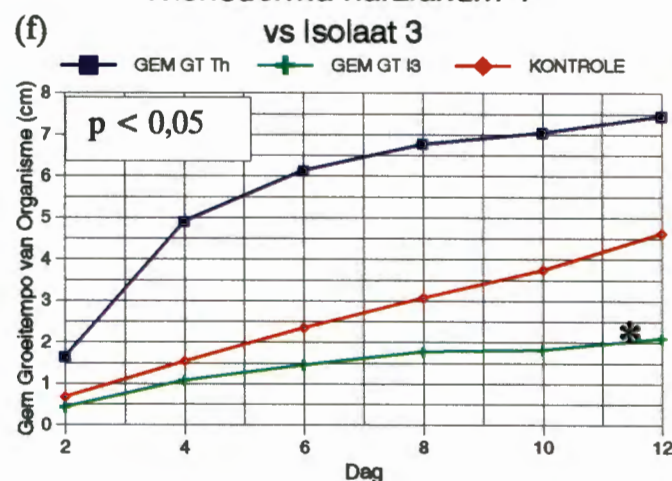
Trichoderma harzianum 4



Trichoderma harzianum 3



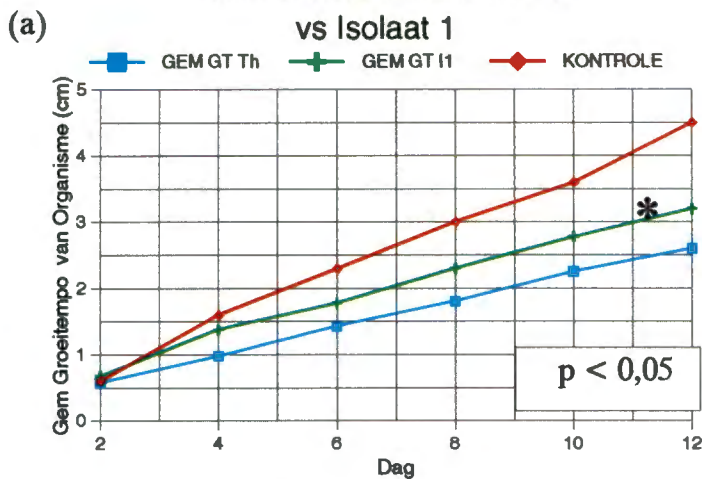
Trichoderma harzianum 4



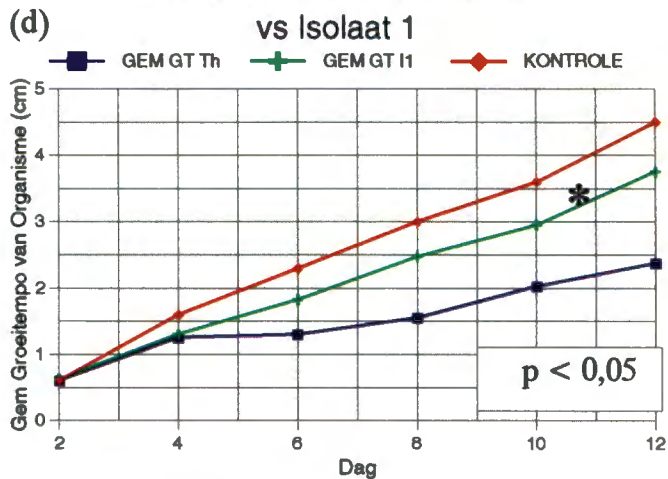
* Die groeitempo van die isolaat van die patogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.6 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *Trichoderma harzianum* (Th) isolaat 3 (a, b en c) en isolaat 4 (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

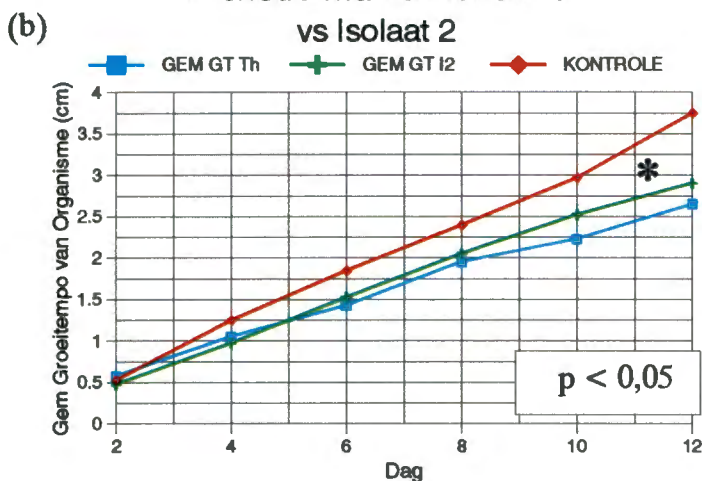
Trichoderma harzianum 5



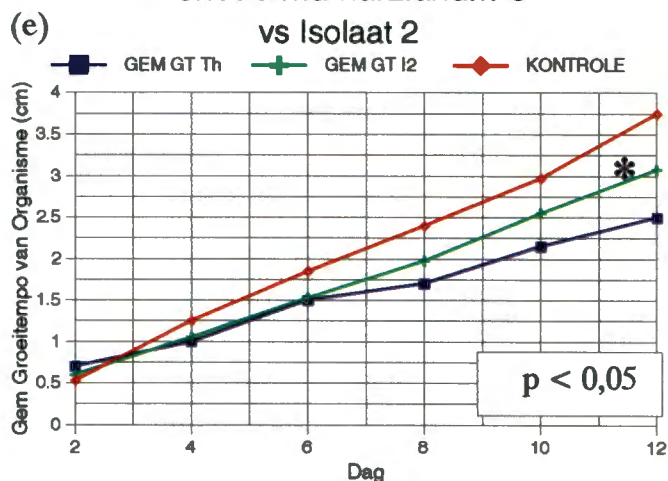
Trichoderma harzianum 6



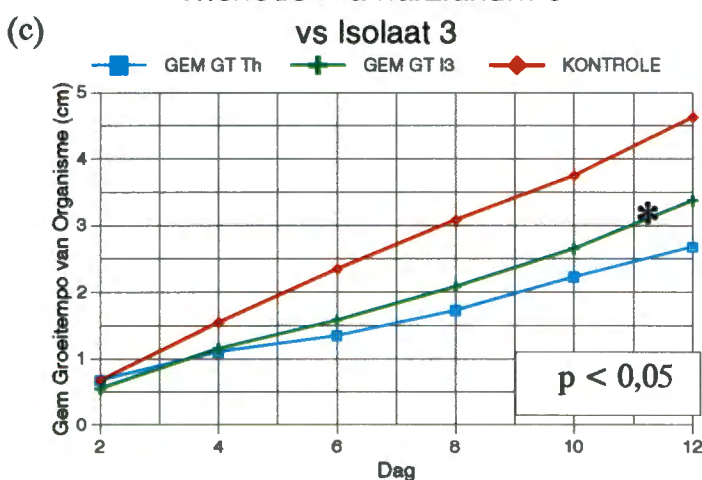
Trichoderma harzianum 5



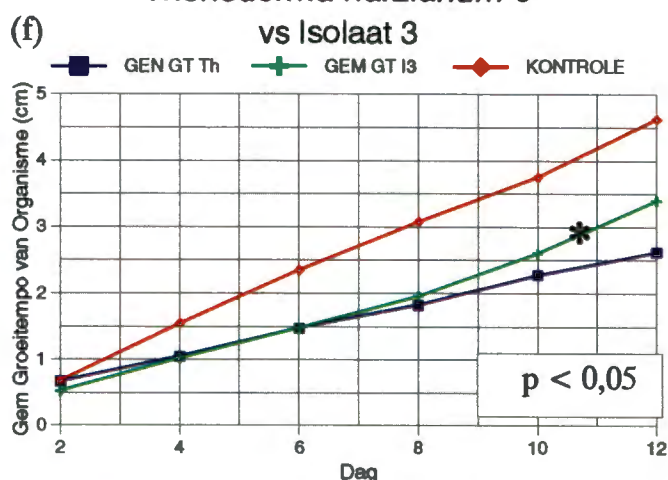
Trichoderma harzianum 6



Trichoderma harzianum 5



Trichoderma harzianum 6



* Die groeitempo van die isolaat van die patoogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.7 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *Trichoderma harzianum* (Th) isolaat 5 (a, b en c) en isolaat 6 (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patoogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

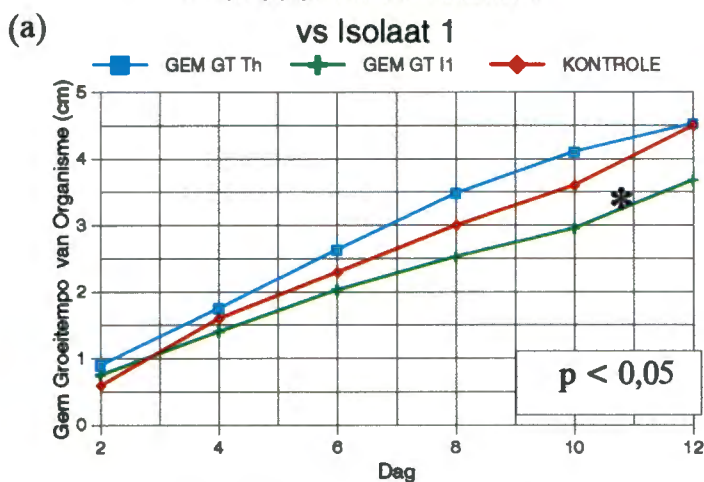
Trichoderma harzianum isolaat Th7 (fig. 4.8 a, b en c) inhibeer die groei van isolate 1 en 3 van die patogeen betekenisvol. Th7 se groeitempo is effens hoër as die van die patogeen. Al sewe isolate is in verdere proewe gebruik.

Trichoderma fasciculatum (Tf) (fig. 4.8 d, e en f) inhibeer die groei van isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Die t-toets wys dat daar 'n betekenisvolle verskil tussen die kontroles en isolate bestaan. *T. fasciculatum* se groeitempo is hoër as die groeitempo van isolate van die patogeen. Die fungus is in verdere proewe gebruik.

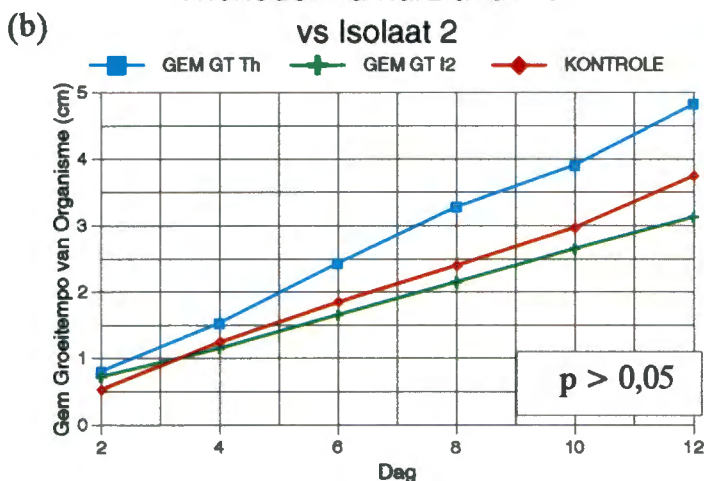
Al vier isolate van *Pseudomonas* sp. (P1 - P4) (fig. 4.9 (a - f) en 4.10 (a - f)) inhibeer die groei van al drie isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, behalwe by P1 waar daar nie 'n betekenisvolle verskil tussen isolaat 2 van die patogeen en die kontrole is nie. Al vier isolate van *Pseudomonas* sp. se groeitempo's is baie hoër as die van die patogeen, daarom is die bakterieë in die eerste *in vivo* toetsing gebruik. P1, P2 en P3 is ook in die tweede toetsing gebruik.

Alhoewel *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) (fig. 4.11 a, b en c) nie die groei van enige van die drie isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* inhibeer nie is die groeitempo baie hoër as die van die patogeen, daarom is *P. aeruginosa* in die tweede *in vivo* toetsing gebruik.

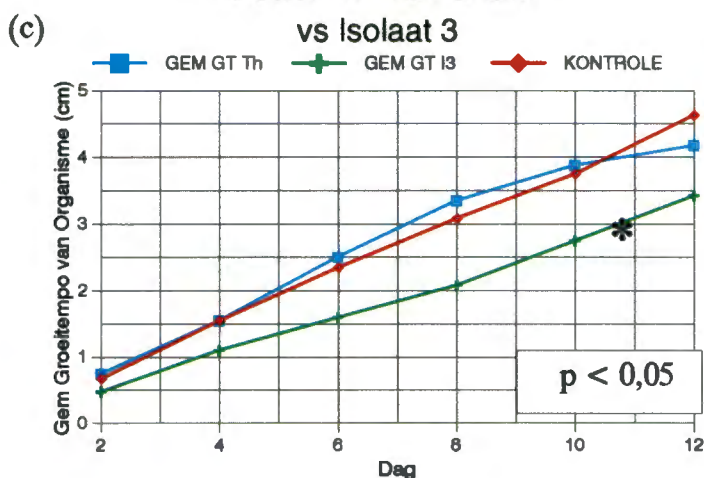
Trichoderma harzianum 7



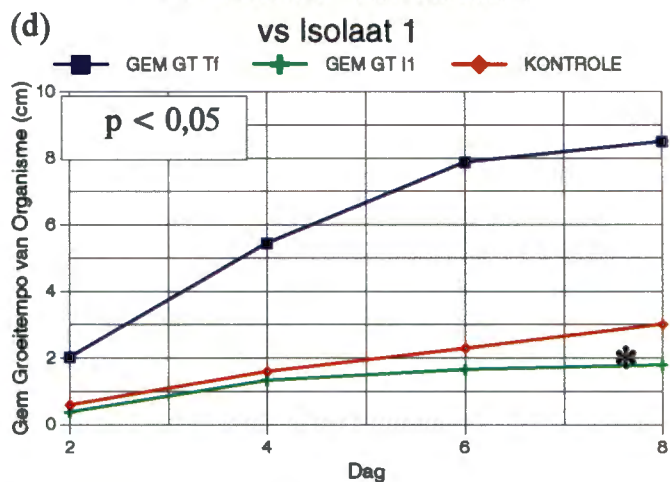
Trichoderma harzianum 7



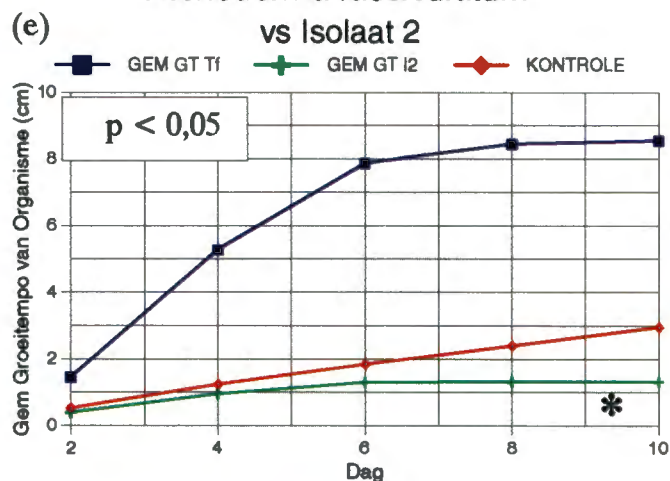
Trichoderma harzianum 7



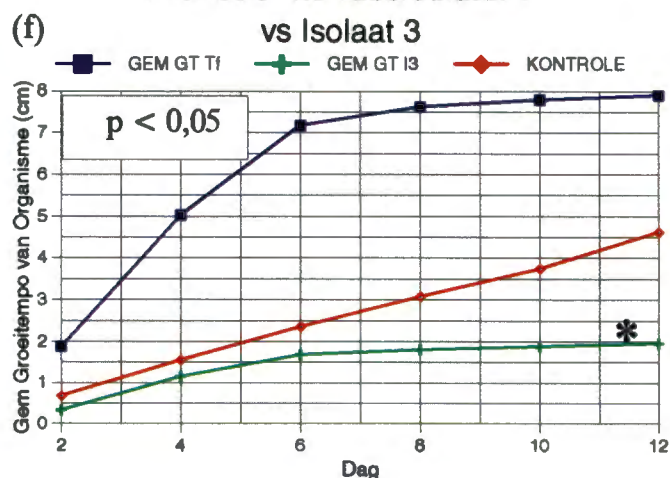
Trichoderma fasciculatum



Trichoderma fasciculatum

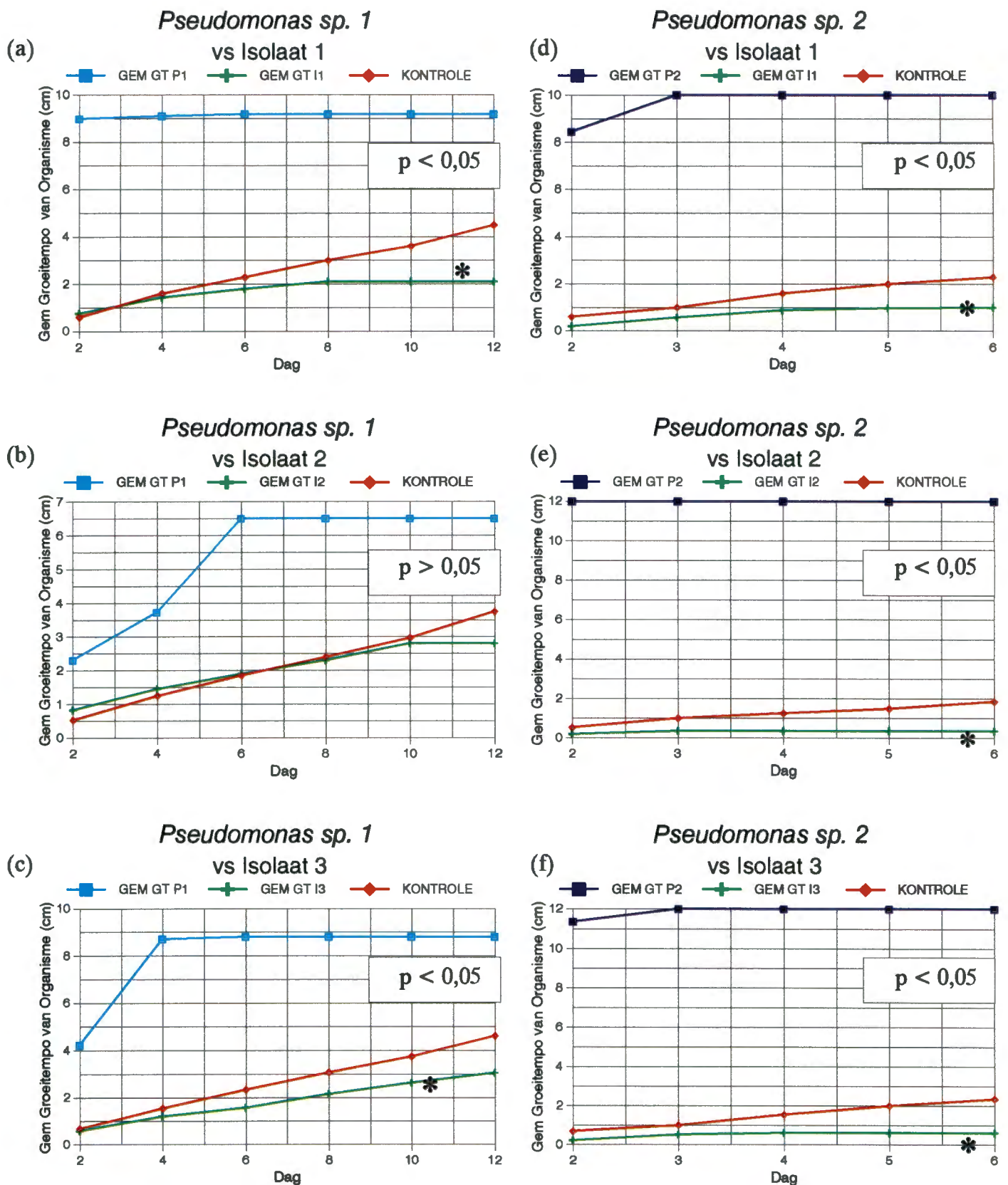


Trichoderma fasciculatum



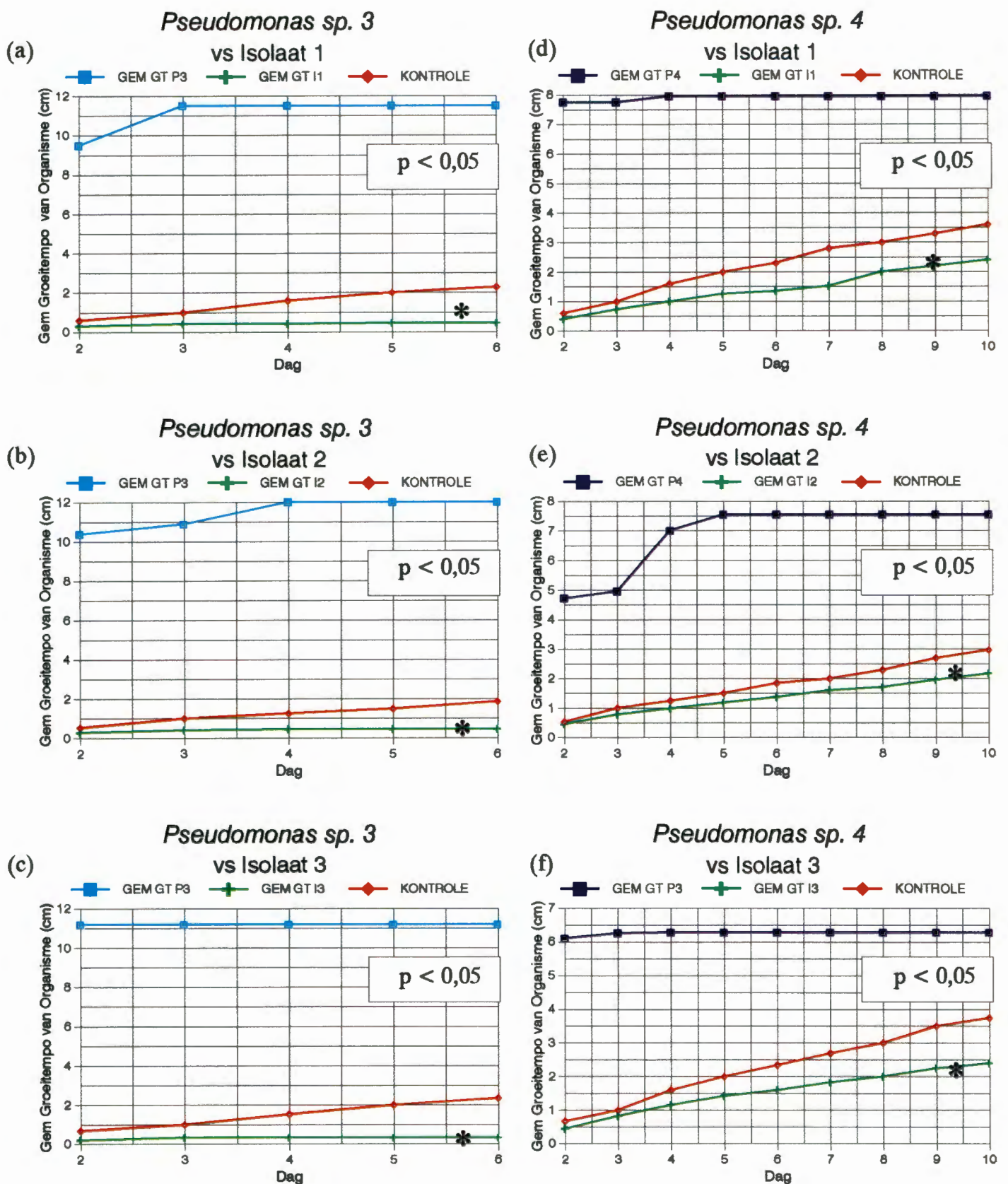
* Die groeitempo van die isolaat van die patogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.8 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *Trichoderma harzianum* (Th) isolaat 7 (a, b en c) en *T. fasciculatum* (Tf) (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.



* Die groeitempo van die isolaat van die patoogen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.9 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *Pseudomonas* sp. isolate P1 (a, b en c) en P2 (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patoogen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.



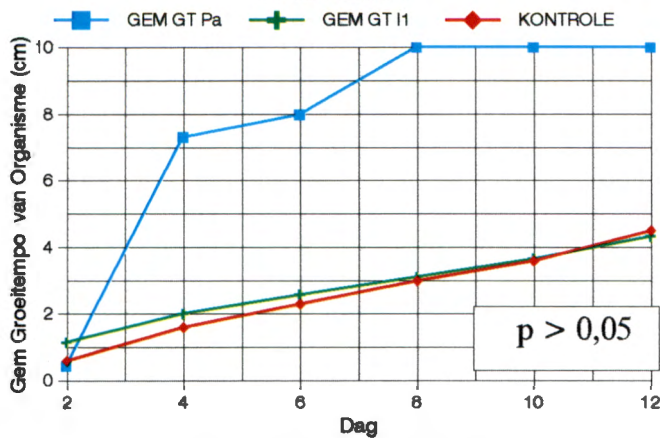
* Die groeitempo van die isolaat van die patoogen verskil betekenisvol van die kontrole.

Fig. 4.10 (a-f): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *Pseudomonas* sp. isolate P3 (a, b en c) en P4 (d, e en f). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patoogen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

Pseudomonas aeruginosa

(a)

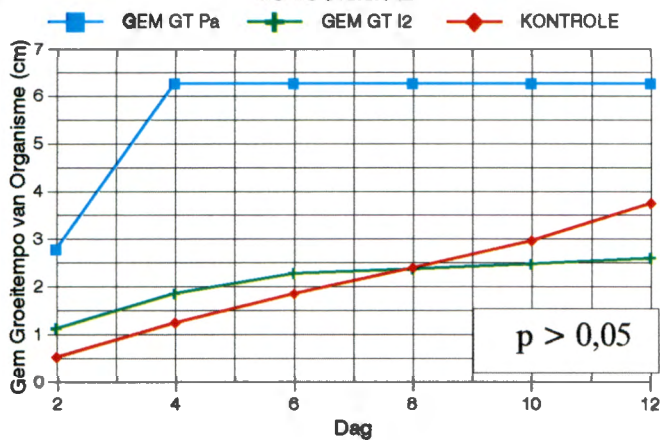
vs Isolaat 1



Pseudomonas aeruginosa

(b)

vs Isolaat 2



Pseudomonas aeruginosa

(c)

vs Isolaat 3

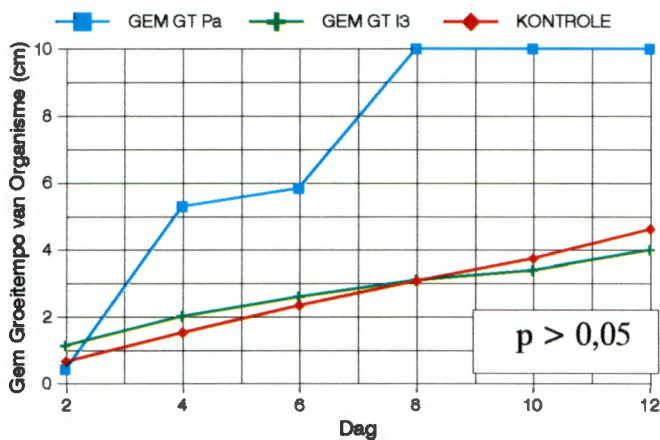


Fig. 4.11 (a-c): Gemiddelde groeitempo (GT) van isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* teenoor *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) (a, b en c). Die kontrole is die gemiddelde groeitempo van die patoogeen isolaat in die afwesigheid van 'n toetsorganisme.

5. *IN VIVO* TOETSING VAN ORGANISMES VIR ANTAGONISME.

5.1. Metodes.

5.1.1. Materiaal.

Gewortelde angeliersteggies van vier kultivars en gesteriliseerde grond is van Geoff Botha kwekery te Weltevrededepark naby Johannesburg verkry. Volgens 'n ooreenkoms met die leweransier van die kultivars wat in die proef gebruik is, kan die name van die kultivars nie verstrek word nie. Gevolglik word na die toets kultivars slegs as kv1, kv2, kv3 en kv4 verwys.

5.1.2. Metode van eerste *in vivo* toetsing van elf antagonist.

Die volgende organismes is getoets teen die isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*: *Aspergillus* sp., drie isolate van *Trichoderma harzianum* (Th2, Th3 en Th4), *T. fasciculatum*, drie isolate van *F. proliferatum* (Fp1, Fp2 en Fp3) en drie isolate van *Pseudomonas* sp. (P2, P3 en P4). Die patogeen isolate en toetsorganisme is vermeerder deur ongeveer 60 ml sorghumsaad te was, te bedek met gedistilleerde water en vir 20 minute by 104 kPa in 'n outoklaaf te steriliseer. 'n Agar kultuur van die organisme is in 5 ml gesteriliseerde water gehomogeniseer, oor die afgekoelde sorghumsaad gegiet en by 24 °C geïnkubeer. Bakterieë is op ADA $\frac{1}{2}$ sonder antibiotika vermeerder.

5.1.2.1. Toets vir vatbaarheid van drie kultivars vir *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en bepaling van die virulensie van die patogeen isolate: Drie angelier kultivars is gebruik, naamlik: kultivar 1 (kv1) met 'n lae weerstand, kultivar 2 (kv2) met 'n medium weerstand en kultivar 3 (kv3) met 'n onbekende weerstand (bepaal deur die leweransier van kultivars). Dieselfde drie isolate van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* as in paragraaf 4.1.5 is gebruik. 'n Gewortelde angeliersteggie is in stoomgesteriliseerde grond waarin 10 ml patogeen-sorghum mengsel gemeng is, geplant. Die potte wat gebruik is het 'n inhoudsmaat van ongeveer 1000 ml grond. Vier herhalings is per kultivar opgestel. 'n Gewortelde angeliersteggie wat in gesteriliseerde grond sonder die patogeen-sorghum mengsel geplant is, het as kontrole gedien. Potte is onwillekeurig op verskillende posisies in 'n kweekhuis geplaas. Die grondtemperatuur van die potte het tussen 20 °C en 30 °C en die grond pH tussen 6 en 7 gevarieer.

Analise van die grond is gedoen (tabel 5.1). Tabel 5.2 gee die standaard konsentrasies van die katione en anione nodig vir optimale groei van angelierplante. Dit is gebruik om die voedingsaanvullings vir die proewe te bepaal.

TABEL 5.1: Analise van grond wat gebruik is vir die eerste toetsing van elf antagonist.

KATIONE										ANIONE				
Makro-elemente (mmol l ⁻¹)					Spoorelemente (μmol l ⁻¹)					(mmol l ⁻¹)				
K	Ca	Mg	Na	NH ₄	B	Zn	Cu	Fe	Mn	NO ₃	P	SO ₄	HCO ₃	Cl
2,5	2,4	1,1	1,2	1,2	108	1,2	0,9	41	62	9,1	0,37	2,2	0,5	2,8

TABEL 5.2: Konsentrasies van katione en anione wat as maatstaf dien vir bepaling van voedingsaanvulling (Sonneveld, 1987).

KATIONE										ANIONE				
Makro-elemente (mmol l ⁻¹)					Spoorelemente (μmol l ⁻¹)					(mmol l ⁻¹)				
K	Ca	Mg	Na	NH ₄	B	Zn	Cu	Fe	Mn	NO ₃	P	SO ₄	HCO ₃	Cl
2,7	2,3	1,5	-	0,3	20	3,0	1,5	5,0	2,0	4,0	0,2	1,5	0,5	2,8

Plante is daaglik benat en het weeklik die volgende voedingsaanvulling gekry: 0,5 g KNO₃, 0,7 g Ca(NO₃)₂·4H₂O en 0,3 g Mg(NO₃)₂·6H₂O opgelos in 1 liter water (Sonneveld, 1987).

Plante is twee keer per week op 'n skaal van 0-5 geëvalueer. 0 = geen simptome, 1 = effense verwelking, nie noodwendig verwelksiekte nie, 2 = beperkte simptome, verwelking van blare aan die een kant van die stingel en die groeipunt wat afbuig, 3 = goed ontwikkelde simptome in minder as die helfte van die plant, 4 = meer as die helfte van die plant verwelk en 5 = die hele plant verwelk.

5.1.2.2. Toets vir antagonisme: Twee gewortelde angeliersteggies is in stoomgesteriliseerde grond waarin 10 ml van die patogeen-sorghum mengsel en 10 ml van die toetsorganisme-sorghum mengsel of 10 ml bakteriële suspensie gemeng is, geplant. Die potte wat gebruik

is het 'n inhoudsmaat van ongeveer 1000 ml. Vir elke toetsorganisme is drie herhalings uitgevoer. Gewortelde angeliersteggies wat in stoomgesteriliseerde grond waar beide die patogeen en die toetsorganisme weggelaat is, en waar net die toetsorganisme weggelaat is, het as kontroles gedien.

Om vas te stel of angeliersteggies wat vir die proef gebruik is nie reeds deur ander patogene geïnfekteer is nie, is die oppervlaktes van vier angelierplantjies van elke kultivar gesteriliseer met 3,5 % natriumhipochloriet. Monsters van die stingels en wortels is op ADA $\frac{1}{2}$ met 250 mg l⁻¹ Penbritin en 250 mg l⁻¹ Chloromycetin en PCA geplaas. Die kulture is by 24 °C geïnkubeer.

Analise van die grond is gedoen (tabel 5.1). Plante is daaglik benat en het weekliks die volgende voedingsaanvulling gekry: 0,5 g KNO₃, 0,7 g Ca(NO₃)₂·4H₂O en 0,3 g Mg(NO₃)₂·6H₂O opgelos in 1 liter water (Sonneveld, 1987).

Plante is onwillekeurig in verskillende posisies in 'n kweekhuis geplaas waar die grondtemperatuur tussen 20 °C en 30 °C en die grond pH tussen 6 en 7 gevarieer het. Plante is twee keer per week op dieselfde skaal geëvalueer as plante in paragraaf 5.1.2.1.

5.1.3. Metode van verdere *in vivo* toetsing van veertien antagoniste.

Kultivar 4 (kv4) met 'n medium weerstandbiedendheid vir *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* is gebruik. Die volgende organismes is getoets: 7 isolate van *Trichoderma harzianum* (Th1 - Th7), *T. fasciculatum*, *F. proliferatum* (Fp3), *F. moniliforme*, 3 isolate van *Pseudomonas* sp. (P1 - P4) en *P. aeruginosa*.

Dieselfde metode soos beskryf in paragraaf 5.1.2.2. is vir die tweede toetsing gebruik. Die toets vir antagonisme het verskil van die eerste toetsing deurdat net een gewortelde angeliersteggie per pot geplant is en agt herhalings vir elke antagonis opgestel is. Gedurende die eerste toetsing is waargeneem dat in baie gevalle net een van die twee plantjies in 'n pot verwelksiekte-simptome vertoon het. Die verandering in die metode is aangebring om dit te verhoed. Analise van die grond is gedoen (tabel 5.3).

TABEL 5.3: Analise van grond wat gebruik is vir verdere *in vivo* toetsing van veertien antagonist.

KATIONE										ANIONE				
Makro-elemente (mmol l ⁻¹)					Spoorelemente (μmol l ⁻¹)					(mmol l ⁻¹)				
K	Ca	Mg	Na	NH ₄	B	Zn	Cu	Fe	Mn	NO ₃	P	SO ₄	HCO ₃	Cl
0,8	0,8	0,4	0,5	0,01	40	1,5	0,3	73	16	2,8	0,03	0,2	-	-

Plante het ’n eenmalige toediening van 0,1 g superfosfaat per pot gekry. Elke week is 0,1 g Ca(NO₃)₂ en elke alternatiewe dag 0,1 g KNO₃ op die oppervlakte van elke pot se groeimedium geplaas. Plante is elke tweede dag benat (Sonneveld, 1987).

Die potte is onwillekeurig op verskillende posisies in die kweekhuis geplaas, waar die grondtemperatuur gevarieer het van 10 °C tot 30 °C. Die pH van die grond het tussen 5 en 6 gevarieer.

5.2. Resultate van toets vir vatbaarheid van drie kultivars vir *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en die bepaling van die virulensie van die patogeen isolate.

Die resultate vir die toets word grafies in figuur 5.1 weergegee. Die persentasie siekte indeks word gestip teenoor die aantal dae. Die persentasie siekte indeks (%SI) word soos volg bereken:

$$\% SI = \frac{\Sigma \text{siektewaarde toegeken}}{\text{maksimum siektewaarde}} * 100.$$

Die som van die siektewaardes toegeken is die siektewaardes wat op ’n bepaalde dag aan die plante toegeken is. Die persentasie siekte indeks gee ’n aanduiding van hoe siek die plant op ’n spesifieke dag is. Hoe hoër %SI hoe sieker is die plant. As al die plante heeltemal verwelk is, is %SI = 100%. Al die resultate is onderwerp aan ’n t-toets om die betekenisvolheid van verskille in vatbaarheid van kultivars vir die patogeen te bepaal. Die betekenisvolheidspeil is $p < 0,05$. Indien daar betekenisvolle verskille is word dit met ’n

asterisk op die grafiek aangedui.

Na 103 dae is gevind dat: Vir isolaat 1 van die *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* toon kv1 'n siekte indeks van 60%, kv2 : 55% en kv3 : 10% (fig. 5.1(a)). Vir isolaat 2 van die patogeen toon kv1 'n siekte indeks van 65%, kv2 : 70 % en kv3 : 60% (fig. 5.1(b)). Vir isolaat 3 van die patogeen toon kv1 'n siekte indeks van 10%, kv2 : 10% en kv3 : 15% (fig. 5.1(c)). Na 103 dae was kv1 die meeste vatbaar vir isolaat 1 van die patogeen en kv3 die minste vatbaar. Daar is geen betekenisvolle verskil tussen die vatbaarheid van die kultivars vir isolaat 2 en 3 van die patogeen nie. Dit blyk ook dat isolaat 2 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* die mees virulente isolaat van die drie patogeen isolate was en isolaat 3 die minste.

5.3. Resultate van eerste *in vivo* toetsing van elf antagoniste.

Die eerste *in vivo* toets vir antagonisme het plaasgevind voordat al die isolate *in vitro* getoets is, wat meegebring het dat sommige van die isolate twee keer getoets is en ander net gedurende die tweede toetsing getoets is.

Die resultate van die eerste *in vivo* toetsing word grafies in figure 5.2 - 5.13 weergegee. Die %SI van 'n kultivar word gestip teenoor die aantal dae. Al die resultate is onderwerp aan 'n t-toets om betekenisvolheid van verskille in die %SI te bepaal. Die betekenisvolheidspeil is $p < 0,05$. Indien die %SI van 'n kultivar betekenisvol van die kontrole verskil word dit met 'n asterisk op die grafiek aangedui.

Figuur 5.2 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin geen antagonis gemeng is nie en wat as kontroles gedien het.

Figuur 5.3 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Aspergillus* sp. in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 het *Aspergillus* sp. nie isolate 1, 2 en 3 van die patogeen geïnhibeer nie. By kultivar 2 is net isolaat 1 van die patogeen betekenisvol deur *Aspergillus* sp. geïnhibeer terwyl isolaat 2 en 3 nie geïnhibeer is nie. By kultivar 3 is isolate 1, 2 en 3 betekenisvol deur *Aspergillus* sp. geïnhibeer.

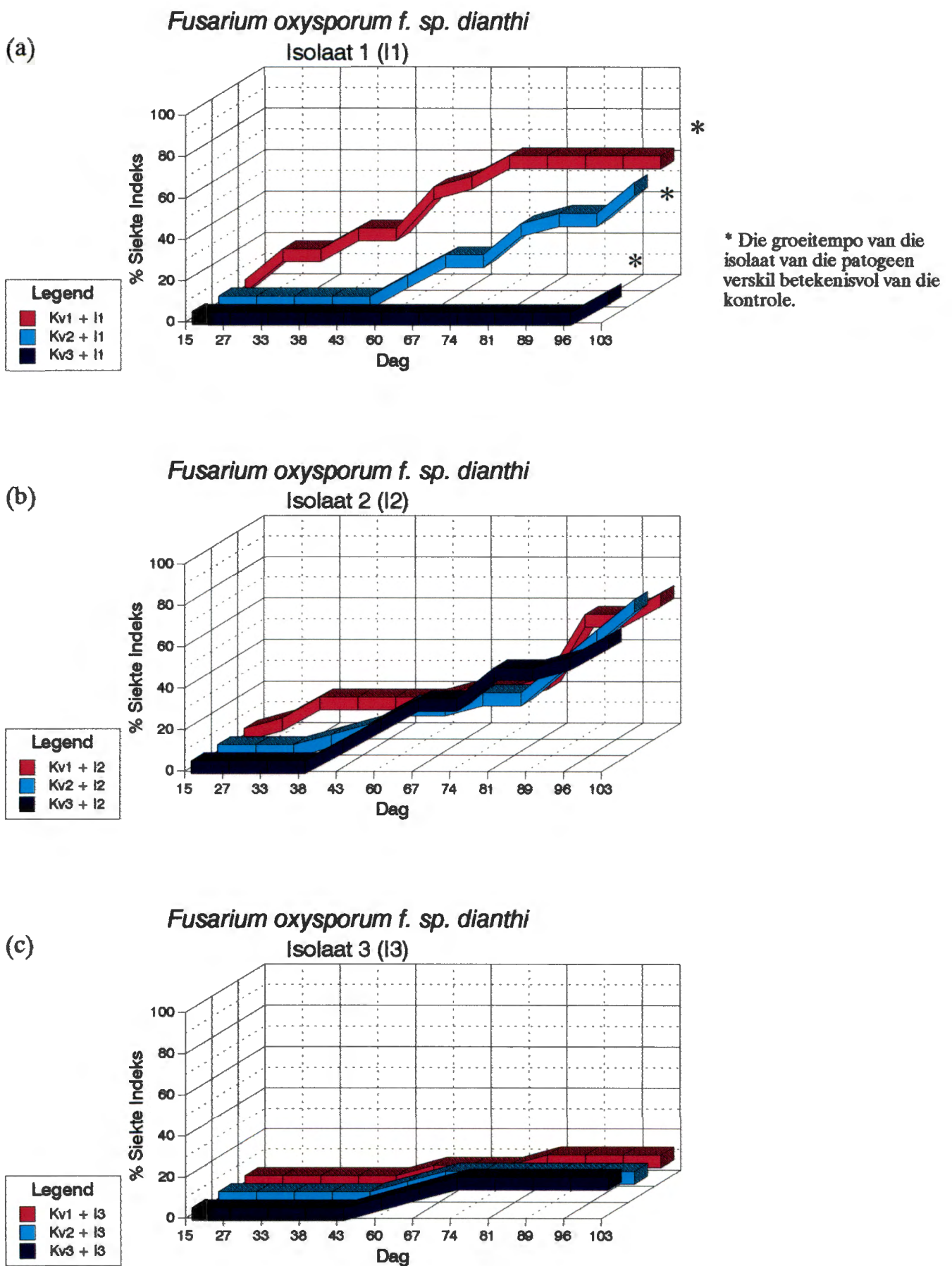


Fig. 5.1 (a-c): Die vatbaarheid van angelier kultivars (kv1, kv2 en kv3) vir isolate I1, I2 en I3 van *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* uitgedruk as persentasie siekte indeks.

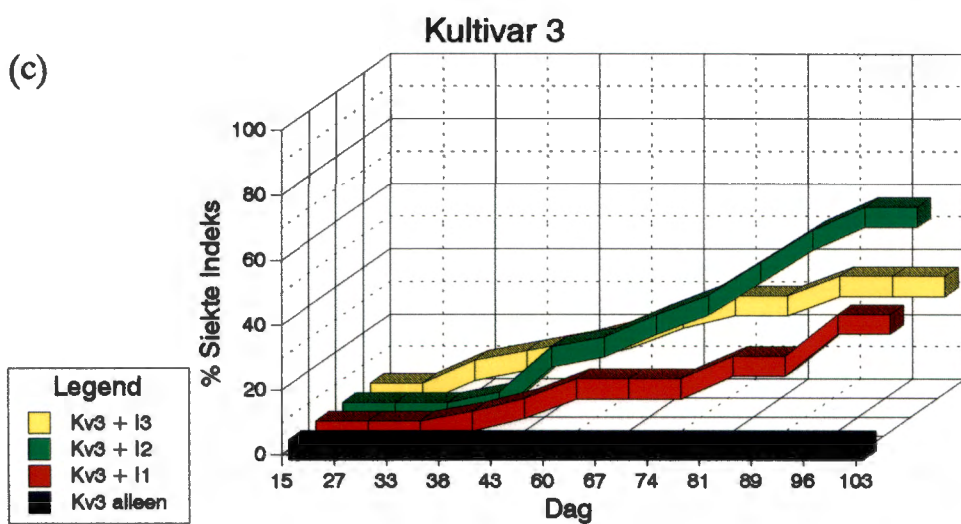
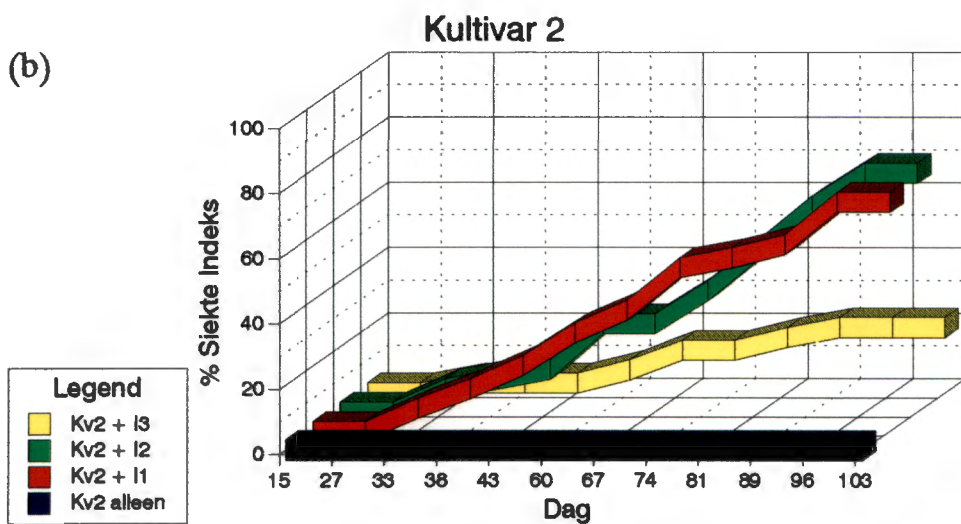
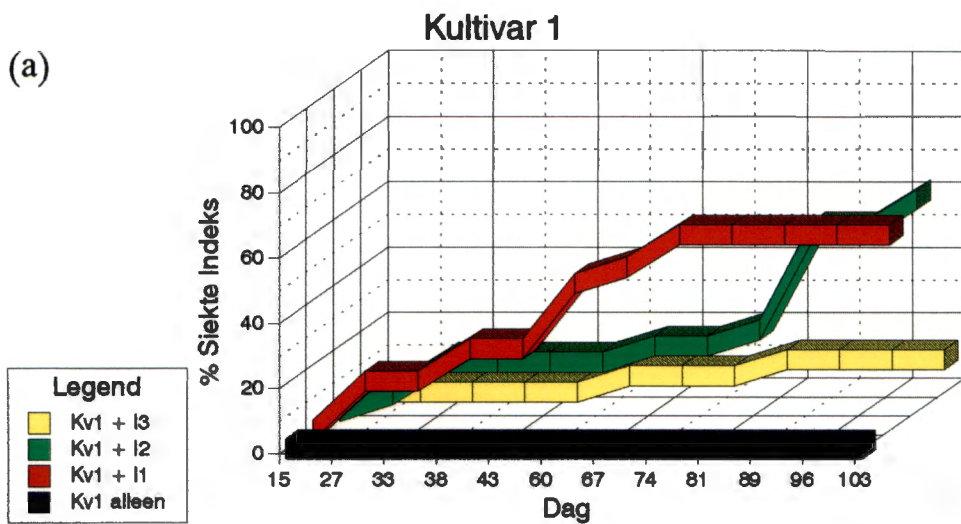
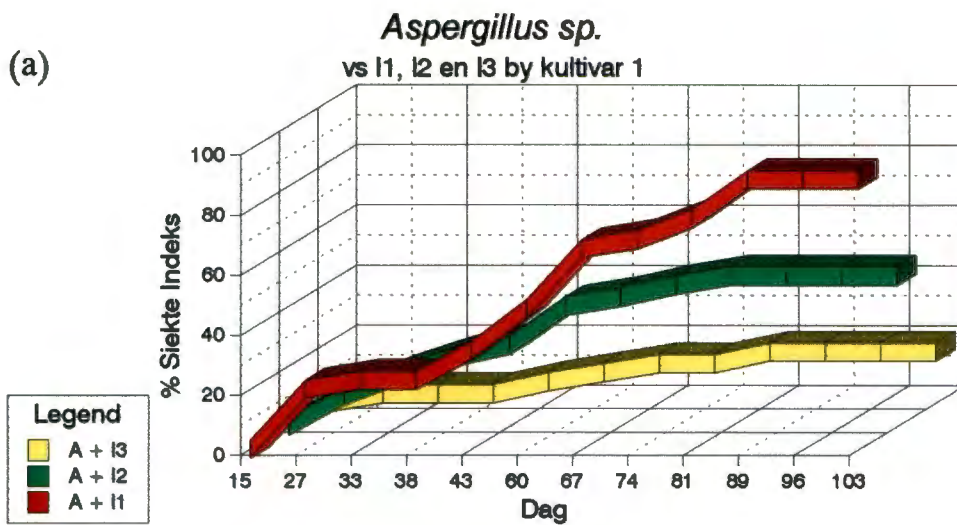


Fig. 5.2 (a-c): % Siekte indeks van angelier kultivars kv1, kv2 en kv3 geplant in grond geïnfesteerd deur *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* oor 'n periode van 103 dae.



* Die % siekte indeks van die isolaat van die patogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

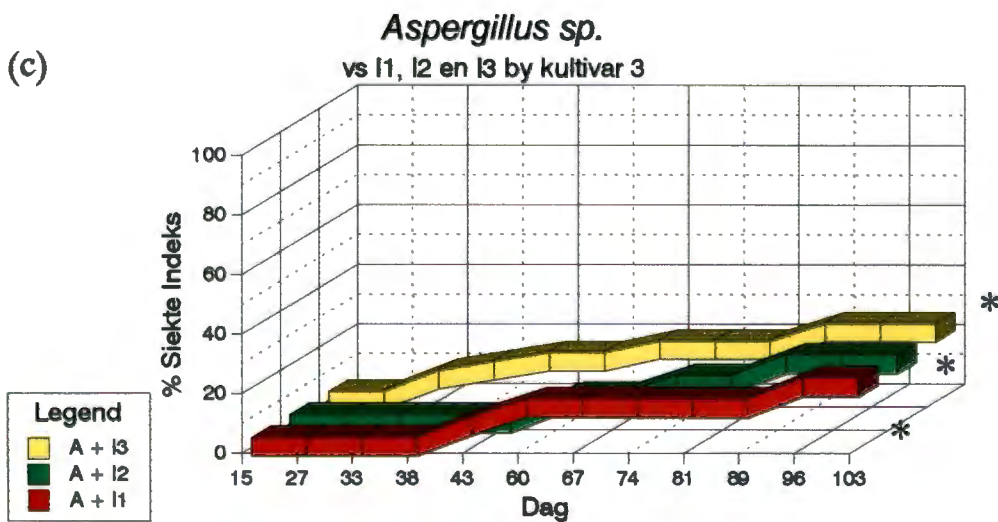
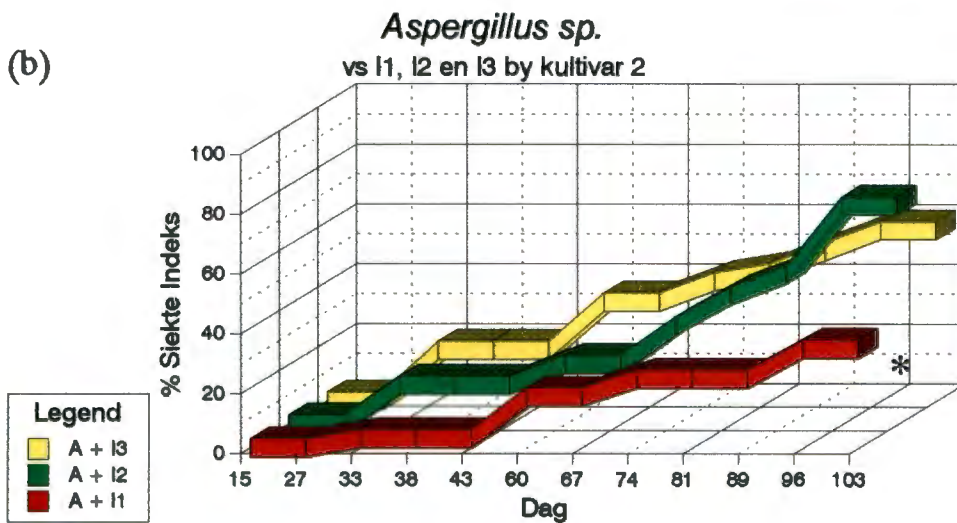


Fig. 5.3 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Aspergillus sp.* (A) gemeng is.

Figuur 5.4 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Trichoderma harzianum* 2 in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is isolate 1 en 2 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer terwyl isolaat 3 van die patogeen nie geïnhibeer is nie. By kultivar 2 is isolate 1, 2 en 3 van die patogeen betekenisvol deur *T. harzianum* 2 geïnhibeer. By kultivar 3 is net isolaat 1 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer.

Figuur 5.5 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Trichoderma harzianum* 3 in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is net isolaat 1 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer. By kultivar 2 is isolate 1 en 2 van die patogeen betekenisvol deur *T. harzianum* 3 geïnhibeer. Isolaat 3 is nie geïnhibeer nie. By kultivar 3 is isolate 1 en 2 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer.

Figuur 5.6 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Trichoderma harzianum* 4 in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is net isolaat 1 betekenisvol geïnhibeer. By kultivar 2 is net isolaat 1 van die patogeen betekenisvol deur *T. harzianum* 4 geïnhibeer. Daar is geen betekenisvolle verskil tussen isolaat 2 van die patogeen en die kontrole nie en isolaat 3 is nie geïnhibeer nie. By kultivar 3 is net isolaat 3 betekenisvol geïnhibeer.

Figuur 5.7 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Trichoderma fasciculatum* in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is isolate 1 en 2 betekenisvol geïnhibeer, terwyl isolaat 3 van die patogeen nie geïnhibeer is nie. By kultivar 2 is isolate 1 en 2 van die patogeen betekenisvol deur *T. fasciculatum* geïnhibeer. By kultivar 3 is isolate 1 en 3 betekenisvol geïnhibeer, terwyl isolaat 2 van die patogeen nie geïnhibeer is nie.

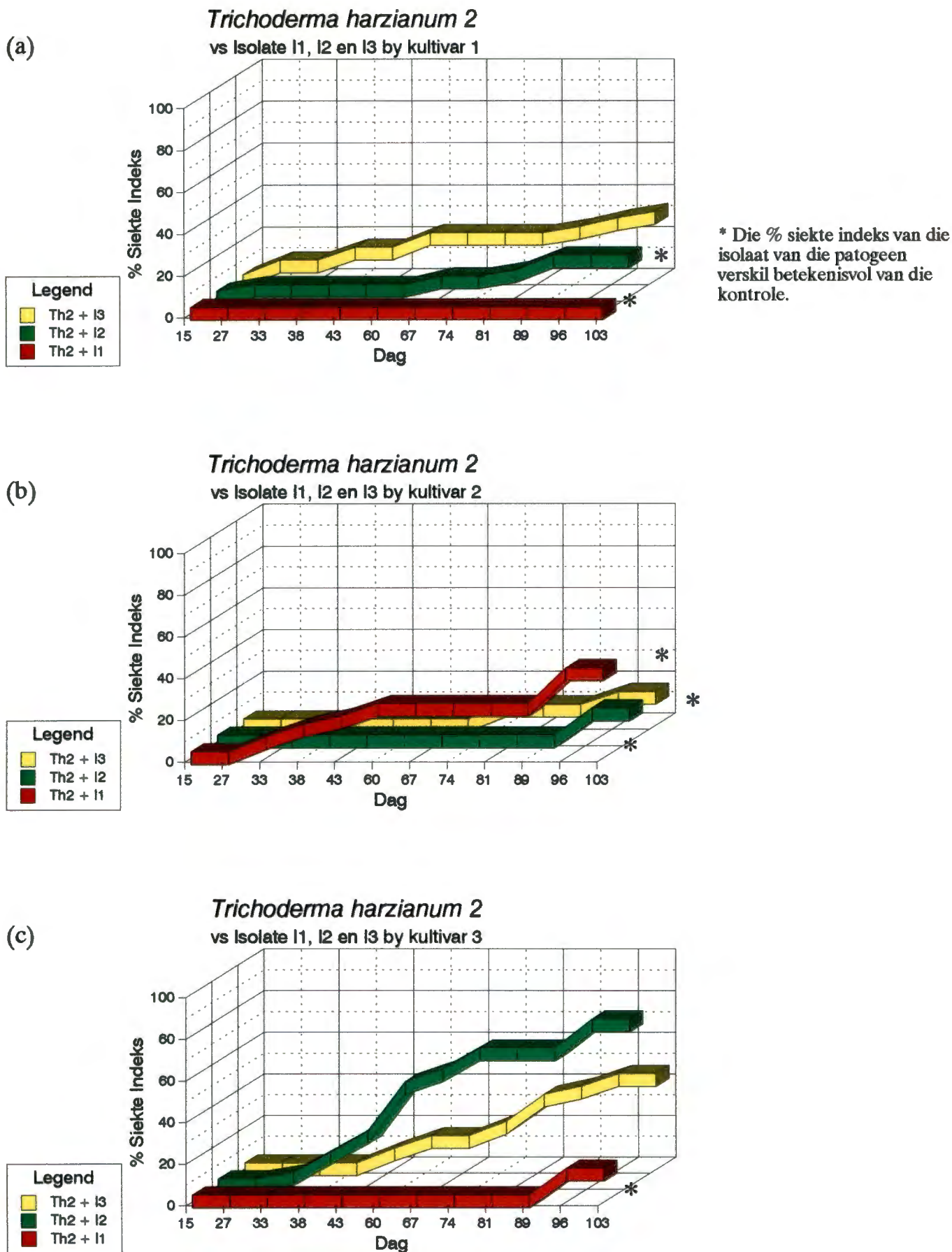


Fig. 5.4 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Trichoderma harzianum* isolaat 2 (Th2) gemeng is.

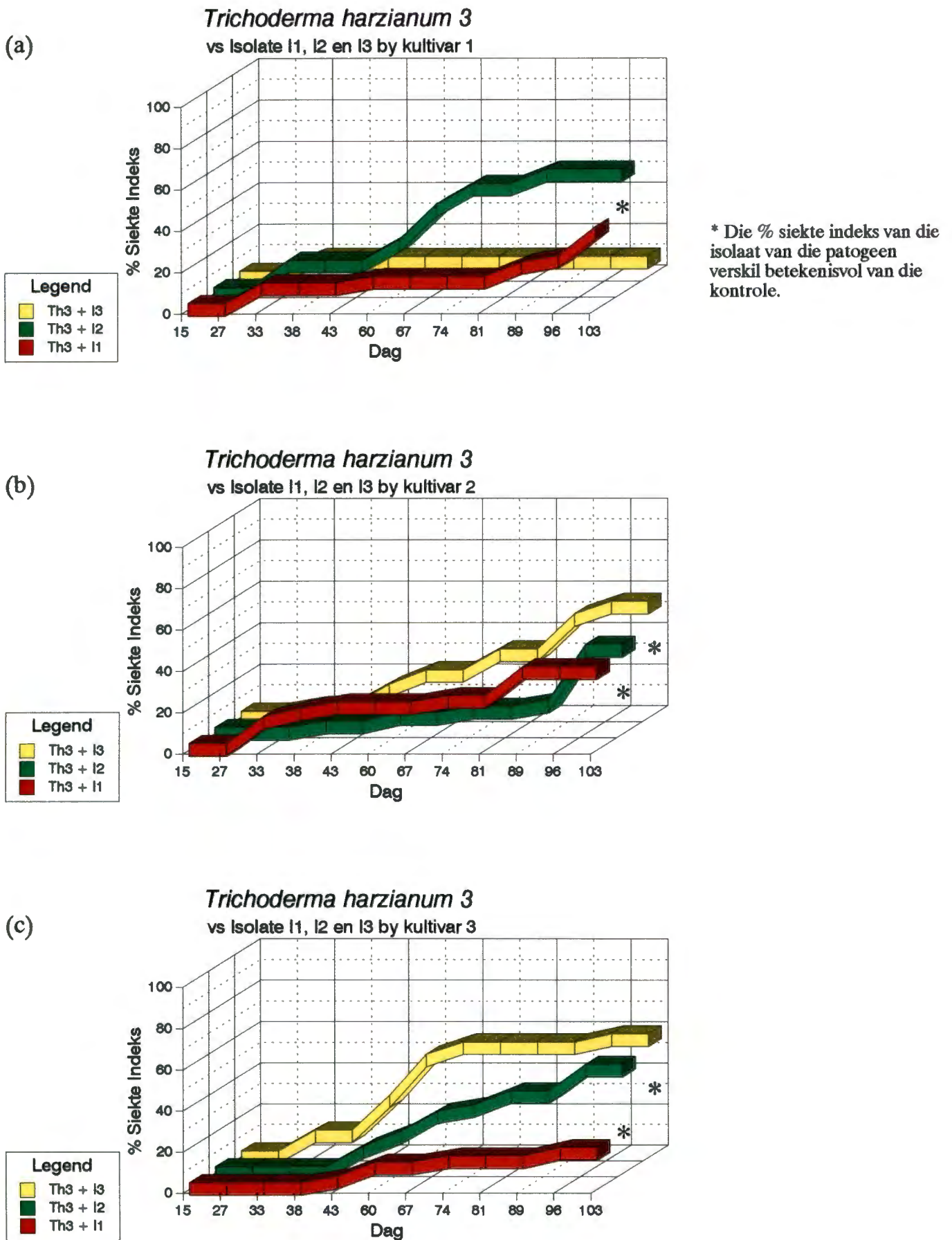


Fig. 5.5 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Trichoderma harzianum* isolaat 3 (Th3) gemeng is.

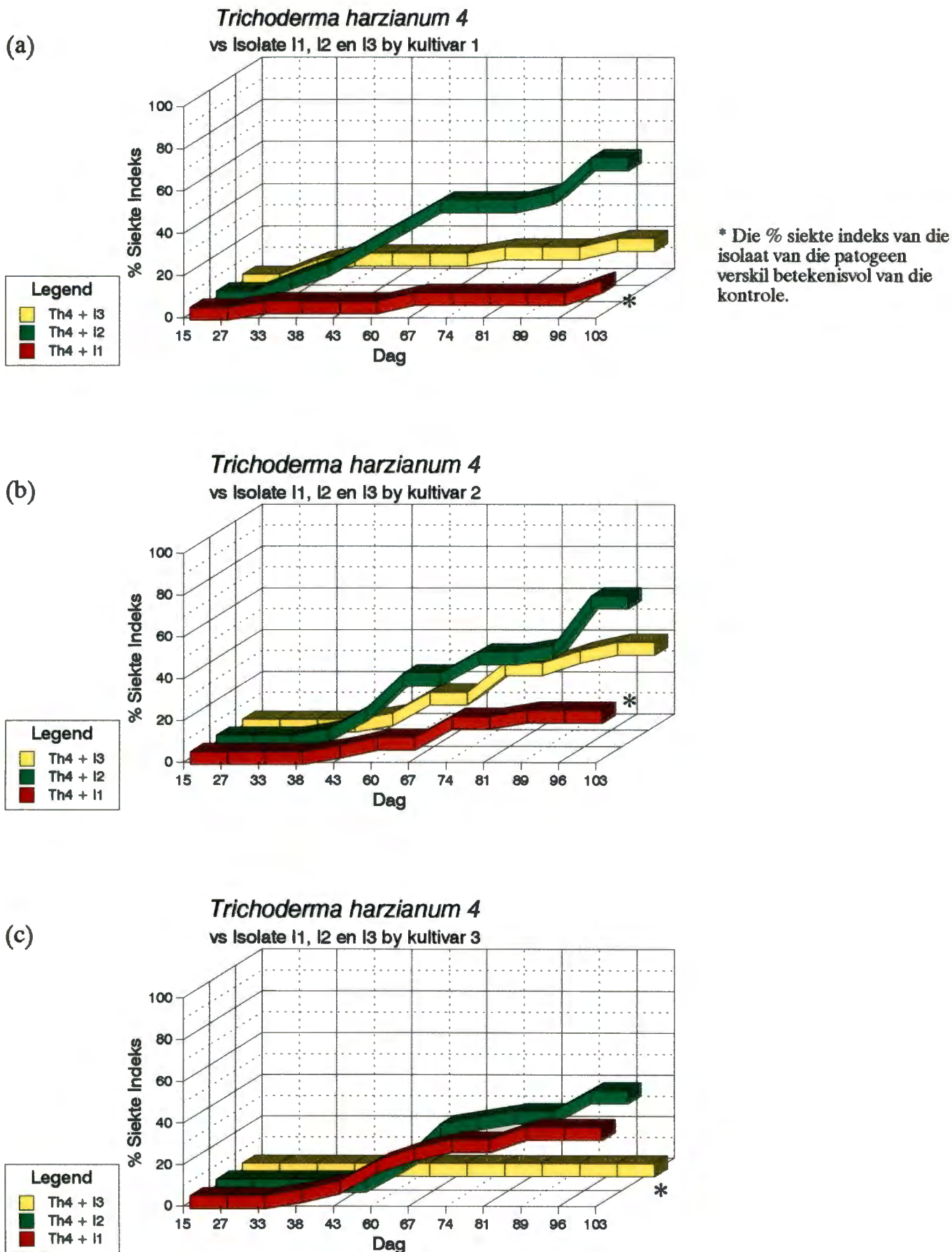


Fig. 5.6 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Trichoderma harzianum* isolaat 4 (Th4) gemeng is.

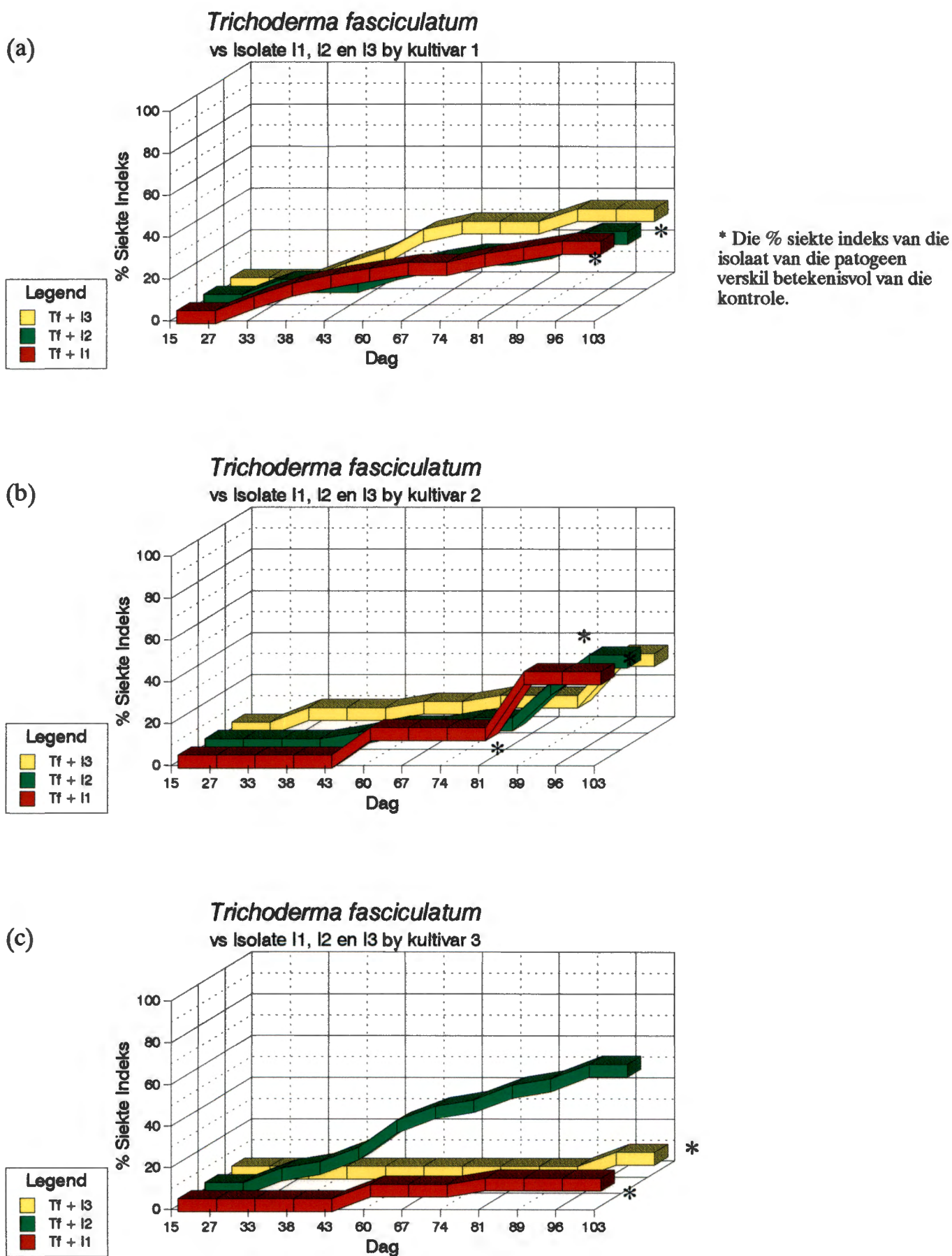


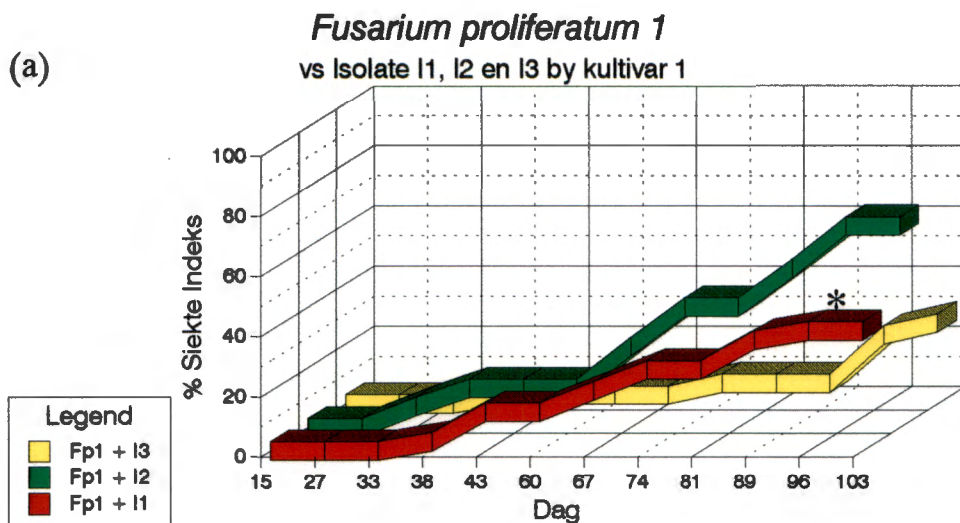
Fig. 5.7 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Trichoderma fasciculatum* (Tf) gemeng is.

Figuur 5.8 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium proliferatum* 1 in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is net isolaat 1 van die patogeen deur *F. proliferatum* 1 geïnhibeer. By kultivar 2 is net isolaat 1 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer. Isolaat 2 van die patogeen verskil nie betekenisvol van die kontrole nie en isolaat 3 van die patogeen is nie geïnhibeer nie. By kultivar 3 is net isolaat 2 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer. Isolaat 1 van die patogeen is nie geïnhibeer nie en isolaat 3 van die patogeen verskil nie betekenisvol van die kontrole nie.

Figuur 5.9 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium proliferatum* 2 in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is net isolaat 1 van die patogeen deur *F. proliferatum* 2 geïnhibeer. Isolate 2 en 3 is nie geïnhibeer nie. Isolate 1, 2 en 3 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* is nie by kultivar 2 of 3 geïnhibeer nie.

Figuur 5.10 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium proliferatum* 3 in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivars 1 en 2 is net isolate 1 en 2 van die patogeen deur *F. proliferatum* 3 geïnhibeer. Isolaat 3 van die patogeen is in albei gevalle nie geïnhibeer nie. By kultivar 3 is net isolaat 2 betekenisvol geïnhibeer. Isolate 1 en 3 van die patogeen is nie geïnhibeer nie.

Figuur 5.11 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Pseudomonas* sp. 2 in verskillende potte met isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is isolate 1 en 2 van die patogeen deur *Pseudomonas* sp. 2 geïnhibeer. Isolaat 3 van die patogeen is nie geïnhibeer nie. By kultivar 2 is isolaat 1 van die patogeen geïnhibeer. Isolaat 2 van die patogeen en kontrole verskil nie betekenisvol nie en isolaat 3 van die patogeen is nie geïnhibeer nie. By kultivar 3 is isolate 1, 2 en 3 betekenisvol geïnhibeer.



* Die % siekte indeks van die isolaat van die patogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

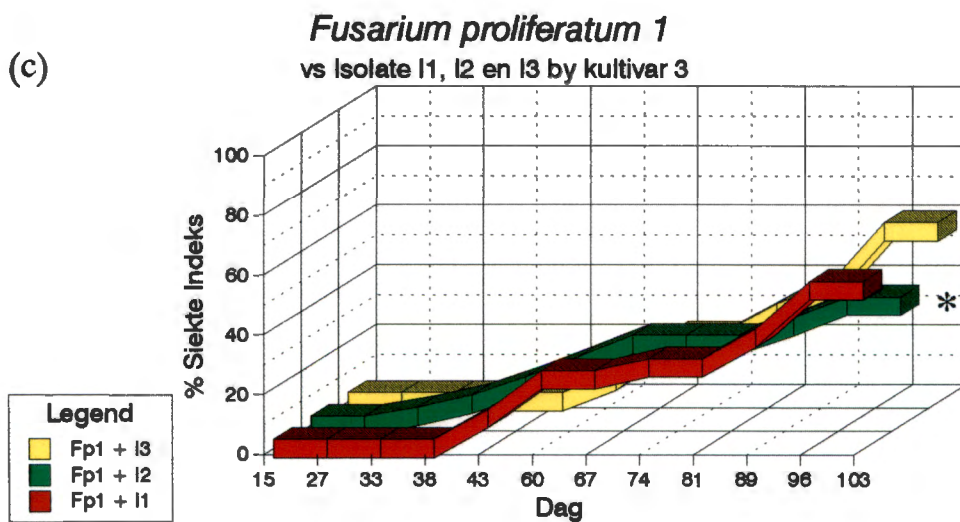
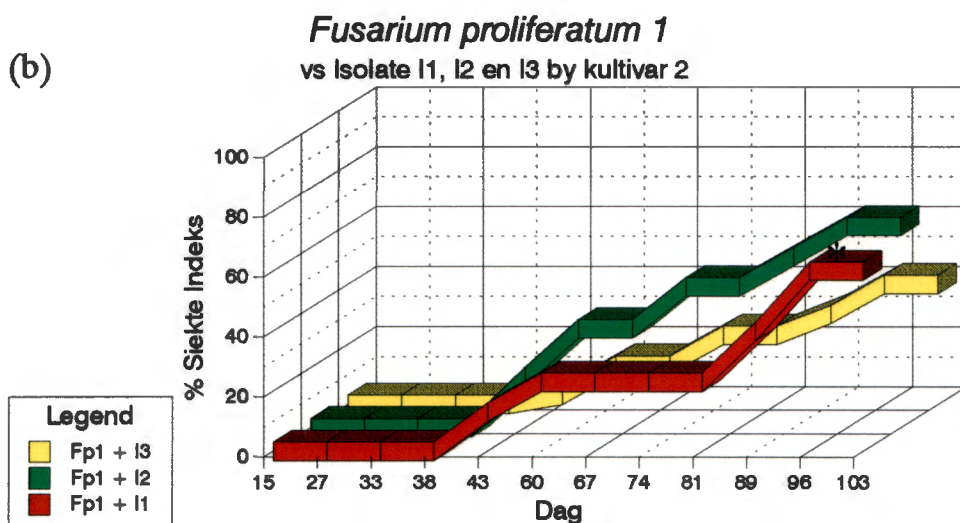
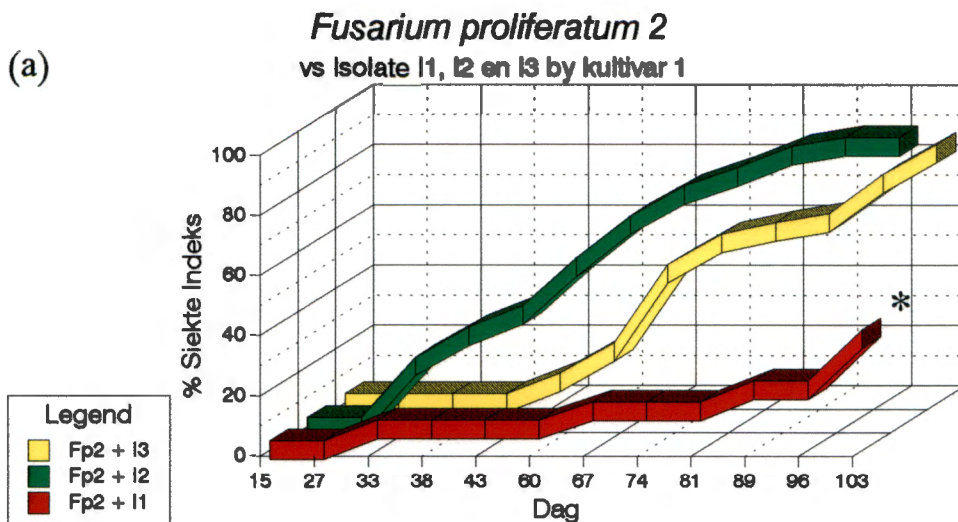


Fig. 5.8 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *F. proliferatum* 1 (Fp1) gemeng is.



* Die % siekte indeks van die isolaat van die patogeen verskil betekenisvol van die kontrole.

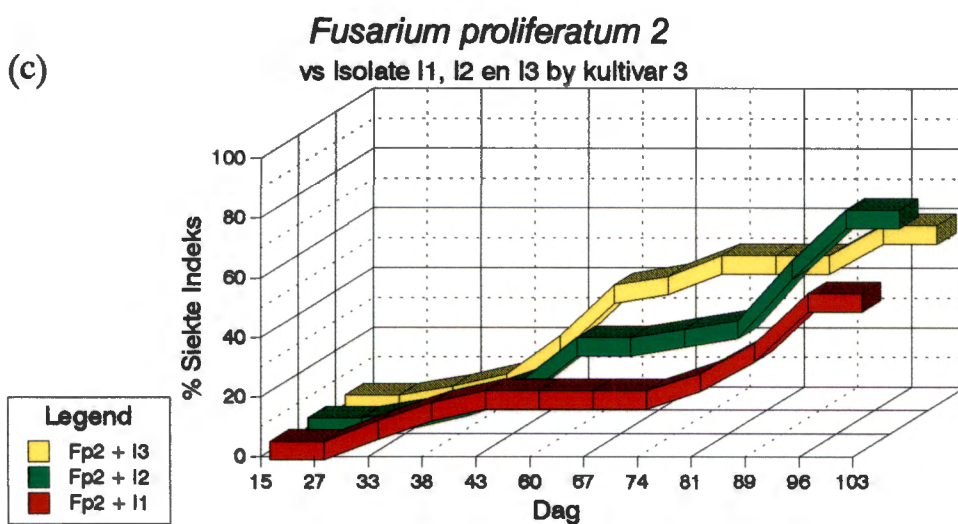
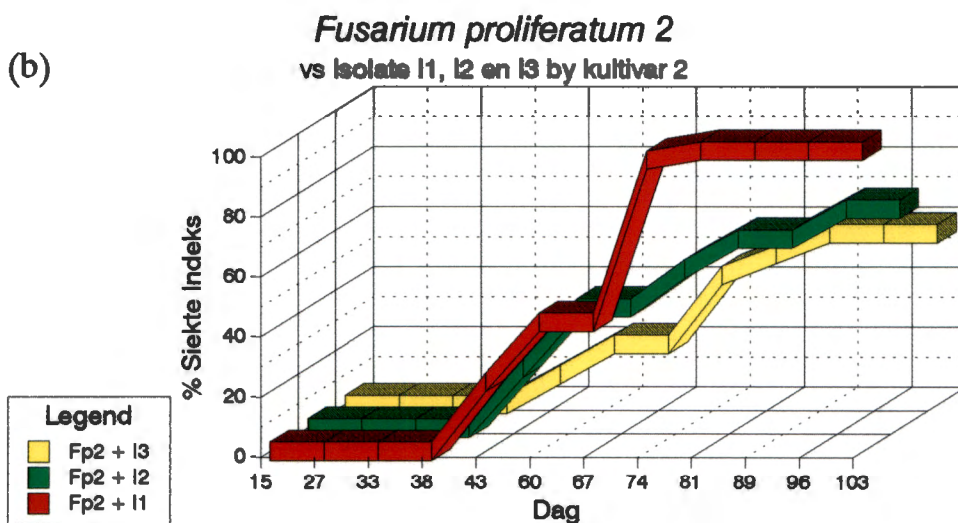


Fig. 5.9 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *F. proliferatum* 2 (Fp2) gemeng is.

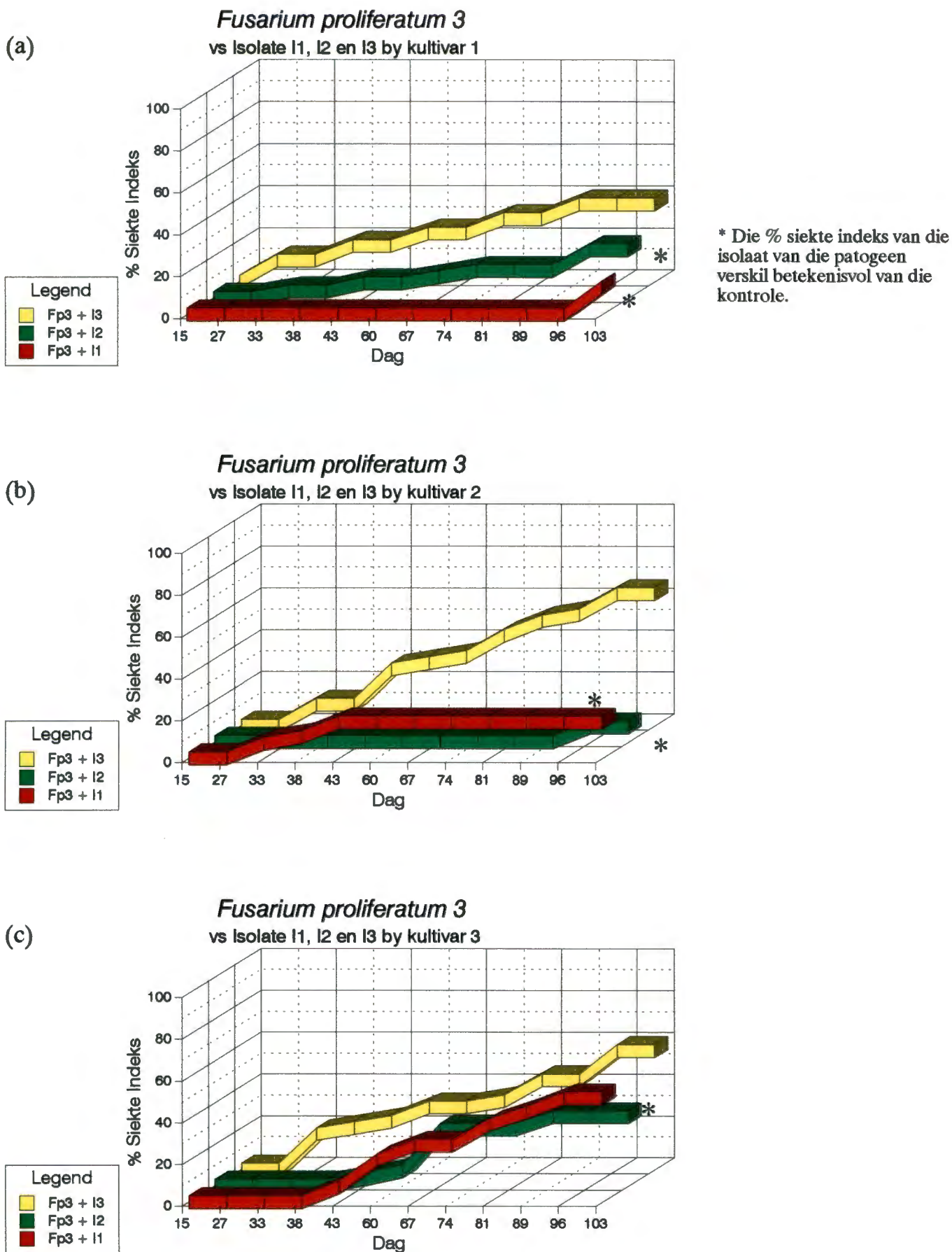


Fig. 5.10 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *F. proliferatum* 3 (Fp3) gemeng is.

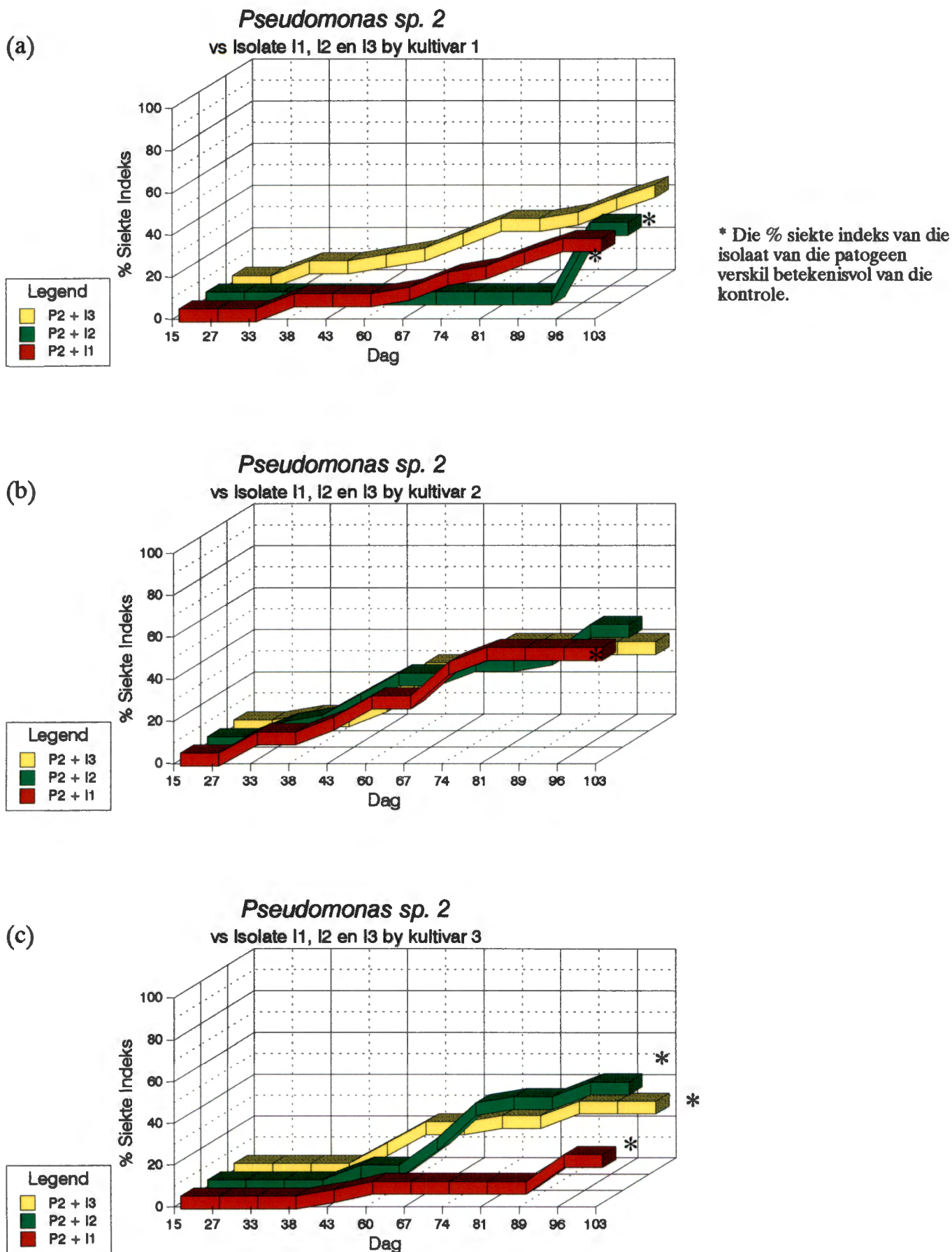


Fig. 5.11 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Pseudomonas sp. 2* (P2) gemeng is.

Figuur 5.12 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Pseudomonas* sp. 3 in verskillende potte met isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is net isolaat 1 van die patogeen betekenisvol deur *Pseudomonas* sp. 3 geïnhibeer. By kultivar 2 is nie een van die isolate van die patogeen geïnhibeer nie. By kultivar 3 is net isolaat 3 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer.

Figuur 5.13 (a - c) gee die %SI van kv1, kv2 en kv3 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Pseudomonas* sp. 4 in verskillende potte met isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. By kultivar 1 is nie een van die isolate van die patogeen geïnhibeer nie. By kultivar 2 is net isolaat 1 van die patogeen betekenisvol geïnhibeer. Isolate 2 en 3 van die patogeen is nie geïnhibeer nie. By kultivar 3 is net isolaat 2 van die patogeen betekenisvol deur *Pseudomonas* sp. 4 geïnhibeer. Isolaat 1 van die patogeen verskil nie betekenisvol van die kontrole nie en isolaat 3 van die patogeen is nie geïnhibeer nie.

5.4. Resultate van verdere *in vivo* toetsing van veertien antagoniste.

Die resultate van die tweede *in vivo* toetsing word grafies in figure 5.14 - 5.18 weergegee. Die %SI van 'n kultivar word gestip teenoor die aantal dae. Al die resultate is onderwerp aan 'n t-toets om betekenisvolheid van verskille in die %SI te bepaal. Die betekenisvolheidspeil is $p < 0,05$. Indien die %SI van 'n kultivar betekenisvol van die kontrole verskil word dit met 'n asterisk op die grafiek aangedui.

Figuur 5.14 (a) gee die %SI van angelierplante, kultivar 4 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is en wat as kontrole gedien het.

Figuur 5.14 (b) en (c), figuur 5.15 (a) - (c) en figuur 5.16 (a) en (b) gee die %SI van kv4 wat in gesteriliseerde grond geplant is waarin onderskeidelik isolate 1 - 7 van *Trichoderma harzianum* in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. Nie een van die isolate van die patogeen verskil betekenisvol van die kontroles nie. *T. harzianum* inhibeer dus nie een van die isolate van die patogeen nie.

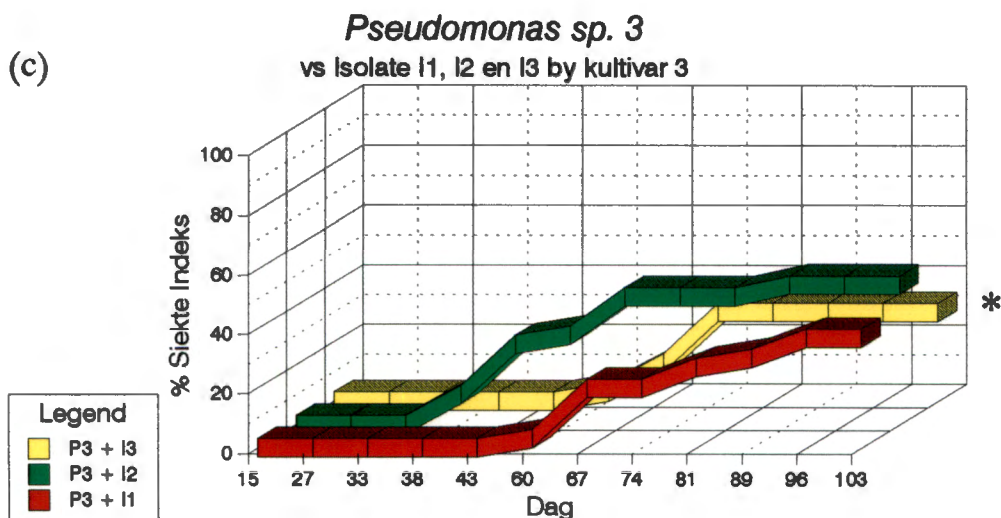
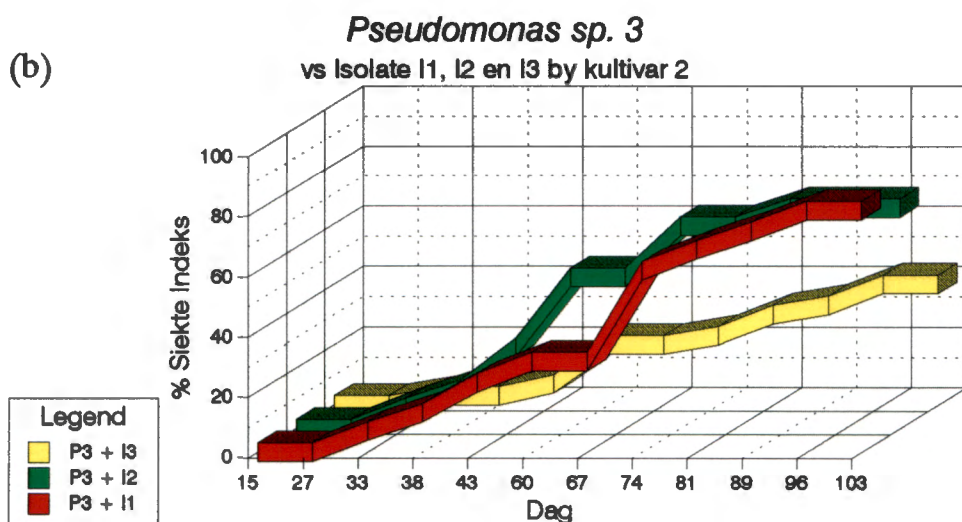
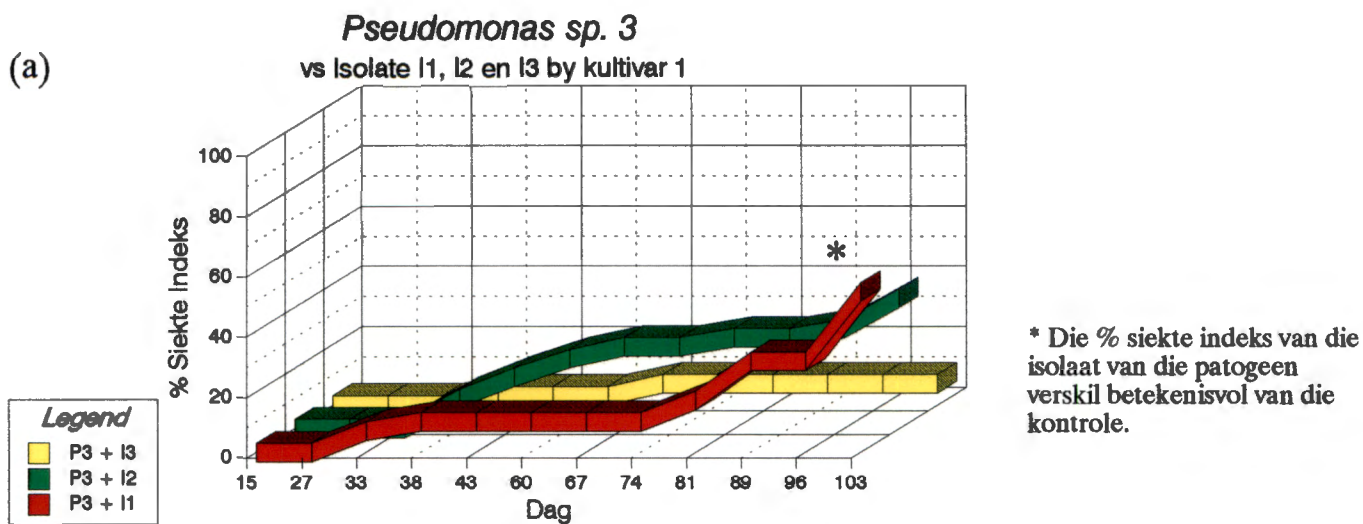
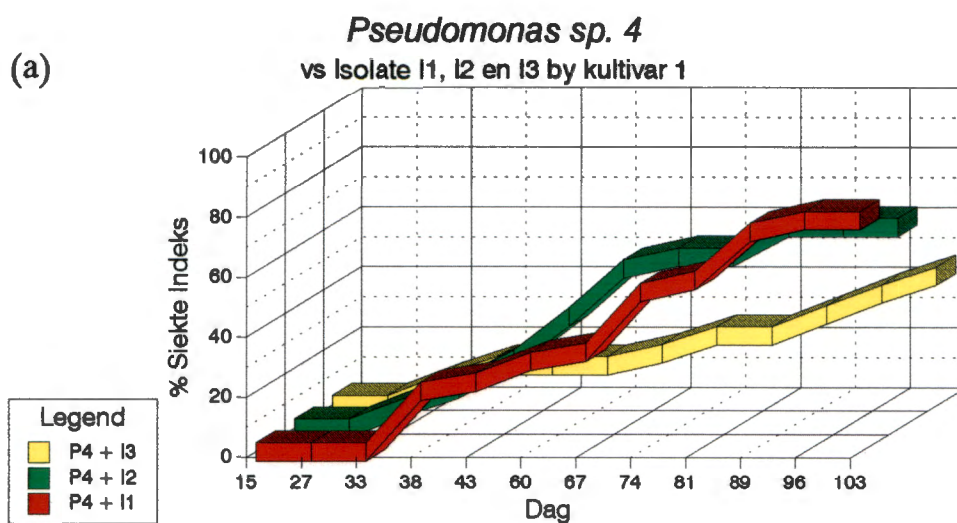


Fig. 5.12 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Pseudomonas sp. 3* (P3) gemeng is.



* Die % siekte indeks van die isolaat van die patoogen verskil betekenisvol van die kontrole.

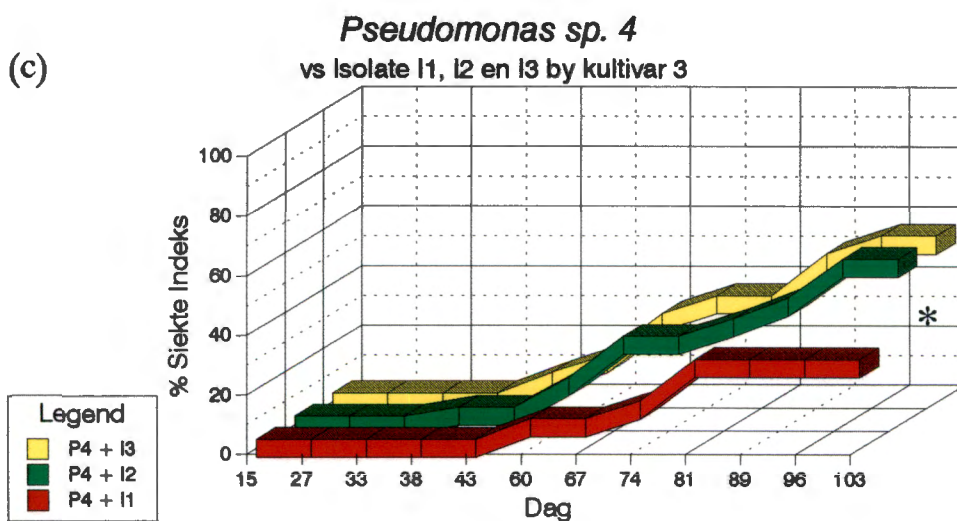
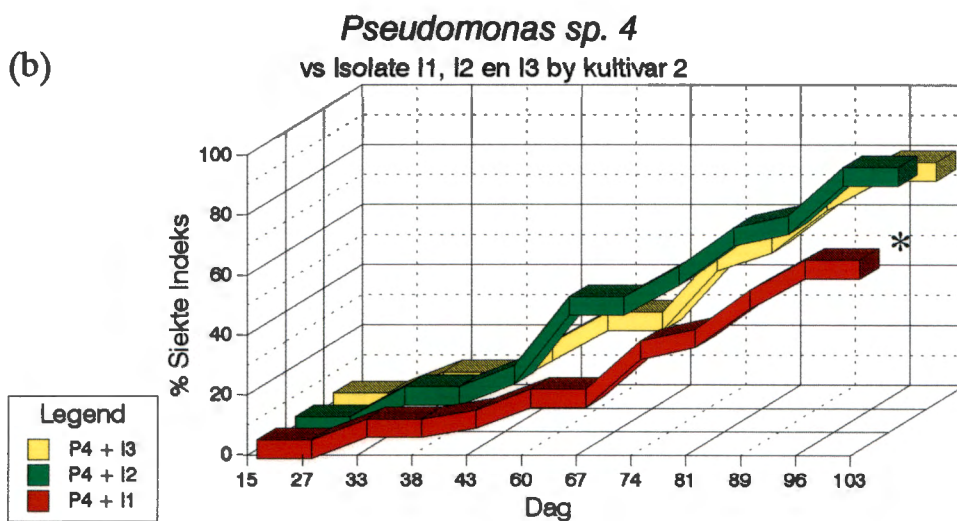


Fig. 5.13 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante kultivars 1, 2 en 3 geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Pseudomonas sp. 4* (P4) gemeng is.

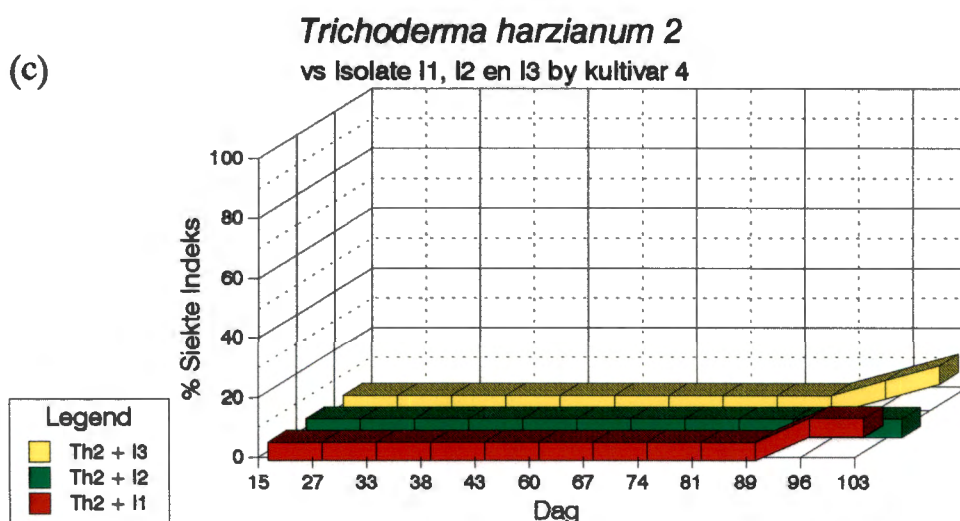
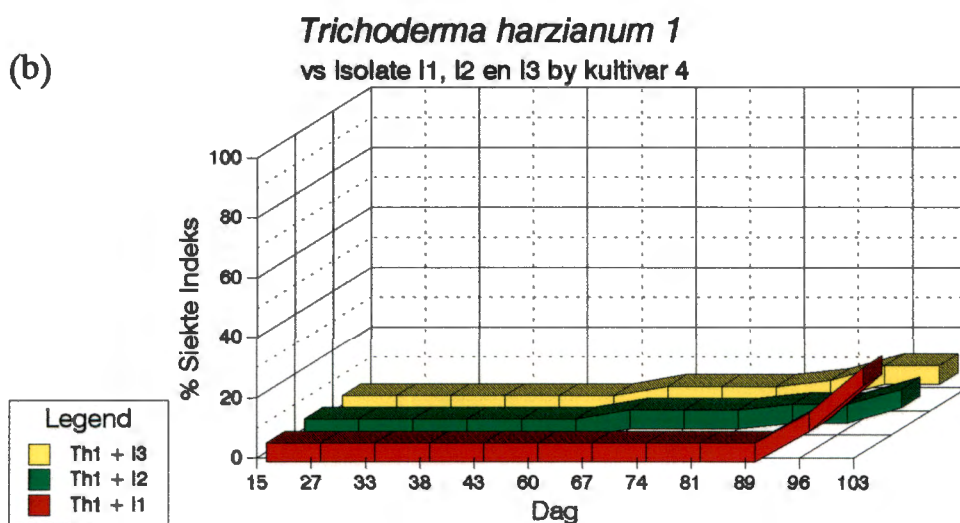
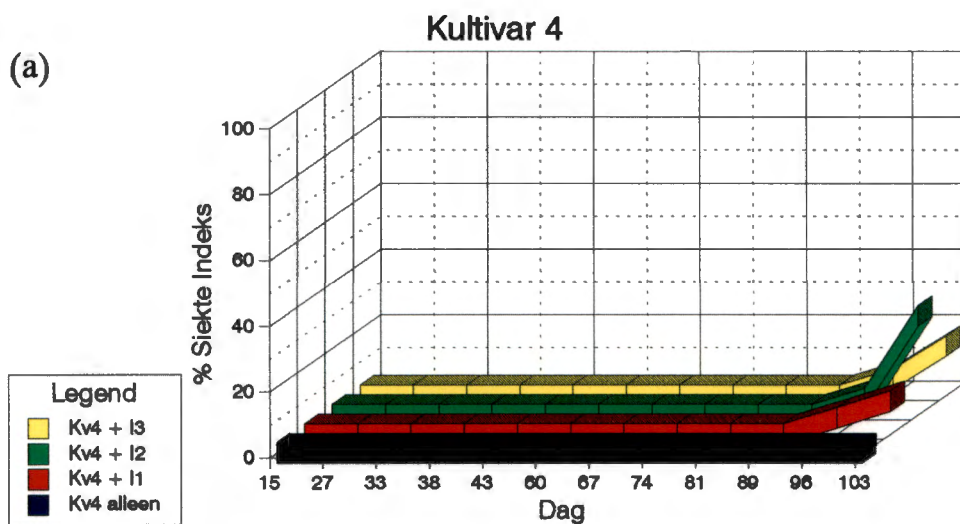


Fig. 5.14 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante geplant in gesteriliseerde grond geïnfesteerd deur *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 alleen (a) of gemeng met *Trichoderma harzianum* isolaat 1 (Th1) (b) of isolaat 2 (Th2) (c).

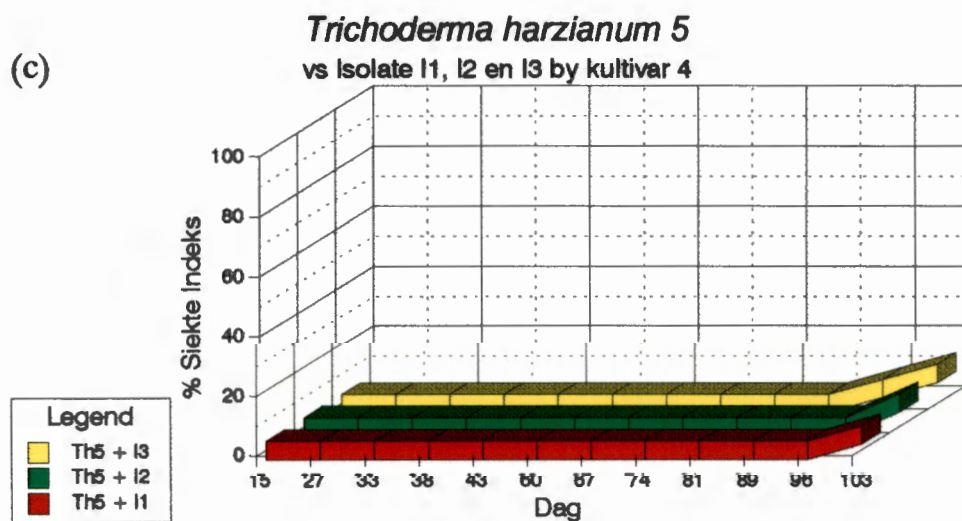
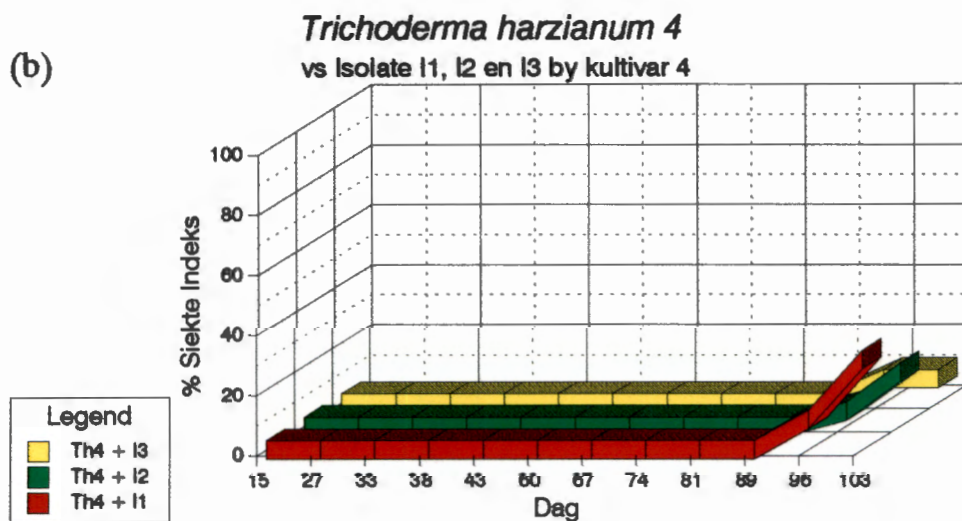
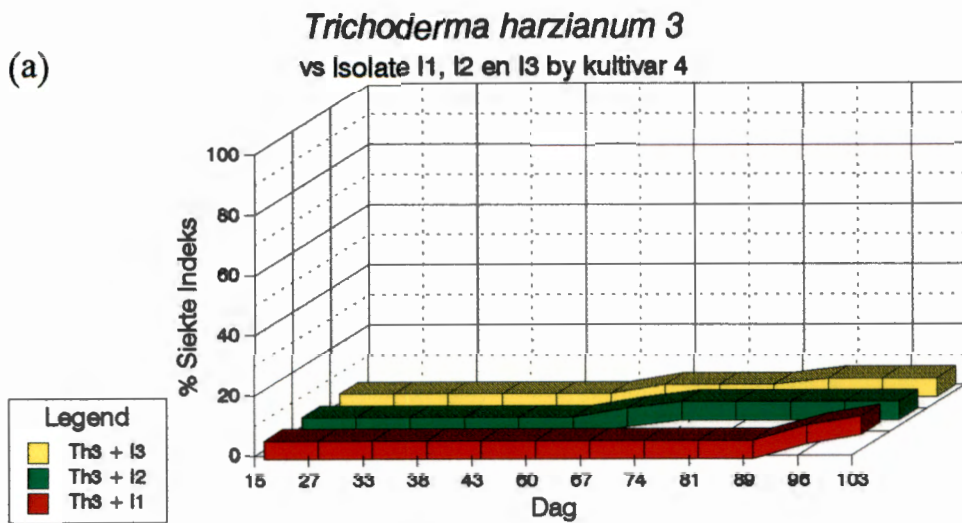


Fig. 5.15 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Trichoderma harzianum* isolaat 3 (Th3) (a) of isolaat 4 (Th4) (b) of isolaat 5 (Th5) (c) gemeng is.

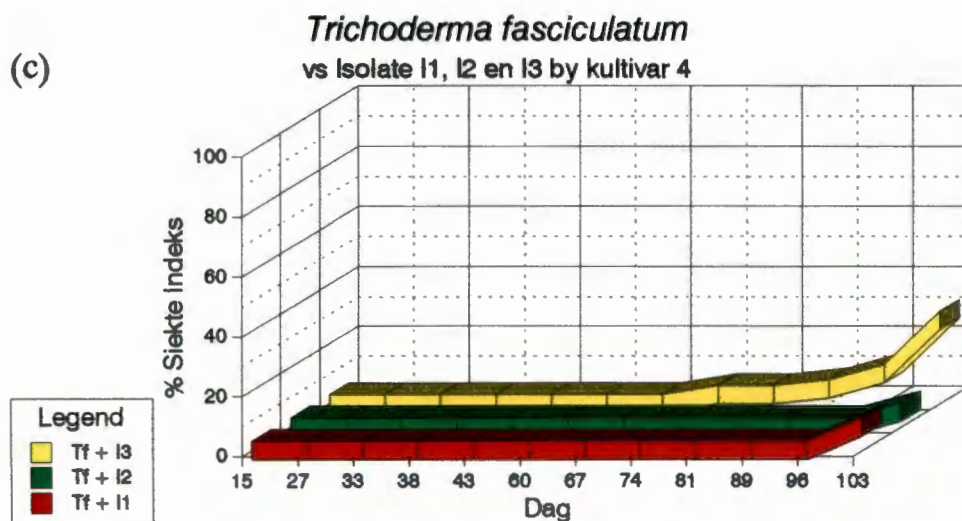
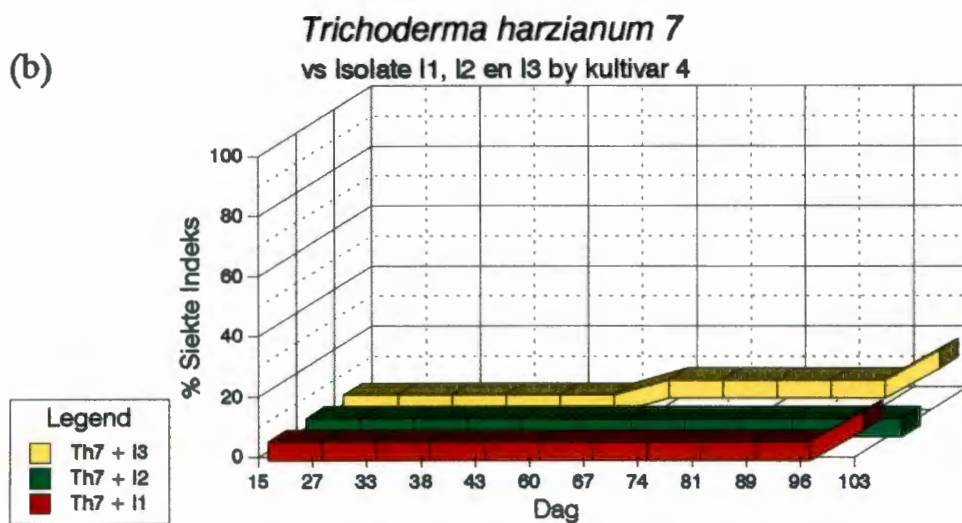
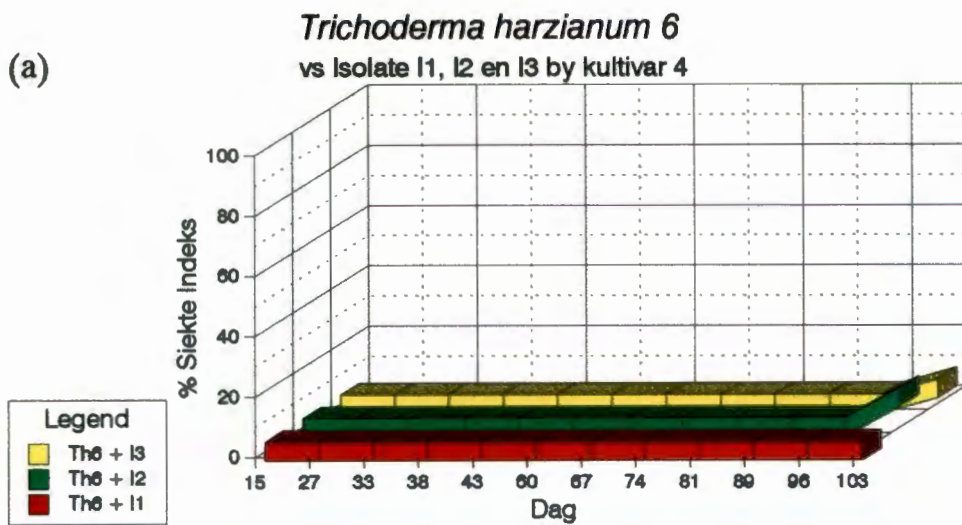


Fig. 5.16 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Trichoderma harzianum* isolaat 6 (Th6) (a) of isolaat 7 (Th7) (b) of *T. fasciculatum* (Tf) (c) gemeng is.

Figuur 5.16 (c) en figuur 5.17 (a) en (b) gee die %SI van kv4 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin onderskeidelik *Trichoderma fasciculatum*, *Fusarium proliferatum* 3 en *F. moniliforme* in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. Nie een van die isolate verskil betekenisvol van die kontroles nie.

Figuur 5.17 (c) en figuur 5.18 (a) en (b) gee die %SI van kv4 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Pseudomonas* in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. Nie een van die isolate verskil betekenisvol van die kontroles nie.

Figuur 5.18 (c) gee die %SI van kv4 wat geplant is in gesteriliseerde grond waarin *Pseudomonas aeruginosa* in verskillende potte met onderskeidelik isolate 1, 2 en 3 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* gemeng is. Nie een van die isolate verskil betekenisvol van die kontroles nie.

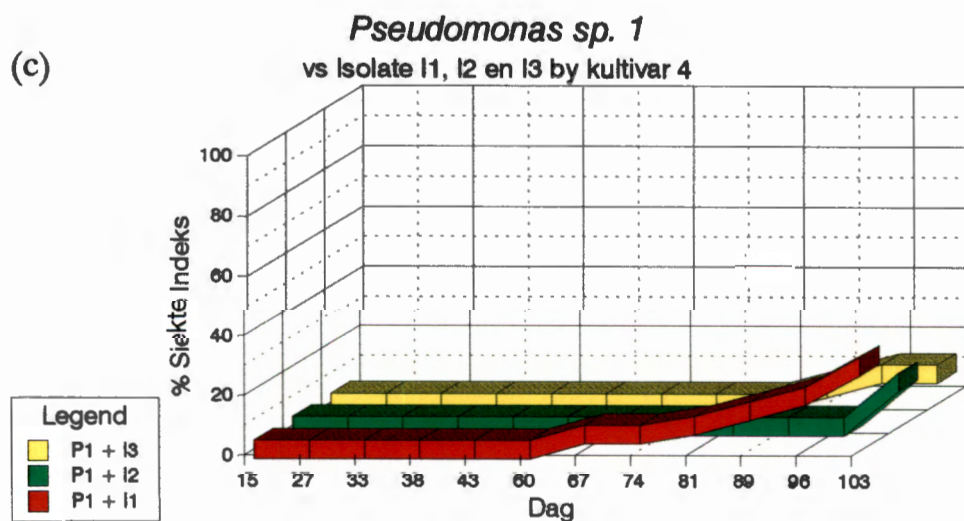
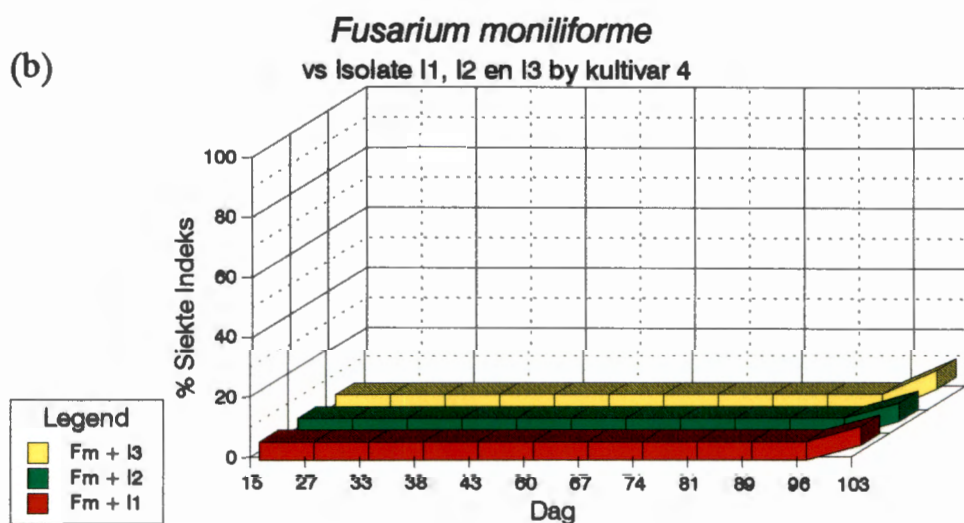
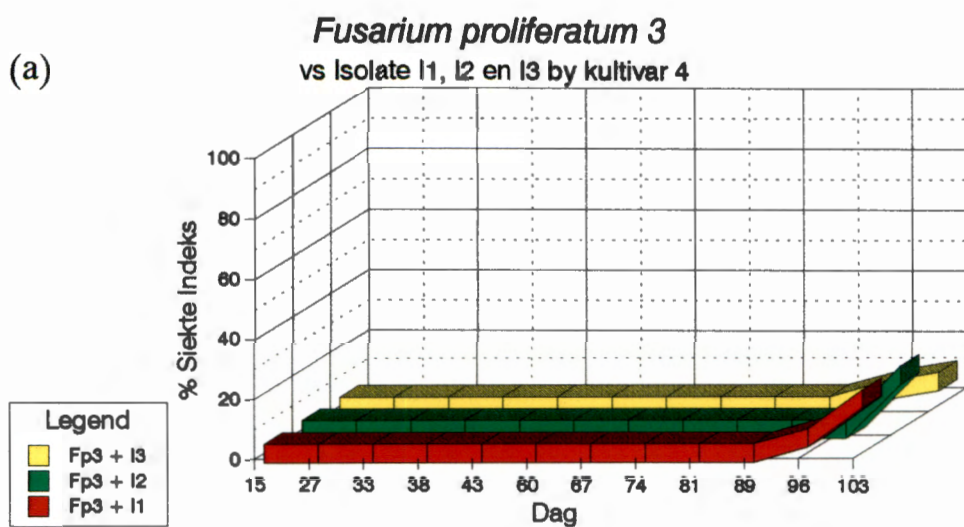


Fig. 5.17 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante geplant in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *F. proliferatum* isolaat 3 (Fp3) (a) of *F. moniliforme* (Fm) (b) of *Pseudomonas* sp. 1 (P1) (c) gemeng is.

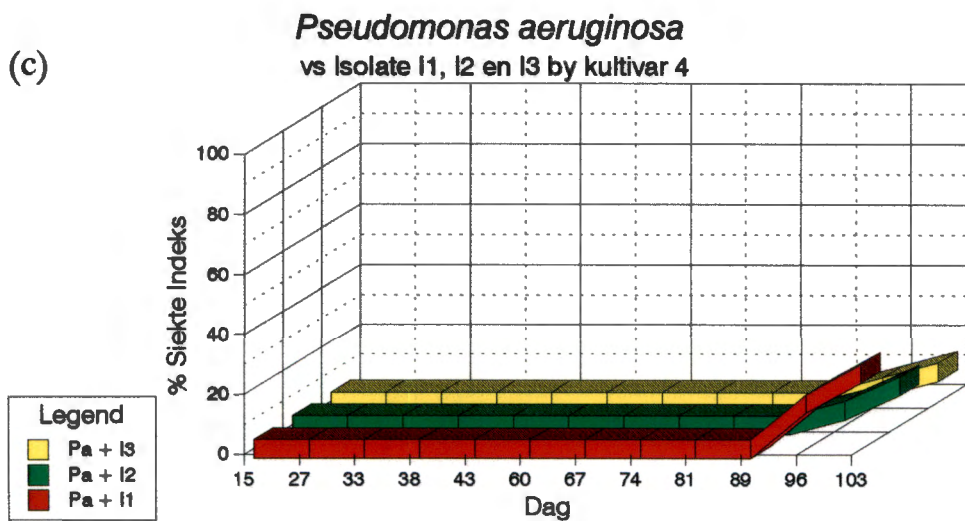
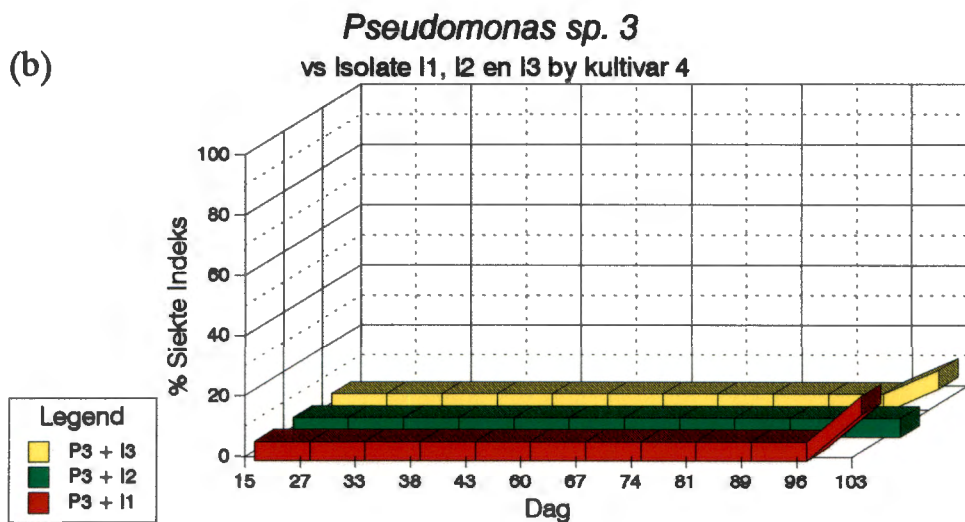
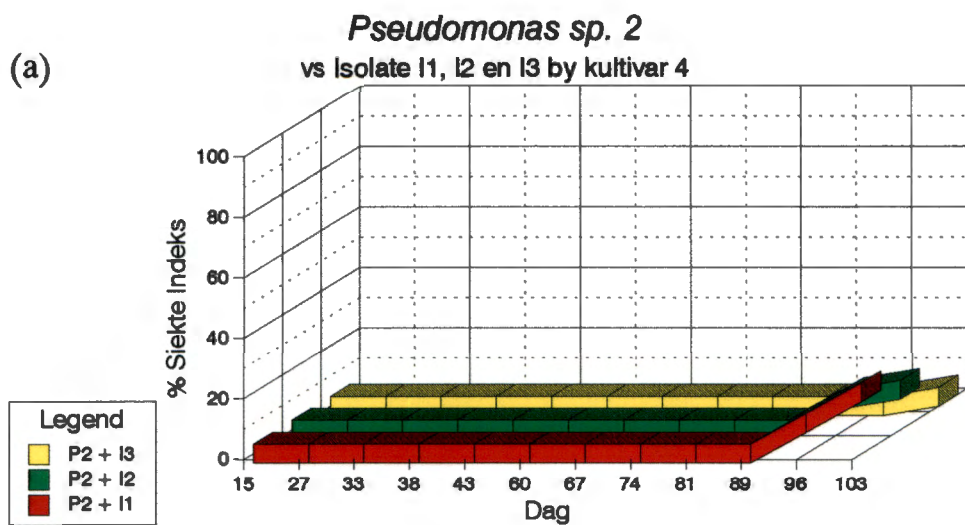


Fig. 5.18 (a-c): % Siekte indeks van angelierplante in gesteriliseerde grond waarin *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolate I1, I2 en I3 en *Pseudomonas* sp. isolaat 2 (P2) (a) of isolaat 3 (P3) (b) of *P. aeruginosa* (Pa) (c) gemeng is.

6. TOETSING VAN SUKSESVOLLE ANTAGONISTE IN 'n KOMMERSIËLE KWEKHUIS.

6.1. Materiaal en metodes.

Beddings in kweekhuis nommer drie by Geoff Botha kwekery te Weltevrededepark naby Johannesburg is in mikroperssele van 1,5m x 1m x 0,2m verdeel. Die persele is van mekaar geskei met gesteriliseerde afskortings nadat die grond vir 10 minute met stoom (temperatuur varieer tussen 82 °C en 90 °C) gesteriliseer is.

Die patogeen en antagonist is vermeerder soos in paragraaf 5.1.2 beskryf. Kultivar 1 is gebruik omdat die kultivar die laagste weerstand teen die patogeen het. Isolaat (I2) van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* is gebruik. Uit vorige eksperimente het geblyk dat die isolaat die mees virulente van die drie isolate is.

Die toetsorganismes wat gebruik is, is die volgende: *Pseudomonas* (P2), *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma harzianum* isolate Th2 en Th3 mengsel, isolaat Th5, isolaat Th6 en 'n mengsel van *T. harzianum* isolate Th1, Th2, Th3, Th4, Th5, Th6 en Th7. Gewortelde angelier-steggies van kv1 is elf dae nadat 2,7 liter van die patogeen-sorghum mengsel en 2,7 liter van die antagonis-sorghum mengsel of 2,7 liter bakteriële suspensie per perseel in die grond ingewerk is, geplant. 'n Analise van die grond is gedoen (tabel 6.1).

TABEL 6.1: Analise van grond in die beddings in kweekhuis nommer 3 by Geoff Botha kwekery wat gebruik is vir die toetsing van antagonist in 'n kommersiële kweekhuis.

KATIONE										ANIONE				
Makro-elemente (mmol l ⁻¹)					Spoorelemente (µmol l ⁻¹)					(mmol l ⁻¹)				
K	Ca	Mg	Na	NH ₄	B	Zn	Cu	Fe	Mn	NO ₃	P	SO ₄	HCO ₃	Cl
2,4	1,1	0,3	0,6	0,47	118	2,2	0,8	49,1	16,3	3,2	0,09	1,0	0,6	2,0

Die volgende voedingsaanvulling is per vierkante meter toegedien: 30 g MgSO₄, 20 g KAN en 40 g superfosfaat.

6.2. Resultate van toetsing van suksesvolle antagoniste in 'n kommersiële kweekhuis.

Die aantal plante per perseel het gevarieer, omdat die steggies wat doodgegaan het voordat die eerste lesing geneem is, verwyder is. Vir die kontrole sonder *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* is 464 steggies in 'n bedding van 8m geplant. Twee monsters is uit die bedding geneem wat die totaal op 462 gebring het. Die doel van die bedding was om as 'n buffer te dien en sodoende verspreiding van die patogeen na die res van die kweekhuis te beperk. Die plante is op dieselfde skaal geëvalueer as die in paragraaf 5.1.2.1.

Resultate van toetsing van antagoniste in 'n kommersiële kweekhuis word in tabel 6.2 weergegee. Figuur 6.1 gee 'n histogram wat die gemiddelde persentasie siek plante per perseel na 100 dae stip teenoor die geïnfecteerde kontrole, *Trichoderma harzianum* isolate Th2 en Th3 kombinasie, isolaat Th5, isolaat Th6, 'n mengsel van 7 Th-isolate, *Fusarium moniliforme* en *Pseudomonas* sp. isolaat 2.

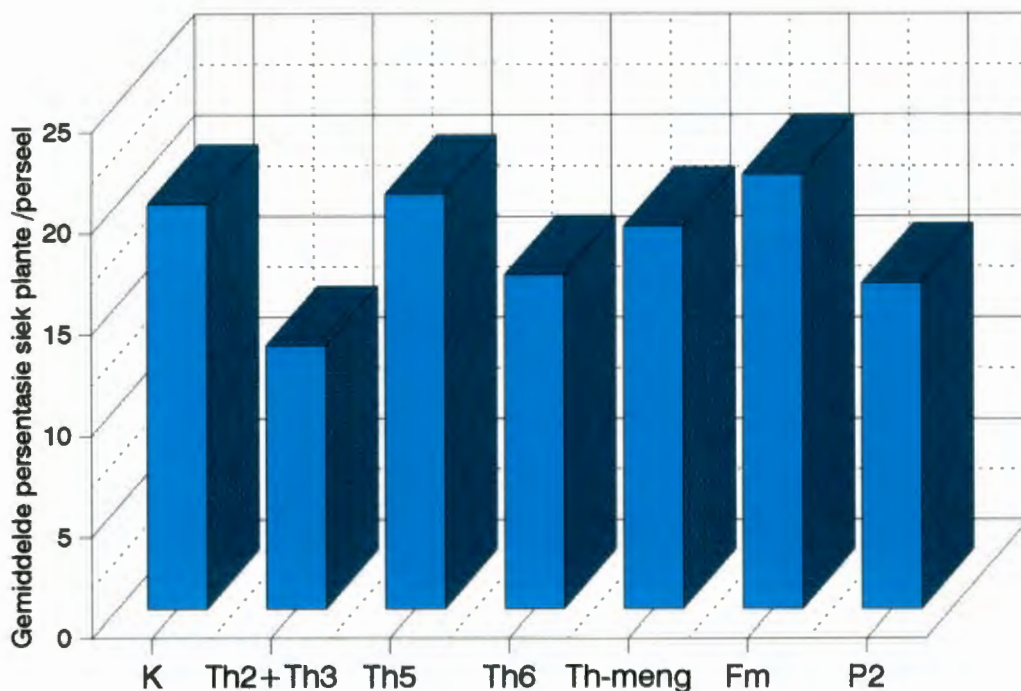


Fig. 6.1: Histogram om die effek van antagoniste op verwelksiekte van angeliere, wat veroorsaak word deur *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* na 100 dae te toon. Die gemiddelde persentasie plante / perseel wat simptome vertoon, word gestip teenoor die geïnfecteerde kontrole (K), *Trichoderma harzianum* isolate (Th2 + Th3), Th5, Th6 en 'n mengsel van *T. harzianum* isolate (Th-meng), *F. moniliforme* (Fm) en *Pseudomonas* sp. (P2).

TABEL 6.2. Sietkewaardes van angelierplante (kultivar 1) na kweking in grond geïnfekteer met *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (I2) en verskillende antagoniste in beddings in kweekhuis nommer 3 by Geoff Botha kwekery te Weltevrededepark. Antagoniste wat gebruik is, is *Trichoderma harzianum* isolaat, *Fusarium moniliforme* en *Pseudomonas* sp.

Toetsorganismes	Totale aantal plante / perseel			Siekte waarde	Aantal plante / perseel wat simptome vertoon op dag 26			Gem aantal plante / perseel met simptome	Aantal plante / perseel wat simptome vertoon op dag 63			Gem aantal plante / perseel met simptome	Aantal plante / perseel wat simptome vertoon op dag 100			Gem aantal plante / perseel
	Herbaling 1	Herbaling 2	Herbaling 3		Herbaling 1	Herbaling 2	Herbaling 3		Herbaling 1	Herbaling 2	Herbaling 3		Herbaling 1	Herbaling 2	Herbaling 3	
Kontrole + I2	77	78	88	2	0	0	0	0	36	32	40	36	28	37	26	30
				3-5	0	0	0	0	8	5	2	5	43	9	5	19
Kontrole - I2	462			3-5	0				20				20			
<i>T. harzianum</i> (Th2 + Th3)	79	86	80	2	0	0	0	0	19	14	12	15	26	16	13	18
				3-5	0	0	0	0	4	3	0	2	33	9	1	14
<i>T. harzianum</i> isolaat Th5	79	77	87	2	0	0	0	0	36	37	47	40	12	30	37	26
				3-5	0	0	0	0	14	0	0	5	47	21	5	24
<i>T. harzianum</i> isolaat Th6	79	71	79	2	0	0	0	0	35	14	13	21	20	8	19	16
				3-5	0	0	0	0	21	0	0	7	54	8	5	22
Mengsel van <i>Trichoderma</i> isolate	87	87	64	2	0	0	0	0	36	33	15	28	29	24	21	25
				3-5	0	0	0	0	5	0	1	2	27	23	9	20
<i>F. moniliforme</i>	79	79	79	2	0	0	0	0	30	35	21	29	6	29	19	18
				3-5	0	0	0	0	27	2	0	10	70	25	3	33
<i>Pseudomonas</i> sp.	74	79	76	2	0	0	0	0	40	26	24	30	26	28	24	26
				3-5	0	0	0	0	6	0	3	3	19	10	5	11

7. BESPREKING.

Biologiese beheer deur antagonistiese organismes het heelwat potensiaal maar die verkryging van moontlike antagoniste lewer heelwat probleme op. Volgens Whipps (1987) het die voedingsmedium 'n groot effek op die groeitempo en morfologie van die fungusse asook op die produksie van en die reaksie op antibiotiese stowwe. Kompetisie en interaksie tussen patogene en antagoniste word ook beïnvloed. Interaksies tussen 'n patogeen en 'n antagonis kan ook varieer met verskillende isolate. Volgens die navorser is dit moontlik die rede waarom *in vitro* en *in vivo* resultate van mekaar verskil. In hierdie studie is aartappeldekstrose agar gebruik vir die *in vitro* toetsing van antagonisme. Aartappeldekstrose agar is ryk aan koolstof, wat die produksie van antibiotiese stowwe kan aanhelp en meer lise van hifes veroorsaak. Whipps (1987) het gevind dat fungusse soos *Fusarium oxysporum* die beste groei op grondekstrak agar en dat fungusse soos *Trichoderma* spp. die beste groei op aartappeldekstrose agar. Dit is derhalwe beter om meer as een voedingsmedium te gebruik om antagonistiese eienskappe te bepaal. Voedingsmediums moet aanpas by die organisme se natuurlike medium, byvoorbeeld grondekstrak agar vir 'n grondfungus.

Merriman en Russell (1990) het bedenkinge oor die gebruik van agartoetse vir antagonisme. Volgens die navorsers wys toetse op agar nie organismes uit wat 'n patogeen kan benadeel deur kompetisie, of 'n organisme wat moontlik in kruisbeskerming gebruik kan word nie. Volgens Merriman en Russell (1990) is 'n alternatief vir die agartoets 'n eenvoudige toets wat organismes teenoor 'n patogeen in grond toets. Die omgewingstoestande waaronder beheer moet plaasvind kan gesimuleer word. Die toets neem langer om uit te voer, maar gee meer bruikbare resultate.

Die meeste toetsorganismes wat vir die biologiese beheer van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* *in vitro* getoets is, het die groeitempo van een of meer isolate van *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* geïnhibeer. Net isolate van *Aspergillus* sp., *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *Trichoderma harzianum*, *T. fasciculatum* en *Pseudomonas* sp., wat die groeitempo van isolate 1, 2 en 3 van die patogeen geïnhibeer het, of isolate van *T. harzianum* en *Pseudomonas* sp. waarvan die groeitempo merkbaar hoër was as die van die patogeen, is *in vivo* getoets. In die *in vivo* toetsing het die organismes egter 'n verskeidenheid resultate gelever. *Aspergillus* sp. wat isolate 1, 2 en 3 van die patogeen *in vitro* geïnhibeer het, het

nie een van die isolate van die patogeen by kultivar 1 *in vivo* geïnhibeer nie. *Pseudomonas* sp. isolate P3 en P4 en *T. harzianum* isolaat Th4, wat al drie die patogeen isolate *in vitro* geïnhibeer het en wat 'n merkbaar hoër groeitempo as die patogeen gehad het, het swak resultate *in vivo* gelewer.

In die *in vivo* toetsing in potte vir antagonisme teenoor *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* het isolate van *Trichoderma* sp. goeie resultate gelewer. *Trichoderma harzianum* isolaat Th2 het die beste resultate gelewer. Die isolaat het die patogeen se groei effektief by kultivar 1 en 2 gerem. Plante van kultivar 1 wat geplant was in gesteriliseerde grond waarin *T. harzianum* isolaat Th2 en *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* isolaat 1 gemeng is, het geen uitwendige of inwendige simptome getoon nie (fig. 5.4 (a)). Hoewel isolaat 3 van die patogeen by kultivar 1 nie betekenisvol deur isolaat Th2 geïnhibeer is nie, was die persentasie siekte indeks van die kultivar in die geval baie laag (fig. 5.4 (a)). *T. harzianum* isolaat Th4 en *T. fasciculatum* het isolaat 3 van die patogeen by kultivar 3 in so 'n mate gerem dat die angelierplante eers aan die einde van die toetsperiode simptome begin toon het (figure 5.6 (c) en 5.7 (c)). Die *Trichoderma* sp. isolate het ook goeie resultate in die beddings van die kommersiële kweekhuis gelewer. 'n Kombinasie van *T. harzianum* isolate Th2 en Th3 het die beste resultate gelewer (fig. 6.1).

Sivan en Chet (1989) het gevind dat *Trichoderma harzianum* die ontkieming van chlamydospore van *Fusarium oxysporum* verminder in grond wat verryk is met lae konsentrasies asparagien en glukose. Dit is moontlik die gevolg van kompetisie. As die konsentrasie van asparagien en glukose verhoog word, verhoog die ontkieming van die chlamydospore. Die meeste eksudate in die risosfeer word deur die wortelpunte uitgeskei.

As 'n antagonis die wortelpunt kan koloniseer, kan infeksie deur patogene wat die vaatweefsel van die gasheer deur die ongedifferensieerde xileem in die wortelpunt binnedring, verminder word. Volgens die outeurs het *T. harzianum* nie 'n groot invloed op *F. oxysporum* buite die risosfeer nie, wat kompetisie as 'n biologiese beheermeganisme onderskryf. Dennis en Webster (1971) het gevind dat die meeste *Trichoderma* sp. isolate, insluitende *T. harzianum*, se hifes die hifes van verskeie toetsfungusse, insluitende *F. oxysporum*, verstrengel. Penetrasie van die hifes deur *Trichoderma* spp. vind selde plaas. Volgens die navorsers kom dit voor asof *T. harzianum* nie die vermoë besit om antibiotiese stowwe te produseer nie.

Isolaat P2 van *Pseudomonas* sp. het goeie resultate *in vivo* in die potte gelever. Die isolaat was baie effektief by kultivar 3, waar al die isolate van die patogeen betekenisvol geïnhibeer is (fig. 5.11 (c)). Isolaat P2 van *Pseudomonas* sp. het die groei van die patogeen ook redelik effektief in die beddings van die kommersiële kweekhuis gerem (fig. 6.1). 'n Suspensie van 'n isolaat van *Pseudomonas* sp. en die patogeen is vir hierdie studie in die grond ingewerk. Na 38 dae in die potte het die meeste plante simptome begin toon. Tydens die toetsing in 'n kommersiële kweekhuis het reeds 42 % van die plante na 63 dae simptome getoon, terwyl 47% van die kontrole plante simptome getoon het. Yuen, et al. (1985) het verwelking van angeliere vir tot 4 maande verminder deur die plant se wortels in suspensies of modder wat antagonistiese bakterieë bevat, te doop en in potte te plant. Die metode was egter ook nie baie suksesvol in kommersiële kweekhuise nie. Beter resultate in potte word dus verkry deur die wortels van die plant direk te behandel. Plante kan vir tot twee jaar in 'n kweekhuis groei en is oor die hele tydperk vatbaar vir *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Angelierwortels groei ook weg van die plek waar die bakterieë se populasie die grootste is. Yuen, et al. (1985) het ook aangetoon dat wortel koloniserende bakterieë se populasie met verloop van tyd afneem. Na vyf maande was daar baie min of geen van die toegediende bakterieë teenwoordig in die risosfeer van plante waarvan die wortels met die spesifieke bakterieë behandel is.

In hierdie studie is gevind dat isolaat 2 van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* die mees virulente was en dat daar geen betekenisvolle verskil tussen die vatbaarheid van kultivars 1, 2 en 3 vir die patogeen isolaat was nie (fig 5.1 (b)). *Aspergillus* sp., *F. proliferatum* (Fp1), *Trichoderma harzianum* (Th2 en Th3), *T. fasciculatum* en *Pseudomonas* sp. (P2 en P4) het egter verskillende resultate vir isolaat 2 van die patogeen by kultivars 1, 2 en 3 gelever. Net *F. proliferatum* (Fp3) het isolaat 2 van die patogeen in kultivars 1, 2 en 3 betekenisvol geïnhibeer. Kultivar 1 was die meeste vatbaar en kultivar 3 die minste vatbaar vir isolaat 1 van die patogeen (fig. 5.1 (a)). *F. proliferatum* (Fp2) en *Pseudomonas* sp. (P3) het isolaat 1 van die patogeen by kultivar 1 geïnhibeer, maar nie by kultivar 2 of kultivar 3 nie. Die resultate is moontlik die gevolg van spanningsfaktore. Volgens Smith (1977) kan spanningsfaktore, byvoorbeeld die voorkoms van nematodes, 'n plant se weerstand teen verwelksiekte afbreek. Tydens die eerste *in vivo* toetsing is die plante op dag 33 met Metasystox, 'n sistemiese dodert, bespuit vir beheer van plantluise. Daar is waargeneem dat sommige plante van kultivar 2 heeltemal verwelk het en binne 'n week doodgegaan het. Die simptome verskil van verwelksiekte-simptome, waar verwelking eers aan die een kant

van die plant begin en dan na die res van die plant versprei. By nadere ondersoek is nematodes op die wortels van die plante gevind, wat moontlik die vinnige verwelking van die plante verklaar.

In al die *in vivo* toetsings was die boor- en mangaan konsentrasies van die grond hoog (tabelle 5.1, 5.3 en 5.4). Tydens die eerste *in vivo* toetsing van die elf toetsorganismes is veral geel vlekke by kultivar 1 opgemerk, wat moontlik aan 'n oormaat mangaan toegeskryf kan word. Geen organisme kon uit die vlekke geïsoleer word nie. Stoomsterilisatie van grond veroorsaak dat die konsentrasies van boor en mangaan sodanig verhoog dat dit moontlik toksies vir die plant kan wees. Stoomsterilisatie en 'n lae pH van die grond veroorsaak dat MnO_2 omgesit word in Mn^{2+} -ione, wat deur die plant opgeneem kan word. Dit kan lei tot 'n oormaat mangaan wat lei tot die volgende simptome: onreëlmatige geel en nekrotiese vlekke op blare, afval van blare, en later kan apochlorose van jong blare voorkom. 'n Oormaat boor veroorsaak nekrotiese vlekke. 'n Oormaat boor en mangaan kan verhoed word deur die pH van die grond te verhoog deur Ca(OH)_2 in te werk (Swaans & Nachielsen, 1991).

Tydens die tweede *in vivo* toetsing van veertien toetsorganismes was die potte binne dae nadat die angeliersteggies geplant is, met *Chromelosporium fulvum* bedek. Die fungus word dikwels op klam oorgesteriliseerde grond in kweekhuise aangetref. Die swam is 'n swak kompeteerder en verdwyn sodra die normale mikroflora in die substraat vestig (Coetzee, 1987).

Die tweede toetsing van veertien toetsorganismes het vanaf 3 Junie 1993 tot 11 September 1993 geduur. Die temperatuurbeheer in die kweekhuis was nie voldoende nie, wat veroorsaak het dat die grondtemperatuur snags tot 5 °C gedaal het. Die optimum temperatuur vir die voorkoms van *Fusarium* verwelksiekte by angeliere in kweekhuise is 22 °C - 26 °C (Jarvis, 1992). Geen verwelksiekte-simptome is waargeneem by lae temperature wat varieer tussen 14 °C en 15 °C, terwyl vinnige verwelking plaasvind by 26 °C (Jarvis, 1992). Dit is dus moontlik dat die patogeen se groei deur die lae temperature negatief beïnvloed is. Angeliere se optimum groei vind ook plaas tussen 20 °C en 30 °C, maar die plante kan goed groei by lae temperature solank dit nie ryp nie (De Bruin, 1994). Teen die einde van die toetsperiode het die temperatuur aansienlik gestyg. Terselfdertyd was daar 'n toename in die persentasie siekte indeks van die plante

(figure 5.14 tot 5.18 (a-c)).

Tydens toetsing in die praktyk is die eerste herhalings van *Trichoderma harzianum* isolate (Th2 + Th3), Th5 en Th6, *Fusarium moniliforme* en die geïnfekteerde kontrole in persele wat langs waaiers, wat warm lug uit die kweekhuis onttrek, uitgevoer. Die grondtemperatuur van die bedding het gevarieer tussen 23 °C en 24 °C. As die resultate van die eerste herhaling vergelyk word met die tweede en derde herhalings waar die grondtemperatuur tussen 22 °C en 23 °C gevarieer het, is daar groot verskille (tabel 6.1). By *T. harzianum* isolate Th5 en Th6 het onderskeidelik 14 en 21 van die 79 plante in die eerste herhaling op dag 63 reeds gevorderde simptome getoon, terwyl die ander herhalings se plante nog geen gevorderde simptome getoon het nie. By *F. moniliforme* het 27 van 79 plante in die eerste herhaling op dag 63 reeds gevorderde simptome getoon terwyl die derde herhaling geen simptome vertoon het nie. Net 2 van die 79 plante by die tweede herhaling het gevorderde simptome getoon. By *T. harzianum* isolate (Th2 + Th3) en die geïnfekteerde kontrole was die verskille nie so groot nie. Die twee persele was in 'n bedding aan die kant waar 'n deur is, geleë. Hoewel daar nie so 'n groot verskil in die grondtemperatuur van die verskillende beddings was nie, kon die hoër temperatuur moontlik die patogeen in die bedding bevoordeel het. Die grondtemperatuur van die beddings is nie gereeld gemeet nie. Dit is dus moontlik dat daar groter verskille in die grondtemperatuur van die verskillende beddings kon wees. Volgens Nelson (1964) beïnvloed grond- en lugtemperatuur die siekteverloop en die uitdrukking van simptome. Fletcher en Martin (1972) vind dat simptome vinniger verskyn by hoër grondtemperatuur. Die navorsers het gevind dat angelierplante wat geplant is in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* geïnfesteerde grond, waarvan die temperatuur tussen 23 °C - 25 °C gevarieer het, benewens verwelksiekte-simptome, akute apochlorose toon terwyl angelierplante in grond met 'n temperatuur van 18 °C - 20 °C, net 'n reduksie in vegetatiewe groei getoon het.

Aan die kant van die kweekhuis langs die bedding waar die eerste herhaling van die *in vivo* toetsing van antagoniste teen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* uitgevoer is, was *Yucca* sp. in potte geplant. Volgens Jarvis (1992) is die grond in die potte 'n moontlike bron van inokulum van verskeie grondpatogene soos nematodes, virusse, insekte en myte, aangesien die grond rondom die potte nie gesteriliseer kan word nie.

Die hoeveelheid antagonis- en patogeen-sorghum mengsel wat in die *in vivo* toets in potte en in die persele gebruik is, is op 'n lukraak manier bepaal. Dit is waarskynlik wenslik om vooraf te bepaal hoeveel van die antagonis nodig is om 'n bepaalde hoeveelheid van die patogeen te inhibeer.

Biologiese beheer bied 'n koste-effektiewe, langwerkende en veilige alternatief vir die gebruik van chemiese doders. Ondanks intensiewe navorsing wat veral gedoen is op die biologiese beheer van grondpatogene, bestaan daar nog nie 'n suksesvolle, kommersieel aanvaarbare metode vir biologiese beheer nie. Vir biologiese beheer om ekonomies uitvoerbaar te wees is dit nodig om 'n metode te ontwikkel waardeur die antagonis maklik en koste-effektief toegedien kan word. Die onderdrukkende effek van grond kan oorgedra word deur 'n klein hoeveelheid van die grond te meng met steriele grond. Alabouvette (1990) het gevind dat steriele grond gemeng met grond wat 'n onderdrukkende effek vir *Fusarium* sp. verwelksiektes het, goeie resultate lewer. Dit is egter 'n onpraktiese en onbetroubare metode om grootskaals te gebruik (Merriman & Russell, 1990).

Deur die fisiese omgewing te verander kan die onderdrukkende effek van natuurlike grond verhoog word, byvoorbeeld *Trichoderma* spp. is meer effektiewe antagoniste in suur grond (Alabouvette, 1990). Tog is dit steeds onprakties om die fisiese omgewing op groot skaal te verander, en meer navorsing is nodig om uit te vind watter faktore verander moet word. Tans is dit meer prakties om groot hoeveelhede antagonistiese mikroörganismes in gesteriliseerde grond in kweekhuise in te werk (Alabouvette, 1990). 'n Ander metode wat baie belangstelling geniet is die ontwikkeling van kultivars wat in ander substrate, byvoorbeeld glasvesel, groei. In die substrate kan 'n antagonis gevestig word voordat die patogeen in die substraat kan versprei (Alabouvette, 1990).

In die studie is gevind dat isolate van *Trichoderma harzianum* goeie resultate lewer teenoor 'n bepaalde isolaat van *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. 'n Vraag wat onbeantwoord bly, is hoe die antagoniste in natuurlik geïnfesteerde grond sal optree. Daar is nog niks bekend oor die meganisme van beheer nie. Die optimum hoeveelheid van die antagonis wat toegedien moet word om die patogeen doeltreffend te inhibeer is ook nog onbekend. Heelwat meer navorsing sal ook gedoen moet word oor geskikte metodes om die antagoniste te vermeerder. Die vraag bestaan ook of daar nog ander patogene in die blombedryf is wat deur die spesifieke antagoniste geïnhibeer kan word, wat die spektrum

van gebruik sal verhoog. Ten slotte sal dit belangrik wees om te bepaal of die biologiese beheer van plantpatogene met mikroörganismes 'n ekonomies uitvoerbare onderneming sal wees.

8. LITERATUURLYS.

ALABOUVETTE, C. 1990. Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils. (In Hornby, D., ed. Biological control of soil-borne plant pathogens. London : C.A.B. International p. 27-43.) ✓

ARMSTRONG, G.M. & ARMSTRONG, J.K. 1968. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing a tracheomycosis in the syndrome of disease. *Phytopathology*, 58:1242-1246. ✓

BAAYEN, R.P. 1987. Responses related to lignification and intravascular periderm formation in carnations resistant to *Fusarium* wilt. *Can. J. Bot.*, 66:784-792. ✓

BAAYEN, R.P. 1988a. *Fusarium* wilt of carnations - disease developement, resistance mechanisms of host and taxonomy of the pathogen. Utrecht : Rijksuniversiteit. (Proefschrift - PhD) 165p. ✓

BAAYEN, R.P. 1988b. Inkapseling *Fusarium*-schimmel belangrijk bij afweermechanisme. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:34-35. ✓

BAAYEN, R.P. 1988c. Ziekteverloop geeft inzicht voor veredeling tegen *Fusarium*. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:30-31. ✓

BAKER, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 6:263-294. ✓

BAKER, R. 1980. Measures to control *Fusarium* and *Phialophora* wilt pathogens of carnations. *Plant Disease*, 64:743-749. ✓

BAKER, K.F. & COOK, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco : W.H. Freeman and Co. 433p. ✓

BOOTH, C. 1970. CMI Descriptions of pathogenic Fungi and Bacteria. England : The Eastern Press. ✓

COETZEE, J.C. 1987. Die biologie van enkele fungussoorte wat by die kommersiële verbouing van *Agaricus bisporus* (Lange) in Suid-Afrika probleme skep. Pretoria : UP. (Verhandeling - M.Sc) 284p. ✓

COOK, R. C. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* 75:25-29. ✓

CUGUDDA, L. & GARIBALDI, A. 1987. Soil suppressive to *Fusarium* wilt of carnation: studie on mechanism of suppressiveness. *Acta Horticulturae*, 216:67-76.

DAVIS, D. 1967. Cross-protection in *Fusarium* wilt diseases. *Phytopathology*, 37:311-314. ✓

DE BRUIN, D. 1994. Mondelinge mededeling aan outeur. Geoff Botha kwekery te Weltevrededepark, Johannesburg. ✓

DEKKER, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. *Ann. Rev. Phytopath.*, 14:405-428. ✓

DELP, C.J. 1977. Privately supported disease management activities. (In Horsfall, J. G. & Cowling, E. B., eds. *Plant Disease an Advanced Treatise*, vol 1. *How Disease is Managed*. New York : Academic Press. p. 381-392.) ✓

DEMMINK, J.F. & BAAYEN, R.P. 1988. Waakzaamheid geboden bij fysio's van *Fusarium*. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:46-47. ✓

DENNIS, C. & WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III Hypal interaction. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 57:363-369.

ELAD, Y. & BAKER, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 75:1053-1059. ✓

FISHER, N.L. & BURGESS, L.W. & TOUSSOUN, T.A., NELSON, P.E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72:151-153. ✓

FLETCHER, J.T. & MARTIN, J.A. 1972. Spread and control of *Fusarium* wilt of carnations. *Plant Pathology*, **21**:182-187. ✓

HARLING, R. & TAYLOR, G.S. 1985. A light microscope study of resistant and susceptible carnations infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Canadian Journal of Botany*, **63**:638-646. ✓

JARVIS, W.R. 1992. Managing diseases in greenhouse crops. Minnesota : APS Press. 288p. ✓

JOHNSON, L.F. & CURL, E.A. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Minnesota : Burgess Publishing Co. 245p. ✓

LOCKE, J.C., MAROIS, J.J. & PAPAIVIZAS, G.C. 1985. Biological control of *Fusarium* wilt of greenhouse - grown *Chrysanthemums*. *Plant Disease*, **69**:167-169. ✓

MAROIS, J.J. 1990. Biological control of diseases caused by *Fusarium oxysporum*. (In PLOETZ, R.C. ed. *Fusarium* of banana. St. Paul, Minnesota : p. 77-81.) ✓

MERRIMAN, P. & RUSSELL, K. 1990. Screening strategies for biological control. (In Hornby, D., ed. Biological control of soil-borne plant pathogens. London : C.A.B. International p. 427-436.) ✓

NELSON, P.E. 1964. Carnation as a symptomless carrier of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology*, **54**:323-329. ✓

NELSON, P.E. 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with the emphasis on *Fusarium oxysporum*. (In PLOETZ, R.C. ed. *Fusarium* of banana. St. Paul, Minnesota : p. 27-34.) ✓

NELSON, P.E. & TAMMEN, J. & BAKER, R. 1960. Control of vascular wilt disease of carnation by culture-indexing. *Phytopathology*, **50**:356-360. ✓

NELSON, P.E. & TOUSSOUN, T.A. & MARASAS, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. University Park : The Pennsylvania State University Press.

NIEMANN, G.J. & BAAYEN, R.P. 1988. Chemische verschillen tussen vatbare en resistente anjercultivars. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:39.

PARK, C. & PAULITZ, T.C. & BAKER, R. 1988. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 78:190-194.

PENNYPACKER, B.W. & NELSON, P.E. 1972. Histopathology of carnation infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology*, 62:1318-1326.

RATTINK, H. 1988. *Fusarium* en resistente anjerrassen beïnvloed elkaar. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:40-41.

RATTINK, H. & SPARNAAIJ, L.D. & DEMMINK, J.F. 1988. Anjerrassen worden steeds resistenter. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:28-29.

ROWE, R.C. & FARLEY, J.D. 1981. Strategies for controlling *Fusarium* crown and root rot in greenhouse tomatoes. *Plant Disease* 65:107-111.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. 1985. Plant physiology. California : Wadsworth Publishing Co. 540p.

SCHER, F.M. & BAKER, R. 1980. Mechanism of biological control in *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology*, 70:412-417.

SCHER, F.M. & BAKER, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 72:1567-1573.

SEQUEIRA, L. 1962. Influence of organic amendments on survival of *Fusarium oxysporum*

f. sp. *cubense* in soil. *Annual review of Phytopathology* 13:976-982. ✓

SIMEONI, L.A. & LINDSAY, W.L. and BAKER, R. 1987. Critical iron level associated with biological control of *Fusarium* wilt. *Phytopathology*, 77:1057-1061. ✓

SIVAN, A & CHET, I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* in rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 79:189-203. ✓

SMITH, S.N. 1977. Comparison of germination of pathogenic *Fusarium oxysporum* chlamydospores in host rhizosphere soils conducive and suppressive to wilts. *Phytopathology*, 67:502-510. ✓

SMITH, S.N. & SNYDER, W.C. 1972. Germination of *Fusarium oxysporum* chlamydospores soils favourable and unfavourable to wilt establishment. *Phytopathology*, 62:273-277. ✓

SNEH, B. 1981. Use of rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation. *Phytopath. Z.*, 100:251-156. ✓

SONNEVELD, C. 1987. Proefstation voor tuinbouw onder glas te naaldwijk consulentschap voor de tuinbouw te naaldwijk. *Serie voedingsoplossingen glastuinbouw*, 10.

SPARNAAIJ, L.D. & BAAYEN, R.P. & RATTINK, H. 1988a. *Fusarium*-onderzoek richt zich op toepassing in de praktijk. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:48-49. ✓

SPARNAAIJ, L.D. & DEMMINK, J.F. & RATTINK, H. & BAAYEN, R.P. 1988b. *Fusarium* dringt langs vele wegen in anjerplant binnen. *Vakblad voor de Bloemisterij*, 15:32-33. ✓

STEYN, H.S. 1994. Mondelinge mededeling aan outeur. Statistiese Konsultasiediens, PU vir CHO. Potchefstroom. ✓

SWAANS & NACHIELSEN. 1991. Mangaan. *Info-Koerier*, 3. Junie. ✓

SUBRAMANIAN, C.V. 1971. Hyphomycetes. New Dehli : ICAR. ✓

VAN PEER, R. & SCHIPPERS, B. 1992. Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Neth. J. Pl. Path.*, **98**:129-139. ✓

WHIPPS, J.M. 1987. Effect of media on growth and interaction between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, **107**:127-142. ✓

YUEN, G.Y. & SCHROTH, M.N. 1983. Reduction in *Fusarium oxysporum* infection and systemic colonization of carnation from treatment with *Rhizobacterium* MAF1 (abstract). *Phytopathology*, **73**:963. ✓

YUEN, G.Y. & SCHROTH, M.N. 1986. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by iron competition with *Alcaligenes* sp. *Phytopathology*, **76**:171-175. ✓

YUEN, G.Y. & SCHROTH, M.N. & McCAIN, A.H. 1985. Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria. *Plant Disease*, **69**:1071-1075. ✓