NEXT LEVEL SIERTEELTVEREDELING
SAMENWERKEN AAN WEERBARE SIERTEELTGEWASSEN.

BIOTOETSEN

POP 3 SAMENWERKING IN HET KADER VAN EIP NOORD-HOLLAND 2017. VERSLAGLEGGING PROJECT 'NEXT LEVEL SIERTEELTVEREDELING – SAMENWERKEN AAN WEERBARE SIERTEELTGEWASSEN.

"EUROPEES LANDBOUWFONDS VOOR PLATTELANDSONTWIKKELING: EUROPA INVESTEERT IN ZIJN PLATTELAND".

INLEIDING

Dit verslag is het resultaat van projectsamenwerking van Royal Van Zanten B.V., Evanthia B.V., Kolster B.V., De Ruiter Innovations B.V., De Zonnebloem B.V. met de Universiteit van Amsterdam (penvoerder), Hogeschool Inholland en Stichting Amsterdam Green Campus (initiatiefnemer en projectleiding) en met medewerking van Vertify, Naktuinbouw, Wageningen Universiteit en Greenport Aalsmeer.

De sierteeltsector werkt hard aan het verkleinen van de ecologische footprint. Een belangrijk uitdaging daarbij (naast energie, water en meststoffen) is om het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen terug te dringen door het selecteren van meer weerbare planten (cultivars) tegen ziekteverwekkers. Planten die minder gevoelig zijn voor pathogenen kunnen ook uit met veel minder middelen. Een van de succesvolle maatregelen bij het vergroten van de weerbaarheid van planten tegen ziekteverwerkers (pathogenen) is derhalve de ontwikkeling van biotoetsen voor het selecteren van weerbare cultivars.

In het project POP-3 komen bedrijven en kennisinstellingen bijeen om van elkaar te leren en elkaar te ondersteunen bij het ontwikkelen en uitvoeren van biotoetsen. Daarbij werken we op pre-competitief niveau nauw samen en blijft de specifieke soortervaring en innovatiekracht onderdeel van de afzonderlijke bedrijfsvoering. Dit rapport geeft algemene informatie over plant pathogenen en plagen, een algemene opzet van een biotoets en uitleg van relevante begrippen. Daarnaast wordt specifieke informatie gegeven over de schimmels *Fusarium* en *Botrytis* en het insect *Trips* en zijn de afzonderlijke opgeleverde protocollen voor biotoetsen zoals gerealiseerd bij de betrokken bedrijven toegevoegd.

Bij de ontwikkeling van protocollen is het belangrijk om te realiseren dat vooral de deskundige jarenlange ervaring van de kweker en de veredelaar in combinatie met de specifieke omstandigheden in het bedrijf bepalend zijn bij de succesvolle ontwikkeling van biotoetsen. Dat laatste laat zich niet in een algemeen protocol vertalen.

Hierbij wil ik het Europees Landbouwfonds voor Plattelandsontwikkeling danken voor deze mogelijke projectregeling. Daarbij gaat een speciale dank uit naar Michel Haring en Gerard Kooijman (Amsterdam Green Campus), Nelleke Kreike (Hogeschool Inholland) en Stefan van der Heijden (Royal van Zanten) bij de initiatie van deze samenwerking alsmede al de studenten van Inholland die zich als onderdeel van hun studie hebben ingezet voor de bedrijven.

Niek Persoon
Projectleider Amsterdam Green Campus

ALGEMENE OPZET VAN EEN BIOTOETS

Auteurs:
Martijn Rep, professor Fytopathologie, Universiteit van Amsterdam-SILS
Jan van Kan, universitair hoofddocent Fytopathologie, Wageningen University & Research
William Quaedvlieg, hoofd Fytopathologie, Royal Van Zanten B.V.

Het pathogeen

Identificatie

Een plantenziekte kan worden veroorzaakt door een virus, een bacterie, een schimmel, een oömyceet, een aaltje, een insect of een mijt (in de laatste twee gevallen spreken we doorgaans over een **plaag** in plaats van een ziekte). Identificatie van de ziekteverwekker vereist: (1) **aanwezigheid** van de ziekteverwekker in/op de zieke plant, (2) **isolatie** en in kweek brengen van de ziekteverwekker, (3) **infectie** of **besmetting** van een gezonde waardplant en waarneming van dezelfde ziektesymptomen, (4) **herisolatie** van de ziekteverwekker uit/van de geïnfecteerde of besmette zieke planten. Deze stappen worden **Koch's postulaten** genoemd, naar de onderzoeker die deze heeft voorgesteld[1]. Isolatie kan heel eenvoudig zijn als de ziekteverwekker buiten de waardplant in kweek kan worden gebracht (de meeste maar niet alle bacteriën, schimmels, oömyceten en aaltjes) of met het blote oog zichtbaar is (de meeste insecten en mijten). In het geval van **obligaat biotrofe** ziekteverwekkers (virussen en sommige bacteriën, schimmels en oömyceten) moet men genoegen nemen met extracten uit aangetaste planten (virussen, obligaat biotrofe bacteriën) of sporen (obligaat biotrofe schimmels en oömyceten).

[1] https://nl.wikipedia.org/wiki/Kochs_postulaten

Variatie

Elke ziekteverwekker komt voor als **populatie** met een bepaalde mate van **genetische variatie**. In veel gevallen uit een deel van die genetische variatie zich in verschillen in **virulentie** of **agressiviteit**, **waardplant-specificiteit** of **cultivar-specificiteit**. Voor een biotoets moet altijd een keuze gemaakt worden voor slechts één of een klein aantal **isolaten** van het pathogeen of lijnen van een plaag-organisme. Die keuze heeft grote consequenties. Er kan bijvoorbeeld een **resistente** of **tolerante** cultivar van een gewas worden geïdentificeerd of ontwikkeld door biotoetsen met een bepaalde stam (soms een **fysio** genoemd) van een pathogeen of plaag-organisme. Het kan dan echter blijken die cultivar niet of minder resistent of tolerant is tegen andere stammen (fysio's). Daarom verdient het aanbeveling om zoveel als mogelijk de genetische variatie en de variatie in **virulentie** en **cultivar-specificiteit** te bepalen binnen de populatie van het pathogeen. Op basis daarvan kunnen dan één of meerdere isolaten of lijnen van een pathogeen of plaag worden gekozen voor resistentie-veredeling of het *screenen* van cultivars op resistentie of tolerantie.

Bewaren

Om bruikbaar te zijn voor resistentie-veredeling of het *screenen* van cultivars op resistentie of tolerantie moet een isolaat of lijn bewaard worden. In de meest eenvoudige gevallen kan dat door **invriezen** van het organisme of het plantenextract (in geval van een virus bijvoorbeeld). Om na invriezen opnieuw **inoculum** te verkrijgen (zoals bacteriën of schimmelsporen) is **opkweken** van het pathogeen nodig. Hiervoor is dan vast en/of vloeibaar **kweekmedium** nodig, en **apparatuur** zoals een hogedrukpan en flowkast voor steriel werken, een weegschaal en een (schud)incubator. Als invriezen en opkweken niet mogelijk is, zoals in het geval van aaltjes, insecten, mijten en obligaat biotrofe pathogenen die geen vries-resistente sporen maken (meeldauw bijvoorbeeld), moet een **populatie** aangehouden worden op de waardplant.

De waardplant

Variatie

In vrijwel alle gewassen bestaat genetische variatie. Vaak is er sprake van **accessies** waarvan de genetische samenstelling en daarmee de eigenschappen van generatie tot generatie (grotendeels) gelijk blijven. Door middel van kruisingen worden voortdurend nieuwe accessies ontwikkeld. Deze accessies kunnen verschillen in gevoeligheid voor bepaalde ziekten en plagen. Biotoetsen zijn er vaak op gericht om deze variatie in gevoeligheid vast te stellen. Zo kan een (relatief) resistente of tolerante accessie worden geïdentificeerd voor een veredelingsprogramma of kweek.

Vermeerdering

Voor het ontwikkelen van een biotoets moet rekening gehouden worden met de manier(en) waarop een gewas wordt vermeerderd, bijvoorbeeld door stekken of een andere methode van **klonaal** vermeerderen, of door zaad. Ook moet rekening gehouden

worden met het seizoen waarin dit kan plaatsvinden, het aantal planten die kunnen worden gegenereerd met een bepaalde hoeveelheid uitgangsmateriaal, en het groeistadium waarin de planten voor een biotoets kunnen of moeten worden gebruikt.

Inoculatie of besmetting

Inoculum

Het **inoculum** is datgene waarmee een plant wordt geïnfecteerd. Dit inoculum kan bijvoorbeeld bestaan uit virusdeeltjes, bacteriële cellen, sporen of mycelium van schimmels of oömyceten. Deze moeten in een bepaalde minimale 'concentratie' worden toegediend en dus in voldoende hoeveelheid worden verkregen. Hierbij is er een belangrijk verschil tussen enerzijds **obligaat biotrofe** pathogenen, zoals virussen en obligaat biotrofe bacteriën, schimmels en oömyceten, en anderzijds pathogenen die buiten de plant kunnen groeien en dus kunnen worden gegroeid in/op kunstmatig **kweekmedium**. In het eerste geval moet inoculum uit eerder geïnfecteerde planten worden verkregen. In het laatste geval kan het inoculum worden verkregen uit een cultuur van het pathogeen, waarbij er soms, in het geval van schimmels of oömyceten, de kweekomstandigheden garant staan voor de vorming van sporen dan wel mycelium.

Infectiemethode

Afhankelijk van de ziekte zal een bepaald deel van de plant moeten worden **geïnoculeerd**, zoals het blad, de bloem, de vrucht, de bol of de wortels. De leeftijd van de plant en de omstandigheden waarin deze is opgekweekt is vaak van belang, zowel vanwege voldoende mate van ontwikkeling van het deel van de plant dat moet worden geïnfecteerd, als vanwege de mogelijkheid dat gevoeligheid voor infectie of **symptoom**-ontwikkeling afhankelijk is van de leeftijd van de plant of de wijze waarop deze is opgekweekt. Soms moet het deel van de plant dat wordt geïnfecteerd voorbehandeld worden, bijvoorbeeld door verwondingen aan te brengen die het binnendringen van het weefsel door het pathogeen vergemakkelijkt.

Omstandigheden

De mate en snelheid van infectie/besmetting en symptoomontwikkeling in de plant is afhankelijk van de omstandigheden, die daarom gereguleerd en/of gemeten moeten worden. Enkele belangrijke factoren zijn hierbij: temperatuur, lichtsterkte, lichtkwaliteit, daglengte, luchtvochtigheid en de samenstelling van de aarde of het kweekmedium.

Het meten van ziekte

Proefopzet

Een biotoets heeft een bepaald doel, bijvoorbeeld het bepalen van de mate van **gevoeligheid** of **resistentie** van bepaalde cultivars van een gewas voor een bepaalde **ziekteverwekker**. Om het doel van een biotoets te kunnen bereiken is het noodzakelijk om in ieder geval de volgende zaken van te voren te bepalen: (1) de keuze van **positieve**

controles en **negatieve controles**, (2) het aantal planten per infectie/besmetting (zie hieronder over **betrouwbaarheid**), (3) de methode van infectie/besmetting, (4) de manier en tijdsbestek van opkweken van de te infecteren planten, (5) de omstandigheden tijdens de biotoets en het tijdsbestek ervan, (6) de inrichting van de ruimte (**randomisering**), (7) wijze van labeling van de planten, (8) eventuele maatregelen tegen kruisbesmetting en inperking van het pathogeen of het plaag-organisme.

Kwalitatieve beoordeling

In veel gevallen worden symptomen kwalitatief beoordeeld. Dat wil zeggen, er worden geen kwantitatieve metingen gedaan maar er wordt gebruik gemaakt van een **ziekte-index**, om de mate van zichtbare aantasting van de plant of het weefsel te classificeren. Dit kan vele vormen aannemen – voorbeelden zijn: hoeveelheid bladoppervlakte dat dood of vergeeld is, of sporulatie (van schimmel of oömyceet) vertoont; mate van verwelking; mate van verkleuring; geschatte grootte van een **lesie**. Doorgaans worden rond de vijf categorieën onderscheiden. Het is belangrijk om per categorie een voorbeeld (foto) te hebben, zodat de stabiliteit van de indeling door verschillende personen en door de jaren heen gewaarborgd blijft.

Kwantificeren

Als het mogelijk is, is het wenselijk om (ook) kwantitatief de mate van aantasting van een plant vast te stellen. Ook dit kan vele vormen aannemen, zoals het wegen van een (deel van) een plant, het meten van de grootte van lesies, het (met camera en software) meten van (totaal) bladoppervlak en/of het percentage van een blad dat is verkleurd, het tellen van het aantal cysten, insecten, mijten, eieren per wortelstelsel, blad, plant etc., of het meten van de hoeveelheid pathogeen per gram plantenweefsel (bijvoorbeeld middels qPCR, 'colony-forming units').

Betrouwbaarheid

Elke meting heeft een mate van **betrouwbaarheid**. Op het eerste oog kan er een kwalitatief verschil worden waargenomen in de mate van aantasting tussen controle planten (negatieve controle) en geïnfecteerde of besmette planten of tussen verschillende infecties of besmettingen, en vrijwel altijd zijn er kwantitatieve verschillen tussen individuele metingen en tussen gemiddelden van meerdere metingen. Het is echter essentieel dat de **mate van betrouwbaarheid** van dergelijke verschillen wordt vastgesteld. Deze betrouwbaarheid kan worden bepaald met een statistische toets en wordt dan met het woord **significantie** aangegeven, vaak uitgedrukt in een zogenaamde **p-waarde**. Een p-waarde geeft de kans aan dat een gemeten verschil door *toeval* is ontstaan in plaats van door een *werkelijk* verschil in gevoeligheid van de plant of virulentie van het pathogeen (dus hoe kleiner de p-waarde, hoe groter de betrouwbaarheid!)[2]. Afhankelijk van de soort meting (kwalitatief of kwantitatief) en het

[2] Vaak wordt een verschil 'statistisch significant' of gewoon 'significant' genoemd als de p-waarde kleiner is dan 0,05 (dus een kans van 1 op 20 of minder dat het verschil door toeval is ontstaan)

aantal groepen dat wordt vergeleken zal een bepaalde statistische toets moeten worden gebruikt.

Noteren en bewaren van resultaten

Het is vaak van belang om resultaten van eerder uitgevoerde biotoetsen te raadplegen alvorens een nieuwe biotoets uit te voeren. Om dat te kunnen doen is het essentieel dat die resultaten correct worden genoteerd en dat ze op een begrijpelijke en toegankelijke manier worden bewaard. Daarbij is het van belang om niet alleen de ruwe en bewerkte resultaten en de datum van de proef te noteren, maar ook alle bekende gegevens over het pathogeen, het inoculum, de planten, de kweekmethode, de infectiemethode, de omstandigheden van de proef, de proefopzet en de meetmethode.

Veiligheid

Voorzorgsmaatregelen

Ziekten en plagen van planten zijn doorgaans niet gevaarlijk voor mensen, maar sommigen komen niet in Nederland voor en mogen zich daarom in geen geval verspreiden buiten de ruimten die voor de biotoets worden gebruikt. Bovendien kan verspreiding of overleving van een pathogeen of plaagorganisme na een biotoets problemen veroorzaken voor andere biotoetsen die naderhand in de betreffende ruimte worden uitgevoerd. Maatregelen dienen daarom genomen te worden om elke verspreiding van een pathogeen of plaagorganisme, of de overleving ervan te voorkomen. Dat betreft de ruimte waar de toets wordt gedaan en tevens de ruimte waar het pathogeen of plaagorganisme wordt opgekweekt en tijdens het vervoer tussen ruimtes. Hier horen onder andere bij: goede afsluiting van ruimtes en containers, sterilisaties van al het gebruikte materiaal onmiddellijk na gebruik en vernietiging van planten na afloop van de biotoets.

Aanvulling William Quaedvlieg: Als een organisme een quarantaine of quarantaine waardige status heeft mag dit alleen maar met de juiste vergunning en onder de strengste insluiting en hygiëne maatregelen voor biotoetsen worden gebruikt. Alle andere organismen hebben wettelijk gezien geen enkele status en mogen dan ook zonder verdere voor extra regelgeving vrij voor biotoetsen worden gebruikt. Binnen dit rapport wordt een nuance aangebracht tussen goede algemene hygiëne maatregelen en wettelijk vereiste (hygiëne) maatregelen. Een normaal bedrijf zal namelijk vrijwel nooit de mogelijkheid hebben om het gebruikte materiaal voor afvoer te steriliseren en dat zal wettelijk gezien ook vrijwel nooit nodig zijn. Het verstandig afvoeren van toets materiaal is voor bedrijven daarom veel belangrijker dan nadruk leggen op het steriliseren van het afval wat bijvoorbeeld een universiteit of wij bij Royal van Zanten in sommige gevallen wel doen als we met een Q-organisme werken.

In alle andere gevallen zou ik persoonlijk het afval hygiënisch in een aparte, afgesloten groene container afvoeren en deze even reinigen na gebruik. Ziek of geïnfecteerd materiaal dus bijvoorbeeld niet bij het algemene groen afval gooien als dit een redelijkerwijs verspreidingsrisico met zich meebrengt. Zie verder register Q-organismen

op de NVWA website voor verdere details over organismen die een aparte vergunning nodig hebben.

Inspectie en maatregelen

Ondanks genomen voorzorgsmaatregelen is het mogelijk dat overleving of verspreiding heeft plaatsgevonden. Inspectie is daarom nodig om mogelijke overleving of verspreiding van met name plaagorganismen vast te stellen. In zo een geval dient de ruimte waarin verspreiding of overleving heeft plaatsgevonden volledig te worden gesteriliseerd.

FUSARIUM, BOTRYTIS EN TRIPS

Fusarium

Fusarium is een **genus** van schimmels waarbinnen zeer veel plant-pathogene soorten voorkomen (Summerell, 2019). De focus in dit rapport is de soort *Fusarium oxysporum* (Fo) die **verwelkingsziekte**, **wortelrot** of **bolrot** kan veroorzaken in zeer veel verschillende gewassen, met name in de groenteteelt en sierteelt, maar ook bijvoorbeeld in banaan en dadelpalm (Michielse and Rep, 2009). Van Fo is geen seksueel stadium bekend, hoewel er wel aanwijzingen zijn dat een bepaalde vorm van genetische recombinatie kan plaatsvinden (Laurence et al., 2014). Omdat in afwezigheid van een seksuele cyclus soortgrenzen niet goed kunnen worden vastgesteld, wordt vaak gesproken over het Fo **soortencomplex**, die een (enorm) groot aantal **klonale lijnen** herbergt. Elke klonale lijn heeft een unieke genetische samenstelling, en elk **isolaat** of **stam** behoort dus tot een klonale lijn.

Belangrijk om te beseffen is dat verreweg de meeste klonale lijnen van Fo niet pathogeen zijn. Deze niet-pathogene klonale lijnen van Fo komen algemeen voor in de bodem en als **endofyt** in wortels, zonder schade te veroorzaken. Klonale lijnen die wel ziekte veroorzaken worden gegroepeerd naar waardplant. Zo zijn er bijvoorbeeld vijf klonale lijnen bekend die verwelkingsziekte in tomaat kunnen veroorzaken, en deze staan tezamen bekend als Fo *forma specialis lycopersici* oftewel Fol (Biju et al., 2017). Veel gewassen kennen dus hun eigen ***forma specialis*** van Fo, die uit één of meerdere klonale lijnen kan bestaan. Zo is er één klonale lijn bekend die ziekte veroorzaakt in tulp (Fo *forma specialis tulipae*). Het vermogen van sommige klonale lijnen van Fo om ziekte te veroorzaken op een specifieke waardplant ligt in de aanwezigheid van specifieke **virulentiegenen** in het DNA van de schimmel, die gegroepeerd liggen op **pathogeniteits-chromosomen** (van Dam et al., 2017). Omdat Fo in de grond zit en wortels of bollen binnendringt, kan deze worden bestreden door **grondontsmetting**.

De ideale manier om Fo ziekten te beheersen is echter de ontwikkeling of identificatie van resistente of tolerante cultivars. Er worden ook pogingen gedaan om Fo-ziekten te beheersen door het toevoegen van bepaalde bacteriën of schimmels aan de bodem of aan de plant (***biocontrol***) (Bubici et al., 2019). Fo kan gemakkelijk gekweekt worden op eenvoudige voedingsbodems (vast of vloeibaar). De meeste stammen maken **sporen** en deze kunnen bij -80°C tientallen jaren worden bewaard. Bij biotoetsen worden doorgaans de wortels van de waardplant (al dan niet beschadigd) gedompeld in een **sporensuspensie** met een bekende concentratie van sporen (doorgaans variërend van 10^5 tot 10^7 per ml). Soms wordt het **mycelium** gebruikt om bijvoorbeeld bollen te infecteren. **Symptomen** zijn (een combinatie van) wortelrot, bolrot, vaatverbruining, groeiremming, verwelking en/of afsterving.

Botrytis

Botrytis is een **genus** van c.a. 67 schimmelsoorten waarvan het merendeel plant-pathogene soorten zijn. De meest voorkomende en schadelijke soort is *Botrytis cinerea* (ook “grauwe schimmel” genoemd) die **vruchtrot** kan veroorzaken in honderden gewassen, met name in zacht fruit (aardbei), groente (tomaat) en siergewassen (lelie, tulp, chrysant) (Williamson et al., 2007). De schade veroorzaakt door *Botrytis* loopt in de miljarden Euro/jaar (Dean et al., 2012).

Van *Botrytis cinerea* is een seksueel stadium bekend, hoewel dit niet vaak wordt gevonden in het veld. Toch is duidelijk dat in het veld regelmatig genetische recombinatie plaatsvindt. Soortgrenzen in *Botrytis cinerea* kunnen niet goed worden vastgesteld, en wordt gesproken over het *Botrytis cinerea* **soortencomplex**, waarin een groot aantal genetisch verwante maar verschillende **lijnen** aanwezig zijn (Walker 2016). Hoewel de soort *Botrytis cinerea* vele honderden gewassen kan infecteren, is er tussen *Botrytis cinerea* **isolaten** verschil in hun **pathogeniteit** op individuele waardplanten. Er is vaak sprake van **waardplant voorkeur**, maar die is niet absoluut. Een isolaat afkomstig van tomaat infecteert over het algemeen tomaat beter dan druif, maar kan ook een druif flink ziek maken.

Daarnaast zijn er andere *Botrytis* soorten die specifiek één gewas aantasten. Daarbij gaat het vooral om bolgewassen, zoals tulp (*Botrytis tulipae*), ui (*Botrytis squamosa*) en pioenroos (*Botrytis paeoniae*) (Hyde et al., 2014). *Botrytis cinerea* en andere *Botrytis* soorten verspreiden zich bovengronds d.m.v. **sporen** die met de wind worden meegevoerd. Eén zwaar geïnfecteerde plant kan in een week gemakkelijk 1 miljard nieuwe *Botrytis* sporen produceren. Bestrijding is vaak met chemische middelen. **Biologische bestrijding** is in meerdere landen ontwikkeld, maar is vaak slechts op bepaalde gewassen en in bepaalde klimaatgebieden effectief.

Botrytis cinerea kan gemakkelijk gekweekt worden op simpele voedingsbodems (vast of vloeibaar). De meeste stammen maken **sporen** en deze kunnen bij -80°C tientallen jaren worden bewaard. Bij biotoetsen worden doorgaans de bladeren (Benito et al. 1998), bloemen of vruchten geïnfecteerd met een **sporensuspensie** met een bekende concentratie van sporen (doorgaans variërend van 10^4 tot 10^6 per ml). **Symptomen** zijn (een combinatie van) bladnecrose, bladrot, vruchtrot, bloemrot en bloemverwelking (Williamson et al., 2007).

Trips

Tripsen (Thysanoptera: Thripidae) zijn veel voorkomende zuigende en vliegende insecten welke wereldwijd verantwoordelijk zijn voor enorme economische schades bij een grote verscheidenheid aan sierteelt- en voedselgewassen. Er zijn meer dan 5000 soorten van Tripsen bekend en zowel de volwassen insecten als de larven leven op voedingsstoffen uit plantensap. Om bij dit sap te komen prikken ze met hun scherpe monddelen individuele plantencellen aan om de inhoud hiervan op te zuigen. Hierdoor raken cellen beschadigd en/of sterven af wat een kenmerkend zilvergrijs vlekje op de plant achterlaat, dit soort schade wordt dan ook wel zilverschade genoemd. Als Tripsen in grote aantallen voorkomen kan de som van al deze kleine zuigschades ertoe leiden dat aangetaste planten in groei achterblijven en een gereduceerde opbrengst teweeg brengen. Buiten deze directe groeischade kunnen Tripsen ook indirect blad, bloem en vruchtschade veroorzaken.

Omdat Tripsen thigmotaxis gedrag vertonen (ze verstoppen zich graag in dicht gewas zoals bijvoorbeeld knoppen en bloemen) veroorzaken ze relatief veel schade aan deze vaak snelgroeiende plantdelen. Als deze actief delende cellen in deze jonge plantdelen beschadigd raken of afsterven kan er asymmetrische celdeling en dus grillige groei in een jonge vrucht, blad of bloem optreden welke in de groenteteelt tot lelijk fruit en in de sierteelt tot asymmetrische planten en bloemen met een lagere sierwaarde leidt (Reitz 2009; Cook, Herbert et al. 2011).

Frankliniella occidentalis (Californische Trips) is één van de meest schadelijke Trips soorten ter wereld . Door zijn snelle reproductievermogen, hoge invasiviteit, brede waardplanten range, insecticide resistenties en het vermogen om efficiënt planten virussen te verspreiden is deze soort de afgelopen 30 jaar zelfs uitgegroeid tot één van de belangrijkste plaaginsecten te wereld. F. occidentalis bezit een breed scala aan enzymen waarmee ze belangrijke plant verdedigingsstoffen tegen insecten in hun

maagdarmkanaal kunnen afbreken en hierdoor komen ze dan ook op meer dan 500 verschillende sier- en voedselgewassen voor (Li, Schuler et al. 2007; Reitz 2009).
De levensduur van een volwassen F. occidentalis is relatief kort (gemiddeld 40 dagen voor een vrouwtje onder laboratorium condities) waardoor ze zich zeer snel kunnen reproduceren (maximaal 15 generaties per jaar) (www.cabi.org). F. occidentalis kan vrieskou overleven en begint met voortplanten zodra de temperatuur boven de 8-10°C komt. Een volwassen vrouwtje legt afhankelijk van de temperatuur ongeveer 2 tot 10 eieren per dag (in o.a. kroonbladeren, kelkbladeren en jong ontwikkelend fruit) waaruit zich dan na 3 tot 4 dagen een larve ontwikkelt. Bij een optimumtemperatuur van 25-30°C kan de generatietijd van ei naar volwassen Trips slechts 9 tot 13 dagen bedragen (Reitz 2009).

Pollen fungeren voor F. occidentalis als een extra eiwit voedingsbron en zorgt ervoor dat vrouwtjes extra eieren leggen, dat larven sneller groeien en dat de generatietijd dus nog verder wordt verkort (Trichilo and Leigh 1988). De combinatie hoge temperatuur en bloeiend gewas kan dan ook tot een explosieve groei van een aanwezige F. occidentalis populatie leiden (Hulshof and Vänninen 2002).

F. occidentalis larven en volwassenen verstoppen zich graag in het gewas en zijn hierdoor relatief lastig te bestrijden aangezien bestrijdingsmiddelen deze gedeeltes van de plant vaak niet goed kunnen bereiken. Deze combinatie van lastige chemische bestrijding en korte generatietijd leidt ertoe dat resistenties tegen chemische bestrijdingsmiddelen relatief gemakkelijk kunnen ontstaan en dit heeft er de afgelopen decennia toe geleid dat een oorspronkelijke resistente Californische F. occidentalis populatie zich over vrijwel de gehele wereld heeft weten te verspreiden (Jensen 2000).

Buiten de groeischade die ze kunnen toebrengen zijn Tripsen zelf ook nog eens belangrijke vectoren (verspreiders) van minimaal vijf economisch zeer schadelijke orthotospovirussen waar bijvoorbeeld TSWV (tomatenbronsvlekkenvirus) ook toe behoort. TSWV is evolutionair gezien zelfs zo nauw met F. occidentalis verbonden dat dit plantenvirus zich in de speekselklieren van F. occidentalis kan vermeerderen zonder dat de Trips hier zelf schade van ondervindt. Dit mechanisme zorgt er voor dat een systemisch geïnfecteerde Trips gedurende zijn hele levensduur TSWV besmettelijk blijft (Reitz 2009; Margaria, Bosco et al. 2014).

De combinatie van al deze factoren en het feit dat er steeds minder bestrijdingsmiddelen op de markt zijn, heeft ervoor gezorgd dat het vinden van F. occidentalis resistente gewassen de afgelopen jaren een steeds hogere prioriteit heeft

gekregen. Het lastige aan deze eigenschap is dat men deze eigenlijk alleen kan kwantificeren door naar de Trips ontwikkelingssnelheid en mortaliteit op het gewas zelf te kijken en hiervoor moet dus de interactie tussen Trips en het gewas bestudeerd worden. Naarmate een gewas namelijk beter Trips resistent is zal de Trips ontwikkelingssnelheid afnemen en de mortaliteit de 100% steeds dichter gaan benaderen en zal er een punt zijn waarop er dus geen Trips reproductie meer in dit gewas kan plaatsvinden.

Om de ontwikkelingssnelheid en mortaliteit echter betrouwbaar te kunnen toetsen zal er echter in een gesloten systeem moeten worden getoetst zodat Trips in- of uitvlieg de toets uitslagen niet kunnen beïnvloeden.

In de groenteteelt (o.a. paprika) worden Trips resistentietoetsen dan ook vaak via “detached leaf assays” op bladponsen in petrischalen uitgevoerd (Abd-El-Haliem, Hoogstrate et al. 2018; Haperen, Voorrips et al. 2019) maar in de sierteelt komt het ook vaak voor dat deze toetsen op complete planten in zogenaamde insecten tenten plaatsvinden. De petrischalen methode geeft over het algemeen betere en snellere resultaten maar is niet geschikt voor alle gewassen aangezien een bladpons bijvoorbeeld door stress niet voor alle gewassen dezelfde Trips resistentie score zal laten zien als een gehele plant. Dit zal per individueel gewas moeten worden uitgezocht.

Het opzetten van een F. occidentalis resistentietoets vergt als eerste dat er een stabiele F. occidentalis populatie kan worden aangehouden in een met licht uitgeruste klimaat cel of kiemkast welke op een constante temperatuur van 25°C en een relatieve luchtvochtigheid van 70% kan worden ingesteld. Hierin kunnen dan kooien of bakken met sperziebonen, Chrysanten of snackkomkommers worden geplaatst waarmee Tripsen zich kunnen voeden en op kunnen voortplanten. Uit deze populatie kunnen dan bijvoorbeeld na 24 uur blootstelling aan snackkomkommers, Trips eieren worden geïsoleerd waaruit zich dan na 4 dagen Trips larven ontwikkelen. Per detached leaf assay kunnen dan vijf larven op een bladpons worden uitgezet .

Na 3 , 5 en 7 dagen pons blootstelling kan dan microscopisch de mortaliteit en de ontwikkelingssnelheid van de uitgezette larven worden gescoord om zodoende te kunnen bepalen of het onderzochte plantenras een hogere of lagere mortaliteit/ontwikkelingssnelheid heeft ten opzichte van een referentie ras en dus meer of minder F. occidentalis resistent is (Haperen, Voorrips et al. 2019). Dit type onderzoek staat los van een trips schade gevoeligheidstoets waarbij de trips schade gevoeligheid van planten wordt onderzocht en niet zozeer een echter resistentie tegen trips reproductie. Als een plant namelijk redelijk ongevoelig is voor trips schade wil dit niet zeggen dat tripsen zich hier niet minder succesvol op kunnen voortplanten. Deze eigenschappen zijn namelijk maar zeer zelden aan elkaar gelinkt.

Royal Van Zanten. Dr. William Quaedvlieg
Hoe voer je een simpele *Fusarium (oxysporum)* biotoets uit?

Inleiding
Het ontwikkelen en uitvoeren van een *Fusarium oxysporum* (F.o.) biotoets is een relatief simpel proces. Veruit de grootse moeilijkheid binnen dit proces bestaat uit het initieel verkrijgen, karakteriseren en langdurig opslaan van de benodigde F.o. isolaten waarmee dan vervolgens een biotoets kan worden uitgevoerd. Als deze collectie echter eenmaal is aangelegd en gekarakteriseerd, is het voorbereiden en uitvoeren van de fysieke biotoets zelf een vrij standaard procedure.

Het opzetten en uitvoeren van F.o. biotoetsen bestaat wezenlijk uit vier fases:
1) Het inventariseren van de al beschikbare telerskennis qua F.o. gevoelige rassen .
2) Het aanleggen van een eigen F.o . collectie.
3) Het karakteriseren van de pathogeniciteit van de gevonden F.o. isolaten.
4) Het voorbereiden, uitvoeren en scoren van een F.o. biotoets.

In de onderstaande paragrafen zullen elk van deze fases in een kort protocol beschreven worden waarmee deze dan succesvol kunnen worden doorlopen. Deze protocollen worden bewust zo simpel mogelijk gehouden om zodoende elke organisatie die zijn eigen F.o. biotoetsen wil gaan opzetten, dit met zo weinig mogelijk middelen te kunnen laten uitvoeren. Men zal er echter niet aan kunnen ontkomen om hiervoor een minimale laboratorium inrichting en apparatuur tot de beschikking te hebben. Indien deze middelen niet beschikbaar zijn zou men dit werk initieel bijvoorbeeld aan een commerciële partij zoals Vertify, Naktuinbouw of het Westerdijk instituut kunnen uitbesteden maar op de langere termijn is het aan te raden om hier zelf in te investeren. Er is namelijk genoeg kwalitatief goede tweedehands laboratoriumapparatuur in omloop om dit proces met een relatief kleine investering zelf te kunnen doorlopen.

Laboratorium benodigdheden voor het opzetten van een F.o biotoets:
- Bunsenbrander met gaspatroon.
- Simpele microscoop (max 400X) met licht en toebehoren.
- Neubauer telkamer.
- Stoof of warme kamer (25°C).
- Scalpels, lange naalden en pincetten.
- 300ml erlenmeyers.
- Snelkookpan of tafel autoklaaf.
- Afsluitbare reageerbuizen.
- Petrischalen.
- Zeven met een diameter van 6, 3 en 1 mm.
- Miracloth.
- Spiritus of 70% ethanol.
- Blender.
- Water agrar platen (20 gram Micro Agar/agar-agar in 1 liter water autoclaveren).
- Ongekookte rijst.

In onderstaand protocollen zal voor kwalitatief hoge microscopische F.o. foto's worden doorverwezen naar specifieke fotoplaten in het gratis toegankelijke 2018 Persoonia artikel: "Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos" geschreven door Lombard et all. Door de naam van dit artikel online te zoeken is dit snel en gemakkelijk te verkrijgen.

Het inventariseren van de al beschikbare telerskennis qua F.o. gevoelige rassen
Binnen vrijwel elke organisatie is er een zekere mate van institutionele of anekdotische "telerskennis" beschikbaar over welke rassen er in meer of mindere mate F.o. gevoelig zijn voordat dat er ooit maar één enkele F.o. biotoets is uitgevoerd. Voordat er begonnen wordt met het ontwikkelen en uitvoeren van een eigen F.o. biotoets is het belangrijk om deze informatie zoveel mogelijk in kaart te brengen. Deze kennis dient namelijk initieel als basis voor het isoleren en karakteriseren van F.o. isolaten en het opzetten van de biotoets zelf. Binnen deze procesfases is het namelijk van belang om:

- Op de juiste locatie en uit het juiste gewas interessante F.o. isolaten te isoleren.
- Qua F.o. gevoeligheid een representatief referentiepanel te gebruiken (zwaar, matig en licht vatbare planten).

Als men namelijk op zoek gaat naar F.o. isolaten is het van belang om dit te doen op een locatie die bekend staat als F.o. problematisch voor het te veredelen gewas aangezien de Fusarium druk op deze locatie dan waarschijnlijk hoog zal zijn en dit zorgt ervoor dat de kans op het vinden van een sterk pathogeen F.o. isolaat dan ook veel hoger ligt dan bij een monster uit een niet problematische locatie. Voor het karakteriseren van de isolaten en het opzetten van de toets zelf is het van belang om alvast wat basiskennis te hebben over mogelijke referentierassen die tijdens deze toetsen gebruikt kunnen worden.

Het karakteriseren van de pathogeniciteit van de gevonden F.o. isolaten gebeurt namelijk aan de hand van de mate van ziekteverschijnselen die de isolaten op een panel referentierassen met verschillende Fusarium gevoeligheden (zwaar, matig en licht vatbaar) veroorzaken. Een zwak pathogeen F.o. isolaat zal namelijk wel bij een zeer vatbaar ras sterke symptomen kunnen veroorzaken, maar deze zullen veel minder sterk zijn bij wat minder vatbare rassen. Een sterker pathogeen F.o. isolaat zal daarentegen zowel bij een zeer vatbaar als bij een wat minder vatbaar ras sterke symptomen kunnen veroorzaken. Naarmate er meer biotoetsen uitgevoerd worden zal er qua Fusarium gevoeligheden steeds meer kennis beschikbaar komen waaraan het panel referentierassen dan aangepast kan worden maar vooral aan het begin van dit proces zal men hiervoor vooral op institutionele of anekdotische kennis aangewezen zijn.

Het aanleggen van een eigen F.o. collectie
Om F.o. isolaten te kunnen isoleren dient er bij voorkeur F.o. symptomatisch materiaal uit een "problematische" locatie bemonsterd te worden. Hierbij dienen dan ook nog eens bij voorkeur rassen bemonsterd te worden die relatief weinig Fusarium gevoelig zijn (grotere kans om een sterker pathogeen F.o. isolaat te vinden). Van deze planten wordt dan laag in de stengel een stengelmonsters van ongeveer 10 cm lengte genomen dat dan vervolgens in het lab verder kan worden opgewerkt. In het lab worden dan binnen een steriele omgeving (bij een brandende Bunsenbrander) deze F.o. symptomatische stengelstukjes in stukjes van

c.a. 6mm lang gesneden en gedurende 30 seconden met 70% ethanol ontsmet en dan m.b.v. een steriele pincet steriel op een Water Agar plaat (WA) uitgelegd.
Als dit aangetaste stengelstukje dan inderdaad een Fusarium isolaat bevat dan zal hier dan na een dag of vijf incuberen bij 25°C een schimmel uitgroeien die op WA voornamelijk banaanvormige (macro)sporen produceert (zie figuur 15r op pagina 32 van Lombard et all.).

Er zijn honderden Fusarium soorten bekend maar op Nederlands materiaal kan F.o. ruwweg worden herkend doordat de conidiogene cellen waaraan deze banaanvormige sporen worden gevormd (flesvormige structuurtjes waaraan deze sporen "groeien") ongeveer even lang zijn als de sporen zelf (zie figuur 15h op pagina 32 van Lombard et all.). Deze ruwe identificatie methode is zeker niet perfect maar goed genoeg om een initiële collectie aan te leggen die nog verder gekarakteriseerd gaat worden.

Van deze Fusarium soort kan dan vervolgens een rijnkweek gemaakt worden door deze naar een nieuwe WA plaat over te zetten. De geïsoleerde Fusarium isolaten kunnen o.a. worden opgeslagen door deze een week lang bij 25°C in een steriele reageerbuis met WA te laten groeien om deze buis daarna met gesteriliseerde paraffineolie te vullen en af te sluiten. De paraffineolie zorgt er dan voor dat er geen extra zuurstof bij de schimmel kan komen en dat er geen vocht meer uit het medium kan verdampen.

De schimmel gaat hierdoor in een soort fysiologische winterslaap waarin deze op kamertemperatuur enkele jaren kan overleven. Om deze schimmel dan weer in kweek te brengen hoeft er enkel met een steriele naald wat schimmelmateriaal onder de olie vandaan te worden gehaald en op een WA plaat te worden aangeënt waarnaar de schimmel weer actief gaat groeien.

Het karakteriseren van de gevonden F.o. isolaten
Om vast te kunnen stellen of een gevonden Fusarium isolaat inderdaad pathogeen is op een gewas en hoe zwaar pathogeen dit isolaat dan ook werkelijk is, zal deze op het eerder genoemde referentiepanel getoetst moeten worden. Hiervoor moet het schimmelweefsel eerst vermeerderd worden tot er genoeg inoculum schimmelsporen zijn gevormd om hiermee grond te kunnen besmetten (inoculeren). Over het algemeen wordt hiervoor een inoculum concentratie van 10^6 sporen per milliliter gebruikt . Met deze sporen worden vervolgens de individuele potten met grond/substraat geïnoculeerd (bijvoorbeeld 20 milliliter per pot) waarin dan vervolgens in drievoud referentiepanel planten kunnen worden gepoot.

Omdat een plant pathogeen interactie zeer milieu afhankelijk is zal binnen elke biotoets een zekere mate van variatie per toets optreden (bijvoorbeeld maar twee van de drie geïnoculeerde planten worden ziek) en daarom is het nodig om binnen een toets altijd met een aantal herhalingen te werken om zodoende betrouwbaar te kunnen toetsen.

Om genoeg toets inoculum te produceren worden de te karakteriseren Fusarium isolaten individueel bij 25°C in een rijstmedium opgekweekt (40 gram ongekookte rijst samen met 50 ml water in een 300ml erlenmeyer autoklaveren) waarin dan na c.a. vijf dagen een sporendichtheid van rond de 10^{7-8} sporen per milliliter aan kleinere, ovaal tot langwerpige Fusarium sporen (microconidia) is ontstaan (zie figuur 15q op pagina 32 van Lombard et

all.). Deze sporendichtheid kan o.a. doormiddel van een microscoop en een Neubauer telkamer worden bepaald. Hierna word deze cultuur met 200ml water in een blender gehomogeniseerd en doormiddel van enkele zeefstappen van 6,3 en 1mm, opgevolgd door een laatste miracloth zeefstap, kunnen hier dan de aanwezige Fusarium micro sporen uit worden geïsoleerd en met water verdund tot een dichtheid van 10^6 sporen per milliliter.

Mits gekoeld kunnen deze sporen enkele dagen in deze suspensie bewaard worden. Een bepaald volume van deze sporensuspensie (bijvoorbeeld 20 milliliter) kan vervolgens worden gebruikt om potten met substraat mee te inoculeren waarop het te toetsen gewas dan geplant kan worden. Indien het gebruikte Fusarium isolaat dan inderdaad pathogeen is op dit betreffende gewas zullen er na X weken (gewas en temperatuur afhankelijk) dan Fusarium achtige ziekteverschijnselen (meestal verwelking) in dit gewas optreden die dan per plant aan de hand van een scoringslijst kunnen worden geregistreerd. Het meest agressieve Fusarium isolaat zal hierbij dan binnen het panel de sterkste symptomen laten zien en dit isolaat zal dan meestal ook het beste isolaat zijn om betrouwbare en herhaalbare biotoetsen mee uit te voeren.

Een scoringslijst bestaat bijvoorbeeld uit vier categorieën waarbij de eerste categorie dan bestaat uit planten die geen symptomen laten zien, de twee categorie bestaat uit planten die matige symptomen laten zien, de derde categorie bestaat uit planten zware symptomen laten zien en de vierde categorie bestaan dan bijvoorbeeld uit planten die dood zijn.

Het voorbereiden, uitvoeren en scoren van een F.o. biotoets
Het voorbereiden, uitvoeren en scoren van een standaard F.o. biotoets gebeurt feitelijk op dezelfde manier als het karakteriseren van Fusarium isolaten, alleen op een grotere schaal. Zo worden er dan i.p.v. één enkele 300ml erlenmeyer met rijst medium per isolaat bijvoorbeeld tien erlenmeyers gebruikt om het benodigde inoculum uit te bouwen aangezien er voor een grotere routinematige toets simpelweg ook veel meer inoculum nodig zal zijn.

Verdere verloopt een standaard Fusarium biotoets vrijwel precies hetzelfde als de hierboven beschreven karakterisering procedure (inoculum maken, grond inoculeren, planten in drievoud poten en dan na x weken ziekteverschijnselen scoren) alleen op een grotere schaal. Hierbij is het ook weer belangrijk om een panel met licht, matig en zwaar vatbaar materiaal als controles mee te nemen om te kunnen beoordelen hoe goed de biotoets over het algemeen is verlopen. Hoe beter een biotoets namelijk is verlopen, hoe meer symptomen er binnen dit vatbare panel zullen ontstaan. Mochten deze controle planten echter geen- of maar minimale symptomen laten zien dan geeft dit aan dat de biotoets suboptimaal is verlopen en dat de resultaten hiervan dan ook niet heel betrouwbaar zullen zijn en beter herhaald zouden moeten worden.

Aan de hand van de verkregen Fusarium resistentiedata kan dan een F.o. veredelingsprogramma worden opgezet door constant te selecteren op- en te kruisen met planten die in deze toets de minste F.o. symptomen laten zien. Hierdoor zal er dan na enkele generaties selecteren een hoger F.o. resistentie niveau binnen het betreffende gewas gaan optreden.

Royal van Zanten. Dr. William Quaedvlieg.
Hoe voer je een simpele *Botrytis cinerea* biotoets uit?

Inleiding
Het ontwikkelen en uitvoeren van een *Botrytis cinerea* (B.c.) biotoets is een relatief simpel proces. Veruit de grootse moeilijkheid binnen dit proces bestaat uit het initieel verkrijgen, karakteriseren en langdurig opslaan van de benodigde B.c. isolaten waarmee dan vervolgens een biotoets kan worden uitgevoerd. Als deze collectie echter eenmaal is aangelegd en gekarakteriseerd, is het voorbereiden en uitvoeren van de fysieke biotoets zelf een vrij standaard procedure.

Het opzetten en uitvoeren van een B.c. biotoetsen bestaat wezenlijk uit vier fases:

1) Het inventariseren van de al beschikbare telerskennis qua B.c. gevoelige rassen .
2) Het aanleggen van een eigen B.c. collectie.
3) Het karakteriseren van de pathogeniteit van de gevonden B.c. isolaten.
4) Het voorbereiden, uitvoeren en scoren van een B.c. biotoets.

In de onderstaande paragrafen zullen elk van deze fases in een kort protocol beschreven worden waarmee deze dan succesvol kunnen worden doorlopen. Deze protocollen worden bewust zo simpel mogelijk gehouden om zodoende elke organisatie die zijn eigen B.c. biotoetsen wil gaan opzetten, dit met zo weinig mogelijk middelen te kunnen laten uitvoeren.

Men zal er echter niet aan kunnen ontkomen om hiervoor een minimale laboratorium inrichting en apparatuur tot de beschikking te hebben. Indien deze middelen niet beschikbaar zijn zou men dit werk initieel bijvoorbeeld aan een commerciële partij zoals Vertify, Naktuinbouw of het Westerdijk instituut kunnen uitbesteden maar op de langere termijn is het aan te raden om hier zelf in te investeren. Er is namelijk genoeg kwalitatief goede tweedehands laboratoriumapparatuur in omloop om dit proces met een relatief kleine investering zelf te kunnen doorlopen.

Laboratorium benodigdheden voor het opzetten van een *Botrytis cinerea* biotoets:
- Simpele kunstof 2- of 3ml pipetten
- Bunsenbrander met gaspatroon.
- Simpele microscoop (max 400X) met toebehoren.
- Neubauer telkamer.
- Stoof of warme kamer (15 tot 24°C).
- Scalpels, lange naalden en pincetten.
- Snelkookpan of tafel autoklaaf.
- Afsluitbare reageerbuizen.
- Petrischalen.
- Miracloth.
- Spiritus of 70% ethanol.
- Kleine kunststof of glazen trechter (c.a. 50ml inhoud).

- V8 medium platen (15 gram Micro Agar/agar-agar plus 2 gram $CaCO_3$ autoclaveren in 800 ml water en 200 ml biologisch tomatensap)
- Tween 20.
- Metalen of glazen drigalski spatel.
- Glucose.
- 2 tot 10ul pipet en pipetpunten.

In onderstaand protocol zal voor kwalitatief hoge microscopische B.c. foto's worden doorverwezen naar specifieke fotoplaten in het gratis toegankelijke 2019, "Plant disease" artikel "Phenotypic and Genetic Characterization of Botrytis cinerea Population from Kiwifruit in Sichuan Province, China" geschreven door Yan-gang Pei et all. Door de naam van dit artikel online te zoeken is dit snel en gemakkelijk te verkrijgen.

Het inventariseren van de al beschikbare telerskennis qua *Botrytis cinerea* gevoelige rassen

Binnen vrijwel elke organisatie is er een zekere mate van institutionele of anekdotische "telerskennis" beschikbaar over welke rassen er in meer of mindere mate B.c. gevoelig zijn voordat dat er ooit maar één enkele B.c. biotoets is uitgevoerd. Voordat er begonnen wordt met het ontwikkelen en uitvoeren van een eigen B.c. biotoets is het belangrijk om deze informatie zoveel mogelijk in kaart te brengen. Deze kennis dient namelijk initieel als basis voor het isoleren en karakteriseren van B.c. isolaten en het opzetten van de biotoets zelf.

Binnen deze procesfases is het namelijk van belang om:

- Op de juiste locatie en uit het juiste gewas interessante B.c. isolaten te isoleren.
- Qua B.c. gevoeligheid een representatief referentiepanel te gebruiken (zwaar, matig en licht vatbaar).

Als men namelijk op zoek gaat naar B.c. isolaten is het van belang om dit te doen op een locatie die bekend staat als B.c. problematisch voor het te veredelen gewas aangezien de *Botrytis* druk op deze locatie dan waarschijnlijk hoog zal zijn. Dit zorgt er ook voor dat de kans op het vinden van een sterk pathogeen B.c. isolaat dan ook hoger ligt dan bij een monster uit een niet problematische locatie. Voor het karakteriseren van de isolaten en het opzetten van de toets zelf is het van belang om alvast wat basiskennis te hebben over mogelijke referentierassen die tijdens deze toetsen gebruikt kunnen worden.

Het karakteriseren van de pathogeniteit van de gevonden B.c. isolaten gebeurt namelijk aan de hand van de mate van ziekteverschijnselen die de isolaten op een panel referentierassen met verschillende Botrytis gevoeligheden (zwaar, matig en licht vatbaar) veroorzaken. Een zwak pathogeen B.c. isolaat zal namelijk wel bij een zeer vatbaar ras sterke symptomen kunnen veroorzaken, maar deze zullen veel minder sterk zijn bij wat minder vatbare rassen.

Een sterker pathogeen B.c. isolaat zal daarentegen zowel bij een zeer vatbaar- als bij een wat minder vatbaar ras sterke symptomen kunnen veroorzaken. Naarmate er meer biotoetsen uitgevoerd worden zal er qua *Botrytis* gevoeligheden steeds meer kennis beschikbaar komen waaraan het panel referentierassen dan aanpast kan worden maar

vooral aan het begin van dit proces zal men hiervoor vooral op institutionele of anekdotische kennis aangewezen zijn.

Het aanleggen van een eigen *Botrytis cinerea* collectie
Om B.c. isolaten te kunnen isoleren dient er bij voorkeur B.c. symptomatisch materiaal uit een "problematische" locatie bemonsterd te worden. Hierbij dienen dan ook nog eens bij voorkeur rassen bemonsterd te worden die relatief laag Botrytis gevoelig zijn (grotere kans om een sterker pathogeen B.c. isolaat te vinden). Van deze planten worden dan een aangetast stengel, blad of bloem monster genomen die dan vervolgens in het lab verder kunnen worden opgewerkt. In het lab worden deze dan binnen een steriele omgeving (bij een brandende Bunsenbrander) in stukjes van c.a. 6mm lang gesneden, gedurende 30 seconden met 70% ethanol ontsmet en dan m.b.v. een steriele pincet op een V8 medium plaat uitgelegd.

Als dit aangetaste stengelstukje dan inderdaad een B.c. isolaat bevat dan zal hier dan na een dag of vijf incuberen bij 25°C, grijskleurige schimmelpluis met ovale, druifvormige sporen (conidia) uitgroeien die in druiventros vormige clusters op donker/zwarte conidiophoren (steeltjes) worden gevormd (zie voor voorbeelden figuur 2, op pagina 750 van Yan-gang Pei et all.). Er zijn wereldwijd circa 67 *Botrytis* soorten bekend en deze ruwe identificatie methode is dus zeker niet perfect, maar deze is goed genoeg om een initiële collectie aan te leggen die nog verder gekarakteriseerd gaat worden.

Van dit *Botrytis* isolaat kan dan een rijnkweek gemaakt worden door deze naar een nieuwe V8 plaat over te zetten. De geïsoleerde *Botrytis* isolaten kunnen o.a. worden opgeslagen door deze een week lang bij 25°C in een steriele reageerbuis met V8 agar te laten groeien om deze buis daarna met gesteriliseerde paraffineolie te vullen en af te sluiten. De paraffineolie zorgt er dan voor dat er geen extra zuurstof bij de schimmel kan komen en dat er geen vocht meer uit het medium kan verdampen. De schimmels gaat hierdoor in een soort fysiologische winterslaap waarin deze op kamertemperatuur enkele jaren kan overleven. Om deze schimmel dan weer in kweek te brengen hoeft er enkel met een steriele naald wat schimmel materiaal onder de olie vandaan te worden gehaald en op een V8 plaat te worden aangeënt waarnaar de schimmel weer actief gaat groeien.

Het karakteriseren van de gevonden *Botrytis* isolaten
Om vast te kunnen stellen of een gevonden *Botrytis* isolaat inderdaad pathogeen is op een gewas en hoe zwaar pathogeen dit isolaat dan ook werkelijk is, zal deze op het eerder genoemde referentiepanel getoetst moeten worden. Hiervoor moet het schimmelweefsel eerst uitgebouwd worden tot er genoeg inoculum schimmelsporen zijn gevormd om hiermee de toetsplanten te kunnen besmetten (inoculeren). Over het algemeen wordt hiervoor een inoculum concentratie van 10^6 sporen per milliliter gebruikt . Deze sporen worden vervolgens (al dan wel of niet in een agar matrix) in drievoud op het te testen plantdeel (bloem, stengel blad etc.) van referentiepanel planten aangebracht.

Omdat een plant pathogeen interactie zeer milieu afhankelijk is zal binnen elke biotoets een zekere mate van variatie per toets optreden (bijvoorbeeld maar twee van de drie geïnoculeerde planten worden ziek) en daarom is het nodig om binnen een toets altijd met een aantal herhalingen te werken om zodoende betrouwbaar te kunnen toetsen. X dagen

(geheel gewas afhankelijk) na de inoculatie kan dan aan de hand van de ontstaande schade worden bepaald hoe agressief een specifiek isolaat dan ook ongeveer is.

Om genoeg toets inoculum te produceren worden de te karakteriseren *Botrytis* isolaten individueel op twee V8 platen aangeënt en eerst gedurende vijf dagen bij 24°C, opgevolgd door vijf dagen bij 15°C opgekweekt. Na deze tien dagen zullen de platen zijn volgroeid met bruin/ grijskleurig sporulerend *Botrytis* mycelium (schimmelpluis) en kunnen de sporen worden geoogst door c.a. 5ml water met hierin een druppeltje Tween op de plaat te gieten om daarna rustig met een steriele drigalski spatel het bovenliggende mycelium van de agar los te masseren zonder de agar in stukken te breken. Deze sporen/mycelium suspensie word vervolgens d.m.v. Miracloth en een trechter gefilterd en het filtraat hiervan zal voornamelijk uit hoog geconcentreerde *Botrytis* sporen bestaan. Deze sporendichtheid kan o.a. doormiddel van een microscoop en een Neubauer telkamer worden bepaald. De aanwezige *Botrytis* sporen kunnen met water met hierin 2.5 % glucose worden verdund tot een dichtheid van 10^6 sporen per milliliter. Mits gekoeld kunnen deze sporen enkele dagen in deze suspensie worden bewaard.

Voor de biotoets zelf kunnen enkele microliters van deze sporen suspensie (bijvoorbeeld 5ul) in drievoud op- of in het te testen plantdeel (bloem, stengel blad etc.) van de referentiepanel planten worden aangebracht. Hierbij dient echter wel rekening te worden gehouden dat gedurende de eerste 12 uur van deze biotoets de luchtvochtigheid in de biotoets ruimte niet onder de 85% mag komen. *Botrytis cinerea* sporen hebben namelijk vloeibaar water of een hoge luchtvochtigheid nodig om te kunnen kieuwen en hier zal tijdens het uitvoeren van een biotoets dus rekening mee moeten worden gehouden. Mocht de luchtvochtigheid toch te laag worden dan is de kans groot dat het inoculeren gaat mislukken. Een B.c. biotoets zal dus in een geconditioneerde (klimaat cel) of afgesloten ruimte (bakken) moeten plaatsvinden, of de inoculatieplek zal tijdens de eerste 12 uur van de biotoets d.m.v. vochtige tissues of iets dergelijks bedekt moeten worden om het “uitdrogen” van de sporen te voorkomen.

Als er bijvoorbeeld ronde of schuine oppervlaktes zoals bladeren geïnoculeerd dienen te worden kan het handig zijn om de B.c. sporen in een matrix te binden zodat een druppel met sporen niet van dit oppervlak kan afrollen. Hiervoor kan bijvoorbeeld een 1.5% Micro Agar matrix gebruikt worden. Smelt hiervoor 1.5% agar op, giet deze in een plaat en laat deze afkoelen tot deze handwarm is. Voeg hier dan de Botrytis sporen / glucose suspensie aan toe tot er weer een sporen concentratie van 10^6 sporen per milliliter is ontstaan en laat de agar afkoelen tot deze volledig is gestold. Uit deze B.c. sporen agar kan dan met een klein appelboortje (c.a. 5mm) een klein ponsje worden genomen wat dan op een rond of schuin van een toetsplant worden gelegd zonder dat dit stukje gemakkelijk over het oppervlakte kan wegschuiven of wegrollen. Sommige gewassen hebben eigenlijk alleen last van B.c. als ze een verwond oppervlak hebben en bij deze gewassen zal het dan ook nodig zijn om bijvoorbeeld met een gloeiend hete naald een wond op het plant oppervlak te maken voordat hier een betrouwbare B.c. biotoets op uitgevoerd kan worden. Dit is echter ook weer zeer gewas verschillend.

Indien het gebruikte *Botrytis* isolaat inderdaad pathogeen blijkt te zijn is op het betreffende gewas zullen er na X dagen (gewas en temperatuur afhankelijk) dan B.c. achtige

ziekteverschijnselen (rot/vlekken) op de geïnoculeerde plek optreden die dan per plant aan de hand van een bijvoorbeeld schuifmaat en een scoringslijst kunnen worden opgemeten en geregistreerd. Het meest agressieve B.c. isolaat zal hierbij dan binnen het panel de sterkste symptomen laten zien en dit isolaat zal dan meestal ook het beste isolaat zijn om betrouwbare en herhaalbare biotoetsen mee uit te voeren. Een scoringslijst bestaat bijvoorbeeld uit vier categorieën waarbij de eerste categorie dan bestaat uit planten die geen symptomen laten zien, de twee categorie bestaat uit planten die matige symptomen laten zien , de derde categorie bestaat uit planten zware symptomen laten zien en de vierde categorie bestaan dan bijvoorbeeld uit planten die extreem zware symptomen laten zien.

Het voorbereiden, uitvoeren en scoren van een *Botrytis* biotoets
Het voorbereiden, uitvoeren en scoren van een standaard B.c. biotoets gebeurt feitelijk op dezelfde manier als het karakteriseren van *Botrytis* isolaten, alleen op een grotere schaal. Zo worden er dan i.p.v. twee V8 platen bijvoorbeeld tien platen gebruikt om het inoculum uit te bouwen aangezien er voor een grotere routinematige toets simpelweg ook veel meer inoculum nodig zal zijn. Verder verloopt een standaard B.c. biotoets vrijwel precies hetzelfde als de hierboven beschreven procedure van karakteriseren (inoculum uitbouwen, planten in drievoud inoculeren en dan na x dagen ziekteverschijnselen scoren) alleen op een grotere schaal.

Hierbij is het ook weer belangrijk om de luchtvochtigheid goed in de hand te houden en een panel met licht, matig en zwaar vatbaar materiaal als controles mee te nemen om te kunnen beoordelen hoe goed de biotoets over het algemeen is verlopen. Hoe beter een biotoets namelijk is verlopen, hoe meer symptomen er binnen dit vatbare panel zullen ontstaan. Mochten deze controle planten echter geen- of maar minimale symptomen laten zien dan geeft dit aan dat de biotoets suboptimaal is verlopen en dat de resultaten hiervan dan ook niet heel betrouwbaar zullen zijn en beter herhaald zouden moeten worden.

Aan de hand van de verkregen B.c. resistentiedata kan dan een B.c. veredelingsprogramma worden opgezet door constant te selecteren op- en te kruisen met, planten die in deze toets de minste B.c. symptomen laten zien. Hierdoor zal er dan na enkele generaties selecteren een hoger *Botrytis cinerea* resistentie niveau binnen het betreffende gewas gaan optreden.

Renze Koolstra, Evanthia BV

Verslag eerste Biotoets *Fusarium spp.* in Lisianthus (*Eustoma russelianum)*

Inleiding

Fusarium is een veel voorkomend, groot probleem in de teelt van Lisianthus. Momenteel wordt Fusarium bestreden door de grond regelmatig te ontsmetten door middel van stomen, een dure en niet milieu vriendelijke methode, daarnaast zijn er steeds minder mogelijkheden om deze schimmel chemisch te bestrijden. Om vanuit de veredeling een bijdrage te kunnen leveren zal er een bio toets ontwikkeld moeten worden om rassen te kunnen ontwikkelen die tolerant, dan wel resistent zijn tegen Fusarium.

Pathogeen verzamelen

In eerste instantie is begonnen met het verzamelen van zieke planten met Fusarium symptomen bij verschillende telers verdeeld over Nederland. Van 5 verschillende locaties zijn 20 zieke planten verzameld. Deze 20 monsters zijn vervolgens geïsoleerd en rein gekweekt. Vervolgens zijn de 20 Fusarium isolaten onderling genetisch vergeleken d.m.v. merker analyse. De 20 isolaten bestaan uit 5 verschillende soorten. Hieruit zijn de twee meest voorkomende soorten gekozen om mee te toetsen. Concreet gaat het hierbij om *Fusarium solani* en *Fusarium oxysporum*.

Toetsmethode

Als toetsmethode is er voor gekozen om een bekend protocol te gebruiken dat al beschikbaar was bij de locatie waar de test uitgevoerd werd. Het protocol was ontwikkeld voor een ander gewas en kan naar verwachting ook worden toegepast voor Lisianthus.

Er zijn twee rassen uitgekozen waarvan de eerste in de praktijk bekend staat als sterk ongevoelig voor fusarium en de tweede juist als gevoelig. Deze planten zijn verkregen van een jonge plantenkweker in het groeistadium dat ze normaal worden uitgeleverd aan de telers.

De hele proef is 3 weken later nogmaals in herhaling neergezet, in deze herhalingsproef is het zwakkere ras vervangen door aan ander zwak ras doordat het ras dat in de eerste proef gebruikt werd niet meer beschikbaar was bij de jonge plantenkweker.
De inoculatie is uitgevoerd met Fusarium solani en Fusarium oxysporum door de sporensuspensie bij de basis van de plant te pipetteerden. Per behandeling zijn er 24 planten geïnoculeerd en zijn er 6 planten onbehandeld gehouden ter controle. Bij de herhaling die 3 weken later is ingezet is er voor gekozen om een zwaardere sporen concentratie te gebruiken omdat er op dat moment minder symptomen dan verwacht te zien waren in de eerste toets.

Beoordeling
De toets is 4 en 7 weken na inoculatie beoordeeld op symptomen. Deze symptomen zijn: slap blad, dor blad en geel blad. Hier is het aantal planten geteld dat deze specifieke symptomen hadden. In week 7 zijn de planten ook doorgesneden om vaatverbruining waar te nemen, een typisch symptoom van Fusarium. Op de foto zijn de blad symptomen (slap blad, dor blad en geel blad) duidelijk waarneembaar.

Resultaten
Het gebruikte isolaat van *Fusarium oxysporum* bleek in deze proefopzet niet plant pathogeen. Alle planten bleven leven en er waren geen uitwendige en geen inwendige symptomen waarneembaar. Het isolaat van *Fusarium solani* bleek in dezelfde proefopzet wel plant pathogeen en liet een goede aantasting zien. Er was een duidelijk verschil in aantasting aanwezig tussen de sterke en de zwakker rassen. Ook was er een verschil in aantasting te zien tussen de verschillende herhalingen en daarmee de verschillende sporenconcentraties, waarbij de hogere concentratie een zwaardere aantasting gaf.

Binnen de proefopzet met *Fusarium solani* bleven enkele planten onaangetast! Dit kan komende door de methode van inoculatie, milieu of wellicht de genetische variatie binnen de geteste rassen.

Conclusie
De gebruikte proefmethode blijkt geschikt te zijn voor Lisianthus (Eustoma russelianum). Het isolaat van Fusarium solani werkt als een sterk pathogeen inoculum. In de gebruikte proefopzet kan hiermee tolerantie en gevoeligheid voor Fusarium worden aangetoond aan gevoelige rassen (cultivars) in de praktijk. De methode heeft geleid tot nieuwe varianten van planten met verlaagde gevoeligheid voor Fusarium. Deze methode blijkt derhalve geschikt om een grove schifting te maken tussen rassen die sterk tolerant (ongevoelig) zijn voor fusarium en rassen die veel gevoeliger zijn. In die zin is de biotoets geslaagd.

De gebruikte proefmethode is echter nog niet ideaal. Tussen de rassen treedt nog te veel variatie op. Daarnaast is deze methode erg arbeidsintensief en neemt de biotoets veel ruimte in beslag waardoor er weinig planten tegelijk getest worden.

Toetsopzet tweede toets
Tijdens de planning en de discussie voor het opzetten van de tweede toets bleek er een artikel gepubliceerd te zijn door HW Choi (zie referenties) waarin een werkend protocol werd beschreven voor fusarium toetsen voor Lisianthus. Voor de tweede toets zal dit protocol gebruikt worden. De voornaamste reden om over te schakelen naar deze andere methode is navenant: een kortere toetsduur, minder arbeidsintensief en de mogelijkheid om meer planten te testen op hetzelfde oppervlakte. In het artikel worden vergelijkbare resultaten behaald als bij onze eerste biotoets. Het sterke ras uit onze eerste toets is ook meegenomen in dit onderzoek en gaf vergelijkbare resultaten. Het is de verwachting dat deze toets met een grote mate van zekerheid goede resultaten zal opleveren.

Deze tweede biotoets wordt twee maal uitgevoerd waarbij we bij het laatste experiment rekening houden met alle leerervaringen tot nu toe om waar mogelijk de proefopzet als protocol te optimaliseren.

In tegenstelling tot de eerste proefopzet waarbij de sporensuspensie van het pathogeen bij de basis van de plant werd gepipetteerd zal in de tweede biotoets een dompel toets worden uitgevoerd. In een dergelijk experiment worden de wortels van de plant beschadigd en vindt vervolgens inoculatie plaats via onderdompeling van de wortels in een sporen suspensie van Fusarium. Na het inoculeren zullen de planten gepoot worden. In tegenstelling tot de eerste toets kunnen nu 60 verschillende rassen en veredelingslijnen getoetst worden. Hiermee kan

gelijk een eerste screening uitgevoerd worden op het verkregen veredelingsmateriaal. Volgens het artikel zouden na 2 weken de eerste symptomen al zichtbaar moeten zijn. Deze proef wordt medio mei ingezet en de herhaling medio juli afgerond. Al doende is hier sprake van voortschrijdend inzicht!

Marco ten Hoope en Jolien Vermeulen. Kolster B.V.
Verslag eerste Biotoets Trips setosus in Hydrangea macrophylla

Inleiding

De aanleiding voor de opzet van een biotoets voor Trips setosus resistentie/tolerantie in Hydrangea macrophylla is dat de laatste jaren Trips setosus een steeds groter wordend probleem is in de Hortensia teelt. Omdat de middelen om deze Trips te bestrijden steeds beperkter worden en wij als sector steeds duurzamer willen gaan werken moeten wij weten of er rassen bestaan die van nature al een mate van resistentie bezitten. Dit als doel om deze eigenschappen in te kunnen kruisen in nieuw ontwikkelde rassen.

Toetsmethode

De praktijkproef is opgezet in week 39 2020 met 17 Hydrangea macrophylla rassen in 3 herhalingen met 5 planten per herhaling. In de kas bevonden zich drie tafels zodat er per tafel een herhaling neergezet kon worden.

In de eerste week wordt een nulmeting uitgevoerd om te kijken hoe de stand van het gewas is bij aanvang van de proef. Er wordt gekeken naar het aantal aanwezige Trips, mate van zilverschade en aanwezigheid van meeldauw. Omdat er Trips aanwezig was is besloten om alle planten met een gewasbeschermingsmiddel te behandelen. Daarna worden drie van de vijf planten wekelijks beoordeeld op het aantal Trips per ras per veld, de mate van zilverschade en de mate van meeldauw.

Elke week worden dezelfde drie binnenste planten van een veldje beoordeeld. De randplanten van het veldje werden niet gebruikt om te voorkomen dat hier onbetrouwbare gegevens gevonden werden.

Daarnaast werd alleen de derde bladlaag gebruikt om de tellingen van de Trips uit te voeren, dit vanwege de betrouwbaarheid van de gegevens. Verder blijven de bladeren die geteld zijn aan de plant zitten. De beoordeling van zilverschade en meeldauw vindt plaats met behulp van een schaal van 1 tot 10 die met foto's is vastgelegd.

Het einde van de proef wordt bepaald aan de hand van de verschillen in zilverschade en meeldauwschade tussen de verschillende proefvelden. Mocht er op een ras zoveel zilverschade en meeldauw zitten dat die onaantrekkelijk wordt voor de Trips dan zal de Trips zich naar een ander ras verplaatsen waardoor de resultaten onbetrouwbaar worden. Om de betrouwbaarheid van de gegevens vast te stellen werd de proef afgesloten met een alcohol spoeltelling waarbij de planten in zijn geheel ondergedompeld werden in alcohol en de vloeistof door een zeef gefilterd werd om vervolgens de achtergebleven Trips te kunnen tellen.

Resultaten

Voor het ontwikkelen van de biotoets moest gekeken worden naar twee belangrijke meetmomenten: het eerste meet moment waar duidelijk de verschillen tussen de cultivars te zien zou zijn en het meest optimale meetmoment waarbij de verschillen het beste te zien zijn.

In week 40 was voor het eerst een goed verschil te zien tussen de verschillende rassen. In week 42 zijn de verschillen tussen de rassen het beste zichtbaar en is daardoor het meest optimale meetmoment.

In week 40 waren er duidelijk verschillen tussen rassen waar weinig Tripsen aanwezig waren en rassen waar veel Tripsen aanwezig waren.

In week 42 waren die verschillen tussen de rassen er nog steeds hoewel de ras volgorde wel wat verschilde. Wel werd duidelijk dat er rassen waren die altijd hoog of altijd laag in de beoordeling scoorde.

Ook de resultaten op de mate van zilverschade van week 40 en week 42 waren vergelijkbaar. De ras volgorde tussen een lage of hoge mate van zilverschade verschilde af en toe iets maar er waren duidelijk rassen die altijd hoog of altijd laag scoorde.

Wel werd duidelijk dat het aantal getelde Tripsen niet altijd overeenkomt met het verwachte zilverschadebeeld. Soms werd bij een hoog aantal Trips een lage beoordeling aan zilverschade gevonden en bij een laag aantal Trips een hoge mate van zilverschade.

Conclusie

De opzet van deze proef was een free-choice proef. De Tripsen hadden de keuze in de gehele kas om zich te verspreiden over de 17 aanwezige cultivars. Uit deze eerste opzet tot een biotoets zijn verschillen aangetoond tussen cultivars die een hele hoge mate van zilverschade ontwikkelen en/of een hoge populatie Tripsen, en cultivars die veel minder zilverschade ontwikkelen en/of een lage populatie Trips setosus.

De opzet was om rassen te vinden met een resistentie/tolerantie tegen Trips setosus en dat is in deze opzet aangetoond. Een eerste stap is gezet om deze rassen te vinden die dan vervolgens in de veredeling verder gebruikt kunnen gaan worden. Om de ziekte druk op de cultivars gelijkmatig te verdelen zou een no-choice proef opgezet kunnen worden. Hier wordt dan elke cultivar apart in een kooi gezet om te kijken hoe de Trips setosus populatie zich daar verder ontwikkeld. Dat zou dan een volgende opzet kunnen worden om de biotoets verder te gaan perfectioneren.

Marco ten Hoope en Jolien Vermeulen, Kolster B.V.
Verslag tweede Biotoets Trips setosus in Hydrangea macrophylla

Inleiding

In de eerste Biotoets is aangetoond dat er verschillen bestonden in de gevoeligheid tussen cultivars van Hydrangea macrophylla tegen Trips setosus.

De planten die voor dit onderzoek gebruikt werden waren halfwas planten van twee jaar oud. Omdat de voorkeur bij jonger plantmateriaal ligt, om in een eerder stadium de gevoeligheid voor Trips te kunnen aantonen, is in dit onderzoek gewerkt met jong en ouder plantmateriaal.

Proefopzet

De biotoets bestaat uit drie onderdelen:

1. **Kooienproef** met **één ras** per insectenkooi, 3 **halfwas** planten per kooi in 4 herhalingen, de zogenaamde no-choise test uitgevoerd voor 3 rassen waarvan 1 ongevoelig en 2 gevoelige rassen.
2. **Kooienproef** met **één ras** per insecten kooi, 1 stektray met 24 **stekken** per kooi in 4 herhalingen, dus ook een no-choise test uitgevoerd voor 4 rassen waarvan 1 ongevoelig en 3 gevoelige rassen.
3. **Kooienproef** met **drie rassen** per insectenkooi, 2 stektrays met **13 stekken** per ras in 4 herhalingen, dus een multiple-choice test. In deze proef wordt gekeken naar het onderlinge verschil in gevoeligheid van de rassen. In welk ras ontwikkelt de populatie zich het snelst en zie je verschil in schadebeeld in combinatie met populatiegrootte uitgevoerd voor 6 rassen waarvan 2 ongevoelige en 4 gevoelige rassen. De rassen die gebruikt zijn, zijn allemaal rassen die in de eerste Biotoets aangetoond hebben zeer gevoelig of tolerant te zijn in gevoeligheid voor Trips setosus.

Metingen

Voor alle proeven is eerst een nulmeting uitgevoerd om te kijken hoeveel Tripsen er al aanwezig waren in het gewas. Er bleken al Tripsen aanwezig te zijn en er is toen besloten om niet te bestrijden en er ook geen nieuwe in te zetten.
Er zijn 2 visuele metingen uitgevoerd en hierbij is de mate van Tripsschade bepaald op een schaal van 1 tot 10 en of er meeldauw aanwezig was op de planten. Ook zijn er op drie momenten spoeltellingen met alcohol uitgevoerd om het totale aantal Trips te kunnen tellen. Bij de halfwas planten werden van drie planten drie bladeren per plant genomen om te spoelen. Van het jonge materiaal werd er elke keer 2 hele planten gebruikt voor de spoeltelling.

Resultaten

In de **kooienproef met één ras** per insectenkooi met **halfwas** planten is gebleken dat het tolerante ras er opnieuw veelbelovend uitkwam. Ook na 6 weken in de insectenkooi gestaan te hebben was het aantal Tripsen nog erg laag.

De twee andere rassen scoorden veel hoger in het aantal Tripsen en bleken dus wederom erg gevoelig te zijn. Het verschil in schadebeeld komt overeen met de hoeveelheid gevonden Tripsen, dus hoe meer Tripsen hoe hoger het schadebeeld hoewel het tolerante ras wel relatief hoog scoort in schadebeeld t.o.v. de hoeveelheid gevonden Tripsen.

In de **kooienproef met één ras** per insectenkooi met **jong** plantmateriaal is de hoeveelheid aangetroffen Tripsen in het tolerante ras wederom laag. In de andere drie rassen lag dit hoger maar het grote verschil begon pas drie weken na inzet van de proef zichtbaar te worden. De eerste drie weken zaten twee gevoelige rassen nog erg in de buurt van het tolerante ras. Het verschil in schadebeeld komt niet altijd overéén met de hoeveelheid gevonden Tripsen. Het tolerante ras scoorde relatief hoog ten opzichte van het aantal gevonden Tripsen en bij de andere rassen kwam ook niet altijd de hoogte van het schadebeeld overeen met de hoeveelheid getelde Tripsen. De verschillen in waargenomen meeldauwschade was wel groot. Twee rassen vertoonde totaal geen meeldauw terwijl de andere 2 rassen wel een behoorlijke mate van meeldauw schade vertoonde.

In de **kooienproef met drie rassen** per insectenkooi met **jong** plantmateriaal was één kooi die erg opvallend was. In die kooi waren 2 tolerante rassen aanwezig met een gevoelig ras. Na drie weken was er in het gevoelige ras een enorme ontwikkeling te zien t.o.v. de 2 andere rassen.

In de andere kooien was wederom het verschil in meeldauw schade groot. Er waren maar 2 rassen die meeldauw vertoonde, de rest van de rassen bleven schoon van meeldauw.

Conclusie

Het ras dat vorig jaar als meest tolerant eruit kwam is nu ook weer het ras met de laagste hoeveelheid Trips, maar wel met een relatief hoger percentage zilverschade. Er kan geconcludeerd worden dat de hoeveelheid Trips zowel bij de tolerante als gevoelige rassen niet het zilverschade beeld geeft wat je verwacht. Dus een hoge hoeveelheid Trips geeft niet automatisch een hoog zilverschade beeld en andersom.

Wat ook gezegd kan worden op basis van de uitgevoerde toetsen is dat de resultaten bij jonge planten zowel als bij halfwas planten hetzelfde blijft ten aanzien van de gevoeligheid voor Trips en mate van zilverschade.

Ad van Rooijen - De Ruiter Innovations
Ontwikkeling van een biotoets voor het testen van de gevoeligheid van Rosa spp. tegen Botrytis cinerea sporen.

Dit is geen wetenschappelijk doelrapport. Het is op maat gemaakt om de doelgroep te ontmoeten en sommige details zijn om vertrouwelijkheidsredenen achtergehouden.
Supervisor : Ad van Rooijen, Implementor : Dennis Kyalo

Inleiding
Snijrozen zijn de meest populaire snijbloemen, met een omzet van miljarden euro's per jaar. De aanvoer van snijrozen is echter sterk afhankelijk van de logistiek van lange afstandstransport, omdat de productie voornamelijk plaatsvindt in ontwikkelingslanden met lage arbeidskosten en geschikte (niet gestuurde) teeltklimaten, zoals Kenia, Colombia, Ecuador en China, terwijl het afzetgebied voornamelijk Noord-Amerika, Europa en Japan is. Rozenplanten zijn waardplanten voor veel schimmelziekten zoals valse meeldauw (Knight en Wheeler, 1977) en echte meeldauw (Pasini et al., 1996), maar de belangrijkste economische schade wordt veroorzaakt door Botrytis cinerea, een schimmelpathogeen.

De schade ontstaat voornamelijk tijdens opslag of transport van de bloemen (Elad, 1988; Vrind, 2005). Variatie in gevoeligheid voor Botrytis-infectie tussen rozen (Rosa hybrida) cultivars is moeilijk te kwantificeren, maar van groot belang voor zowel veredelaars als de snijbloemenindustrie. Dit komt omdat het zonder een effectieve methode van fenotypering moeilijk is om de ideale genotypen voor veredelingsdoeleinden te selecteren en om onderscheid te maken tijdens het selectieproces.

De Ruiter Innovations bv. heeft proeven gedaan om een effectief werkende biotoets te vinden, die op zijn beurt zou kunnen helpen bij toekomstige veredelingsprogramma's.
Een vrijstaande bloembladtest is een goedkope test die gemakkelijk door bedrijven binnenshuis kan worden uitgevoerd, waardoor de kennisopbouw wordt verbeterd zonder

hoge onderzoekskosten. De optimalisatie van een vrijstaande bloembladtest (DPA) wordt gedaan voor kunstmatige B. cinerea-inoculatie en kwantificering van ziektesymptomen in rozenblaadjes als een eenvoudiger alternatief voor observatieruimte-experimenten.

Probleemstelling

Het effect van de omgeving speelt een zeer belangrijke rol bij de vatbaarheid voor Botrytis cinerea. Denk hierbij aan aspecten als voedingsregimes van planten, klimaat, transport- en opslagomstandigheden enz. In de praktijk is echter genetische variatie in de gevoeligheid voor Botrytis cinerea waargenomen, waarbij rassen die onder vergelijkbare omstandigheden zijn gekweekt, samen worden vervoerd en samen worden opgeslagen, een gevarieerde respons laten zien in termen van Botrytis cinerea-infectie.

Om de interactie tussen tussen B. cinerea en verschillende genotypen van de roos te bestuderen is kunstmatige inoculatie een bruikbare techniek , zowel voor fundamenteel onderzoek als voor veredelingsdoeleinden. In eerdere proeven uitgevoerd bij De Ruiter Innovations werden volledige bloemen van de roos en losse petalen (bloemkroonbladen) bespoten met een suspensie B. cinerea sporen. De mate van aantasting van de ziekte werd gescoord volgens een “ziekte-index” op basis van een schaal van 0-5 (of meer), variërend van geen infectie tot de schimmel die de hele bloem bedekt. Deze conventionele methode kan echter niet worden gebruikt om de ziekteresistentie nauwkeurig te kwantificeren.

De optimalisatie van de biotoets voor betere fenotypering is de volgende stap in de veredeling van resistentie tegen Botrytis. De inspanningen van het bedrijf om een sneller maar efficiënt protocol te vinden ter vervanging van de observatie-test die sterk afhankelijk is van latent inoculum, hebben nog geen vruchten afgeworpen, aangezien de losstaande bloembladtesten geen betrouwbare voorspellende kracht van Botrytis gevoeligheid laten zien. In een reeks van experimenten zal getracht worden de meest voorspellende biotoets te vinden die het meest vergelijkbaar is met het observatie-experiment.
Het is mogelijk om een eigen Botrytis-populatie te kweken in een eigen bedrijfslaboratorium. Echter door het ontbreken van voldoende technische middelen was het niet mogelijk om zuivere isolaten te isoleren. Er is daarom gekozen voor de aanschaf van een Botrytis isolaat bij NAK Tuinbouw.

Doelstellingen

De optimale, zeer voorspellende test bepalen voor de fenotypering van Botrytis cinerea.
Onderzoeken of er een genotype-variatie is in de gevoeligheid voor Botrytis cinerea.

Verwachte hypothese

- Cultivars die uit warme streken worden vervoerd, zijn gevoeliger voor Botrytis cinerea.
- Bloemkleur heeft invloed op de gevoeligheid voor Botrytis cinerea.
- Geurige variëteiten zijn gevoeliger voor Botrytis cinerea.

Materialen:

Botrytis sporen-Naktuinbouw, Papieren zakken, Koffiefilters, Venire Remklauwen, Vergrootlens, Petrischalen, Gedestilleerd water

Figuur 1; (a) enkele vereisten voor de biotoets en (b) petrischalen die klaar zijn voor de losse bloembladen

Methode

De volgend werkwijze is gehanteerd voor het prepareren van de petalen en het uitvoeren van de toets.

1. Dek de knoppen van de rozen die getest worden af voordat ze opengaan, om besmetting door sporen in de kas te voorkomen.

Figuur 2; (a) rassen die uit Kenia zijn vervoerd voor biotoets, (b) rassen in de kas in Nederland voor de biotoets.

2. Gebruik filterpapier op petrischalen met een label waarin één petaal per genotype wordt geplaatst.
3. Voeg 2 ml gedestilleerd water toe op het filtreerpapier voor een hoge luchtvochtigheid die nodig is om de Botrytis te laten groeien
4. Inoculeer elk bloemblad met 2 microliter Botrytis-sporen met een concentratie van 2,0 x 10^5 sporen per ml.
5. Plaats de petrischalen met petalen in een ruimte bij een temperatuur van 20 graden Celsius onder 12 uur lichtregime.
6. Voer als controle een inoculatie uit met gedestilleerd water.
7. Volg de aantasting periodiek, gedurende een periode van 7 dagen.

Data collectie

Breedte / diameter van Botrytis aantasting wordt beoordeeld met behulp van een schaal van 0-7. Nul betekent geen aantasting, zeven betekent dood met volledige mycelia-sporulatie. Observeer en bepaal de mate van aantasting aan de hand van de schaal op de tijdstippen vanaf 48, 60 en 72 uur (hpi, het aantal uren na inoculatie).

Figuur 3; verschillende scores van verschillende genotypen. Hpi staat voor het aantal uren na inoculatie

De opzet werd periodiek om de 3 weken gedaan.

Figuur 4; Een bovenaanzicht van een van de opstellingen. Elke rij is een ander genotype. Genotype-gebaseerde variatie is zichtbaar op de figuur. Het enige wat nodig is, is om dat nauwkeurig te kwantificeren.

Voor een goede kwantitatieve vergelijking is gewerkt met AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) en rAUDPC (relatieve Area Under Disease Progress Curve). AUDPC en rAUDPC zijn kwantitatieve samenvattingen van de ziekte in de loop van de tijd ter vergelijking in tijd, locatie of management tactieken. Zie: https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/EcologyAndEpidemiologyInR/DiseaseProgress/Pages/audpc.aspx

AUDPC wordt uitgedrukt als een percentage. De meest gebruikte methode is de trapeziumvormige methode; waarbij we de tijdsduur verdelen in intervallen en de gemiddelde ziekte-intensiteit berekenen tussen elk paar discrete aangrenzende tijdstippen. De waarde is positief gecorreleerd met mate van gevoeligheid voor *Botrytis cinerea* in dit geval. rAUDPC wordt verkregen door AUDPC te delen door het maximale potentieel van AUDPC, d.w.z. (AUDPC / N). N is het verschil in tijd is tussen de tijd van de uiteindelijke score en de tijd van de 1e score * maximaal mogelijke score In dit onderzoek is 168 * 7 = 1176.

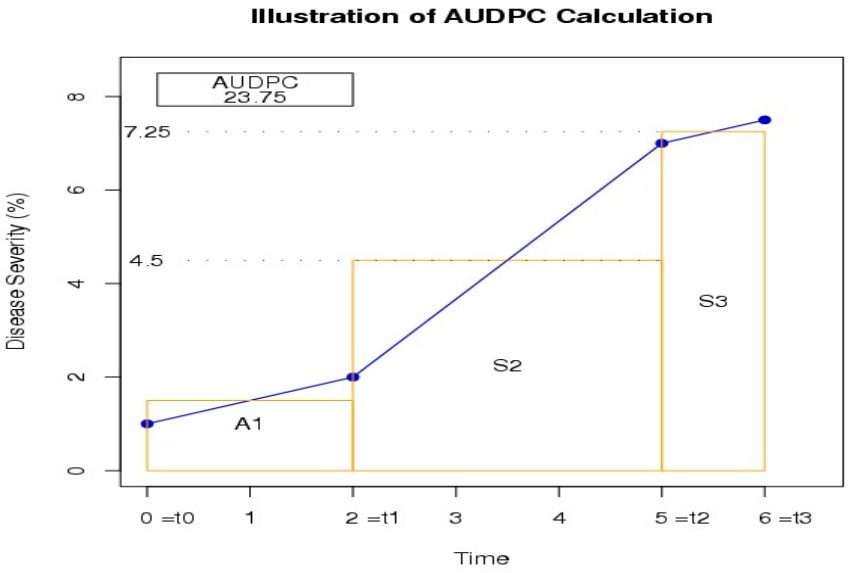
In dit experiment wordt rAUDPC verkregen door AUDPC/ (168*7=1176). De waarde rAUDPC is meer robuust en beter geschikt voor analyse van de verschillende experimenten.
De waarde is voor elke herhaling berekend, wat een betere kwantitatieve index is voor een betere analyse en de gemiddelden worden gebruikt voor vergelijking.

Data verzamel tabel

Object_ID	Cultivar_name	Location	Date_of_test	0	48	72	96	120	144	168	AUDPC	rAUDPC
1023	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	4	NA	NA	6	7	7	780	66,32653061
1024	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	0	NA	NA	4	6	7	420	35,71428571
1025	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	0	NA	NA	0	0	0	0	0
1026	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	1	NA	NA	6	7	7	600	51,02040816
1027	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	3	NA	NA	6	7	7	720	61,2244898
1028	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	3	NA	NA	6	7	7	720	61,2244898
1029	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	1	NA	NA	6	7	7	600	51,02040816
1030	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	0	NA	NA	0	0	0	0	0
1031	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	0	NA	NA	0	0	0	0	0
1032	c-17-1347-001	Holland	16/09/2020	0	0	NA	NA	0	0	0	0	0

Tabel 1; AUDPC en rAUDPC van de gegevens van ongeveer 10 rijen gescoorde cultivars.

Gegevens die op de schaal worden gescoord, zijn ordinaal en moeten worden geconverteerd naar kwantitatieve gegevens voor eenvoudigere parametrische analyse. Dit wordt gedaan door de twee kolommen AUDPC en rAUDPC die kwantitatief zijn en daarom kunnen parametrische tests nu eenvoudig worden uitgevoerd.



Figuur 5; Gebied onder ziektevoortgangscurve

De ontstane gegevens zijn geanalyseerd op het R-softwareplatform. Hierbij zijn de gegevens geanalyseerd m.b.v. een ANOVA en Tukey HSD om te bepalen welke groepen significant verschillen. Ggplot2 wordt gebruikt om alle grafieken te plotten.

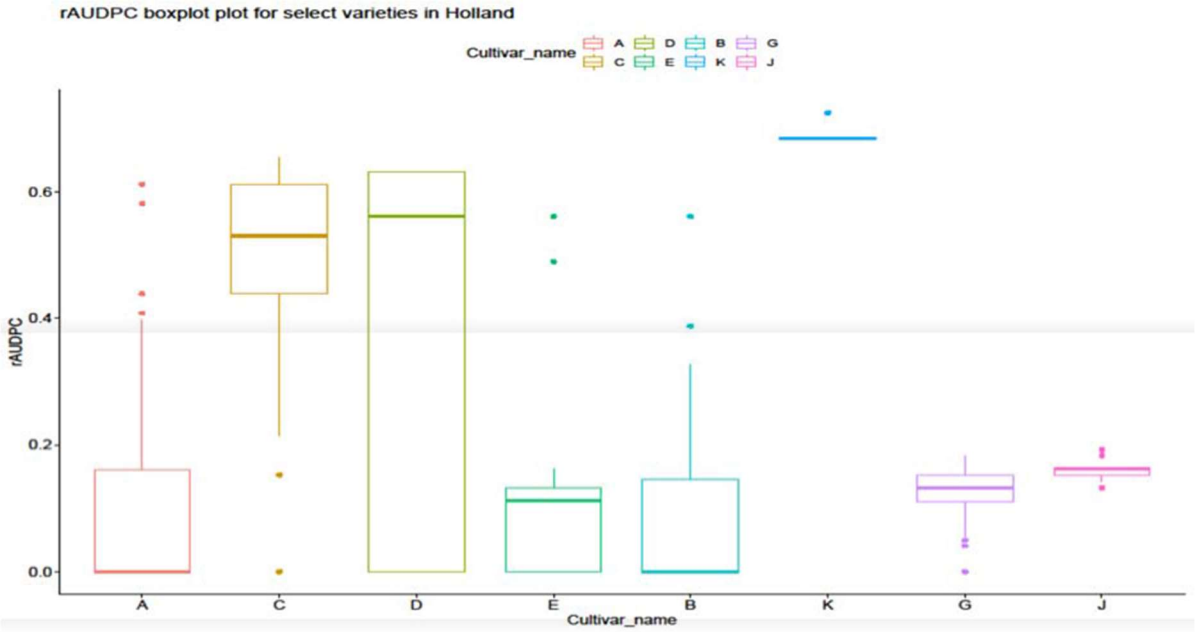
Resultaten

Er is gestart met het testen van onze rassen die momenteel op de markt zijn. De resultaten laten zien dat het mogelijk is de rassen te groeperen in zeer vatbare genotypen, een tussengroep (zeer groot), een groep die minder vatbaar is maar met een grote G x E interactie een kleine groep met een duidelijk lagere vatbaarheid.

Het genotype had een significant effect op de gevoeligheid voor Botrytis cinerea. De testdatum had ook een significant effect op de gevoeligheid voor Botrytis cinerea.

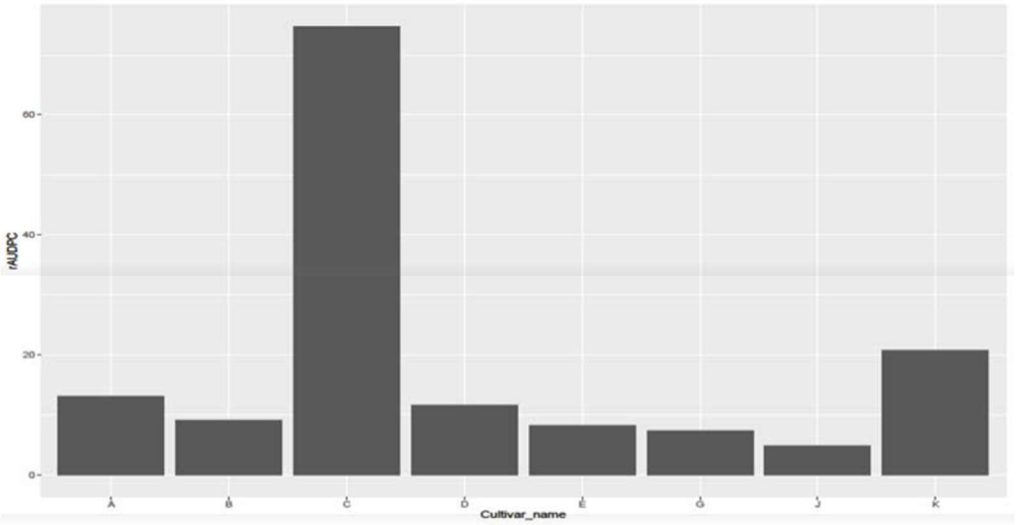
Vervolgens is een Tukey HSD uitgevoerd om te bepalen welke genotypen significant van elkaar verschilden. Hierdoor was het mogelijk om de genotypen die tot dusver zijn getest, te classificeren in categorieën van een paar minder gevoelige genotypen, een grote groep tussenproducten die neigen naar een hoge gevoeligheid en zeer gevoelige genotypen.

Het aantal genotypen dat minder vatbaar is, was verrassend lager dan wat we in de kas zien. Dit kan komen door de hogere verouderingsdruk op de losse bloembladen in vergelijking met snijrozen in de vaas. Dit betekent dus dat rassen in de tussencategorie mogelijk beter presteren bij uitbloei op de vaas.

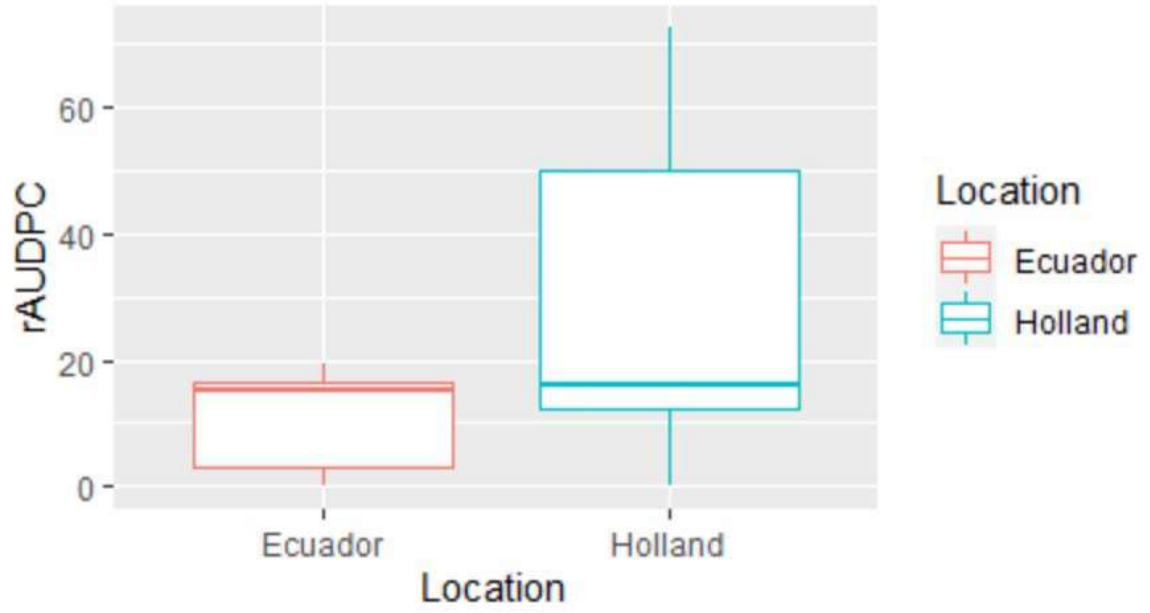


Figuur 6; Boxplot met gemiddelde oppervlakte onder ziekteverloopcurve voor 10 cultivars.

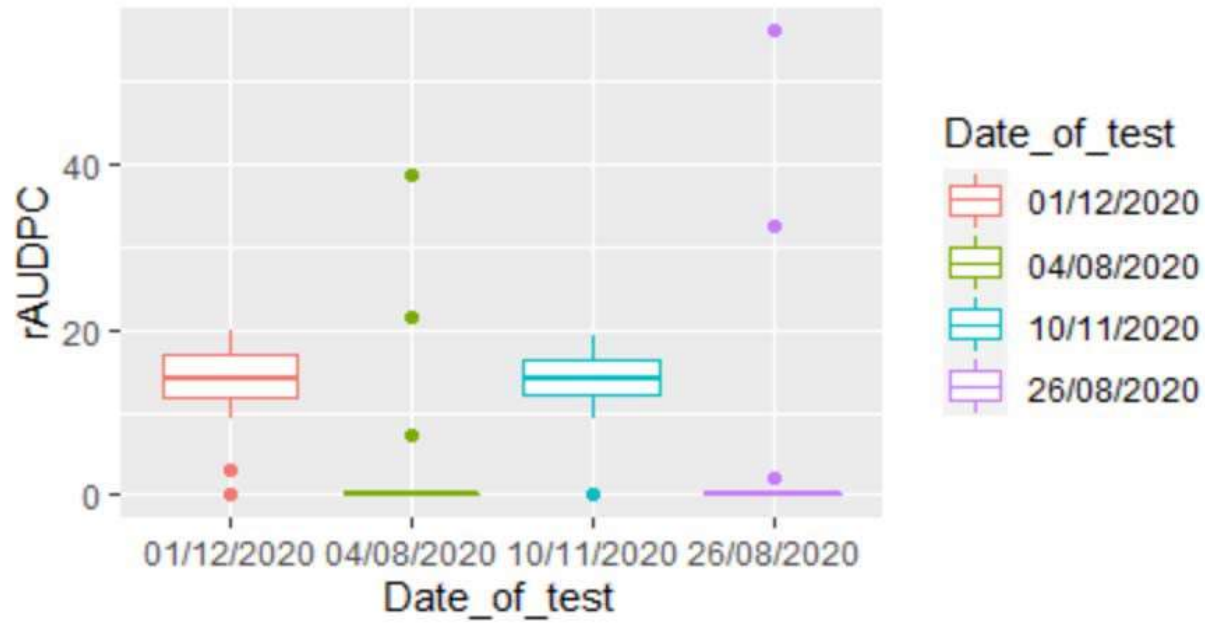
De hoge variantie binnen cultivars, zoals aangegeven door de lange blokken in de boxplot, toont de noodzaak van replicatie aan. Hogere replicatie vermindert dat effect en uiteindelijk volgen de gegevenspunten een gelijkmatige normale verdelingskromme.



Figuur 7; met staafdiagrammen van het gemiddelde gebied onder de voortgangscurve van de ziekte



Figuur 8; Vergelijking van gevoeligheid voor genotypen van verschillende locaties (Ecuador en Nederland).



Figuur 9; Vergelijking van metingen van één variëteit in twee verschillende seizoenen. Als het warmer is, lijkt de variëteit vatbaarder te worden. Dit is een van de rassen met een enorm milieueffect op de vatbaarheid.

Conclusie en discussie

Het is mogelijk om de gevoeligheid voor Botrytis cinerea op een reproduceerbare efficiënte manier te kwantificeren. De biotoets is goedkoop en gemakkelijk uit te voeren in elk basisbedrijfslaboratorium.

De biotoets kan worden gebruikt om de diversiteit van de genetische samenstelling te beoordelen in termen van gevoeligheid voor Botrytis cinerea.
Genetisch variatie in gevoeligheid voor Botrytis cinerea bestaat in rozen. Hoewel de meeste rassen een hoge gevoeligheid vertonen. Enkele vertonen minder gevoeligheid met ook enkele interessante tussenproducten. Volledige weerstand was helaas niet aangetoond!

De invloed van het milieu is erg hoog voor Botrytis cinerea. De meeste cultivars lijken gevoeliger te zijn wanneer ze werden getest in seizoenen van het jaar waarin de lichtintensiteit laag is. Bloemen van de cultivars uit de verafgelegen productie gebieden presteerden beter ondanks het transportknelpunt. Deze constatering zal verder onderzocht worden.

Bij het uitvoeren van de biotoets ter vergelijking van rassen is het daarom belangrijk om voldoende herhalingen te hebben, waarbij de tijd van het jaar als een bepalende variabele wordt beschouwd. Het einddoel van deze tests zou niet alleen moeten zijn om goede QTL's te identificeren en deze te gebruiken in de veredeling van rozen maar ook om de epidemiologie van de ziekte beter te begrijpen. QTL staat voor Quantitative trait locus (een plek op het DNA dat geassocieerd wordt met een bepaald fenotype). Kennis hierin kan bijdragen om de invloeden van het milieu op de gevoeligheid te verminderen en vervolgens rassen te selecteren die superieur zijn in andere kenmerken, maar zeer weinig gevoelig voor Botrytis cinerea.

Er is een grote groep “tussencultivars” en zeer vatbare cultivars. Het volgende doel is om ten minstens 20 genotypen te vinden die minder vatbaar zijn voor Botrytis cinerea. Dit stelt ons in staat om een GWAS (Genome -wide Association Study) te doen en te proberen QTL's te identificeren die mogelijk verantwoordelijk zijn voor de verminderde gevoeligheid.
Als goede QTL's en markers kunnen worden geïdentificeerd en gevalideerd, kan het stapelen ervan in een cultivar een aantasting van Botrytis cinerea aanzienlijk vertragen.

Ad van Rooijen. De Ruiter
Biotoets Trips in snijroos

Inleiding

In de teelt van kasrozen is sinds de jaren 80 Californische trips (Frankliniella occidentalis) een groot probleem. Dit insect komt oorspronkelijk uit de westkust van Noord-Amerika en gedijt goed in de warme omstandigheden in kas in Nederland. De schade ontstaat door het aanzuigen van de volwassen trips aan de diverse delen van de plant. Met name in de petalen van de bloem is direct schade zichtbaar met een verlies aan sierwaarde tot gevolg.

De Californische trips kan op chemische en biologische wijze bestreden worden. Echter vele goed werkende chemische middelen zijn verboden of verliezen hun werkzaamheid. Biologische bestrijding is arbeidsintensief en niet altijd succesvol.

Op basis van visuele waarnemingen wordt in de kas veelvuldig een verschil in het aantal tripsen en de mate van schade tussen verschillende cultivars geconstateerd. Dit zou kunnen betekenen dat er mogelijk vormen van resistentie dan wel tolerantie binnen het gewas Roos aanwezig is. Echter om verschillen in resistentie en of tolerantie aan te duiden is een goede biotoets nodig. Bij het vinden van vormen resistentie en of tolerantie kan er binnen de veredelingsprogramma's gerichter veredeld worden op resistente cultivars. In de toekomst kan mogelijk in de combinatie van fenotypering en genotypering markers gevonden worden binnen het genoom van de roos.

In dit onderzoek zal getracht worden een methode te ontwikkelen om de resistentie/tolerantie van genotypen binnen het gewas roos voor trips te kunnen meten, door middel van het opzetten van een bio-toets. Vanuit het doel van het onderzoek komt de volgende hoofdvraag naar voren: Wat is de beste methode om resistentie tegen trips te meten bij snijrozengewassen?

Om de hoofdvraag zo goed mogelijk te kunnen beantwoorden zijn de volgende deelvragen opgesteld:

1. Wat zijn de belangrijkste schadebeelden van trips in snijrozen?
2. Onder welke omstandigheden kan de proef het beste worden uitgevoerd?
3. Welke meetmethode kunnen worden toegepast bij het beoordelen van het gewas op de schade en aanwezigheid van trips?

Figuur 1: Frankliniella occidentalis bron: https://www.anthura.nl/growing-advise/herkenningskaart-trips/frankliniella-occidentalis/

Materiaal en methode

Onderzoeksstrategie

De onderzoeksstrategie voor dit onderzoek bestaat voornamelijk uit een praktijkproef. Hierbij zal er trips worden geïntroduceerd in verschillende snijrozen cultivars. Vervolgens zal worden bijgehouden hoe de trips zich verspreid over de verschillende cultivars. Het doel van dit onderzoek is het bepalen van de resistentie van een snijrozen cultivar en hier uiteindelijk een waarde aan te kunnen geven.

Proefopstelling

In dit onderzoek is gebruikt gemaakt van oudere planten, geteeld op een steenwol mat. In totaal zijn 20 verschillende cultivars in de proef opgenomen. Van elk cultivar zijn er vier matten a 9 planten gebruikt, welke verdeeld zijn over vier herhalingen (A t/m D).

Uitzetten trips

Om er zeker van te zijn dat er voldoende trips in het gewas aanwezig was, zijn er bij de aanvang van de proef tripsen uitgezet. Deze tripsen waren afkomstig van rozen en gerbera. Vervolgens werd deze op een wit blaadje leeg geklopt en werd er geteld hoeveel tripsen er werden uitgezet. Per veld werd er vervolgens genoteerd hoeveel trips hier zijn uitgezet. Na ongeveer 1 week werden de witte blaadjes verwijderd uit de proefvelden.

Metingen

Tijdens het onderzoek zijn vele metingen uitgevoerd. Wekelijks werd er een visuele beoordeling uitgevoerd. Daarnaast zijn er alcoholspoelingen en tellingen met behulp van vangplanten uitgevoerd.

Visuele beoordeling

Schade

Trips kan op verschillende manieren schade toe brengen aan een gewas. Door over het blad te schrapen met zijn snuit beschadigt de trips de cellen van het oppervlakteweefsel en zuigt deze vervolgens leeg. Er ontstaan daardoor zilvergrijze vlekjes op de bladeren wat visuele schade geeft. Daarnaast kunnen bladeren (wanneer deze verder groeien) vervormen. Ook

kan het zijn dat wanneer er jonge knoppen worden aangeprikt, deze vervormen of niet verder ontwikkelen. Verder kan trips ook virussen met zich mee dragen. Wanneer een nieuwe plant dan wordt aangeprikt door de geïnfecteerde trips, kunnen deze virussen worden overgedragen.

Wekelijks werd het gewas visueel beoordeeld. Er werd hierbij bijgehouden wat de zichtbare trips en meeldauw schade was.

Bij het beoordelen werd er onderscheid gemaakt tussen bloemen en knoppen.
Om de trips schade te beoordelen werd er gebruik gemaakt van schadereeksen. In Figuur 2 is de schadereeks van bloemen vanaf de zijkant zichtbaar. In 3 is de schadereeks van bloemen van bovenaf zichtbaar. In figuur 4 is de schadereeks van de knoppen zichtbaar.

Figuur 2: Schadereeks trips roos zijkant. Van links naar rechts: 1. Eén aantasting op een kroonblad. 2. Op minimaal 2 verschillende kroonbladeren trips aantasting. 3. Op meer dan 4 verschillende kroonbladeren trips aantasting. 4. Op meer dan 6 verschillende kroonbladeren trips aantasting. 5. Op meer dan 6 verschillende kroonbladeren grote trips aantasting.

Figuur 3: Schadereeks trips roos bovenkant. Van links naar rechts: 1. Eén aantasting op een kroonblad. 2. Op minimaal 2 verschillende kroonbladeren trips aantasting. 3. Op meer dan 4 verschillende kroonbladeren trips aantasting. 4. Op meer dan 6 verschillende kroonbladeren trips aantasting. 5. Op meer dan 6 verschillende kroonbladeren grote trips aantasting.

Figuur 4: Schadereeks trips roos knop. Van links naar rechts: 1. Eén lichte aantasting op een kelkblad. 2. Op twee verschillende kelkbladeren lichte aantasting. 3. Rondom de knop lichte aantasting. 4. Rondom ernstige aantasting. 5. Rondom ernstige aantasting en verbruining van de knop.

Spoeltellingen
Naast de visuele beoordelingen, is er ook eens in de 3-4 weken een alcoholtelling verricht.

Vangkaarten
Naast de visuele beoordeling en de alcoholspoeling is een telling uitgevoerd met behulp van gele vangplaten. De kaarten zijn ter hoogte van de bloemen gehangen. Tellingen zijn gedaan 24 uur na aanbrengen van de vangplaat. Hierbij zijn alle tripsen die zich aan de voor of achterzijde van de kaart bevonden geteld. Bij de telling is geen onderscheid gemaakt tussen de verschillende stadia van de trips.

Gegevensverzameling & Analyseren
Analyse van de gegevens is uitgevoerd mbv SPSS middels de One-way ANOVA Tukey-B toets en de Posthoc Homogeneity of Variance met een significantie van 0,05. En voor de correlatie toetsen wordt gebruik gemaakt van de two-tailed Pearson correlatie. Voor het correlatiecoëfficiënt gelden de parameters uit

Tabel 1.

0.00 – 0.30	nauwelijks of geen correlatie
0.30 – 0.50	lage of zwakke correlatie
0.50 – 0.70	middelmatige correlatie
0.70 – 0.90	hoge of sterke correlatie
0.90 – 1.00	zeer hoge of zeer sterke correlatie

Tabel 1: Correlatiecoëfficiënt interpretatie

Resultaten

Visueel
Tijdens het onderzoek is elke week een visuele beoordeling uitgevoerd. Hierbij is zowel naar de schade op de bloemknoppen als op de bloemen beoordeeld. De uitkomsten van de beoordelingen zijn getoetst op verschillen met behulp van de ANOVA toets.

Schade Knop en schade bloem
Op basis van gemiddelde waardes over meerdere weken is een significant verschil aanwezig tussen de verschillende cultivars. Ook wat betreft schade in de bloem is er tussen de verschillende cultivars significante verschillen waargenomen. Tussen de schade aan de knop en schade aan de bloem was een correlatie van 0.875

Alcohol telling
De resultaten in de alcohol tellingen vertoonden een grillig beeld. In week 48 was er een significant verschil aanwezig. In week 50 was dat niet meer aanwezig. De correlatie tussen de alcohol telling en de beoordeling van de knop was 0,654. Voor de alcoholtelling en de beoordeling van de bloem was dat 0,673.

Gele kaarten
De tellingen van de vangkaarten liet enkele cultivars zien waarbij de tellingen significant afwijken van een grote groep cultivars. Echter tussen de kaart tellingen en de schade aan de knoppen en bloem is geen correlatie aangetoond.

Conclusie en discussie

Reflectie op de methode
Uit de resultaten blijkt dat de het meten van de zilverschade aan de knop en of bloem de beste methode is om verschillen in gevoeligheid van een cultivar aan te tonen. Bij een goede schaal verdeling is de wijze van beoordeling op eenvoudige wijze uit te voeren.
De alcohol tellingen vergt veel tijd en toonden in deze proef een lage correlatie aan met de resultaten van de schade aan de knop en bloem. De telling op de vangplaten vertoonde in deze proef geen correlatie met de schade aan de knop en bloem. Dit is geen bruikbare methode.

Reflectie op de resultaten
In deze proef is een significant verschil aangetoond tussen de verschillende cultivars wat betreft zilverschade in de knop en bloem. Deze resultaten kunnen als basis dienen voor het verder onderzoeken hoe groot de genetische verschillen zijn in het ontstaan van zilverschade in de knop en bloem en waarop deze verschillen zijn gebaseerd. Hiervoor moeten meer cultivars getest worden.

Alcoholtellingen van het aantal tripsen in de knop geeft nog geen houvast in het mogelijk ontdekken van een vorm van resistentie. Dit moet nader onderzocht worden.
In deze proef is slechts een lage correlatie aangetoond tussen het aantal tripsen in de knop en bloem en de hoeveelheid zilverschade aan de knop en bloem. Dit moet nader onderzocht worden.

De Zonnebloem B.V. Cris Oostveen
Biotoets Trips in Thunbergia

Inleiding
De aanleiding van het ontwikkelen van een biotoets in de Thunbergia is de wens om bij de veredeling meer rekening te kunnen houden met de gevoeligheid of mogelijk resistentie tegen Trips (*Frankliniella occidentalis*). Om hier een biotoets voor te ontwikkelen is het eerst nodig om van de verschillende soorten die gebruikt kunnen worden bij de veredeling de gevoeligheid te weten. Dit hebben we laten onderzoeken bij Proeftuin Zwaagdijk, dit heet inmiddels Vertify. Het onderzoek heeft plaatsgevonden in het World Horti Center in Naaldwijk onder leiding van Jeroen Sanders.

Proefopzet
In totaal zijn er in deze proef 16 verschillende Thunbergia cultivars gebruikt. Alle cultivars zijn geleverd door handelskwekerij de Zonnebloem uit de Kwakel.
Op het moment dat de planten werden geleverd waren de planten 6 weken oud. Iedere 23 cm pot bestond uit een totaal van drie planten. De potten zijn opgehangen aan gewasdraden op 1,5 meter planthoogte. De ruimte tussen de planten was 100 cm hart-op-hart. De planten zijn geïrrigeerd d.m.v. druppelaars (2 l/uur) en de proef is uitgevoerd in 9 herhalingen. Twee weken na plantdatum werd er in elk veld een gelijkmatige hoeveelheid Californische trips *(Frankliniella occidentalis)* geïntroduceerd bestaande uit zowel larven als adulten.

Op 1 week na de introductie van de tripsen in het gewas, is het aantal larven en adulten geteld in 3 random bemonsterde scheuten van ongeveer 35 cm lengte. De telling is uitgevoerd via de spoeltelling-methodiek waarbij de scheuten in een oplossing met 70% alcohol zijn gebracht. Vanaf het tweede waarnemingsmoment waren er voldoende bloemen aanwezig om ook het aantal trips per 10 bloemen te tellen. Hiernaast is de zilverschade,

veroorzaakt door trips, beoordeeld door het aantal bladbeschadigingen (‘zilvervlekjes’) te tellen op het totaal aantal bladeren per pot.

Resultaten

Tripstelling

Voor het ontwikkelen van de biotoets moet er in deze opstelling gekeken worden wat het beste en meest betrouwbare moment (en manier) is om de trips gevoeligheid vast te stellen. Wat we dus willen weten is hoe snel we de gevoeligheid kunnen constateren die ook in een later stadium nog correct is. De tripstellingen zijn uitgevoerd d.m.v. de spoeltelling-methodiek waarbij 3 scheuten of 10 bloemen in een alcohol-oplossing (70%) voor minimaal 1 uur zijn gebracht; waarna de oplossing over een filter van 100µm is gegoten. De aantallen trips bestaande uit larven en adulten zijn apart met behulp van een microscoop geteld. Op de laatste 2 telmomenten zijn er van iedere cultivar planten (1/3 pot) in zijn geheel gespoeld in de alcohol; per cultivar in 2 herhalingen. Tussen de cultivars werden gedurende de gehele proefperiode grote betrouwbare verschillen waargenomen in de aantallen trips in het gewas. De hoeveelheid trips aangetroffen in de bloemen was relatief laag, waardoor de verschillen tussen de cultivars ook veel minder groot was dan bij de tellingen op blad en scheut.

Tripsschade

De visuele tripsschade werd beoordeeld door het aantal zilvervlekjes met schade veroorzaakt door trips te tellen per plant. De zilvervlekjes worden omschreven als genecrotiseerd weefsel op de bovenkant van het blad. Vanaf de eerste waarneming waren er al significante verschillen te zien tussen de cultivars in de mate van visuele schade veroorzaakt door trips. Er waren soorten met meer en met minder zilverschade aan de bladeren.

Correlatie trips - tripsschade

Om na te gaan of er een verband was tussen de mate van tripsschade (zilvervlekjes) en hoeveelheid trips, is er een correlatieanalyse uitgevoerd. De analyse is uitgevoerd met de data verkregen aan het einde van de proefperiode in week 20; op het moment dat de hoogste aantallen trips en aantasting werd waargenomen. De correlatieanalyse gaf een correlatiecoëfficiënt van 0,68. Hieruit blijkt dat er een middelmatige correlatie bestaat tussen het aantal zilvervlekjes en de hoeveelheid trips. Bij een aantal cultivars waarbij relatief hoge aantallen zilvervlekken werden waargenomen waren de aantallen tripsen in het gewas toch laag.

Conclusie

Zowel op basis van het aantal tripsen waargenomen in het gewas als op basis van de visuele zilverschade kunnen betrouwbare verschillen worden aangetoond in de mate van gevoeligheid voor trips. Bij de eerste waarneming werden er relatief weinig tripsen teruggevonden. Gedurende de proef ontwikkelde de populatie in het gewas zich en werden er grote verschillen in de aantallen trips in scheuten en blad van de cultivars waargenomen. De hoeveelheid trips in de bloemen was gedurende de proef laag en dit is dan ook voor Thunbergia geen goede parameter om de verschillen in trips-gevoeligheid te kunnen aantonen.

Grote verschillen in visuele tripsschade (bladzilvervlekjes) werden vanaf het eerste waarnemingsmoment waargenomen. Gedurende de proef werd er vrijwel geen tripsschade in de bloemen van Thunbergia waargenomen. Op basis van de uitgevoerde correlatieanalyse blijkt dat er een middelmatige correlatie bestaat tussen het aantal zilvervlekjes veroorzaakt door trips en het totale aantal aanwezige trips.

De Zonnebloem B.V. Cris Oostveen
Verslag 1e onderzoek Biotoets Botrytis in Thunbergia

Inleiding
De aanleiding van het ontwikkelen van deze biotoets is de wens in de veredeling om Botrytis resistentie mee te ontwikkelen. Hiervoor moet je eerst een biotoets ontwikkelen zodat je kan testen wat de gevoeligheid of resistentie in het gewas is. Dit onderzoek is door drie studenten uitgevoerd in samenwerking met verschillende instanties. Zo hebben kwekerij de Zonnebloem en docenten van Hogeschool Inholland een rol gespeeld in het succesvol uitvoeren van het onderzoek.

Proefopzet
Algemeen
De onderzoeksstrategie voor het ontwikkelen van een biotoets voor Botrytis cinerea resistentie in de Thunbergia bestaat uit een reeks praktijkproeven en een literatuurstudie. Om deze biotoets te ontwikkelen zijn er meerdere proeven uitgevoerd. Eerst is er Botrytis cinerea vermeerderd vanuit aangeleverd buisjes met sporulerende Botrytis.
Na de vermeerdering van Botrytis cinerea zijn er afgeknipte bloemen van de Thunbergia rassen op water gezet en geïnoculeerd met Botrytis. Ten slotte zijn er bloemen die aan de Thunbergia plant zaten met Botrytis cinerea geïnoculeerd.
Gedurende het project zijn er vijf rassen Thunbergia gebruikt worden. Deze planten zijn onder gecontroleerde omstandigheden in een klimaatcel geteeld. De klimaatcel heeft zes aparte vakken van één vierkante meter. Dit geeft de mogelijkheid om meerdere herhalingen van de proeven neer te zetten.

Methode opkweek Botrytis
Het vermeerderen van de Botrytis is gedaan aan de hand van het mycelium verkregen uit de aangeleverde in Agar pluggen sporulerende Botrytis. De malt extract Agar platen zijn in het midden geïnoculeerd met een klein plukje mycelium. De petrischalen zijn onder geen enkele omstandigheden afgesloten geweest met parafilm omdat de Botrytis cultuur zuurstof nodig heeft om te groeien.

Nadat de petrischalen geïnoculeerd waren zijn de petrischalen in compleet donker geplaats. De petrischalen verbleven in het complete donker totdat het mycelium de rand van de petrischalen bereikt had. Dit duurde ongeveer drie tot vijf dagen. De volgende stap in het proces was het blootstellen van de Botrytis cultuur aan twee dagen normaal licht om het vormen van sporen te stimuleren. Hierna is de Botrytis cultuur terug in het donker geplaats om vervolgens na 5 dagen volwassen sporen te oogsten.

Methode oogsten van Botrytis
Het oogsten van de gevormde sporen is gebeurd met tien milliliter water. De sporen zijn voorzichtig van de petrischaal geschraapt met een plastic spatel totdat de volledige schaal vochtig en donker oogde. Hierbij is er opgelet dat de Agar niet werd beschadigd. De verkregen suspensie van sporen is gefiltreerd door een glaswol laag in een 5 milliliter wegwerppipet om mycelium en klompjes uit de suspensie te filteren. Vervolgens werd de gefilterde vloeistof opgevangen in een 50 milliliter centrifugeerbuisje. Deze buis werd gedurende tien minuten bij 800 RPM gecentrifugeerd. Door centrifugeren ontstonden er twee lagen (pellet onderop en supernatant bovenop). Na het wegpipeteren van de supernatant laag, is er van de pellet laag een suspensie gemaakt in twintig milliliter schoon water. Deze nieuw verkregen suspensie is wederom gecentrifugeerd en de supernatant laag werd wederom van de pellet laag verwijderd.

Van de overgebleven pellet laag is met twintig milliliter een suspensie gemaakt. Deze suspensie is gebruikt om met behulp van een haemocytometer de sporen concentratie te berekenen. Na het berekenen van de sporenconcentratie, is de suspensie nog een keer gecentrifugeerd om vervolgens gesuspendeerd te worden in Potato dextrose broth.

Inoculeren van de afgeknipte Thunbergia bloemen
Voor de eerste inoculatie proef zijn er afgeknipte bloemen op water zijn gezet en vervolgens geïnoculeerd. De beschikbare afgeknipte bloemen zijn per ras in bekers water gezet en genummerd.

Methode inoculeren Thunbergia bloemen
Het inoculeren van de bloemen is gedaan met het van tevoren geprepareerde inoculatiemedium. De Botrytis sporen zijn op locatie toegevoegd aan de Potato dextrose broth om vroegtijdige sporen kieming te voorkomen. Iedere bloem is geïnoculeerd met één druppel van twee microliter. Deze druppel is toegediend op een van de bloemblaadjes. Inoculatie van alle bloemen diende te gebeuren in een tijdsbestek van vier uur om voortijdig kiemen van de schimmelsporen te voorkomen. Deze inoculatie methode is verkozen omdat vanuit de praktijk is gebleken dat deze methodische/wetenschappelijke aanpak van bloemen inoculeren de grootste succes kans heeft op het daadwerkelijk ziek krijgen van de plant.

Na het inoculeren van de bloemen was het noodzaak om de relatieve luchtvochtigheid in de vakken zo dicht mogelijk bij honderd procent te houden gedurende de eerste 24 uur. Tijdens deze periode van hoge luchtvochtigheid is het belangrijk de lichtintensiteit te drukken om de Botrytis cinerea zoveel mogelijk kans te geven.

Methode inoculeren Thunbergia planten
Het inoculeren van de bloemen is gedaan met het van tevoren geprepareerde inoculatiemedium. De Botrytis sporen zijn op locatie toegevoegd aan de Potato dextrose broth om vroegtijdige sporenvorming te voorkomen. Voor het inoculeren was het van belang om de planten water te geven. Het water geven verhoogt de turgor en verbetert het

inoculatieproces. Iedere plant is op twee willekeurige bloemen geïnoculeerd met één druppel van twee microliter. Deze druppel is toegediend op een van de bloemblaadjes. Inoculatie van alle bloemen diende te gebeuren in een tijdsbestek van vier uur om voortijdig kiemen van de schimmelsporen te voorkomen.

Deze inoculatie methode is verkozen omdat vanuit de praktijk is gebleken dat deze methodische/wetenschappelijke aanpak van bloemen inoculeren de grootste succes kans heeft op het daadwerkelijk ziek krijgen van de plant. Na het inoculeren van de bloemen was het noodzaak om de relatieve luchtvochtigheid in de vakken zo dicht mogelijk bij honderd procent te houden gedurende de eerste 24 uur. Tijdens deze periode van hoge luchtvochtigheid is het belangrijk de lichtintensiteit te drukken om de Botrytis cinerea zoveel mogelijk kans te geven.

Meten van het Botrytis schadebeeld
Het schadebeeld op de bloemen en planten is gemeten met behulp van een digitale schuifmaat. Met deze schuifmaat kan de grootte van de laesie bepaald worden. De eerste schadebeelden zijn negentien uur na inoculatie waargenomen. Botrytis resistentie is waar te nemen door het niet verder groeien van de originele laesie of een langzame groeisnelheid. Het waarnemen van de planten gebeurden in totaal op drie momenten.

Conclusie
Er zijn meerdere manieren om een biotoets voor Botrytis resistentie uit te voeren. De hierbij gebruikte methoden bleken naderhand op het gebied van bloemhoudbaarheid niet de gewenste resultaten op te leveren. Daarentegen resulteerden de gekozen omstandigheden en inoculatiemethode wel in het succesvol inoculeren van de planten met Botrytis.
Uit de resultaten van het onderzoek is gebleken dat de inoculatie van bloemen ten opzichte van de inoculatie op de plant de meest bruikbare resultaten oplevert voor het beoordelen van de Botrytis resistentie van verschillende Thunbergia rassen. De aanbeveling is om in de toekomst deze methode verder te optimaliseren.

Verslag 2e onderzoek Biotoets Botrytis in Thunbergia

Inleiding
Dit 2e onderzoek sluit aan op de aanbeveling van het vorige onderzoek. Het onderzoek is in de praktijk op locatie van De Zonnebloem met ondersteuning van drie nieuwe studenten van Inholland uitgevoerd.

Een aandachtspunt van het vervolgonderzoek is om de inoculatie methode te verbeteren. Inoculatie met een pipet is arbeidsintensief. Kan dat niet makkelijker is een van de vragen. Ook de houdbaarheid van de afgeknipte bloemen liet te wensen over in het eerste onderzoek. Kunnen we de houdbaarheid van afgeknipte bloemen verbeteren om de resultaten na inoculatie beter te monitoren? Met deze twee vragen zijn de studenten aan de slag gegaan.

Proefopzet

Methode van inoculatie

Bij deze proef is er op 2 verschillende manieren geïnoculeerd, de helft van de bloemen is geïnoculeerd door middel van bedruppelen met een pipet, de andere helft is geïnoculeerd door middel van verneveling met een parfumspuit. Voorafgaand aan de inoculatie heeft er een kleine pilot plaatsgevonden waarin bekeken is op welke manier de bloemen het best bewaard bleven tijdens de proef. Hieruit is naar voren gekomen dat de bloemen het best bewaard bleven wanneer ze met nog enkele centimeters van het steeltje in water met snijbloemenvoeding staan.

Inoculatie Week 1

Van elk van de 7 rassen zijn 48 bloemen afgeknipt, 24 per inoculatiemethode. Deze zijn vervolgens in de geprepareerde reageerbuizen geplaatst. De reageerbuizen bevatten water met snijbloemvoeding van het merk Chrysal Better Bloom en zijn voor 90% gevuld zodat de bloem in contact is met het water. Op elk rek staan 24 bloemen van hetzelfde ras, verdeeld in 2 groepen, gepipetteerd en verneveld.

Bij de eerste inoculatie is gewerkt met een concentratie van 10.200 sporen per 10 microliter. Hierbij wordt met de pipet 2 microliter op het bloemblad gedruppeld. De tweede helft van de bloemen is geïnoculeerd door middel van verneveling met een parfumspuit. Hierbij is de 50 ml sporenconcentratie overgebracht in de parfumspuit en is er 10 keer gesproeid per groep. Om te voorkomen dat bij het vernevelen andere bloemen geraakt kunnen worden is deze handeling in een apart vak in de klimaatcel uitgevoerd

Voor de controlegroep zijn er van elk ras 2 bloemen afgenomen, waarvan één geïnoculeerd is met kraanwater, en één bespoten is met kraanwater. Bij de volledige planten zijn er van elk ras 5 bloemen geïnoculeerd door middel van pipeteren en 5 door verneveling. Hierna zijn alle bloemen en volledige planten in de klimaatcel geplaatst onder de volgende omstandigheden:

- Eerste 24 uur
    - Dagtemperatuur: 18° C
    - Nachttemperatuur: 16° C
    - Luchtvochtigheid: 100% onder de plastic tenten.
    - Lichtintensiteit: 15 μmol/m^2/s. Blauw, 35 μmol/m^2/s. Rood.

- Na de eerste 24 uur
    - Dagtemperatuur: 18° C
    - Nachttemperatuur: 16° C
    - Luchtvochtigheid: 80%
    - Lichtintensiteit: 30 μmol/m^2/s. Blauw, 70 μmol/m^2/s. Rood.

Na het uitvoeren van de laatste metingen zijn alle bloemen en planten verwijderd uit de klimaatcel en weggegooid.

Inoculatie Week 2
Voor de inzet van de proef in de tweede week is gebruik gemaakt van een verdunde sporenconcentratie. Er zal gebruik gemaakt worden van 1/2e concentratie en 1/4e concentratie. Dit geeft bij 1/2e concentratie 5.100 sporen en bij 1/4e concentratie 2.550 sporen in de vergelijkbare proefopzet.

Voor deze proef zijn er van elk van de 7 rassen 48 bloemen afgeknipt. Hiervan worden 24 bloemen geïnoculeerd met de 1/2e concentratie en 24 bloemen met de 1/4e concentratie. Er zal weer worden geïnoculeerd door middel van pipetteren en vernevelen, echter zal dit keer bij het pipetteren in het hart van de bloem gepipetteerd worden.

Om bij het vernevelen tot dezelfde hoeveelheid geïnoculeerde sporen te komen als bij het pipetteren is er een verdunning gemaakt. Doordat er per keer spuiten 500 microliter vrijkomt zal de oplossing met een factor 21 verdund moeten worden om tot dezelfde totale hoeveelheid sporen te komen bij 1 keer spuiten. Dit geldt bij zowel de 1/2e concentratie als de 1/4e concentratie. Om het volledige bloemoppervlak te kunnen raken met de sporenoplossing zonder te overdoseren is de oplossing 100 keer verdund met kraanwater. Hiermee zijn de bloemen vervolgens 5 keer bespoten vanuit verschillende kanten. Dit is met beide oplossingen gedaan.

Protocol meten van het schadebeeld
Het meten van de schadebeelden aan de Thunbergia's is verschillend per methode van inoculatie. Het meten van de met de pipet geïnoculeerde bloemen zal gebeuren met een schuifmaat. Hiermee kan, vanaf 16 uur na het inoculeren, de grootte van ontstane laesies bepaald worden. Er kan worden gesproken van een resistentie als de laesies niet in grootte toenemen of een zeer lage groeisnelheid hebben. Wanneer er een bloemblad geïnoculeerd wordt ontstaat er één laesie, deze kan dan goed worden gemeten.

Bij het inoculeren in het hart van de bloem kunnen er meerdere laesies ontstaan. Deze zullen alle gemeten worden. Naast het tellen en meten van de laesies wordt er gedurende de waarnemingen ook vastgesteld hoeveel procent van de bloem de glazige rot vertoond. Dit wordt in dit rapport benoemd als bloemdekking. In tegenstelling tot het waargenomen ziektebeeld in de proef van 2019-2020 komt dit ziektebeeld naar voren en niet de necrotische laesies die werden verwacht.

Figuur 2: een bloem met laesies in het hart en op het bloemblad. Ook is er te zien hoe de Botrytis zich verder uit op de bloem. Het is te zien als de glazige rot, in dit rapport wordt dit bloemdekking genoemd.

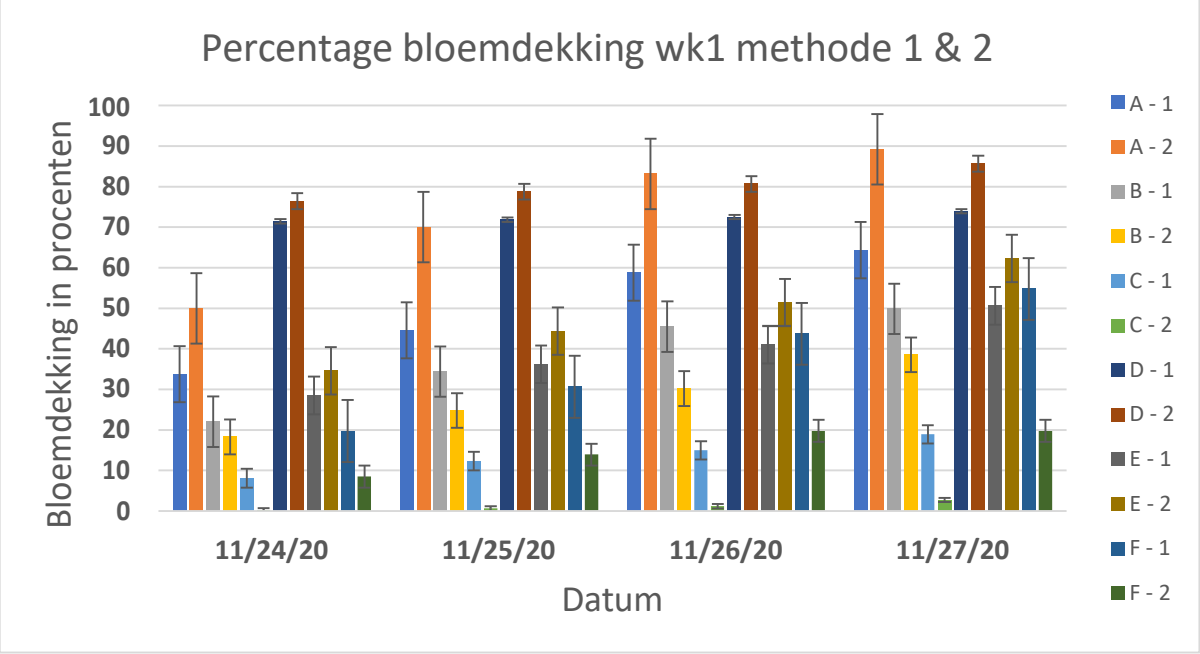
Bij de inoculatie methode door verneveling is er een kans dat er over de gehele bloem laesies ontstaan, wat het lastig maakt om met een schuifmaat de grootte te meten. Daarom wordt er hier gekozen voor het waarnemen van de hoeveelheid laesies en de ontwikkelsnelheid van deze laesies op de bloemen. De hoeveelheid ontstane laesies en ontwikkelsnelheid is hier een indicatie voor mogelijke Botrytis resistentie.

Resultaten

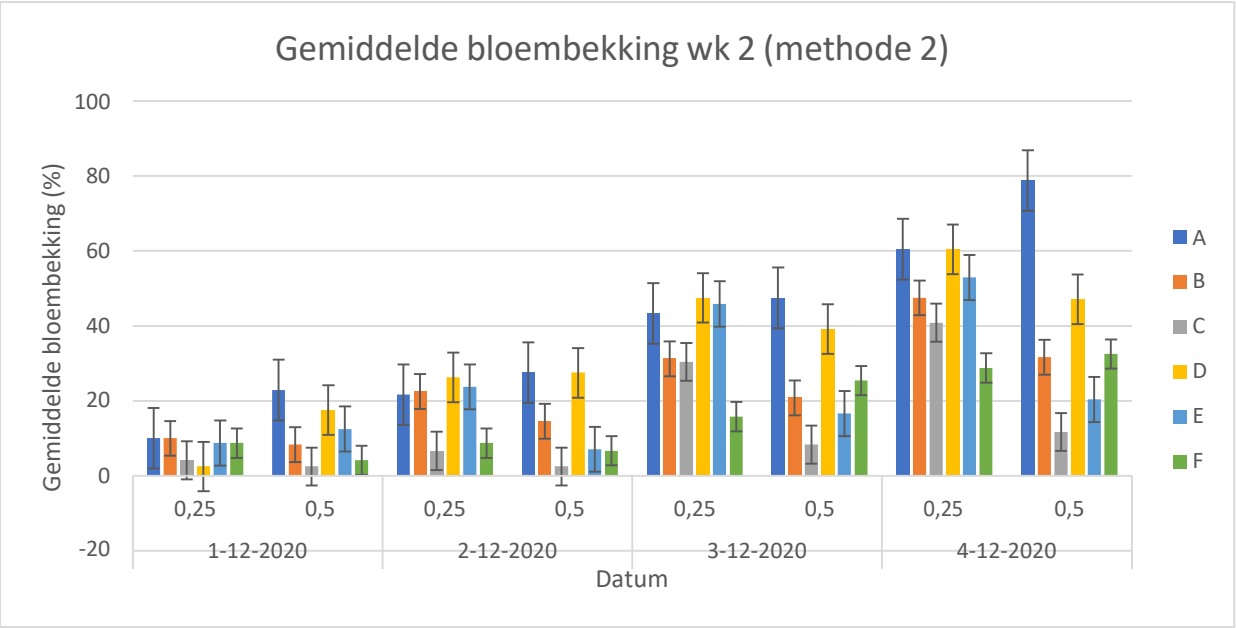
In dit hoofdstuk worden de resultaten van het onderzoek uitgezet in grafieken. In deze grafieken zullen enkele afkortingen en codes worden gebruikt en voor de duidelijkheid zullen deze eerst worden toegelicht. De letters in elke grafiek staan voor de verschillende rassen. Methode 1 is inoculatie door middel van pipeteren en methode 2 is inoculatie door middel van vernevelen.

Resultaten Gemiddeld percentage bloemdekking

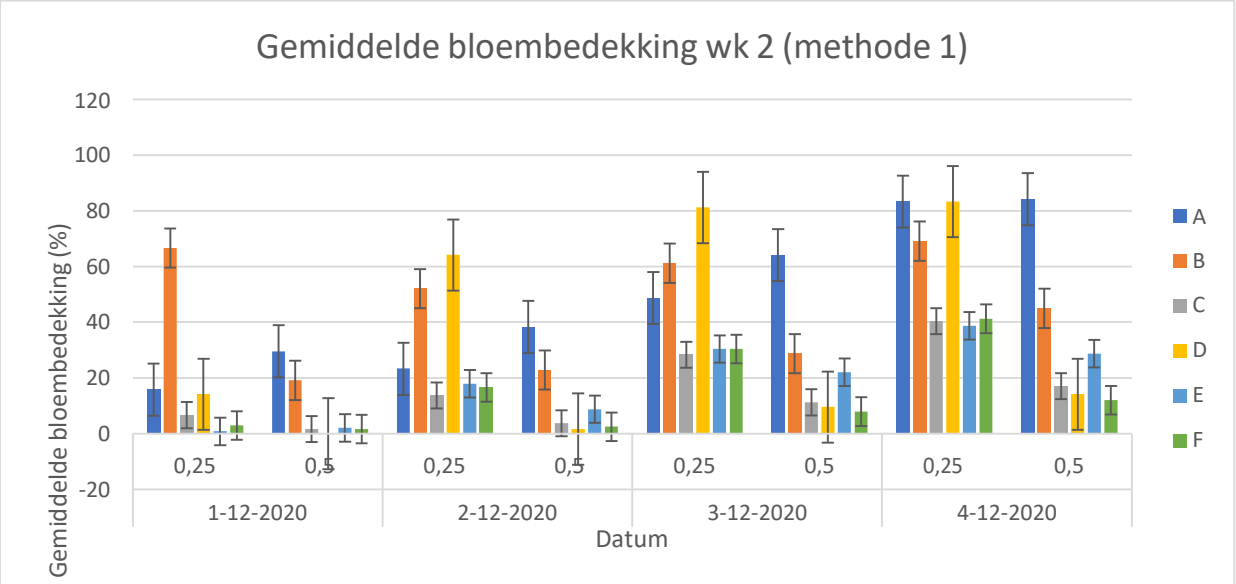
In deze resultaten zullen de waarnemingen voor bloemdekking worden weergegeven. Met bloemdekking wordt de mate waarin de bloem is bedekt door de glazige aantasting. Dit kan ook wel glazigheid worden genoemd, in dit geval hebben wij het echter bloemdekking genoemd. In de grafieken zal worden weergegeven hoe deze bloemdekking zich ontwikkeld gedurende de dagen waarop wordt waargenomen.



Grafiek 1: Gemiddelde bloembedekking per bloem per ras in week 1 (methode 1 en 2). In deze grafiek is te zien hoe de ontwikkeling van de bloemdekking zich heeft ontwikkeld gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de eerste week. De letters met getallen erachter in de legenda staan voor de rassen en inoculatie methode. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode. Op de y-as staat de gemiddelde bloemdekking in procenten en op de x-as de datum.



Grafiek 2: Gemiddelde bloembedekking per bloem per ras in week 2 (methode 2). In deze grafiek is te zien hoe de ontwikkeling van de bloemdekking zich heeft ontwikkeld gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de tweede week. De letters met getallen erachter in de legenda staan voor de desbetreffende rassen en inoculatie methode. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode. Op de y-as staat de gemiddelde bloemdekking in procenten en op de x-as de datum en verschillende concentraties die zijn gebruikt.

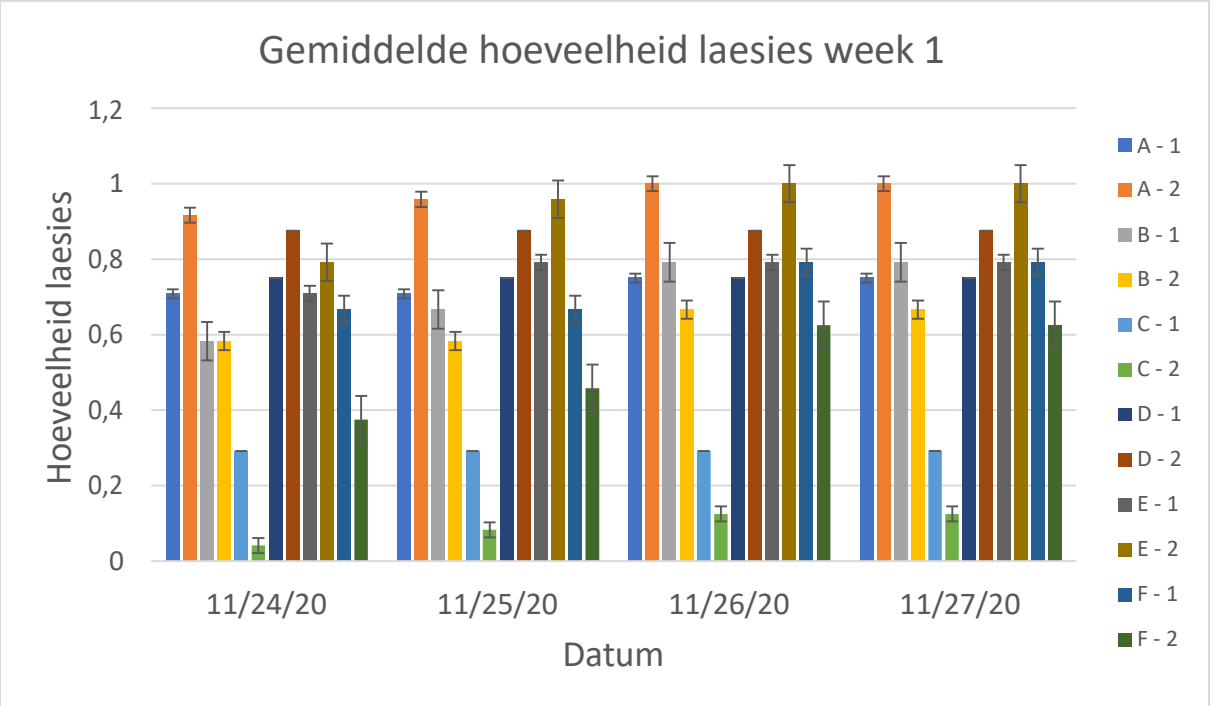


Grafiek 3: Gemiddelde bloembedekking per bloem per ras in week 2 (methode 1). In deze grafiek is te zien hoe de ontwikkeling van de bloemdekking zich heeft ontwikkeld gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de tweede week. De letters met getallen erachter in de legenda staan voor de desbetreffende rassen en inoculatie methode. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode. Op de y-as staat de gemiddelde bloemdekking in procenten en op de x-as de datum en verschillende concentraties die zijn gebruikt.

De metingen beginnen een dag na de inzet van de proef. In grafiek 1 is af te lezen wat de gemiddelde bloembedekking per bloem per ras is in week 1. Wat opvalt is dat rassen C en F erg veel verschillen van de rest van de rassen. Na een Tuckey HSD test kon er bij methode 1 inoculeren worden gezegd dat ras C en F verschillen van alle andere rassen en ook van elkaar. De rest van de rassen is niet significant verschillend van elkaar (*Zie: Bijlage 2.1. & 2.2.)*. Wanneer gekeken wordt naar methode 2 valt op dat ras A en D erg verschillen ten opzichten van de andere rassen, rassen A en D hebben namelijk de grootste mate van bloembedekking ondervonden. Na een Tuckey HSD test kan worden gezegd dat ras A en D inderdaad verschillen van alle andere rassen maar niet van elkaar.

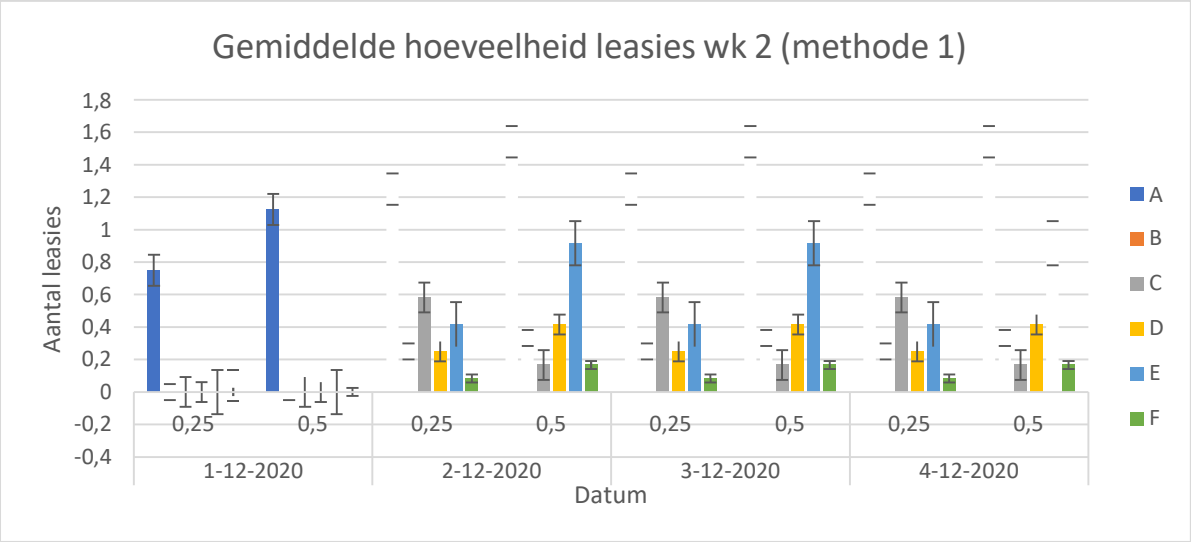
Wanneer gekeken wordt naar grafiek 2 en 3 lijken rassen D, B en A in methode 1 erg te verschillen van de andere soorten. Na het toepassen van een Tuckey HSD test kan gezegd worden dat bij methode 1 ras D significant verschilt met alle andere soorten. Ook ras B en A zijn significant verschillend met alle andere rassen maar niet van elkaar. Bij methode 2 in week 2 kan na het uitvoeren van dezelfde toets worden gezegd dat ras C significant afwijkt van ras E, D en A maar niet van de andere soorten. Ras A en D verschillen niet significant van elkaar. Ras E verschilt niet van ras D maar wel van ras A.

Resultaten Gemiddelde hoeveelheid laesies
In deze paragraaf worden de resultaten van de gemiddelde hoeveelheid laesies weergegeven doormiddel van meerdere grafieken. De laesie uitte zich in een bruinachtige schimmelplek op de rand van het bloemhart en het bloemblad (soms ontstonden er hier meerdere van op een bloem). Deze zijn nauwkeurig geteld en de gemiddelden zijn in de grafieken hieronder weergeven.

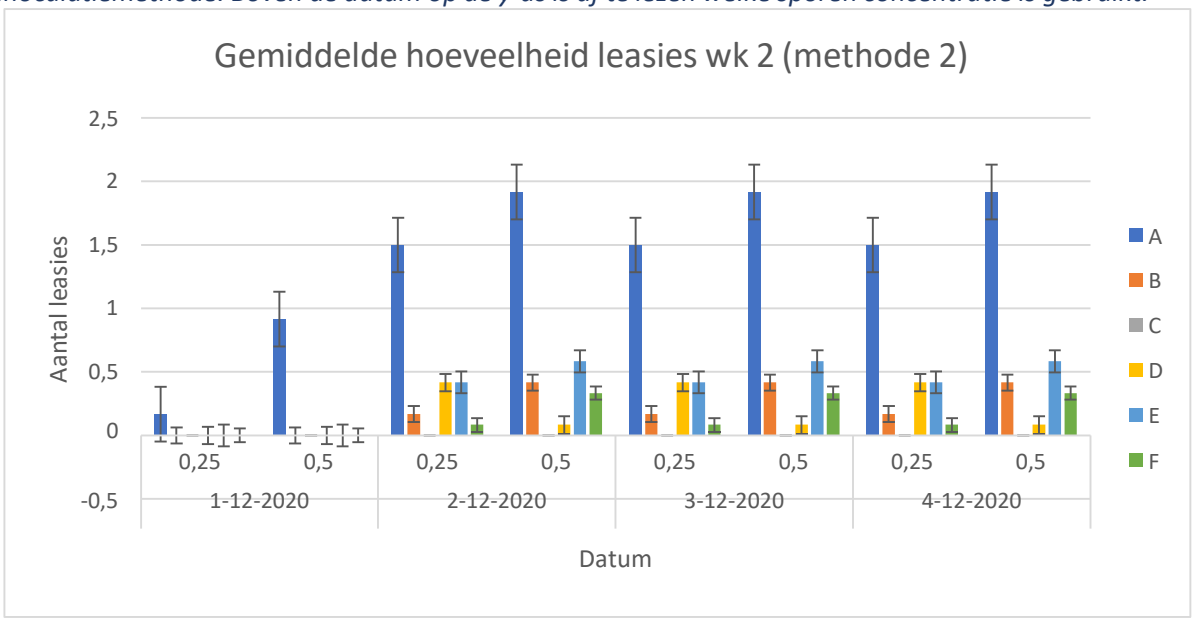


Grafiek 4: Gemiddelde hoeveelheid laesies per bloem per ras in week 1 (methode 1 en 2). In deze grafiek is te zien hoeveel laesies er gemiddeld per bloem per ras zijn ontstaan gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de eerste week. De letters met getallen erachter in de legenda staan voor

de desbetreffende rassen en inoculatie methode. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode.



Grafiek 5: Gemiddelde hoeveelheid laesies per bloem per ras in week 2 (methode 1). In deze grafiek is te zien hoeveel laesies er gemiddeld per bloem per ras zijn ontstaan gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de tweede week. De letters in de legenda staan voor de desbetreffende rassen. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode. Boven de datum op de y-as is af te lezen welke sporen concentratie is gebruikt.



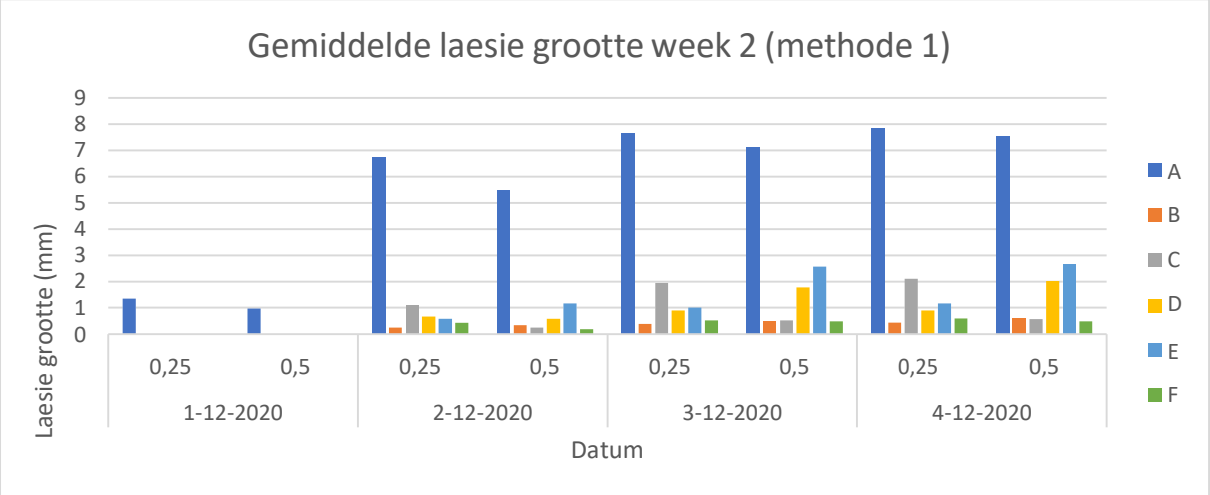
Grafiek 6: Gemiddelde hoeveelheid laesies per bloem per ras in week 2 (methode 2). In deze grafiek is te zien hoeveel laesies er gemiddeld per bloem per ras zijn ontstaan gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de tweede week. De letters in de legenda staan voor de desbetreffende rassen. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode. Boven de datum op de y-as is af te lezen welke sporen concentratie is gebruikt.

Wanneer gekeken wordt naar grafiek 4 valt op dat ras C erg weinig laesies heeft ten opzicht van de rest van de rassen. Na het uitvoeren van een Tuckey HSD test kan gezegd worden dat bij methode 1 ras A significant verschild van alle andere rassen. De andere rassen verschillen niet van elkaar. Wat erg opvalt bij methode 2 in week 1 is dat C weer minder laesies heeft dan de rest van de rassen, ras B en F hebben ook minder laesies dan de rest van de rassen. De andere rassen liggen vrij dicht bij elkaar. Door het uitvoeren van een Tuckey HSD test kan worden gezegd dat ras C significant verschilt in het aantal laesies met de rest van de rassen. Tussen ras F en ras B zit geen significant verschil maar zijn wel significant verschillend van de rest van de rassen. De andere rassen verschillen niet significant van elkaar.

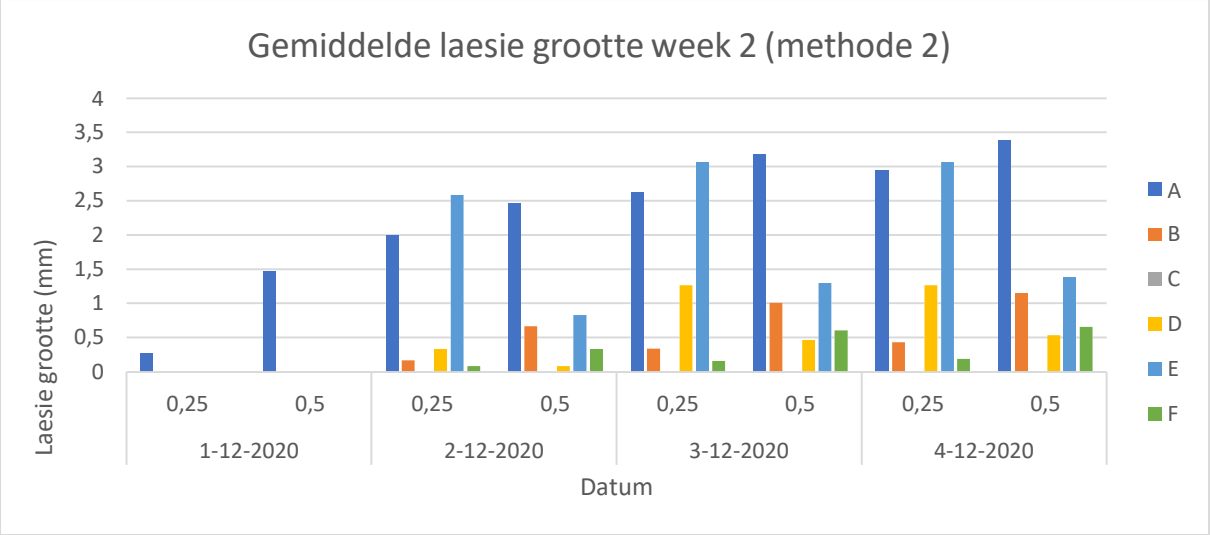
Wanneer gekeken wordt naar grafiek 5 valt op dat ras A veruit het meeste laesies heeft. Na het uitvoeren van een Tuckey HSD test kan gezegd worden dat ras A significant verschilt met alle andere rassen bij methode 1 week 2. Ook verschillen ras F en E van elkaar maar niet van de andere rassen. Wanneer gekeken wordt naar grafiek 6 valt op dat ras A ver boven de rest uit steekt maar ras C nergens last van heeft. Uit de Tuckey HSD test komt dan ook dat ras A significant verschilt van alle andere rassen. Ook verschilt ras C van ras E.

Resultaten Gemiddelde laesie grootte

In deze paragraaf worden de resultaten van de gemiddelde laesie grootte weergegeven doormiddel van meerdere grafieken. De laesies uitten zich in bruinachtige schimmel plekken op de rand van het bloemhart en de bloembladeren. Deze laesies zijn gemeten en de gemiddelde groottes zijn hieronder weergeven in de grafieken.



Grafiek 7: Gemiddelde laesie grootte per bloem per ras in week 2 (methode 1). In deze grafiek is te zien wat de gemiddelde laesies groottes per bloem per ras zijn ontstaan gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de tweede week. De letters in de legenda staan voor de desbetreffende rassen. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode. Boven de datum op de y-as is af te lezen welke sporen concentratie is gebruikt.



Grafiek 8: Gemiddelde laesie grootte per bloem per ras in week 2 (methode 2) In deze grafiek is te zien wat de gemiddelde laesies groottes per bloem per ras zijn ontstaan gedurende de 4 dagen waarop is waargenomen in de tweede week. De letters in de legenda staan voor de desbetreffende rassen. De gekleurde balken in de grafiek corresponderen met de kleurcode achter elk ras met inoculatiemethode. Boven de datum op de y-as is af te lezen welke sporen concentratie is gebruikt.

Wanneer naar grafiek 7 wordt gekeken valt op dat ras A erg veel boven de rest uitkomt. Na het uitvoeren van een Tuckey HSD kan gezegd worden dat bij methode 1 in week 2 ras A significant verschilt met alle andere rassen. Ook verschillen ras B en E van de andere rassen maar niet van elkaar (*Zie: Bijlage 2.9.)*.

Wanneer gekeken wordt naar grafiek 8 valt op dat ras E en A ver boven de andere rassen uitsteken. Na het uitvoeren van een Tuckey HSD kan gezegd worden dat ras A en E significant verschillen van alle andere rassen en van elkaar. De andere rassen verschillen niet van elkaar.

Bloemhoudbaarheid

Tijdens dit onderzoek was het van belang dat de bloemen gedurende meerdere dagen in goede conditie konden blijven om goede waarnemingen te verrichten. Dit is hier uitgedrukt in bloemhoudbaarheid. Hiervoor is er getest met verschillende methoden om de bloemen kwalitatief goed te houden. Het doel van deze test is om te kijken met welke methode de bloemen gedurende een tijdsperiode van maximaal 5 dagen hun kwaliteit het beste kunnen behouden.

In het onderzoek van 2019-2020 is naar voren gekomen dat het enigszins lastig was om de bloemen een langere tijd goed te houden wanneer deze van de plant af waren gehaald. Hier hebben ze de proef uitgevoerd door de bloemen in bekertjes te zetten en hun steeltje in een laag water, dit resulteerde erin dat de bloemen de drie dagen ter nauwer nood haalden. Op het einde van de proef is er getest met een tempex stektray, dit beloofde een goed alternatief te zijn. Echter is er niet voor gekozen om deze aanpak verder te onderzoeken. Mede omdat een stektray niet snel beschikbaar was en er een andere mogelijkheid was die mogelijk veelbelovende resultaten zou kunnen geven.

Werkwijze en resultaten

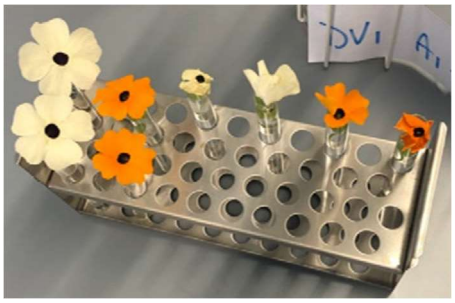
De eerste test bestaat uit 8 buisjes totaal, waarbij er 1 bloemetje per reageer buis word geteld. Van deze 8 bloemetjes telt zowel de oranje Thunbergia als de witte Thunbergia, twee bloemetjes waarvan het bloemetje schuin is afgeknipt en twee waarvan het bloemetje recht is afgeknipt. De reageerbuizen zijn met gewoon leidingwater tot ¾ gevuld. De bloemetjes liggen op de rand en hangen met het uiteinde van de steel in het water.
In de afbeeldingen hieronder zijn de resultaten weergegeven die zijn waargenomen op de vierde dag na het inzetten. Te zien is dat alle bloemen het niet hebben overleefd.

Afbeelding 1: De recht afgeknipte oranje en witte bloemen na vier dagen.

Afbeelding 2: De schuin afgeknipte oranje en witte bloemen na vier dagen.

Het feit dat de bloemen het niet hebben overleefd is toe te wijzen aan het loslaten van de steel en de kelkbladeren en het ontbreken van extra voedingsstoffen. Door het loslaten van de steel heeft de bloem waarschijnlijk geen water tot zijn beschikking gehad en is deze verwelkt. Proefmethode 3 zou dit uitwijzen, als het bloemetje houdbaar is op nat filtreerpapier dan blijkt inderdaad dat het bloemetje via de kelkbladeren water op kan nemen. Het ontbreken van de voedingsstoffen kan leiden tot een zwakkere bloem, daarom wordt er in de vervolgproeven gekozen om standaard te werken met de Chrysal Better Bloom snijbloemenvoeding om de bloemhoudbaarheid te verbeteren.

De tweede test bestaat uit 8 buisjes totaal, waarbij er 1 bloemetje per reageer buis wordt geteld. Van deze 8 bloemetjes telt zowel de oranje Thunbergia als de witte Thunbergia, twee bloemetjes waarvan het bloemetje schuin is afgeknipt en twee waarvan het bloemetje recht is afgeknipt. De reageerbuizen zitten met gewoon leidingwater en snijbloemvoeding tot ¾ gevuld. De bloemetjes liggen op de rand en hangen met het uiteinde van de steel in het water.
In de afbeeldingen hieronder zijn de resultaten weergegeven op de vijfde dag na het inzetten van de proef.



Afbeelding 3: Te zien is dat de vier bloemen aan de linker kant (schuin afgeknipt) er beter bij staan dan de vier bloemen aan de bovenkant (recht afgeknipt).

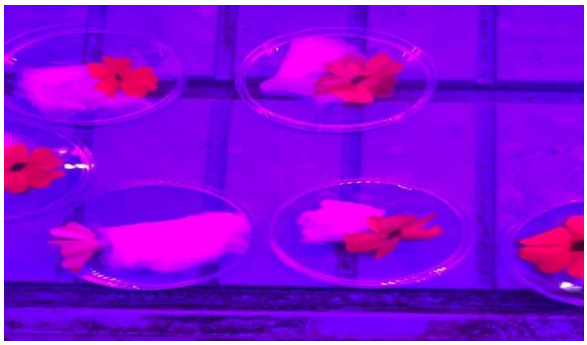
Afbeelding 4: De vier schuin afgeknipte bloemen staan er goed bij, dit duidt een geslaagd experiment aan. De bloemen hebben minimaal vijf dagen overleefd en staan er nog goed

Afbeelding 5: Te zien is hoe het kelkblad van een oranje bloem in het water hangt en dat de kwaliteit van de bloem goed is. Dit duidt erop dat de kelkbladeren inderdaad

Het feit dat bloemen het minimale doel van vijf dagen hebben bereikt is een goed teken. Het betekent dat met deze methode getest kan worden op Botrytis resistentie. Het succes van de proef zou toegewezen kunnen worden aan het feit dat de bloemen op afbeelding 4 met de kelkbladen in het water hingen. Het bleek dat de bloemen aan de bovenkant op afbeelding 3 het water niet goed konden bereiken met hun kelkbladeren en dat ze daarom zijn verwelkt.

De derde test die is uitgevoerd bij De Zonnebloem bestaat uit 6 Petri schaaltjes waarvan er in elke petrischaal een bloem wordt geplaatst. Voor deze test worden alleen de bloemen gebruikt zonder steel, er wordt dus getest of de bloemen houdbaar kunnen blijven via alleen de kelkbladeren. Op de bodem van het Petri schaaltje ligt een natte katoenen wat, deze katoenen wat is nat gemaakt met water + snijbloemenvoeding. De katoenen wat is vervolgens om het kelk blad heen gevouwen.

Gedurende de week is er waargenomen dat de bloemen na 3 dagen hun kwaliteit begonnen te verliezen, dit hing samen met het uitdrogen van de watten. De proef wijst uit dat het een manier is om de bloemen houdbaar te houden, mits de watten regelmatig worden bevochtigd. Dit zal om de twee dagen moeten gebeuren, om de kwaliteit te behouden. De resultaten van de tweede test waren ook dusdanig goed, dat deze methode niet verder is onderzocht of gebruikt. Er is gedurende het hele onderzoek gewerkt met de methode van test nummer twee.



Afbeelding 6: In deze afbeelding is te zien hoe de bloemen werden bewaard gedurende de test. Het is een simpel ontwerp, maar achteraf bleek deze methode ook meer arbeidsintensief te zijn. Wat de keuze voor deze methode ook al minder aantrekkelijk maakte.

Conclusie

In dit praktische onderzoek is gezocht naar antwoord op de vraag: 'Wat is de meest geschikte manier voor het uitvoeren van een biotoets voor Botrytisresistentie in Thunbergia?'

Uit de resultaten is naar voren gekomen dat er bij een sporenconcentratie van 5100 sporen per 10 microliter de beste inoculatie bereikt wordt. Wanneer er een lagere concentratie gebruikt wordt zullen er niet overal sporen vormen en bij een hogere concentratie zal de groei van de laesies op de bladeren te snel gaan of er wordt een overkill gecreëerd. Hierdoor is het moeilijk om effectief te kunnen meten. De beste methode van inoculatie is het gebruik maken van een parfumspuit. Hiermee wordt een maximale dekking bereikt en zal de inoculatie minder tijd in beslag nemen.

De schadebeelden die optreden in Thunbergia's na inoculatie met Botrytis zijn:

- Er zullen laesies vormen op de bloemen;
- De bloem zal nat lijken wat duidt op een infectie.

Uit dit onderzoek is gebleken dat de beste methode om een biotoets voor Botrytis resistentie in Thunbergia uit te voeren, de volgende uitvoering heeft:

- Zet de bloemen van de te onderzoeken rassen in reageerbuizen met leidingwater en snijbloemenvoeding.
- Gebruik voor de inoculatie een sporenconcentratie van 5100 sporen per 10 microliter om de duidelijkste resultaten te verkrijgen.
- Als inoculatiemethode moet er gebruik worden gemaakt van een parfumspuit, deze methode heeft geleid tot de duidelijkste resultaten.

BEGRIPPENLIJST

- **Accessie:** Een genetische variant van een gewas die genetisch stabiel kan worden vermeerderd.
- **Avirulentie**: het verschijnsel dat een pathogeen *geen* ziekte kan veroorzaken op een bepaalde accessie van een plantensoort waarvan het een pathogeen is; de plant is dan resistent, doorgaans doordat het immuunsysteem van de plant de indringer herkent en verdere verspreiding binnen de plant tegenhoudt.
- **Bacterie**: Micro-organisme dat doorgaans ééncellig is, en waarvan de ('prokaroytische') cellen veel kleiner zijn dan eukaryote cellen zoals die van schimmels. Enkele bekende genera van plant-pathogene bacterieën zijn *Pseudomonas*, *Xanthomonas* en *Erwinia*.
- **Besmetting**: het 'bevolken' van een plant, gewas, bodem of ruimte door exemplaren van een plaagorganisme.
- **Besmetting**: Het (moedwillig of ongewild) toevoegen van een plaagorganisme aan een plant, zodanig dat – indien sprake is van een gevoelige waardplant – ziektesymptomen zullen ontstaan.
- **Biologische bestrijding:** Het gebruik van levende organismen om een plantenziekte te bestrijden.
- **Biotoets**: Een experiment waarbij planten worden geïnfecteerd met een pathogeen micro-organisme of besmet met een plaagorganisme, vaak met als doel om de gevoeligheid van de plant voor de pathogeen of plaag vast te stellen.
- **Biotroof**: het verschijnsel dat een pathogeen (het weefsel van) de waardplant niet doet afsterven – de symptomen kunnen dan bijvoorbeeld bestaan uit tumoren, verkleuring, vervorming of remming van groei.
- **Genus**: Een groep verwante soorten (meerdere *genera* kunnen op hun beurt weer een *familie* vormen).
- **Gevoeligheid**: Het verschijnsel dat een plant ziek wordt na infectie door een micro-organisme of besmetting door een plaagorganisme.
- **Hemibiotroof**: het verschijnsel dat een pathogeen bij infectie van een waardplant in eerste instantie het weefsel niet doet afsterven, maar dat in een later stadium wel doet. Dit is vaak het geval. *Phytophthora*, *Fusarium* en *Xanthomonas* zijn hier enkele voorbeelden van.
- **Infectie**: het binnendringen van weefsel (wortels, blad etc.) door een micro-organisme; vaak wordt het woord 'infectie' alleen gebruikt als er ziektesymptomen ontstaan (dus niet in het geval van symptoomloze kolonisatie).
- **Inoculatie**: Het toedienen van inoculum van een micro-organisme aan een plant, zodanig dat – indien sprake is van een pathogeen en een gevoelige waardplant – ziektesymptomen zullen ontstaan.
- **Inoculum**: Een vorm van een micro-organisme of virus die een plant kan infecteren, zoals cellen, sporen, mycelium of virusdeeltjes.
- **Insect**: een zespotig, geleedpotig diertje behoren tot de groep insecta.
- **Kolonisatie**: het zich vermenigvuldigen van een micro-organisme of plaagorganisme binnen of op een plant.
- **Levenscyclus**: het ontwikkelingsproces van een pathogeen of plaagorganisme van 'kiem' (spore, ei) tot nieuwe 'kiemen' (sporen, eieren).
- **Mijt**: een tienpotig, geleedpotig diertje behoren tot de spinachtigen.

- **Nectrotroof**: het verschijnsel dat een pathogeen weefsel doodt en zich vervolgens voedt met dood weefsel. Bekende necrotrofe pathogenen zijn Botrytis en Erwinia.
- **Nematode**: een klein wormpje; sommige nematoden veroorzaken ziekte bij planten doordat ze de wortels aantasten.
- **Obligaat biotroof**: het verschijnsel dat een pathogeen zich alleen kan vermenigvuldigen in/op een levende waardplant. Bekende obligaat biotrofe pathogenen zijn echte meeldauw, valse meeldauw en roest. Virussen zijn altijd obligaat biotroof.
- **Oömyceet**: Een eukaryoot microörganisme dat net als schimmels mycelium en sporen kan maken, echter behorend tot een andere taxonomische groep die meer verwant is aan bepaalde algen. Bekende plantenziekten als valse meeldauw en aardappelziekte (*Phytophthora*) worden door oömyceten veroorzaakt.
- **Pathogeen**: Een micro-organisme (bacterie, schimmel, oömyceet) of virus dat ziekte kan veroorzaken.
- **Pathogeniteit**: het vermogen om ziekte te veroorzaken.
- **Plaagorganisme (plaag)**: Een klein diertje – een insect, mijt of wormpje – dat ziekte veroorzaakt bij planten.
- **Resistentie**: Het verschijnsel dat een plant niet ziek wordt na infectie door een micro-organisme of besmetting door een plaagorganisme. Volgens deze definitie zijn alle plantensoorten resistent tegen bijna alle infecties of besmettingen, een verschijnsel dat 'non-host' resistentie wordt genoemd; resistentie wordt daarom doorgaans beperkter gebruikt, namelijk voor een accessie van een plantensoort die na infectie of besmetting niet ziek wordt, terwijl andere accessies wel ziek worden, en dus de plantensoort als geheel als waardplant wordt aangemerkt.
- **Ruwe data**: De metingen zoals ze bij een experiment zijn geregistreerd (bijvoorbeeld ziekte-index, gewicht, of foto's van planten).
- **Saprotroof**: het verschijnsel dat een micro-organisme zich voedt met niet-levend (afgestorven) materiaal; dit is bijvoorbeeld voor de meeste schimmels het geval.
- **Schade (ziekteschade)**: de hoeveelheid ziekte in een plant of gewas, doorgaans uitgedrukt in verlies aan opbrengst (in aantal, gewicht of geld).
- **Schimmel**: Een micro-organisme behorende tot de (eukaryote) groep fungi. Meestal maken schimmels draadvormige structuren die mycelium wordt genoemd (ook wel hyphen) die met het blote oog zichtbaar zijn, of nog complexere structuren zoals paddestoelen; soms zijn ze uitsluitend ééncellig (gisten). Meestal maken schimmels ook sporen, voor verspreiding of voor overleving bij ongunstige omstandigheden. De meeste plantenziekten worden door schimmels veroorzaakt, maar de meeste schimmels zijn niet pathogeen, en sommige soorten kunnen zelfs voordelig zijn voor de groei van planten (mycorrhizae). Schimmels spelen een belangrijke rol in de ecologie van de bodem, bijvoorbeeld door het beschikbaar maken van nutriënten voor planten.
- **Significantie**: Mate van betrouwbaarheid van een uitkomst van een experiment, vaak uitgedrukt in een p-waarde. Bijvoorbeeld, als een verschil in gemiddeld gewicht tussen enerzijds controle planten en anderzijds planten geïnoculeerd met een pathogeen een p-waarde heeft van 0,01, dan is de kans 1% dat dit verschil door toevallige omstandigheden is ontstaan (dus de 'betrouwbaarheid' van de uitkomst is 99%).

- **Sporensuspensie**: Een vloeistof (doorgaans water) met sporen van een bacterie, schimmel of oömyceet.
- **Tolerantie**: Het verschijnsel dat een plant niet ziek wordt na infectie door een micro-organisme of besmetting door een plaagorganisme, terwijl het micro-organisme of plaagorganisme zich wel in of op de plant vermenigvuldigt.
- **Vector**: Een organisme dat een pathogeen kan overbrengen; meestal gaat het over een insect dat een virus overbrengt.
- **Virulentie**: (de mate van) het vermogen om ziekte te veroorzaken.
- **Virus**: Zeer klein deeltje bestaande uit nucleinezuur (DNA of RNA) en eiwit dat cellen kan infecteren en aanzetten tot het produceren van nieuwe, identieke virusdeeltjes. Ziektesymptomen ontstaan als de (massale) productie van virusdeeltjes de natuurlijke functie van plantencellen en -weefsels verstoort. Veel virussen worden van plant tot plant overgebracht door insecten.
- **Waardplant**: een plantensoort waarop of waarin een plaagorganisme of pathogeen zich kan vermenigvuldigen; vaak wordt het woord 'waardplant' alleen gebruikt als er ziektesymptomen ontstaan (dus niet in het geval van symptoomloze vermenigvuldiging).
- **Ziekte (van een plant)**: Toestand waarin de groei, levensvatbaarheid, ontwikkeling en/of reproductie van de plant is verminderd ten opzichte van wat optimaal mogelijk is. In het geval van planten bedoelen we vaak de toestand die wordt veroorzaakt door infectie met een virus of micro-organisme of besmetting met een plaagorganisme.
- **Ziektedruk**: de hoeveelheid inoculum van een pathogeen of het aantal individuen van plaagorganisme dat in een omgeving aanwezig is en waarvoor het gewas in kwestie gevoelig is.
- **Ziekte-index**: Een door onderzoekers ontworpen reeks categorieën die de mate van ziektesymptomen weergeeft – bijvoorbeeld: vijf categorieën, genummerd van 0 (geen symptomen) tot 4 (maximale ziekteontwikkeling).

Referenties *Fusarium*

Biju, V.C., Fokkens, L., Houterman, P.M., Rep, M. and Cornelissen, B.J.C. (2017) Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Appl.Environ.Microbiol. **83,** 10.1128/AEM.02548-16. Print 2017 Feb 15.

Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M.I., Gomez-Lama Cabanas, C. and Mercado-Blanco, J. (2019) Biological control agents against fusarium wilt of banana. Front.Microbiol. **10,** 616.

Laurence, M.H., Summerell, B.A., Burgess, L.W. and Liew, E.C. (2014) Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the fusarium oxysporum species complex. Fungal Biol. **118,** 374-384.

Michielse, C.B. and Rep, M. (2009) Pathogen profile update: Fusarium oxysporum. Mol.Plant.Pathol. **10,** 311-324.

Summerell, B.A. (2019) Resolving fusarium: Current status of the genus. Annu.Rev.Phytopathol. **57,** 323-339.

van Dam, P., Fokkens, L., Ayukawa, Y., van der Gragt, M., Ter Horst, A., Brankovics, B., Houterman, P.M., Arie, T. and Rep, M. (2017) A mobile pathogenicity chromosome in fusarium oxysporum for infection of multiple cucurbit species. Sci.Rep. **7,** 9042-y.

Choi, H.W. et all. (2016) Characterization of Fusarium solani Causing Fusarium Root Rot of Lisianthus in Korea. The Korean Journal of Mycology.

Referenties *Botrytis*

Benito EP, ten Have A, van 't Klooster JW and van Kan JAL (1998) Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 207-220

Dean R, van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**, 414-430.

Hyde KD, et al. (2014) One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera. *Fungal Diversity* **67**, 21-125.

Walker AS (2016) Diversity Within and Between Species of Botrytis. In “Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems”, eds. S. Fillinger & Y. Elad, pp.91-125, Sabine Fillinger x Yigal EladISBN: 978-3-319-23371-0.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynsi P and van Kan JAL (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**: 561-580.

Referenties *Trips*

Abd-El-Haliem, A. M., S. W. Hoogstrate, et al. (2018). "A Robust Functional Genomics Approach to Identify Effector Genes Required for Trips (Frankliniella occidentalis) Reproductive Performance on Tomato Leaf Discs." Frontiers in Plant Science 9(1852).

Cook, D., A. Herbert, et al. (2011). "Biology, Crop Injury, and Management of Trips (Thysanoptera: Thripidae) Infesting Cotton Seedlings in the United States." Journal of Integrated Pest Management **2**(2): B1-B9.

Haperen, P., R. Voorrips, et al. (2019). "The effect of plant development on Trips resistance in Capsicum." Arthropod-Plant Interactions **13**.

Hulshof, J. and I. Vänninen (2002). Western flower Trips feeding on pollen, and its implications for control.

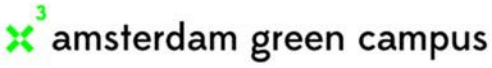
Jensen, S. E. (2000). "Insecticide Resistance in the Western Flower Trips, Frankliniella occidentalis." Integrated Pest Management Reviews **5(**2): 131-146.

Li, X., M. A. Schuler, et al. (2007). "Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics." Annual Review of Entomology **52**(1): 231-253.

Margaria, P., L. Bosco, et al. (2014). "The NSs protein of tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by Frankliniella occidentalis." Journal of virology **88**(10): 5788-5802.

Reitz, S. R. (2009). "Biology and Ecology of the Western Flower Trips (Thysanoptera: Thripidae): The Making of a Pest." Florida Entomologist **92**(1): 7-13, 17.

Trichilo, P. J. and T. F. Leigh (1988). "Influence of Resource Quality on the Reproductive Fitness of Flower Trips (Thysanoptera: Thripidae)." Annals of the Entomological Society of America **81**(1): 64-70.



POP 3 SAMENWERKING IN HET KADER VAN EIP NOORD-HOLLAND 2017. VERSLAGLEGGING PROJECT 'NEXT LEVEL SIERTEELTVEREDELING – SAMENWERKEN AAN WEERBARE SIERTEELTGEWASSEN.

"EUROPEES LANDBOUWFONDS VOOR PLATTELANDSONTWIKKELING: EUROPA INVESTEERT IN ZIJN PLATTELAND".