



# Resistentietoetsing met Japanse roest

## - implementatie en ontwikkeling



**nak**  **tuinbouw**

**Productschap**  **Tuinbouw**

Juni 2013,  
W.D. Smilde

# Resistentietoetsing met Japanse roest

## - implementatie en ontwikkeling

De bloemen- en plantensector investeert in dit project via het  Productschap Tuinbouw

---

### Colofon

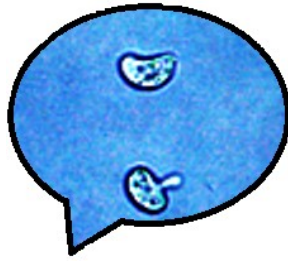
Opdrachtgever:	Bedrijfsleven / Naktuinbouw
Gefinancierd door:	Productschap Tuinbouw
Uitgevoerd door:	Naktuinbouw
Looptijd:	april 2012 tot april 2013
Auteur:	W.D. Smilde
Adres:	Naktuinbouw Sotaweg 22 2371 GD Roelofarendsveen Tel. 071-2236262 <a href="mailto:d.smilde@naktuinbouw.nl">d.smilde@naktuinbouw.nl</a> <a href="mailto:resistenie@naktuinbouw.nl">resistenie@naktuinbouw.nl</a> <a href="http://www.naktuinbouw.nl">www.naktuinbouw.nl</a>
Titel rapport:	Resistentietoetsing met Japanse roest – implementatie en ontwikkeling
Kernwoorden:	<i>Puccinia horiana</i> , <i>Chrysanthemum x morifolium</i>
Foto voorplaat:	Besmette stekken van chrysant. In ballon: Kiemende basidiosporen van <i>Puccinia horiana</i>

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de 32333opdrachtgevers



## Samenvatting

In Nederland is er geen publieke instelling die bedrijven van dienst kan zijn met een toetsing van Chrysant met Japanse roest. Deze resistentietoets vereist speciale maatregelen om ongewenste verspreiding naar de omgeving te voorkomen, en specialistische kennis van de reactie van het isolaat op een reeks genotypen van de chrysant. Door bouwkundige aanpassingen en de ontwikkeling van een toetsprotocol waarbij de zieke planten in een afgesloten plastic bak worden besmet kan nu een gevalideerde, redelijk betrouwbare toets worden aangeboden. De kosten van deze toets lijken voorlopig nog te hoog om aantrekkelijk te zijn voor het bedrijfsleven. Vervolgonderzoek zal zich moeten richten op verlaging van de kosten bij een gelijke of hogere betrouwbaarheid.



## Inhoudsopgave

1. Inleiding.....	5
2. Experimenten.....	6
3. Discussie.....	10
4. Slotopmerking.....	10
5. Referenties.....	11

## 1. Inleiding

Stekgoed van chrysant mag niet besmet zijn met Japanse roest. Dit is vastgelegd in Europese en nationale wetgeving. Door de regelgeving wordt voorkomen dat de ziekte via stekgoed op een bedrijf kan komen. Toch komt de ziekte vrij algemeen voor in teelten. Vooral in het najaar, wanneer de omstandigheden gunstig zijn voor de ziekte, zijn aanvullende maatregelen nodig. Er is daarom grote behoefte aan resistente rassen.

Verschillende Nederlandse chrysantenbedrijven zijn bezig met veredeling op resistentie. Veredelen op resistentie vereist een systematische aanpak die gedurende 5-10 jaar wordt volgehouden. Deze chrysantenbedrijven besteden het toetswerk vaak uit, ter vermijding van het risico op besmetting van het eigen stekgoed. Tot voor kort konden deze bedrijven bij de nVWA in Wageningen terecht, maar deze activiteit past niet langer in het takenpakket van de nVWA. Voor Naktuinbouw ligt deze resistentietoetsing wel in het verlengde van haar takenpakket. Daarom is het isolaat in het kader van dit project overgedragen aan Naktuinbouw.

Bij nVWA werd de toets uitgevoerd via ruimtebesmetting in een kas met onderdruk en volledige klimaatbeheersing. Ruimtebesmetting betekent dat alle planten in de hele kasruimte worden besmet door een combinatie van lage temperatuur, hoge luchtvochtigheid, en turbulente lucht. Ruimtebesmetting vraagt weinig arbeid, maar heeft ook nadelen: het is niet mogelijk om met verschillende isolaten naast elkaar te werken in dezelfde ruimte, en in de zomer is volledige klimaatbeheersing in een kas niet mogelijk. Andere toetsmethodieken zijn beschreven door De Backer et al. (2011) en Takatsu et al. (2000). Bruikbare informatie is ook te vinden in Zandvoort et al. (1968).

Om zeker te zijn van besmetting is voor de validatietoetsing en instandhouding binnen dit project gekozen voor inoculatie via zieke bladeren die boven gezonde planten worden opgehangen. De sporen vallen dan door de zwaartekracht op gezonde bladeren.

Voorafgaand aan de proefnemingen moesten o.a. onder onderdruk met filter op de luchtafvoer, worden aangelegd om te voldoen aan de biologische veiligheidseisen quarantaine pathogenen.

## 2. Experimenten

### Isolaat

Isolaat NL1 werd in september 2012 verkregen van nVWA. Dit isolaat is gekarakteriseerd door De Backer (2011). Op grond van het werk van De Backer is gekozen voor ras no. 13 als instandhoudingsras. Naktuinbouw heeft met het overnemen van deze isolaat van nVWA ook de verantwoordelijkheid voor de instandhouding op zich genomen.

### Methodiek

Stekken die getoetst moesten worden, werden in aluminium bakjes (25 x 16 cm) geplaatst in een afsluitbare plastic bak (34 x 25 x 16 cm) (Afbeelding 1)



Afbeelding 1. Afsluitbare bakken met geïnoculeerde chrysantenstekken onder TL-licht.

Inoculatie vond plaats door twee zieke bladeren, met de sporulerende zijde neerwaarts gericht, vast te klemmen tussen anti-mollengaas en de bovenzijde van de bak. Daarna werden bak en bladeren natgespoten met gedemineraliseerd water en ca. 48 uur op een donkere plaats gezet. Tijdens deze 48 uur werden de aluminium bakjes omgezet tussen de drie herhalingen en 180° gedraaid, en de plastic bakken iets naar achteren en naar de zijkant gekanteld met onregelmatige tussenpozen van 1-12 uur. Deze handelingen zijn bevorderen een gelijkmatige verspreiding van sporen over de planten in de bakken,

Na 14 en 21 dagen werden de bakken geopend en de planten bekeken. Van iedere plant wordt genoteerd of roest zichtbaar was en in welke mate op dezelfde wijze als beschreven door De Backer et al. (2011):

<u>Beschrijving</u>	<u>Interpretatie</u>
0 = geen roest,	resistent
1 = enkele puistjes,	waarschijnlijk vatbaar, iets resistent, of wisselend
2 = veel puistjes.	vatbaar

De maximale aantasting op één van de drie planten per toets werd gebruikt als eindconclusie, eveneens in navolging van De Backer et al. (2011)

### **Klimaatinstelling**

De klimaatcel werd ingesteld op 17°C. Gedurende 12 uur per dag werd TL licht ingeschakeld. (Als de lichten aan zijn, stijgt de temperatuur in de bak naar 19°C.)

### **Hygiënemaatregelen**

Toetsing en instandhouding vinden plaats in een afgesloten ruimte met toegang via een luchtsluis en gesloten ramen. De aanwezigheid van een quarantaine-pathogeen en alle hygiëneregels m.b.t. de PK-II status zijn duidelijk leesbaar opgehangen in de luchtsluis. In de werkruimte wordt voor aanvang van werkzaamheden de luchtaanvoer uitgeschakeld. (Hierdoor ontstaat onderdruk. De permanente luchtafvoer wordt gefilterd via een HEPA filter.) Na afloop van de werkzaamheden wordt de luchtaanvoer weer uitgeschakeld. In de

luchtsluis wordt beschermende kleding aangetrokken. Na afloop van de werkzaamheden wordt de beschermende kleding weer uitgetrokken en worden de handen gewassen. Om deze hygiënemaatregelen te kunnen doorvoeren zijn in mei 2012 enkele bouwkundige aanpassingen verricht. Er is een sluis gebouwd en er is een HEPA filter in de luchtafvoer geplaatst. Deze aanpassingen zijn bekostigd vanuit het project.

### **Proefopzet**

Bij een chrysantenstekbedrijf werd een reeks klonen opgevraagd die in het verleden waren getoetst met isolaat NL1. Per kloon werden drie stekken aangeleverd. De drie stekken werden verdeeld over drie bakken. In elke bak word minstens één stek van een vatbaar standaardras gezet. De perskluiten werden bevochtigd indien nodig. De planten werden in een aluminium bakje geplaatst, waarbij de plaats in de bak correspondeerde met het aangeleverde labelnummer.

### **Resultaten**

Er werden in totaal 88 klonen getoetst (Tabel 1). De resultaten vergeleken met eerdere toetsresultaten. Ongeveer de helft van de klonen werd drie keer getoetst, met drie planten per keer, in de periode December 2012-maart 2013. Na drie keer toetsen was in deze groep van 43 klonen nog één kloon die in geen van de drie toetsen ziek geworden was (42). Dit zou een ontsnapper kunnen zijn, maar het is ook mogelijk dat het eerdere resultaat vals-positief was.

Drie herkomsten (12, 24, 31) gaven een duidelijk wisselend beeld, d.w.z. ontsnapt in één of twee van de drie toetsen. Nummer 31 lijkt ook bij nVWA en in de eerste twee toetsen te zijn ontsnapt.

Daarnaast waren er acht vatbare monsters met een wisselend beeld dat zou kunnen duiden op een intermediaire reactie (2, 17, 20, 23, 41, 44, 45).

De andere helft van de monsters is één keer getoetst. Na één keer toetsen waren twee van de 43 nummers (5%) ontsnapt (72, 77). Deze twee monsters zaten in dezelfde bak. Waarschijnlijk hebben de blaadjes die gebruikt waren voor inoculatie van deze bak niet voldoende gesporuleerd.

In de derde herhaling van de proef bleek na de eerste inoculatie ongeveer 21% van de vatbare planten niet ziek te worden (Tabel 2). Drie weken na de 1<sup>e</sup> inoculatie werden de planten opnieuw geïnoculeerd. Drie weken later bleek het aantal ontsnappers te zijn gedaald tot 7%. Een maand later werd de waarneming herhaald. Er bleek geen enkele verandering in de scores op te treden.

Tabel 1. Resultaten van drie validatieproeven (PH1, PH2 en PH3) geïnoculeerd in afgesloten boxen vergeleken met eerdere resultaten bij nVWA in Wageningen met ruimtebesmetting.  
Legenda: 1 = enkele puistjes; 2= veel puistjes; x= geen gegeven

Monstercode	nVWA	PH1	PH2	PH3	opmerking
1	0	0	0	0	
2	2	1	2	2	
3	0	0	0	0	
4	2	2	2	2	
5	2	2	2	2	
6	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	
9	2	2	2	2	
10	2	2	2	2	
11	0	0	0	0	
12	1	0	0	2	2 x ontsnapt
13	2	2	2	2	
14	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	
16	0	0	0	0	
17	2	1	2	2	
18	0	0	0	0	
19	2	0	2	2	
20	1	2	1	2	
21	0	0	0	0	
22	0	0	0	0	
23	2	1	2	2	
24	2	0	2	0	2 x ontsnapt
25	0	0	0	0	
26	2	2	2	2	
27	0	0	0	0	
28	0	0	0	0	
29	0	0	0	0	
30	0	0	0	0	
31	0	0	0	2	doorbraak
32	0	0	0	0	
33	0	0	0	0	
34	0	0	0	0	
35	0	0	0	X	
36	0	0	0	0	
37	2	2	2	2	
38	0	0	0	0	
39	0	0	1	0	2 x ontsnapt
40	2	2	2	2	
41	2	1	2	2	
42	2	0	0	0	tegenspraak
43	2	2	2	2	
44	1	2	1	2	wisselend
45	2	1	2	2	
46	x	x	0	0	was wisselend bij ILVO
47	2	2			
48	1	1			
49	0	0			
50	2	2			
51	2	2			
52	2	2			
53	2	2			
54	2	2			
55	0	0			
56	2	2			
57	2	2			
58	2	2			
59	2	2			
60	2	2			
61	2	2			
62	2	2			
63	0	0			
64	2	2			
65	2	2			
66	2	2			
67	0	0			
68	1	1			
69	0	0			
70	0	0			
71	2	2			
72	2	0			ontsnapt
73	2	2			
74	2	2			
75	2	2			
76	2	2			
77	2	0			ontsnapt
78	2	2			
79	2	2			
80	0	0			
81	0	0			
82	0	0			
83	0	0			
84	2	2			
85	2	2			
86	2	2			
87	2	2			
88	2	2			

Tabel 2. Aantal ontsnappers in proef PH3 na 1<sup>e</sup> en 2<sup>e</sup> inoculatie.



	13-feb	20-feb
Aantal vatbare planten	<b>192</b>	<b>201</b>
Aantal ontsnapte planten	<b>43</b>	<b>14</b>
Ontsnapte planten	21%	7%

### **Besmetting met natte handschoenen**

Planten kunnen misschien heel makkelijk met de hand besmet worden door met natte latex handschoenen over een sporulerend gewas strijken en daarna over natgespoten planten. Op deze manier bleken lang niet alle planten ziek te worden. Niettemin is het gelukt om enkele planten op deze manier te besmetten.

### **Natte of droge inoculatie**

Binnen de projectperiode zijn verschillende pogingen ondernomen om sporen te verstuiwen in een suspensie. Sporen die in water werden verzameld bleken vast te plakken op de bodem van een Petrischaal. Sporen die in 1% agar werden verzameld konden wel verstoven worden over de planten, maar de inoculatie leverde geen symptomen op. Ook sporen (ca.  $10^5$  per ml) die uit zieke bladeren onder water werden losgeknipt met een schaar gaven geen aantasting na verneveling en donkere incubatie. Deze opvallend slechte resultaten hebben misschien te maken met de kwetsbaarheid van de basidiosporen, en staan in sterk contrast met de goede resultaten van de dwarrelinoculatie. Het enige probleem hierbij is de slechte verdeling van de sporen. Recht onder de zieke blaadjes is er een goede aantasting, maar een paar centimeter verderop niet. Dit probleem kan mogelijk worden opgelost door meer blaadjes te gebruiken, door het bewegen van de bak, of door luchtbeweging in de bak. Met het oog op de kosten lijkt luchtbeweging de beste optie.

### **Inoculatie met ventilator**

De inoculatie door neerdwarrellende sporen in een afgesloten bak kan mogelijk worden verbeterd door een kleine ventilator in de bak te plaatsen. Dit is proefondervindelijk vastgesteld door zieke en gezonde planten naast elkaar te plaatsen in een grote bak (ca. 120 x 30 x 40 cm) met een kleine ventilator. Na 3 weken bleken alle planten ziek. Het aantal roestpuistjes was wel veel lager dan bij de besmetting vanaf bladeren die boven de planten hangen. Daardoor lijkt deze methode toch niet aantrekkelijk.

### **Ruimteinoculatie in de bak**

Onder bepaalde omstandigheden kunnen planten die naast elkaar staan elkaar besmetten via de lucht. In eerste instantie leek deze methode riskant en is daarom niet binnen de projectperiode onderzocht. Na afloop van het project wordt toch in deze richting verder gezocht. Deze methodiek is aantrekkelijk omdat de inoculatie minder tijd kost.

### **Instandhouding bij 15°C**

Vanuit de literatuur is duidelijk dat Japanse roest optimaal groeit bij 17°C. Bij Naktuinbouw is jaarrond wel wat ruimte in een klimaatcel met 15°C, maar niet bij 17°C. Daarom is het goedkoper om de instandhouding bij 15°C uit te voeren. In een kleinschalig experiment is gebleken dat dit mogelijk is. Er blijkt wel een iets grotere kans op uitval van planten door smet te zijn. De planten groeien duidelijk minder goed. Dit kan mogelijk worden gecompenseerd door behoedzaam water te geven, en meer bemesting. Ook deze optie wordt in vervolgonderzoek verder uitgewerkt.

### 3. Discussie

#### Isolaat

Bij nVWA werd in de loop der jaren regelmatig nieuw ziek materiaal ingebracht. Hierdoor was niet duidelijk in hoeverre de ruimtebesmetting in de nVWA kas het resultaat is van een genetisch homogene stam. Besmet plantmateriaal van tien verschillende rassen is overgebracht van de nVWA naar Naktuinbouw en gebruikt voor inoculatie van ras 13 uit de publicatie van De Backer (2011). Dit is een commercieel ras dat uitsluitend onder code gebruikt kan worden in publiek onderzoek. Dit ras heeft de bijzondere eigenschap dat alleen pathotype NL1 hierop kan sporuleren. Pathotype NL1 heeft meer virulentiegeenen dan alle andere door De Backer et al (2011) beschreven pathotypen. Door vermeerdering op ras 13 ontstaat de nodige zekerheid over de stabiliteit van het isolaat.

Hoewel het onderzoek geen volledige overeenstemming opleverde tussen oude en nieuwe resultaten, hoeft toch niet getwijfeld te worden aan de stabiliteit van het isolaat zoals het in gebruik was bij nVWA en nu bij Naktuinbouw. De tegenstrijdige resultaten moeten waarschijnlijk worden toegeschreven aan onopgeloste problemen in de toetsmethodiek, en niet aan problemen met het isolaat.

Het blijft overigens onzeker of het patroon van het gebruikte isolaat geheel overeenstemt met het gepubliceerde patroon van NL1, omdat voor niet alle differentials opnieuw zijn getoetst.

#### Reproduceerbaarheid

De inoculatiemethode in de bakken is niet perfect. Er zijn zo nu en dan ontsnappers. Het aantal ontsnappers hangt af van de sporulatiecapaciteit van de zieke bladeren, en van de positie van de planten onder de bladeren gedurende de 48 urenperiode met nat blad. Daarnaast speelt mogelijk partiële resistentie een rol. Als er minder lesies verschijnen op een bepaald ras (c.p.), zal dat gevolgen hebben voor de ontsnappingskans.

De ontsnappingskans per monster is in theorie gelijk aan het product van de ontsnappingskans per plant. De ontsnappingskans per monster is bijvoorbeeld kleiner dan 1% wanneer de ontsnappingskans per plant 20% is, omdat  $0,2 \times 0,2 \times 0,2 < 0,01$ . Zo bekeken lijkt de gevolgde methodiek goed werkbaar.

Bij selectie van resistentie moet altijd worden gerekend met een bepaalde ontsnappingskans. Vooral bij een groot aandeel vatbare genotypen in een selectieprogramma kan een toets met ontsnappers goed voldoen. In die situatie kan het in theorie voordeliger zijn om planten één voor één te toetsen

### 4. Slotopmerking

Voor een vruchtbare samenwerking met bedrijven moet verder gesproken worden over een kostendekkend toetstarief. Om de tarieven kostendekkend te houden, maar wel acceptabel voor de bedrijven, wordt er na afloop van het project nog verder gezocht naar mogelijkheden van kostenreductie door aanpassingen van het protocol. Gestreefd wordt naar een methode die lagere kosten (m.n. arbeidstijd voor inoculatie) verbindt met een hogere besmettingsgraad in een afgesloten bak.

## 5. Referenties

De Backer, M., H. Alaei, E. van Bockstaele, I. Roldan-Ruíz, T. van der Lee, M. Maes, K. Heungens (2011) Identification and characterization of pathotypes in *Puccinia horiana*, a rust pathogen of *Chrysanthemum x morifolium*. *European Journal of Plant Pathology*, 130(3): 325-338.

Takatsu, Y, K. Ohishi, Y. Tomita, M. Hayashi, M. Nakajima, K. Akutsu (2000) Use of chrysanthemum plantlets grown in vitro to test cultivar susceptibility to white rust, *Puccinia horiana* P. Hennings. *Plant Breeding* 119: 528-530.

Zandvoort, R., C.A.M. Groenewegen, J.C. Zadoks (1968) On the incubation period of *Puccinia horiana*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 74: 128-130.