

**VATBAARHEID VAN KNOLCYPERUS EN ENKELE ANDERE
PLANTESOORTEN VOOR PUCCINIA CANALICULATA**

A. Hoogerbrugge

CABO-verslag nr. 107
maart 1989



Hoogerbrugge

Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek
Postbus 14, 6700 AA Wageningen

INHOUDSOPGAVE

Samenvatting	blz 1
1 Inleiding	3
1.1 Probleemstelling	3
1.2 <i>Cyperus esculentus</i>	4
1.3 <i>Puccinia canaliculata</i>	4
2 Materiaal	7
2.1 Onderzoeksruijnte	7
2.2 Kweken van planten	7
2.3 Inoculum: uredosporen van <i>Puccinia canaliculata</i>	8
2.4 Inoculatie	9
3 Resultaten	11
3.1 Infectieproeven in 1986	11
3.2 Kieming van sporen	12
3.3 Infectieproeven met knolcyperusherkomsten en niet doel-planten in 1987	16
3.3.1 Knolcyperus	16
3.3.2 Niet-doelplanten	17
4 Discussie	19
5 Conclusie	23
6 Literatuur	25
7 Bijlage	

SAMENVATTING

Een isolaat van de roestschimmel *P. canaliculata* is uit de Verenigde Staten geïmporteerd om te onderzoeken of *Cyperus esculentus* en andere *Cyperaceae* vatbaar zijn. De roestschimmel komt niet in Nederland voor zodat het onderzoek onder quarantaine-omstandigheden is uitgevoerd. Het was niet bekend onder welke omstandigheden in een klimaatcel een goede infectie van *P. canaliculata* tot stand gebracht kon worden. Na het opbrengen van de sporen werden de bladeren nat gespoten en werd de verlichting uitgedaan. Infectie van vatbare herkomsten van *C. esculentus* werd verkregen bij een incubatieperiode van circa 16 uur met een relatieve luchtvochtigheid van 100 % en aansluitend 8 uur met een relatieve luchtvochtigheid van circa 95 %. De temperatuur varieerde tijdens de afgesloten donkerperiode van 17-19 °C en tijdens de daarop volgende periode met licht van 21-27 °C. Naarmate de dag- en/of nachttemperatuur hoger was, nam het aantal infecties per blad toe. Werden de sporen 5 dagen of langer in de koelkast bewaard dan was er minder aantasting van de planten dan bij gebruik van verse sporen. De sporen in vloeibare stikstof bewaard gaven na 240 dagen nog een goede infectie.

Op een aantal plaatsen in Nederland zijn knollen van *C. esculentus* verzameld. Het bleek dat er verschil in vatbaarheid was tussen de verschillende herkomsten. Type C (herkomst Boxmeer) werd niet aangetast en type B (de herkomsten Pb (aardappel), Elsendorp en Wintjes) werden weinig aangetast. De herkomsten van het type A, Valkenswaard, Schoof, Kuyper, Rilland en Gilzen werden alle aangetast.

Op *C. esculentus* variëteit Sativus werden necroseplekjes gevormd maar ontstonden geen sori. *C. fuscus* werd aangetast door *P. canaliculata*, op deze plantesoort werden kleine sori gevormd. De overige tot de *Cyperaceae* behorende plantesoorten: *C. flavescens*, *C. albostratus*, *C. alternifolius*, *C. rotundus*, *C. hirta*, *E. palustris* en *S. maritimus* werden niet door *P. canaliculata* geïnfecteerd.

1 Inleiding

1.1 Probleemstelling

Sinds een aantal jaren komt knolcyperus (*Cyperus esculentus*) in Nederland voor. In tropische en subtropische gebieden is knolcyperus al lang bekend als een zeer hardnekkig onkruid, dat grote problemen kan veroorzaken in cultuurgewassen. In Nederland veroorzaakt knolcyperus ook een sterke reductie van opbrengsten bij akker- en tuinbouwgewassen en zijn er wettelijke maatregelen getroffen om op met knolcyperus besmette percelen geen rooivruchten te verbouwen (Habekotté, 1988). Bij het oogsten van wortelgewassen als bieten en wortelen en bolgewassen kan knolcyperus makkelijk verspreid worden doordat knollen met machines of gewassen meegevoerd kunnen worden. Knolcyperus kan zich vegetatief door middel van knollen snel vermeerderen (Phatak, 1984).

Bestrijding van knolcyperus met chemische bestrijdingsmiddelen is moeilijk omdat het onkruid voor de meeste middelen ongevoelig is. Mechanische bestrijding is vaak niet mogelijk vanwege de hoge kosten. Door middel van vroegtijdige concurrentie door het gewas kan de groei tegengegaan worden (Anonymus, 1983). Wordt het gewas echter vroeg geoogst, dan zal *C. esculentus* alsnog opkomen en kunnen de planten nieuwe knollen vormen. Bestrijding met de roestschimmel *Puccinia canaliculata* lijkt perspectief te bieden omdat de door de roestschimmel aangetaste planten een verminderd concurrentievermogen hebben, minder knollen produceren en gevoeliger voor een aantal herbiciden zijn (Scheepens, 1984). De roestschimmel komt niet in Nederland voor. De Plantenziektenkundige Dienst (PD) heeft toestemming verleend om onder quarantaine-omstandigheden onderzoek te verrichten naar een uit de Verenigde Staten afkomstig isolaat van de schimmel. Doel van het onderzoek was om te bekijken of de roest specifiek genoeg is om zonder risico in Nederland te kunnen introduceren. In de Verenigde Staten (VS) is gebleken dat knolcyperusplanten van verschillende plaatsen niet allemaal vatbaar waren voor de roest (Scheepens, 1984). In Nederland zijn daarom ook op diverse plaatsen knollen van *C. esculentus* verzameld en op vatbaarheid getoetst. Ook zijn een beperkt aantal tot de *Cyperaceae* behorende niet-doelplanten getoetst, zodat conclusies getrokken kunnen worden over de risico's voor dit isolaat.

1.2 *Cyperus esculentus*

Cyperus esculentus L. behoort tot de familie der *Cyperaceae*. Dit zijn zegge- of biesachtige planten met een meestal driekantige stengel. In Nederland komen van het geslacht slechts twee inheemse soorten, *C. fuscus* (bruin cypergras) en *C. flavescent* (geel cypergras) voor (Heukels & van Ooststroom, 1977). In Nederland is *C. esculentus* voor het eerst in 1980 in Noord-Brabant signaleerd (Seeters, 1984).

Planten van *C. esculentus* hebben een lengte van 30-80 cm, de bladeren hebben een duidelijke middennerf (Holm et al., 1977). Het blad is voorzien van een dikke waslaag met huidmondjes aan de onderzijde van het blad (Wills et al., 1980). De ontwikkeling van de plant begint met de vorming van 1 à 3 gepredestineerde rhizomen uit een knolletje. Een rhizoom groeit uit tot vlak onder het bodemoppervlak en vormt daar een basale knol. Uit deze knol groeien wortels en het bovengrondse deel van de plant. Uit deze knol kunnen ook nieuwe rhizomen worden gevormd (Mulligan & Junkins, 1976). De vorming van knolletjes en/of scheuten is afhankelijk van het lichtregiem (Jansen, 1971). Echter, ongeacht de lengte van de lichtperiode, zullen er knolletjes gevormd worden. De diameter van de knolletjes varieert van 3-11 mm (Stoller et al., 1972).

1.3 *Puccinia canaliculata*

P. canaliculata behoort tot de orde der *Uredinales* (roestschimmels). In het algemeen zijn uredosporen van roestschimmels relatief dunwandig en kunnen onder natuurlijke omstandigheden slechts korte tijd overleven (Rowell, 1984). De sporen blijven hun kiemkracht houden als zij in vloeibare stikstof bewaard worden (-196 °C). De sporen gaan dan in kiemrust. Voor het kiemen van de sporen na bewaren in vloeibare stikstof is òf onderdompeling in een waterbad van 40 °C gedurende circa 2 minuten vereist òf hydratatie van de sporen gedurende 16-24 uur bij een relatieve luchtvochtigheid van 80 à 90 % (Rowell, 1984). Na de kieming groeit uit de uredospore een kiembuis die via een huidmondje het blad penetreert en daar mycelium vormt. De penetratie en vorming van uredosori verloopt op jonge bladeren iets sneller dan op volwassen bladeren (Becker, 1976). Door *C. esculentus* worden twee typen sporen gevormd: uredosporen en teleutosporen. Het optimum temperatuurtraject voor kieming van uredosporen van *P. canaliculata* ligt tussen 20-26 °C. Kieming wordt geremd door licht,

terwijl 8 uur dauw bij bovengenoemde temperatuur vereist is voor infectie. Bij onderzoek in de Verenigde Staten bleek na inoculatie van *C. esculentus* met uredosporen in april-mei in het veld sporulatie na 10 à 20 dagen op te treden (Scheepens, 1984). *P. canaliculata* kan *C. esculentus* niet via teleutosporen aantasten maar wel de tussenwaardplanten *Xanthium canadense* en *Helianthus annuus* (Callaway et al., 1985). Teleutosporen zijn dikwandig en in staat om ongunstige omstandigheden te overleven. Teleutosporen worden in de herfst gevormd; de vorming is vermoedelijk afhankelijk van zowel temperatuur als daglengte (Scheepens, 1984).

2 Materiaal en methoden

2.1 Onderzoeksruijnte

Het onderzoek werd uitgevoerd in een klimaatcel met interne lucht-circulatie. De luchtcirculatie was continu en daarmee werd tevens de temperatuur en relatieve luchtvochtigheid geregeld. De klimaatcel is verdeeld in vier compartimenten van elk 1 m². In ieder compartiment bevond zich een draaitafel waarop de potten met knolcyperusplanten geplaatst werden. De dag-nachtperiode was 16 uur licht en 8 uur donker. Per compartiment brandden zes High Power Intensity-lampen, fabrikaat Philips, van elk 400 Watt; de hoeveelheid zichtbaar licht was op 20 cm hoogte van de draaitafel 70 Wm⁻². De lampenruimte is door middel van een glasplaat gescheiden van het compartiment; over deze glasplaat stroomde water om de warmte van de lampen af te voeren. De afstand tussen de glasplaat en de draaitafel was 1,2 m. De temperatuur en relatieve luchtvochtigheid werden door middel van een thermohygrograaf geregistreerd. De temperatuur in de verschillende compartimenten was niet altijd gelijk, ruim 1 °C verschil kwam dikwijls voor. Het compartiment aan de zijde waar de luchtaanvoer plaats vond was kouder dan aan de zijde van de afvoer van de lucht.

2.2 Kweken van planten

De knollen van *C. esculentus* zijn soms in kiemrust (Stoller, 1981). Om de kiemrust te doorbreken werden de knollen twee dagen gespoeld met stromend leidingwater. Daarna werden de knollen in met rivierzand gevulde petrischalen van 18 cm diameter en 4 cm hoogte te kiemen gelegd. De petrischalen werden onder TL-verlichting geplaatst, type TLD 36W/33. De temperatuur was ongeveer 24 °C. De gekiemde knollen werden 1 à 3 dagen na het kiemen geplant in plastic potten, diameter 11 cm, hoogte 9 cm en gevuld met potgrond. De verschillende herkomsten van *C. esculentus*, *C. rotundus* en *C. esculentus* variëteit Sativus (chufa) zijn in de onderzoeksruijnte opgekweekt. Nadat de gekiemde knollen gepoot waren, werden de planten van vocht en voedingsstoffen voorzien door middel van een Hoagland oplossing die in een schoteltje onder de pot werd gegeven. Op basis van onder andere de morfologie van de bloeiwijze zijn de herkomsten van *C. esculentus* in drie verschillende ecotypen ingedeeld: A, B en C. De volgende populaties (herkomsten) zijn gebruikt:

Tabel 1 Herkomsten van drie ecotypen (A, B en C) van *C. esculentus*.

Type A	Type B	Type C
Valkenswaard (A1)	Pb (aardappel) (B1)	Boxmeer (C1)
Schoof (A2)	Elsendorp (B2)	
Kuyper (A3)	Wintjes (B3)	
Rilland (A4)		
Gilzen (A5)		

Naast *C. esculentus* werden de volgende plantesoorten getoetst: *C. rotundus*, *Carex hirsuta* (ruige zegge), *Cyperus albstriatus*, *C. alternifolius* (parapluplant), *C. flavescent* (geel cypergras), *C. fuscus* (bruin cypergras), *Eleocharis palustris* (waterbies) en *Scirpus maritimus* (zeebies). Deze plantesoorten zijn in een kas opgekweekt met een wisselende dag/nacht temperatuur van ongeveer 25 à 15 °C en afhankelijk van het seizoen met of zonder bijbelichting.

2.3 Inoculum: uredosporen van *Puccinia canaliculata*

Uit de Verenigde Staten zijn medio april 1986 sporen van *P. canaliculata* ontvangen afkomstig van de Universiteit van Georgia. Dit isolaat wordt ook in de Verenigde Staten bij de bestrijding van *C. esculentus* gebruikt. De sporen waren daar geruime tijd bij -73 °C bewaard. Een deel van de sporen is in dichte glazen ampullen in vloeibare stikstof (-196 °C) geplaatst. Het overige deel is gebruikt om planten te inoculeren. Op enkele herkomsten ontwikkelde de schimmel uredosori en de nieuw gevormde uredosporen werden met een vacuümpomp en cycloonzuiger afgezogen en in een koelkast bewaard. Ook werden planten met vers verzamelde sporen geïnoculeerd. Het bewaren van de sporen in de koelkast (4 °C) werd op diverse wijzen uitgevoerd. De open glazen buisjes met sporen werden in een glazen schaal geplaatst waarin zich ook een bekerglas met glycerine (98 %) bevond. De relatieve luchtvochtigheid wordt daardoor in de petrischaal 45 % (Hoogkamer, mondelinge mededeling). Na enkele maanden werden de sporen op vergelijkbare wijze bij een KOH-oplossing (82,4 mg KOH per 100 ml H₂O) geplaatst. De relatieve luchtvochtigheid is dan circa 20 % (Rowell, 1984). De in de koelkast bewaarde sporen veroorzaakten weinig infectie zodat de hoeveelheid nieuw

gevormde sporen ook gering was. Tenslotte is in januari 1987 een nieuwe zending sporen uit de VS ontvangen. Na inoculatie met deze sporen werden de sporulerende planten twee keer per week afgezogen en de sporen werden in afgesloten ampullen direct in stikstof opgeslagen.

2.4 Inoculatie

De planten werden geïnoculeerd als zij 15 à 25 dagen oud waren. Inoculum, bewaard in de koelkast, werd enkele uren voor het gebruik in de onderzoeksruijnte gebracht zodat het materiaal de omgevingstemperatuur kon aannemen en vocht aantrekken. "Verse" sporen werden op de dag van inoculatie van geïnfecteerde planten verzameld. Sporen in stikstof bewaard, werden, nadat ze uit de stikstof waren gehaald, twee minuten in een waterbad van 40 °C gehouden. Daarna werden de ampullen opengebroken en gedurende circa 6 uur in een petrischaal met vochtig filtreerpapier gelegd zodat de sporen vocht konden opnemen. De sporen zijn zowel met als zonder toevoeging van talkpoeder op de bladeren gebracht. De talkpoeder werd toegevoegd om een betere verdeling van de sporen mogelijk te maken. De hoeveelheid varieerde van 2 à 3 x tot circa 10 x de hoeveelheid sporen. De sporen en talkpoeder werden met een Vibrovix toestel gemengd. Daarna werden de sporen met een penseeltje op de onderzijde van de bladeren gebracht. De lengte van het behandelde deel van de bladeren was ongeveer 20 cm. De oudste bladeren (3 à 5) werden niet behandeld omdat zij als regel vrij snel afsterven. In volgende proeven werden de sporen zowel met een penseeltje als met een poederverstuiver op de planten gebracht. Bij het inoculeren met de poederverstuiver stonden de planten op de draaiende draaitafel met daarop twee ringen van totaal 60 cm hoogte. Na het opbrengen van de sporen werd 10 à 15 ml gedestilleerd water met een Vilbiss-sproeier over de planten verspoten en de bovenzijde van de ring met plasticfolie dicht gemaakt en de lampen van het betreffende compartiment uitgedaan. De relatieve luchtvochtigheid was tijdens de afsluiting met folie 100 % en de bladeren bleven nat. Doordat in de overige compartimenten de lampen wel aanbleven was er gedurende circa 8 uur diffuus licht en was het 8 uur donker. Na 16 uur werden de lampen weer aangedaan en de afsluiting met folie op een kier opgezet. In de periode dat het folie op een kier stond werd de relatieve luchtvochtigheid ongeveer 95 % en waren na 8 uur de bladeren als regel opgedroogd. 24 uur na het inoculeren werd het folie en de bovenste ring verwijderd. De minimum-temperatuur tijdens de donkerperiode was 17 à 19 °C en de maximum-temperatuur tijdens

de lichtperiode als het folie er nog op lag, 21 à 25 °C. De gemiddelde temperatuur in de compartimenten was 20 à 21 °C. Bij ieder inoculatie-experiment werd een sporekiemingstoets uitgevoerd. De sporen werden, met of zonder talkpoeder, met een penseeltje of poederverstuiver op een objectglaasje met wateragar gebracht of in een druppelglaasje. De objectglaasjes werden in petrischalen met vochtig filtreerpapier op de draaitafel geplaatst. De objectglaasjes werden na circa 18 uur onder het microscoop beoordeeld. Ook werd het blad bemonsterd en de kieming van de sporen op het blad vastgesteld. Het blad werd gedurende 24 uur in fixeermiddel (Timmers, 1986) gelegd en daarna enkele uren tot 24 uur in lactofenol-trypaanblauw (Heath, 1971). Voordat het blad beoordeeld werd, werd het blad (in lactofenol-trypaanblauw) een uur in een waterbad van 40 °C geplaatst zodat er een betere blauwkleuring van de hyfen ontstond. De bladeren werden afgespoeld en met polyvinylalcohol (PVA) (Omar & Bolland, 1980) op een objectglaasje onder het microscoop beoordeeld.

3 Resultaten

3.1 Infectieproeven in 1986

De in april 1986 ontvangen sporen van *Puccinia canaliculata* kiemden en veroorzaakten infectie op planten van *Cyperus esculentus*. Daarbij werden 4 herkomsten gebruikt: 2 herkomsten van type A en 2 herkomsten van type B.

Tabel 2. Aantal aangetaste planten van verschillende herkomsten in 1986

Datum	Herkomst	Type	Spore- bewaartijd (dagen)	Aantal planten	
				geïnoculeerd	aangetast
16 april	Valkenswaard	A	*	4	4
	Gilzen	A		4	2
	Pb (aardappel)	B		4	0
	Wintjes	B		4	0
6 mei	Valkenswaard	A	0	4	4
	Gilzen	A		6	3
	Schoof	A		2	2
	Pb (aardappel)	B		5	3
	Wintjes	B		10	5
2 juni	Valkenswaard	A	0-17 **	4	4
	Gilzen	A		5	4
	Schoof	A		4	2
	Pb (aardappel)	B		4	4
	Wintjes	B		8	5
9 juli	Gilzen	A	0	3	2
	Pb (aardappel)	B		3	0
	Wintjes	B		3	0

* Sporen ontvangen uit de VS

** Mengsel van sporen die op verschillende dagen zijn verzameld.

De sporen werden in deze proef met een kwast op de bovenzijde van het blad aangebracht. Tevens werd de kieming op wateragar bekeken. Alleen aan de onderzijde van het blad werden sori gevormd zodat in het vervolg aan de onderzijde van het blad de sporen werden aangebracht. In de volgende proeven zijn sporen gebruikt die van geïnfecteerde planten in de cel zijn verzameld. Tijdens de incubatieperiode waarbij het folie op een kier was opengezet varieerde de maximumtemperatuur in het compartiment van 24-27 °C.

In de proeven van 16 april en 9 juli werden alleen op de planten van type A sori gevormd terwijl in de proeven van 6 mei en 2 juni zowel bij A als type B sori werden gevormd. In de vier experimenten werd bij het type A 75 % van de planten door de schimmel aangetast en bij het type B 41 %. Het aantastingsniveau bij planten van het type B was niet alleen lager, de sori waren ook kleiner. Soms waren slechts enkele sori op een plant aanwezig. Ook bij de planten van het type A was het aantal sori meestal betrekkelijk gering.

3.2 Kieming van sporen

De infectie-voorwaarden onder celomstandigheden waren niet precies bekend. In voorgaande proeven werd een incubatieperiode van ongeveer 24 uur gehanteerd, om het aantastingsniveau te verhogen is de periode verlengd tot 40 uur. Het percentage aangetaste planten werd daardoor echter juist minder zodat in december 1986 de incubatieperiode weer op 24 uur werd gesteld. Tevens werd toen de temperatuur met 2 °C verlaagd. Het percentage aangetaste planten bleef echter lager dan bij de start van de experimenten (tabel 3). De gegevens in tabel 3 hebben betrekking op planten van de herkomst Valkenswaard. De bewaartijd en de voorbehandeling van de sporen varieerden. De te gebruiken hoeveelheid sporen was zeer gering en werd met een overmaat aan talkpoeder gemengd en met een kwastje op het blad gesmeerd. Bij nummer 10 werd bij de helft van het aantal planten de sporen met een verstuiver opgebracht. Tijdens de incubatieperiode was de minimum nachttemperatuur 17 à 18 °C en de maximum dagtemperatuur varieerde van 21 - 24 °C tijdens de periode dat het folie een klein stukje geopend was.

Tabel 3. Omstandigheden en resultaten van de experimenten in december 1986 en januari 1987 met de herkomst Valkenswaard.

Nr	Spore- bewaartijd (dagen)	Voorbehandeling sporen	Kieming %	Aantal planten	
				behandeld	aangetast
1	0	--	0	3	2
2	0	--	36	5	4
3	1	5 uur cel	0	2	1
4	2	2 uur cel	84	3	3
5	2	2 uur cel	84	2	0
6	2	2 uur cel	0	2	2
7	5	5 uur cel	0	4	0
8	8	2 uur cel	0	2	0
9	83	5 uur cel	0	7	1
10	244 (VS)	3 min 40 °C water	80	10	0
11	** (VS)	4 min 40 °C water	15	7	4
12	4 (VS)	5 uur cel	0	2	0

** Uit de VS ontvangen in januari 1987 en na ontvangst direct gebruikt.

Uit tabel 3 blijkt dat de kieming van sporen soms goed was maar in veel gevallen was er geen kieming op wateragar of in de druppel. Desondanks werd in een later stadium dikwijls wel infectie op de planten vastgesteld. In enkele gevallen (nummers 2 en 11) was de kieming op een druppelglaasje beter dan op wateragar (wateragar < 1 %). Bij de nummers 4 en 5 was dat juist tegengesteld. Er ontstond geen infectie toen na het toedienen van de sporen geen hoge relatieve luchtvochtigheid werd gecreëerd doordat de ring niet met folie werd afgesloten (nummer 5). Bij nummer 4 waar de ring wel afgesloten was, werden onder overigens gelijke omstandigheden alle planten geïnfecteerd. De sporen van nummer 10 zijn in april 1986 ontvangen en toen direct in vloeibare stikstof opgeslagen. De kieming op wateragar was goed, desondanks werd er geen infectie veroorzaakt. De sporen van nummer 11 zijn in januari 1987 uit de VS ontvangen en direct gebruikt. De sporen uit de VS (nummer 11) welke daarna 4 dagen in de koelkast werden bewaard kiemden niet meer en veroorzaakte ook geen infectie (nummer 12).

Omdat het aantal geïnfecteerde planten gering was (35 %), werd de temperatuur weer met 1 °C verhoogd. De nachttemperatuur ging daardoor iets omhoog terwijl de maximum dagtemperatuur in de periode dat het folie

open was nauwelijks omhoog ging. De aantasting van de planten steeg toen tot 100 %.

In de hierna volgende experimenten zijn sporen op het blad geteld (tabel 4); ook de kieming werd op het blad vastgesteld. De sporen werden bewaard in stikstof (n) of koelkast (k) of werden direct na het verzamelen gebruikt. Ongeveer 40 uur na het inoculeren werden enkele bladdeeltjes van 3 cm lengte van de knolcyperusplanten afgeknipt en circa 24 uur in fixeermiddel en daarna in lactofenol-trypaanblauw gelegd.

Tabel 4. De ouderdom van de sporen en methode van behandeling van knolcyperusplanten waarbij het aantal gekiemde sporen en het aantal sori op het blad is vastgesteld.

Datum 1987	Spore- bewaartijd (dagen)	Toegediend met	Aantal planten	Aantal sporen per mm ²	Kieming %	Gemiddeld aantal sori/blad
17-2	0	kwast	4	1,4	3,7	3,0
	4 k	kwast	4	0,5	0	1,2
24-2	0	kwast	3	1,1	1,0	1,4
	15 k	kwast	3	0,2	0	2,3
10-3	0	kwast	4	3,6	2,0	3,2
	18 n	kwast	4	3,1	4,6	2,4
24-3	0	kwast	3	1,5	1,0	11,6
	18 n	kwast	3	1,6	6,7	8,2
	25 n	kwast	3	3,4	0,5	14,7
7-4	0	verstuiver	4	3,1	13,5	6,1
	24 k	kwast	2	2,5	4,1	7,7
	24 n	kwast	3	0,3	2,9	10,6
21-4	0	verstuiver	5	1,3	0,5	4,2
	34 n	kwast	4	1,7	6,1	10,9
6-5	0	kwast	4	25,3	5,2	8,9
	39 n	verstuiver	5	0,1	0	1,2
19-5	0	kwast	6	2,6	2,0	7,3
	46 n	verstuiver	4	0,2	4,1	1,0
2-6	0	verstuiver	9	0,2	21,7	2,2
16-6	0	verstuiver	4	0,1	7,8	6,9
	5 k	kwast	4	4,0	0,3	4,4

Alle planten werden geïnfecteerd. Het bladoppervlak waarop sporen geteld werden varieerde van 200-400 mm² per behandeling. Er kwamen met de kwast-behandeling 2,5 zoveel sporen op het blad (gemiddeld 2,0 per mm²) dan na een behandeling met de verstuiver (0,8 sporen per mm²) waarbij de telling van 6 mei buiten beschouwing is gelaten. Het aantal sporen dat na behandeling met een kwast op het blad gevonden werd was significant groter dan bij het verstuiven van de sporen (bij een onbetrouwbaarheid van $P < 0,05$ volgens de toets van Wilcoxon). Er werd geen verschil in het

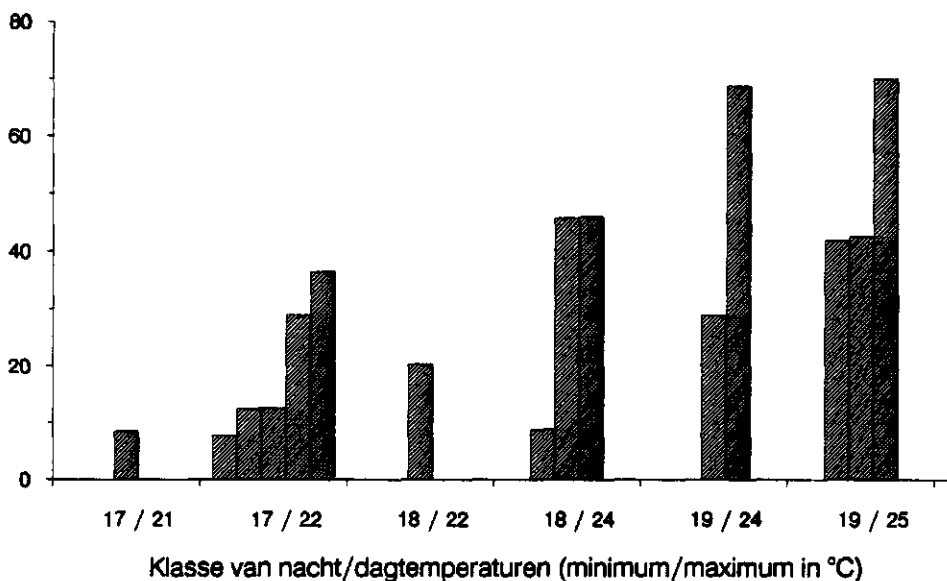
aantal sporen gevonden of zij in de koelkast dan wel in de stikstof bewaard werden of dat verse sporen gebruikt werden.

Het percentage verse sporen dat op het blad gekiemd is was gemiddeld 6 %, de sporen bewaard in stikstof 3,5 % en bij de sporen welke in de koelkast bewaard werden was de kieming gemiddeld 1 %. Het percentage gekiemde sporen is volgens de toets van Kruskal-Wallis niet significant verschillend tussen verse sporen en sporen bewaard in de stikstof of koelkast. Ook het percentage gekiemde sporen was bij de met de kwast of met een verstuiver toegediende sporen niet significant verschillend (bij een onbetrouwbaarheid van $P < 0,05$ volgens de toets van Wilcoxon). Op 7 april en 2 juni was het percentage gekiemde sporen ten opzichte van de overige percentages hoog.

Het aantal sori dat op het blad gevormd werd was na een behandeling met de kwast gemiddeld 6,1 en na het verstuiven van de sporen 3,3.

Een hogere minimumtemperatuur 's nachts en/of een hogere maximumtemperatuur tijdens het tweede deel van de incubatieperiode overdag veroorzaakte een significant hoger aantal sori op de bladeren (bij een onbetrouwbaarheid van $P < 0,05$ volgens de rangcorrelatietoets van Spearman). Het is niet mogelijk aan te geven of een hogere minimumtemperatuur dan wel een hogere maximumtemperatuur belangrijk was voor een grotere toename van het aantal sori (figuur 1).

Gemiddeld aantal sori per plant



Figuur 1. Verband tussen het aantal sori per plant en de minimum nachttemperatuur en de maximum dagtemperatuur.

3.3 Infectieproeven met knolcyperusherkomsten en niet-doelplanten in 1987

Op 2 en 16 juni werden verse sporen gebruikt, op de overige data sporen die in stikstof waren bewaard. De sporen werden steeds met ongeveer 10 x de hoeveelheid talkpoeder gemengd en verstoven. De hoeveelheid sporen varieerde van 12 tot 20 mg per behandeling met uitzondering van 9 september, toen 75 mg sporen werd gebruikt waarvan overwegend sporen uit de Verenigde Staten (van januari 1987); daaraan werd 75 mg talkpoeder toegevoegd. De incubatie-periode was 24 uur. De minimum nachttemperatuur varieerde van 17 à 19 °C en de maximum dagtemperatuur was 21 à 22 °C.

3.3.1 Knolcyperus

In 1987 zijn de herkomsten Kuyper, Rilland, Boxmeer en Elsendorp onderzocht, waarbij Valkenswaard als referentie werd gebruikt. Ook is Pb (aardappel) nogmaals onderzocht (tabel 5).

Tabel 5. Aantal behandelde en geïnfecteerde bladeren van verschillende knolcyperusherkomsten in 1987

Datum	Herkomst	Type	Aantal bladeren behandeld	Percentage aangetaste bladeren	Gemiddeld aantal sori/blad
2 juni	Valkenswaard	A	24	42	2,1
16 juni	Valkenswaard	A	40	70	6,4
9 sept.	Valkenswaard	A	23	61	3,8
	Kuyper	A	69	38	1,4
	Elsendorp	B	49	0	0
	Pb (aardappel)	B	49	0	0
	Boxmeer	C	58	0	0
12 okt.	Valkenswaard	A	57	18	0,5
	Rilland	A	78	59	2,8
2 nov.	Valkenswaard	A	53	21	1,5
25 nov.	Valkenswaard	A	45	24	0,5
15 dec.	Valkenswaard	A	39	67	3,7

Bij de herkomsten van het type B (Elsendorp en Pb (aardappel)) en type C (Boxmeer) werden geen sori op het blad gevormd. De herkomsten Kuyper en Rilland waren wel vatbaar voor de roest. Op 2 en 25 november was het percentage aangetaste planten van de herkomst Valkenswaard respectievelijk 83 en 66. Bij de overige experimenten was 100 % van de planten aangetast. Het percentage aangetaste bladeren varieerde in de verschillende

experimenten sterk. Er is een significante correlatie tussen het percentage aangetaste bladeren en het gemiddeld aantal sori per blad (bij een onbetrouwbaarheid van $P < 0,05$ % volgens de rangcorrelatietoets van Spearman). De bewaartijd van de sporen in de stikstof had geen invloed op de aantasting.

3.3.2 Niet-doelplanten

In de periode juni tot en met december 1987 zijn ook de niet-doelplanten op vatbaarheid onderzocht. De herkomst Valkenswaard werd steeds als referentieplant toegevoegd (voor resultaten zie tabel 5). Er zijn ongeveer 8 planten per soort onderzocht (tabel 6).

Tabel 6. Plantesoorten, getoetst op vatbaarheid voor *Puccinia canaliculata*.

Datum	Aantal planten	Plantesoort	Vatbaar	Necrose	Sporulatie
2 juni	4	<i>Cyperus fuscus</i>	ja	+	+
16 juni	4	<i>Cyperus fuscus</i>	ja	+	+
16 juni	8	<i>Cyperus flavescens</i>	nee	-	-
9 sept.	3	<i>Cyperus flavescens</i>	nee	-	-
12 okt.	8	<i>Cyperus albostriatus</i>	nee	-	-
2 nov.	8	<i>Cyperus alternifolius</i>	nee	-	-
2 nov.	4	<i>Carex hirta</i>	nee	-	-
25 nov.	8	<i>Cyperus esculentus</i> var. <i>Sativus</i>	nee	+	-
25 nov.	3	<i>Carex hirta</i>	nee	-	-
15 dec.	8	<i>Cyperus rotundus</i>	nee	-	-
15 dec.	8	<i>Eleocharis palustris</i>	nee	-	-
15 dec.	8	<i>Scirpus maritimus</i>	nee	-	-

Alle planten van de herkomst *C. fuscus* werden zowel op 2 als 16 juni aangetast door de roest. Het aantal sori varieerde van 8 tot 25 per plant en het aantal aangetaste bladeren van 4 tot 13. De sori waren minder groot dan bij *C. esculentus* en om de sorus werd een ring van necrose gevormd. Bij *C. esculentus* variëteit *Sativus* ontstonden alleen geringe necroseplekjes maar werden geen sori gevormd. De overige plantesoorten vertoonden geen effecten na het aanbrengen van de sporen.

De plantesoorten waren in de kas opgekweekt. Het gevolg was dat, zodra de planten in de klimaatcel bij een hogere temperatuur voor onderzoek werden geplaatst, er een sterke aantasting van bladluizen optrad. Alle planten in de cel moesten daarom opgeruimd worden zodra er duidelijk vastgesteld was

dat er aantasting op knolcyperus of andere planten voorkwam. Daardoor was het niet mogelijk het verloop van de infectie vast te stellen en, wegens verontreiniging, sporen te verzamelen.

4 Discussie

De roestschimmel *P. canaliculata* komt niet in Nederland voor, zodat het onderzoek onder quarantaine-omstandigheden moest plaats vinden. De onderzoeksruijnte was klein waardoor de mogelijkheden van variatie in een experiment beperkt waren. Het effect van verschillende variabelen moest door middel van meerdere proeven vastgesteld worden. Ook waren de infectievoorwaarden van de sporen niet precies bekend. De beschikbaarheid van planten in het gewenste groeistadium en de aanwezigheid van verse sporen konden niet altijd goed op elkaar worden afgestemd.

Uit onderzoek in de VS (Scheepens, 1984) bleek dat niet alle knolcyperusplanten vatbaar zijn voor de schimmel. De uit de VS ontvangen sporen werden direct na ontvangst gebruikt om planten te infecteren en een gedeelte werd in vloeibare stikstof opgeslagen. Bij de start van het onderzoek waren planten van het type A en B beschikbaar. Het aantal sori dat werd gevormd was betrekkelijk gering en was bij type A groter dan bij type B. De hoeveelheid te verzamelen sporen was gering. De sporen werden in een koelkast in een afgesloten petrischaal bewaard. In de petrischaal was een lage relatieve luchtvochtigheid zodat de sporen enigszins konden indrogen waardoor ze langer houdbaar zouden zijn.

Een aantal mogelijkheden is onderzocht om de infectiekans te vergroten. De verlenging van de incubatieperiode tot 40 uur, waarbij het folie 24 uur op een kier werd gehouden had tot gevolg dat bijna geen planten meer werden geïnfecteerd. Mogelijk dat dit veroorzaakt wordt omdat het blad te lang vochtig blijft. Na de kieming groeit uit de uredosporen een kiembuis die aan het blad hecht. Na het bereiken van een huidmondje wordt een appressorium gevormd dat in rust blijft onder omstandigheden van dauw in combinatie met het ontbreken van licht (Rowell, 1984). De glycerine in de petrischaal werd vervangen door een KOH-oplossing waardoor in de petrischaal een relatieve luchtvochtigheid van 20 % ontstond. Het gebruik daarvan veroorzaakte geen betere infectie (Frantzen, 1987). De opslagperiode in de koelkast blijkt van groot belang te zijn (tabel 3). Sporen langer dan 5 dagen in de koelkast bewaard veroorzaakten geen infectie terwijl bij een kortere bewaarperiode 75 % van de planten geïnfecteerd werden. In enkele gevallen lukte het bij een langere bewaarperiode wel infectie te veroorzaken (Frantzen, 1987). De periode

waarin het inoculum vóór de behandeling aan de celomstandigheden werd blootgesteld en vocht kon absorberen had onder deze omstandigheden geen invloed op het resultaat. De kieming van de sporen werd ook op wateragar of druppelglaasjes vastgesteld. Soms werd 0,1 % U.S.P. XIX-Tween 80 (Polysorbatum 80) aan de druppel toegevoegd. De petrischalen met daarin een objectglaasje met wateragar of een druppelglaasje werden een aantal malen zowel open als dicht in de ring geplaatst waar tijdens de incubatieperiode ook de planten stonden. Dit had echter geen invloed op de kieming en in veel gevallen was er geen kieming. Toch werd daarna vaak wel aantasting door *P. canaliculata* op de planten vastgesteld. Daaruit kan de conclusie worden getrokken dat de gebruikte kiemprouwen op wateragar of druppelglaasje geen betrouwbare indicatie zijn voor het wel of niet slagen van infectie.

Nadat de celtemperatuur met 1 °C verhoogd was, werd de aantasting van de planten 100 % (tabel 4). Het aantal geïnfecteerde bladeren was na het opbrengen van de sporen met de kwast 81 % en door middel van verstuiven 54 %. Het percentage aangetaste bladeren was na de behandeling met de kwast significant hoger dan na het verstuiven van de sporen (bij een onbetrouwbaarheid van $P < 0,05$ volgens de toets van Wilcoxon). Van de planten die met de kwast behandeld werden, zijn de 3 à 4 oudste bladeren niet met sporen ingesmeerd omdat zij als regel vrij snel na het behandelingstijdstip verouderingsverschijnselen vertoonden. Gemiddeld zijn daardoor 4 bladeren per plant behandeld waarna op 3,2 bladeren per plant sori werden gevormd. Het gemiddeld aantal sori per blad bedroeg 6. Het met de kwast behandelde oppervlak per blad was ongeveer 10 cm^2 . Er waren ongeveer 200 sporen per cm^2 aanwezig zodat 0,30 % van de sporen tot de vorming van een sorus kwam. Dit percentage is betrekkelijk gering. Bij een behandeling met de kwast werden, bij dezelfde uitgangshoeveelheid sporen, meer sporen op het blad gebracht dan bij een behandeling met een verstuiver. Bij laatstgenoemde methode worden de sporen in de ruimte waarin de planten staan, verstoven zodat verlies van sporen ontstaat. Het gevolg was dat het aantal sporen op het blad per oppervlakte-eenheid kleiner en ook het aantal sori per blad minder was dan bij een behandeling met de kwast.

De sori werden alleen aan de onderzijde van het blad gevormd, nabij de de bladtop meer dan bij de basis. De bladtop hangt in de meeste gevallen naar beneden; het gevolg daarvan was dat het blad op dat gedeelte langer vochtig bleef waardoor hier mogelijk meer sporen kiemden en meer sori werden gevormd. Daarentegen zou ook verwacht mogen worden dat aan de

bladbasis, welke naar beneden gericht is, meer sori gevormd zouden worden, hetgeen niet gebeurde. Het jongste behandelde blad was meestal nog verticaal gericht en korter dan de overige bladeren. Bij de behandeling met de kwast werd op het jongste blad ongeveer 10 cm lengte en bij de overige bladeren 20 cm lengte met sporen behandeld. Desondanks werden op het jongste blad meer uredosori gevormd en verminderde het aantal sori naarmate het blad ouder was.

Ongeveer 9 à 10 dagen na het toediening van het inoculum werden bruine puntjes op de bladeren zichtbaar welke daarna uitgroeiden tot open sori. Meestal werden twee weken na het inoculeren voor de eerste keer sporen afgezogen. Het grootste aantal sporulerende sori werd ongeveer drie weken na het inoculeren bereikt. Bij gezonde planten en goede groeiomstandigheden werden drie à vier weken lang sporen van de planten afgezogen. Dicht bij elkaar liggende sori vormden soms een grote sorus van 3-5 mm doorsnede. Bladeren waarop zeer veel sori voorkwamen, stierven af. Van de overige aangetaste bladeren ging soms alleen de bladtop dood, in beide gevallen groeide de plant door naar het bloeistadium. Bij het onderzoek werden naast behandelde ook onbehandelde planten in de incubatieruimte geplaatst. Er vond geen aantasting van onbehandelde planten plaats. Wel werd bij een aantal planten, waarbij de bladeren niet behandeld waren, sori gevonden. Bij deze proefomstandigheden werd een eenmalige besmetting met sporen toegepast, welke infectie tot gevolg had. Onder veldomstandigheden zal bij goede weersomstandigheden regelmatig sporulatie en infectie plaats vinden (Phatak et al., 1983; Scheepens, 1984). De relatieve luchtvochtigheid is 's nachts hoog en het blad kan door dauw nat worden. Onder celomstandigheden gebeurde dit niet.

De verschillende herkomsten van *C. esculentus* vertoonden een verschillende vatbaarheid voor *P. canaliculata*. De herkomst behorend tot het type C (Boxmeer) en de herkomst Elsendorp behorend tot het type B werden niet geïnfecteerd. De twee andere herkomsten van type B, Pb (aardappel) en Wintjes en de tot het type A behorende herkomst Gilzen waren minder vatbaar dan de overige herkomsten van het type A, zij vormden minder sori en deze waren kleiner. Het cultuurgewas *C. esculentus* variëteit Sativus bleek ook onvatbaar voor dit isolaat van *P. canaliculata*.

De plantesoorten die niet als waardplant bekend stonden, werden getest nadat bekend was onder welke omstandigheden de roest *C. esculentus* kon

nadat bekend was o f er welke omstandigheden de roest *C. esculentus* kon infecteren. Enkele plantesoorten zoals *C. fuscus*, *C. flavescens* en *C. hirta* werden op 2 data geïnoculeerd. De planten van *C. albostratus* werden in 1 experiment onderzocht, *C. rotundus*, *E. palustris* en *S. maritimus* werden gezamenlijk in 1 experiment en *C. alternifolius* werd gelijk met een deel van *C. hirta* geïncubeerd, evenals *C. esculentus* var. *Sativus*. Steeds werd de herkomst Valkenswaard van *C. esculentus* als referentieplant toegevoegd en werden de sporen door middel van een verstuiver op de planten gebracht. In alle experimenten werd *C. esculentus* geïnfecteerd. Bij *C. esculentus* var. *Sativus* ontstonden kleine necrotische plekjes. Er werden geen sori gevormd. Na infectie door roestschimmels wijst necrose op resistentie (Bruzzeze & Hasan, 1986). Op *C. fuscus* vormde de roest in beide experimenten kleine spore-hoopjes (kleiner dan 1 mm doorsnee). De sori waren ook omringd door een zone van necrotische weefsel. De overige plantesoorten vertoonden geen reactie op het behandelen met *P. canaliculata*.

5 Conclusie

Uit het onderzoek is gebleken dat *P. canaliculata* niet alleen *C. esculentus* kan aantasten maar ook een andere tot de *Cyperaceae* behorende plantesoort: *C. fuscus*. Ook blijkt dat bij *C. esculentus* zowel vatbare als niet-vatbare herkomsten voorkomen. Bestrijding met *P. canaliculata* zal slechts een deel van de problemen met *C. esculentus* oplossen. Als criterium voor introductie van *P. canaliculata* was de eis gesteld dat geen van de te toetsten soorten vatbaar mochten zijn met uitzondering van *C. esculentus* en *C. rotundus*. Omdat de schimmel niet specifiek genoeg is, is in overeenstemming met internationale richtlijnen besloten het onderzoek te beëindigen.

7. Literatuur

- Anonymus, 1983. Vlugschrift voor de Landbouw nr. 364. Knolcyperus, een gevaarlijk onkruid! Ministerie van Landbouw en Visserij.
Consulentschap voor de Gewasbescherming, Wageningen.
- Becker, S.M. 1976. Untersuchungen zur Verbreitung der Uredosporen van *Hemileia vastatrix* Berk und Br. in Kenia. Justus Liebig-Universitaet Giessen, 204 pp.
- Bruzzesse, E. & Hasan, S. 1986. The collection and selection in Europe of isolates of *Phragmidium violaceum* (Uredinales) pathogenic to species of European Blackberry in Australia. *Annals of Applied Biology* 108: 527-533; 585-596.
- Callaway, M.B., Phatak, S.G. & Wells, H.D. 1985. Studies on alternate hosts of the rust *Puccinia canaliculata*, a potential biological control agent for nutsedges. *Plant Disease* 69: 924-926.
- Frantzen, J. 1987. Biologische bestrijding van knolcyperus: een hindernis-loop. Onderzoeksverslag KU Nijmegen en LU Vakgroep Fytopathologie, 50 pp.
- Habekotté, B. 1988. Populatie-dynamica van *Cyperus esculentus* L. (knolcyperus) in relatie tot verschillende landbouwkundige maatregelen, LU, Wageningen, 26 pp.
- Heath, M. 1971. Haustorial sheath formation in Cowpea leaves immune to rust infection. *Phytopathology* 61: 383-388.
- Heukels, H. & Ooststroom, S.J. van. 1977. Flora van Nederland. S.J. van Ooststroom, Ed. Noordhoff, Groningen, 925 pp.
- Holm, L.G., Plucnett, D.L., Pancho, J.V. & Herberg, J.P. 1977. The worlds worst weeds. The University Press of Hawaii, Honolulu, 609 pp.
- Jansen, L.L. 1971. Morphology and photoperiodic responses of Yellow Nutsedge. *Weed Science* 19: 210-219.
- Mulligan, G.A. & Junkins, E.B. 1976. The biology of Canadian weeds. 17. *Cyperus esculentus* L. *Canadian Journal of Plant Science* 56: 339-350.
- Omar, M.B. & Bolland, L. 1980. A permanent mounting medium for fungi, *Stain Technology* 53: 293-294.
- Phatak, S.C. 1984. Knock Out Nutsedge. *American Vegetable Grower*, 32: 44-46.
- Phatak, S.C., Sumner, D.R., Wells, H.D., Bell, D.K. & Glaze, N.C. 1983. Biological control of yellow nutsedge with the indigenous rust fungus *Puccinia canaliculata*. *Science* 219: 1446-1447.

- Rowell, J.B. 1984. Controlled infection by *Puccinia graminis* f. sp. tritici under artificial conditions. In: W.R. Bushnell & A.P. Roeyes (Eds.), The cereal rusts, Vol.1: Academie Press, Orlando, 291-332.
- Scheepens, P.C. 1984. Verslag van een studiereis naar de Verenigde Staten en Canada op het gebied van de biologische onkruidbestrijding, 6-25 augustus 1984. CABO, Wageningen, 12 pp.
- Seeters, P. v. 1984. Akkeronkruid overwoekert op grote schaal landbouwgewassen. In: de Volkskrant 19 mei.
- Stoller, E.W., Slife, F.W. & Andersen, R.N. 1972. Yellow Nutsedge control in soybeans. Weed Science 20: 194-201.
- Stoller, E.W. 1981. Yellow Nutsedge: a menace in the Corn Belt. U.S.D.A. Technical Bulletin no. 1642.
- Timmers, A.C.J. 1986. *Puccinia punctiformis*: levenscyclus en verspreiding. Katholieke Universiteit Nijmegen, 91 pp.
- Wills, G.D., Hoagland, R.E. & Paul, R.N. 1980. Anatomy of Yellow Nutsedge (*Cyperus esculentus* L.). Weed Science 28: 432-437.

Bijlage I

De samenstelling van het fixeermiddel (Timmers, 1986):

20 ml formaldehyde
20 ml azijnzuur
180 ml alcohol (50 %)

De samenstelling van lactofenol-trypaanblauw (Heath, 1971):

20 ml gedestilleerd water
20 ml melkzuur (90 %)
20 ml glycerine
20 g fenol
0,04 g trypaanblauw
120 ml alcohol (96 %)

De samenstelling van PVA (polyvinylalcohol) (Omar & Bolland, 1980):

1,66 g polyvinylalcohol
10 ml gedestilleerd water
10 ml melkzuur (90 %)
1 ml glycerine