

# **Werkzaamheid van de roestschimmel *Puccinia punctiformis* als mogelijk biologisch bestrijdings- middel tegen akkerdistel (*Cirsium arvense*)**

A.S. van Leest en P.C. Scheepens

**ab-dlo**

Het DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO) is onderdeel van de Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij.

Het instituut is opgericht op 1 november 1993 en is ontstaan door de samenvoeging van het Wageningse Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO) en het in Haren gevestigde Instituut voor Bodemvruchtbaarheid (IB-DLO).

DLO heeft tot taak het genereren van kennis en het ontwikkelen van expertise ten behoeve van de beleidsvoorbereiding en -uitvoering van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, het bevorderen van de primaire landbouw en de agrarische industrie, het inrichten en beheren van het landelijk gebied, en het beschermen van natuur en milieu.

AB-DLO heeft tot taak het verrichten van zowel fundamenteel-strategisch als toepassingsgericht onderzoek en is gepositioneerd tussen het fundamentele basisonderzoek van de universiteiten en het praktijkgerichte onderzoek op proefstations. De verkregen onderzoeksresultaten dragen bij aan de bevordering van:

- de bodemkwaliteit;
- duurzame plantaardige produktiesystemen;
- de kwaliteit van landbouwprodukten.

Kernexpertises van het AB-DLO zijn: plantenfysiologie, bodembioïogie, bodemchemie en -fysica, nutriëntenbeheer, gewas- en onkruiddecologie, graslandkunde en agrosysteemkunde.

#### **Adres**

##### *Vestiging Wageningen:*

Postbus 14, 6700 AA Wageningen

tel. 08370-75700

fax 08370-23110

e-mail [postkamer@ab.agro.nl](mailto:postkamer@ab.agro.nl)

##### *Vestiging Haren:*

Postbus 129, 9750 AC Haren

tel. 050-337777

fax 050-337291

e-mail [postkamer@ab.agro.nl](mailto:postkamer@ab.agro.nl)

# Inhoudsopgave

|  | pagina |
|--|--------|
| Voorwoord  | 1      |
| Samenvatting   | 3      |
| Summary  | 4      |
| 1. Inleiding   | 5      |
| 2. Doel van het experimentele onderzoek  | 7      |
| 3. Experimenten  | 9      |
| 3.1. Ontwikkeling van systemische infectie na ingraven in het veld van<br>geïnoculeerde akkerdistelwortels | 9      |
| 3.2. Transport van teliosporen in de bodem   | 10     |
| 3.3. Knopontwikkeling in het veld  | 13     |
| 3.4. Ontwikkeling van systemische infectie na inbrengen in de bodem van<br>teliosporen                     | 14     |
| 3.5. Sporenproductie en -bewaring  | 15     |
| 3.6. Conclusies van het experimentele onderzoek  | 15     |
| 4. Perspectieven en aanbevelingen  | 17     |
| Referenties  | 19     |

# Voorwoord

Het huidige onkruidkundige onderzoek is vooral gericht op het ontwikkelen van mogelijkheden om het gebruik van chemische onkruidbestrijdingsmiddelen en de afhankelijkheid van deze vorm van bestrijding te verminderen. Hierbij wordt aangesloten bij de beleidsdoelstellingen, zoals geformuleerd in het Meerjarenplan Gewasbescherming. Biologische onkruidbestrijding is in principe een gunstig alternatief voor chemische onkruidbestrijding. Thans zijn er wereldwijd drie commercieel verkrijgbare mycoherbiciden en vijf mycoherbiciden die op niet-commerciële wijze worden verspreid. Verwacht mag worden dat in de periode tussen de jaren 2000 - 2020 een tiental middelen voor de Nederlandse boeren, tuinders en beheerders van openbaar groen ter beschikking zullen komen. Om dit mogelijk te maken dient er echter innovatief onderzoek gedaan te worden, niet alleen om een wetenschappelijke basis te leggen voor de ontwikkeling van biologische onkruidbestrijding, maar ook om het bedrijfsleven te overtuigen van de commerciële haalbaarheid van bestrijdingsmiddelen gebaseerd op schimmels of andere organismen.

In dit rapport wordt verslag gedaan van onderzoek naar de werkzaamheid van een roestschimmel als bestrijdingsmiddel tegen akkerdistel. Het onderzoek werd uitgevoerd om beter inzicht te krijgen hoe bestrijding van dit onkruid onder veldomstandigheden verbeterd kan worden. Hierbij werd voortgebouwd op experimenten die in de laboratoria van het DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek plaatsvonden. Het onderzoek werd naast de gangbare LNV-programmafinanciering, medegefinancierd door het ministerie van VROM.

Dr. L.A.P. Lotz

Programmaleider onkruidkundig onderzoek, AB-DLO



## Samenvatting

Het meerjarige onkruid akkerdistel (*Cirsium arvense*) is de laatste jaren als probleem in grasland, maar ook in sommige akkerbouwsystemen, in importantie sterk toegenomen. Bestrijding is noodzakelijk om verdere uitbreiding van distelhaarden te voorkomen. Maaien en chemische bestrijding zijn niet altijd te rijmen met de beheersdoeleinden. Gezocht wordt naar een milieuvriendelijke en effectieve bestrijdingsmethode die specifiek is voor akkerdistel.

Doel van het onderzoek op het AB-DLO is biologische bestrijding van akkerdistel met de inheemse roestschimmel *Puccinia punctiformis* door verhoging van het percentage systemisch geïnfecteerde scheuten, na toediening van teliosporen aan het systeem. De mogelijkheden tot het manipuleren van stappen in het infectieproces werden onderzocht, alsmede een meer praktijkgerichte wijze van toediening.

Er werden verschillende experimenten opgezet, zowel onder veldomstandigheden als onder geconditioneerde omstandigheden. De veldexperimenten vonden plaats in een extensief beweide grasland te Vlakte, Zuid-Beveland. Er werden twee experimenten uitgevoerd. Eén veldproef werd aangelegd, waarin geïnoculeerde wortelstukjes werden uitgepoot. De stukjes waren in het lab met teliosporen bestoven om het transport van de teliosporen in de bodem over te slaan. Door deze opzet zou kunnen worden bepaald of andere factoren dan transport van teliosporen een beperkende rol spelen in het slagen van de roestinfectie. De proef is in 1993 mislukt, en daarom in 1994 opnieuw ingezet. Waarschijnlijk zijn extreem natte weersomstandigheden in het veld van invloed geweest. Het experiment wordt beschreven in hoofdstuk 3.1.

De inspoeling van teliosporen in de bodem werd bestudeerd als belangrijke stap in de levenscyclus van de roestschimmel en wordt beschreven in hoofdstuk 3.2. Naast het nemen van monsters in de veldproef met de sporentoediening (beschreven in 3.4) werden er grondkolommen verzameld. In deze kolommen werd de inspoeling van teliosporen gevolgd in de tijd, afhankelijk van de dagelijkse watergift. De hoeveelheden teliosporen per bodemlaag werden bepaald. Hetzelfde werd gedaan voor de monsters gestoken in de veldproef. Conclusie uit de beide experimenten was dat er verspreiding van teliosporen in de bodem plaats vindt (veld) en dat 10 % van de aangebrachte teliosporen inspoelt naar diepere lagen (kolommen).

In hoofdstuk 3.3 wordt beschreven hoe de knopontwikkeling van distel onder veldomstandigheden verloopt. Het aantal knoppen en de grootte van deze knoppen werd bepaald. Het aantal knoppen per meter wortel is laag in september en de knoppen zijn relatief klein. Gedurende het najaar en vroege voorjaar worden er nieuwe knoppen gevormd en groeien de reeds gevormde knoppen door.

Naast het in hoofdstuk 3.1 beschreven experiment werd er nog een proef uitgevoerd in het veld. Uitgezette veldjes werden voorzien van handgemaakte voren, waarin gesuspenderde teliosporen werden gespoten. Na opkomst van de distels in het voorjaar, werden de veldjes beoordeeld op aanwezigheid van al dan niet systemisch geïnfecteerde scheuten. Ook hier speelde het weer een belangrijke, negatieve rol. De aantallen opgekomen scheuten bleven ver achter bij andere jaren en er werd uiteindelijk maar één systemische scheut gevonden. Dit experiment wordt beschreven in hoofdstuk 3.4. Het is eveneens herhaald in 1994.

Aan het einde van dit project kan geconcludeerd worden dat de vraag of verhoging van het infectiepercentage onder veldomstandigheden mogelijk is, nog niet beantwoord kan worden. Wel kan de conclusie getrokken worden, dat na toediening op de bodem, transport van teliosporen in de bodem plaatsvindt. Het percentage inspoeling is echter laag. Daarom dienen, voor een effectieve bestrijding, de teliosporen onder de zodelaag aangebracht te worden.

## Summary

The perennial weed Canada thistle (*Cirsium arvense*) has become a serious problem in extensively managed grasslands in the Netherlands during the last decade. To avoid further spread of thistle populations, either vegetatively or generatively, it is necessary to control the weed before the flowering stage. Mowing and chemical control do not always cope with the main goal of the manager.

Aim of the investigations at AB-DLO is biological control of Canada thistle with the native rust fungus *Puccinia punctiformis* by increasing the proportion of systemically infected shoots after application of teliospores to the system. Possibilities to manipulate steps in the infection process as well as a way to apply spores in the field were investigated.

Several experiments were carried out, both in the field and under controlled conditions.

The study site was located in an extensively used grassland in the southwestern part of the Netherlands (51°30'N, 4°00'E). Two experiments were carried out at this site.

Aim of one of the field experiments was to determine whether soil factors other than transport of spores are crucial for the infection process. This was investigated by inoculating thistle root pieces in the lab and planting these in the field to omit the otherwise necessary transport of teliospores into the soil. The experiment failed in 1993 and was repeated in 1994. Not a single root piece sprouted to a shoot. Extreme wet weather conditions seem to have played an important role in this failure.

The transport of teliospores, an important step in the life cycle of the rust fungus, was studied. This downward movement was investigated in field plots which had been sprayed with teliospores. Samples were taken, divided into several soil layers and analysed in the lab. The dispersal of teliospores in time was demonstrated. To improve knowledge about this process, the transport was studied under more controlled circumstances, too. Soil columns, taken from the field, were provided on top with suspended teliospores. Water was added daily, and after one or three weeks the columns were divided in depth classes, dried in an oven, grinded and analysed for the number of teliospores per gramme of soil. Spore transport in time was demonstrated. There was a significant increase of teliospores in the lowest layer with time, and significant differences between layers disappeared with time. About 10 % of the added teliospores had been transported downwards.

To investigate the thistle bud development under field conditions thistle roots were dug up and the number and size of the roots were measured. The buds of the first shoots to appear in spring were developed in september already. The formation of new buds seems to happen in a sequential way.

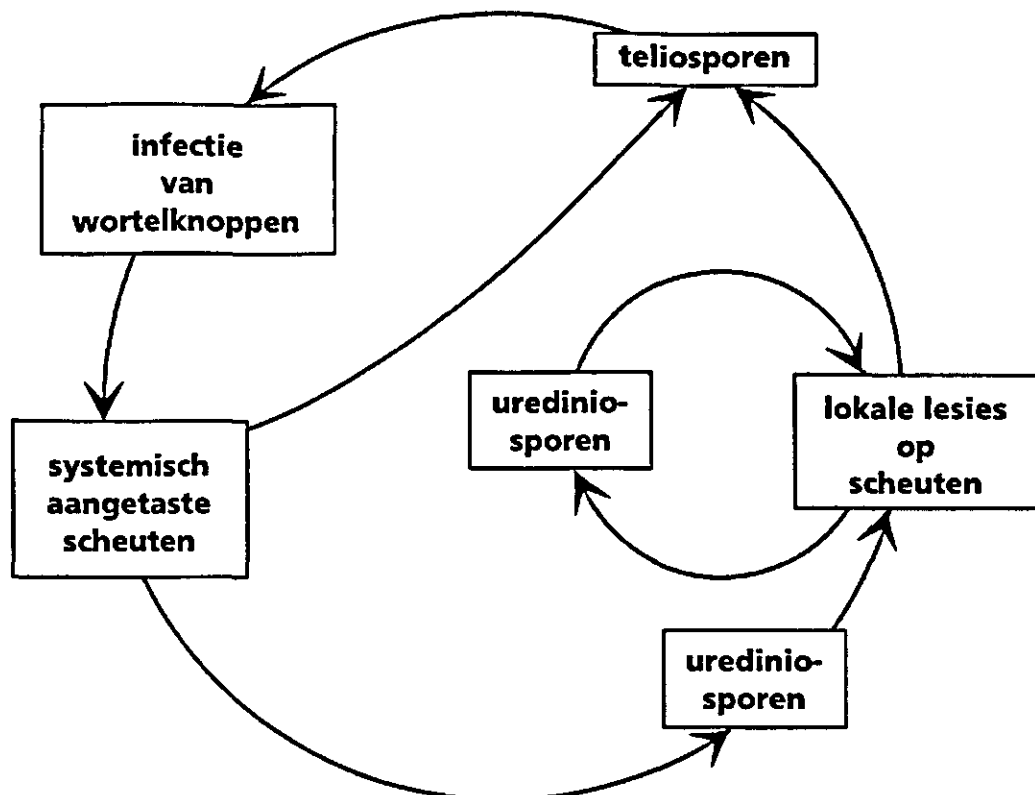
Aim of a second field experiment was to determine the effect of teliospore application underneath the grass sward. Furrows were made in field plots. In these furrows a teliospore suspension was sprayed. The experiment was carried out at the end of the growing season. Next spring, the number of developed shoots was counted per plot. Not a single infected shoot was counted in the treated plots. Again, extreme weather conditions in 1993 were reasoned as the main cause of this failure. The experiment was repeated in 1994.

It is still not possible to answer the question whether the level of systemic infection can be artificially increased. It has become evident from the experiments, that roughly 10 % of the spores is transported in the soil. For effective control of Canada thistle, the teliospores should be supplied directly under the grass sward.

# 1. Inleiding

Het meerjarige onkruid akkerdistel, *Cirsium arvense* (L.) Scop., vormt een probleem in graslanden die veelal beheerd worden ter bevordering van natuurwaarden. Maaien en chemische bestrijding van de distels is in strijd met het primaire ecologische doel van de beheerders, het creëren van een kruidenrijkdom. In grasland zonder onkruidbestrijding kan de distel zich ongeremd uitbreiden. Amor en Harris (1975) spreken voor de Europese en Noordamerikaanse situatie over een jaarlijkse vegetatieve uitbreiding van distelhaarden van 1 tot ruim 12 m. Distels bezitten van nature een zwak concurrerend vermogen. In beweid grasland met een open zode kunnen ze zich vaak volledig ontplooien. De uitlopende distelscheuten worden er in de groei niet geremd doordat het korte gras geen directe concurrent is. Uiteindelijk zal het effect van de distelgroei voor de beheerder negatief uitpakken. De distels gaan overheersen en er bestaat gevaar voor zaadverspreiding naar belendende percelen. Thans wordt gezocht naar een effectieve, milieuvriendelijke manier om het onkruid te beheersen. Hiertoe is AB-DLO, met medefinanciering van het Ministerie van VROM, gestart met onderzoek naar de mogelijkheid om de akkerdistels op biologische wijze te bestrijden.

De akkerdistel heeft in de vrije natuur voorkomende pathogenen. Eén hiervan, de roestschimmel *Puccinia punctiformis* (Str.) Röhl, is soortspecifiek. Infectie door de roestschimmel kan voor het plantsysteem desastreuze gevolgen hebben. *P. punctiformis* heeft meerdere sporenstadia, waarvan het ongeslachtelijke urediniosporen- en het geslachtelijke teliosporenstadium de belangrijkste zijn (Fig. 1).



Figuur 1 Levenscyclus van de roestschimmel *Puccinia punctiformis* vereenvoudigd weergegeven (volgens Gäumann, 1959)



In het verleden is al door verscheidene groepen onderzoek verricht naar het systeem akkerdistel - *P. punctiformis* (Olive, 1913; Cockayne, 1915; Buller, 1950; Menzies, 1953; Van den Ende et al., 1987; French & Lightfield, 1990; Frantzen, 1994a). De teliosporen fungeren als het ruststadium. Ze worden onder natuurlijke omstandigheden aan het einde van het groeiseizoen gevormd. Kiemende teliosporen kunnen systemische infectie veroorzaken. Hiervoor dient het mycelium van de roest na infectie het weefsel van een distelwortelknop te doorgroeien. Na een succesvolle infectie zal de wortelknop uitgroeien tot een systemisch geïnfecteerde scheut. Deze scheut zal reeds voor het bloeistadium afsterven. In extensief beheerde graslanden in Nederland is tot 10 % van de distelscheuten systemisch geïnfecteerd door de roestschimmel (Frantzen & Scheepens, 1993).

Onderzoek op het AB-DLO naar biologische bestrijding van akkerdistel met *P. punctiformis* is gericht op verhoging van het percentage systemisch geïnfecteerde scheuten door toediening van teliosporen aan het systeem. Eerder uitgevoerde volveldsbespuitingen met teliosporen (Frantzen & Scheepens, 1993) gaven echter geen significante toename in het percentage systemische aantasting. Onder geconditioneerde omstandigheden, waarbij de teliosporen rechtstreeks op de wortelknoppen worden aangebracht, is dit percentage veel hoger. Frantzen en Van der Zwerde (1994a) vonden voor de meest effectieve combinatie van distelkloon en schimmelisolaat een maximaal knopinfectiepercentage van 50-60 %. Het inzicht om dit verschil te verklaren ontbreekt nog. Het ontbrekende inzicht heeft betrekking op het deel van de levenscyclus tussen het moment dat teliosporen worden gevormd en de infectie van wortelknoppen. Om in het veld een hoger aantastingsniveau te krijgen zal dit proces verder onderzocht moeten worden. Dan zal kunnen blijken of het systeem akkerdistel - *P. punctiformis* in voldoende mate te manipuleren is.

Voor infectie van wortelknoppen moeten teliosporen eerst door de bodem worden getransporteerd. Dit transport is nooit feitelijk aangetoond (French and Lightfield, 1990; Frantzen & Van der Zwerde, 1994b). Het is aannemelijk dat de teliosporen zich door de bodem zullen verplaatsen, maar het is te verwachten dat een groot deel van de gevormde sporen, nadat ze op de grond terecht zijn gekomen, aan het gras blijft kleven. Om het meest geschikte tijdstip van sporentoediening vast te stellen, is meer inzicht nodig over vorming en infecteerbaarheid van wortelknoppen.

## 2. Doel van het experimentele onderzoek

Doel van het onderzoek op het AB-DLO is biologische bestrijding van akkerdistel met de roestschimmel *P. punctiformis* door verhoging van het percentage systemisch geïnfecteerde scheuten, na toediening van teliosporen aan het systeem. De mogelijkheden tot het manipuleren van stappen in het infectieproces werden onderzocht, alsmede een meer praktijkgerichte wijze van toediening.

Kern van het hier beschreven onderzoek was het beantwoorden van de vraag hoe het verhogen van de natuurlijke infectiegraad onder veldomstandigheden mogelijk is. Een uitgangspunt hierbij was, dat het transport van teliosporen in de bodem beperkend zou zijn. In één experiment werd verplaatsing van teliosporen naar de wortelknoppen overgeslagen door inoculatie van akkerdistelwortelknoppen in het lab en uitplanten van de knoppen in het veld. Dit experiment moest uitsluitsel geven of ook andere factoren dan sporetransport beperkend waren. Om meer inzicht te verkrijgen in het transport van teliosporen in de bodem, werd de inspoeling zowel in het veld als onder meer geconditioneerde omstandigheden gevolgd. Inzicht in de knopontwikkeling en de infecteerbaarheid van de knoppen is nodig om het juiste moment van sporetoediening te kunnen bepalen. De verwachting is dat vooral de kleine knoppen infecteerbaar zijn. De knopontwikkeling in het veld werd bestudeerd.

Onderdeel van het onderzoek was het vertalen van het inzicht in het systeem *C. arvensis*-*P. punctiformis* naar een succesvolle toepassing onder praktijkomstandigheden. Om het effect van toegediende teliosporen te verhogen werden ze in een veldexperiment aangebracht onder de graszoden, in de door distels bewortelde bodemlaag. Hierbij werd een toedieningswijze gebruikt die in principe gemakkelijk is te mechaniseren en op grote schaal toe te passen.



### 3. Experimenten

#### 3.1. Ontwikkeling van systemische infectie na ingraven in het veld van geïnoculeerde akkerdistelwortels

*Proefopzet.* Door inoculatie van wortelstukken in het lab en uitplanten van de wortelstukjes in het veld werd het transportstadium van teliosporen door de zodelaag overgeslagen en zou indirect aangetoond kunnen worden of deze laag een natuurlijke barrière vormt voor de teliosporen. Een deel van de stukjes werd in het lab geïnoculeerd en vóór het uitplanten geïncubeerd gedurende de periode die nodig is voor de schimmel om de knoppen te infecteren. Er werden 100 wortelstukken per behandeling, verdeeld over vier tijdstippen, uitgeplant in een proefveld te Vlake, Zuid-Beveland. Ter controle werd een gelijk aantal wortelstukjes in de kas uitgeplant.

De effecten van inoculatie en van de incubatieperiode werden bepaald. Er werden drie distelklonen opgenomen in het experiment, te weten Almere, Yerseke en Vlake. De verwachting was dat, na sporetoediening, het percentage systemisch aangetaste distelscheuten hoger zou zijn dan de natuurlijke infectiegraad. Als het transport van teliosporen inderdaad de belangrijkste beperking is, zou het percentage systemisch aangetaste scheuten in kas en veld gelijk moeten zijn.

*Resultaten kasgegevens.* In tabel 1 is het aantal uitgelopen wortelstukken en het percentage systemische scheuten weergegeven.

Tabel 1 Aantal en percentage van de potten met één of meer systemisch geïnfecteerde scheuten in de kas

| Kloon   | Behandeling | Aantal uitgelopen wortelstukken | % Systemisch         |
|---------|-------------|---------------------------------|----------------------|
| Almere  | +/-         | 85 a <sup>1)</sup>              | 49 % a <sup>1)</sup> |
| Almere  | +/+         | 78 a b                          | 58 % a               |
| Yerseke | +/-         | 54 c                            | 26 % b               |
| Yerseke | +/+         | 28 d                            | 14 % b               |
| Vlake   | +/-         | 61 b c                          | 25 % b               |
| Vlake   | +/+         | 56 c                            | 13 % b               |

+/- = geïnoculeerd, niet geïncubeerd;

+/+ = geïnoculeerd, geïncubeerd

<sup>1)</sup> De significante verschillen zijn aangeduid met verschillende letters ( $P < 0.05$ )

De percentages werden statistisch geanalyseerd volgens een verdelingsvrije rangcorrelatie voor een blokkenproef. De opkomstpercentages van de drie gebruikte klonen bleken nogal te variëren. De kloon Almere had een significant hoger opkomstpercentage dan de andere twee. Kloon Almere gaf ook een significant hoger percentage systemisch geïnfecteerde scheuten dan Yerseke en Vlake. Er bleek geen aantoonbaar effect van de incubatie op het percentage

aantasting. Bij kloon Yerseke was het opkomstpercentage na incubatie significant lager dan na direct uitplanten. Naast systemische scheuten kwamen er regelmatig gezonde scheuten op in dezelfde pot.

*Resultaten veldgegevens.* Van al de uitgepote wortelstukjes is vrijwel niets opgekomen. De verklaring hiervoor dient gezocht te worden in de weersomstandigheden. Het heeft in het najaar '93 aanmerkelijk meer geregend dan normaal. Het grondwaterpeil is in die tijd ook gestegen. Uit literatuur blijkt dat de distel gevoelig is voor wateroverlast (Bakker, 1960). Daarnaast is er een vorstperiode geweest in november 1993. Ook dit is niet bevorderlijk voor de ontwikkeling van distelwortelknoppen (Schimming *et al.*, 1988). De wortelstukjes hebben bloot gestaan aan allerlei secundaire infecties die via de snijvlakken zijn opgetreden, waardoor ze zijn weggerot.

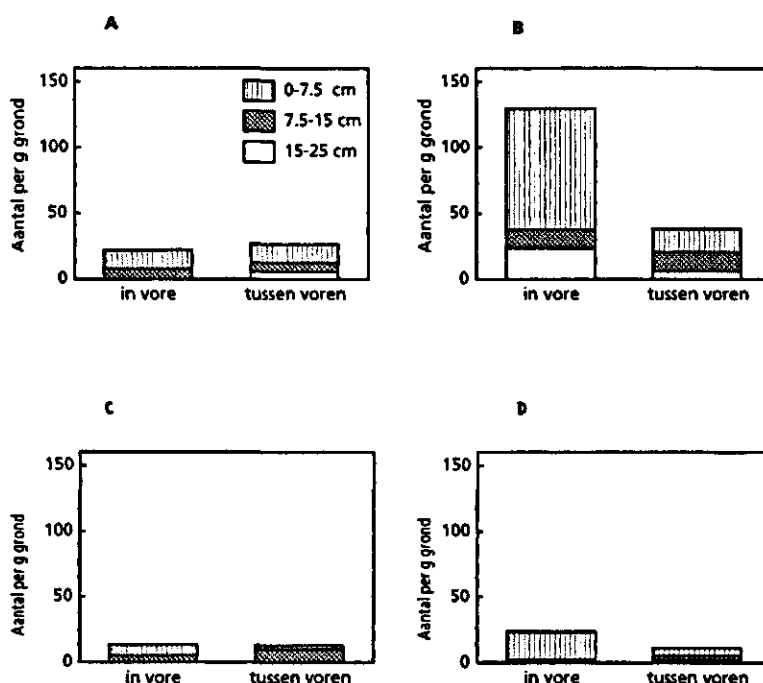
Het experiment wordt in het najaar van '94 herhaald met grotere wortelstukken (10-15 cm) op goed gedraineerd bouwland.

## 3.2. Transport van teliosporen in de bodem

*Proefopzet.* Voor het vaststellen van het transport van teliosporen van *P. punctiformis* in de bodem werden twee experimenten opgezet: één in het veld en één onder geconditioneerde omstandigheden. Voor het transport van teliosporen onder veldomstandigheden werd gebruik gemaakt van het eerder genoemde proefveld te Vlakte. Hier werd een aantal veldjes van 1 m<sup>2</sup> voorzien van handgemaakte voren, waarin een bespuiting werd uitgevoerd met teliosporen van *P. punctiformis* (zie 3.4). Van deze veldjes werden zowel in als tussen de voren monsters gestoken op de dag van de sporentoediening en drie weken daarna. Er werd een onderverdeling gemaakt in drie diepteklassen, 0-7,5 cm, 7,5-15 cm en 15-25 cm, gebaseerd op de verdeling van de distelwortels in de bodemlaag. Voor de situatie in het proefveld werd vastgesteld dat de wortels met de wortelknoppen zich 5 tot 10 cm onder de graszodelaag bevonden. De monsters werden in het lab geanalyseerd op het aantal aanwezige teliosporen. Hiertoe werden submonsters van 5 g gedroogde en gemalen grond afgewogen en uitgespoeld over een zevenset. Het aantal aanwezige teliosporen werd bepaald door drie druppels van elk 100 µl per monster onder een microscoop te scoren. Het experiment had zes herhalingen.

Voor het aantonen van transport van de sporen onder geconditioneerde omstandigheden, werden in hetzelfde proefveld twintig grondkolommen verzameld. Deze werden onder een foliekap (AB-DLO terrein) geplaatst, waarna er per kolom 100 mg gesuspendeerde teliosporen op aangebracht werden. De kolommen werden dagelijks voorzien van water. Er werd onderscheid gemaakt in watergift (1 mm of 4 mm per dag) en oogsttijdstip (1 week of 3 weken na inzet). Op het moment van oogst werden de kolommen verdeeld in 4 diepteklassen, 0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm en 15-25 cm. Ook hier werd het aantal aanwezige teliosporen per g grond per grondlaag bepaald. Er waren vijf herhalingen.

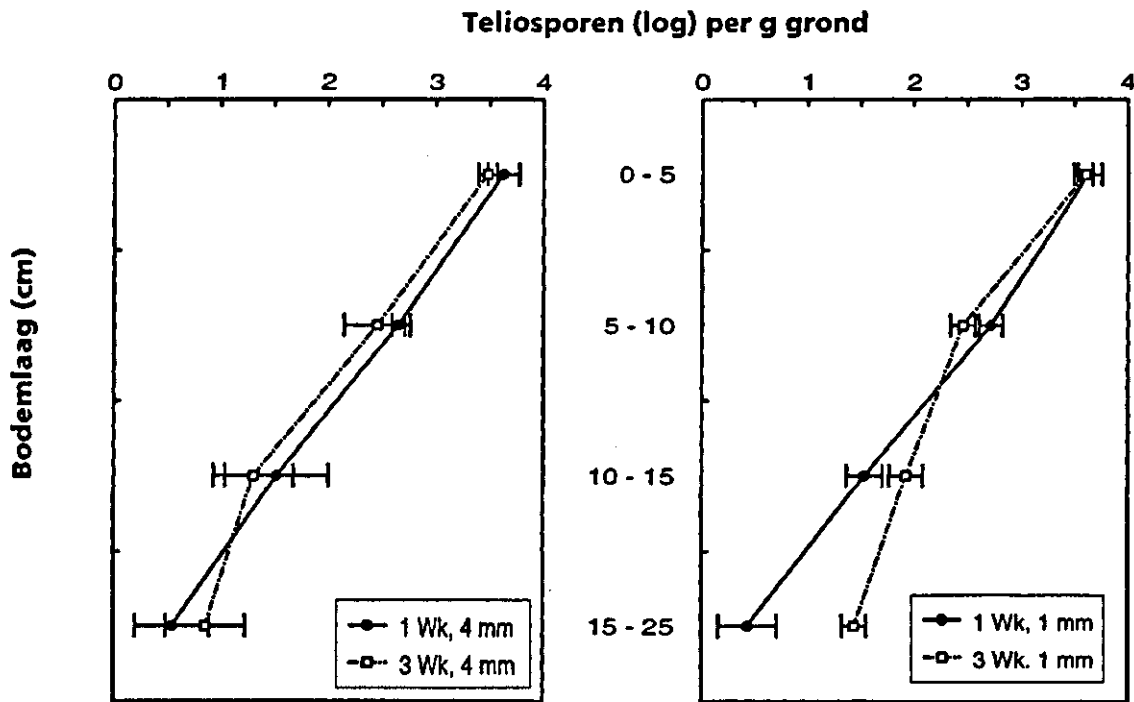
*Resultaten en discussie veldbemonstering.* De gevonden aantallen teliosporen per g grond zijn weergegeven in Fig. 2. De vier grafieken geven de aantallen weer onderverdeeld per oogsttijdstip en veldbehandeling. De helft van de monsters is van onbehandelde veldjes en de rest is van behandelde veldjes.



**Figuur 2** Aantal teliosporen van *Puccinia punctiformis* per g grond verdeeld in diepteklassen en tijdstip na behandeling. De monsters waren afkomstig uit een veldproef.  
 A = onbehandeld, bemonsterd op 09/09; B = behandeld, bemonsterd op 09/09;  
 C = onbehandeld, bemonsterd op 01/10; D = behandeld, bemonsterd op 01/10.

De gegevens werden geanalyseerd met behulp van een GLM (Poisson-verdeling;  $P < 0,05$ ). Er blijkt een significant hoger aantal teliosporen aanwezig te zijn in de bovenste laag in de vore van behandelde veldjes op de dag van teliosporentoediening. Dit was te verwachten, omdat de teliosporen in deze voren zijn aangebracht en de voren niet dieper dan 10 cm zijn geweest. Na drie weken bleek deze significante verhoging genivelleerd. De teliosporen waren vanuit de vore kennelijk verspreid door de bodem. Uit de resultaten blijkt niet of de verspreiding horizontaal, verticaal of in beide richtingen heeft plaatsgehad. Een andere mogelijkheid kan zijn dat de teliosporen door verhoogde microbiële activiteit zijn verteerd. Door de sporenbepuiting zouden de van nature lage aantallen microben plekgewijs explosief toe kunnen nemen. Ondanks de korte tijd van drie weken tussen de twee bemonstertijdstippen, kunnen we deze mogelijkheid niet zonder meer uitsluiten.

**Resultaten en discussie kolommenproef.** De gevonden aantallen teliosporen per g grond van de kolommen zijn gegeven in Fig. 3. De twee grafieken geven de aantallen weer per watergift. De twee tijdstippen van bemonstering zijn gecombineerd weergegeven. Mede gezien de bevindingen bij de veldbemonstering werden een controlebehandeling zonder teliosporen en een bemonstering op het moment van sporenaanbrenging niet uitgevoerd. Bij deze twee varianten zou er sprake geweest zijn van de natuurlijke situatie. De veldbemonstering toonde aan dat de aantallen aanwezige teliosporen erg laag zijn en niet in verhouding staan tot de aantallen die er uiteindelijk na één week zijn ingespoeld (zie onderstaande figuur). Gezien de tijd, die nodig is om monsters te analyseren, en de relatief weinig toevoegende waarde van de gegevens, hebben we afgezien van een uitvoering van deze extra behandelingen.



**Figuur 3** Het aantal teliosporen per g grond, weergegeven per dagelijkse watergift en per tijdstip van bemonstering

De gegevens werden geanalyseerd met behulp van een GLM (Poisson-verdeling;  $P < 0,05$ ). We kunnen hier éénduidig spreken van neerwaarts teliosporetransport. Voor beide behandelingen geldt dat zo'n 10 % van de aangebrachte teliosporen inspoelde naar diepere lagen. Eén week na inzet van het experiment waren er in de diepere lagen reeds teliosporen aanwezig. De aantallen teliosporen per grondlaag namen significant af met toenemende diepte. Dit geldt voor beide behandelingen.

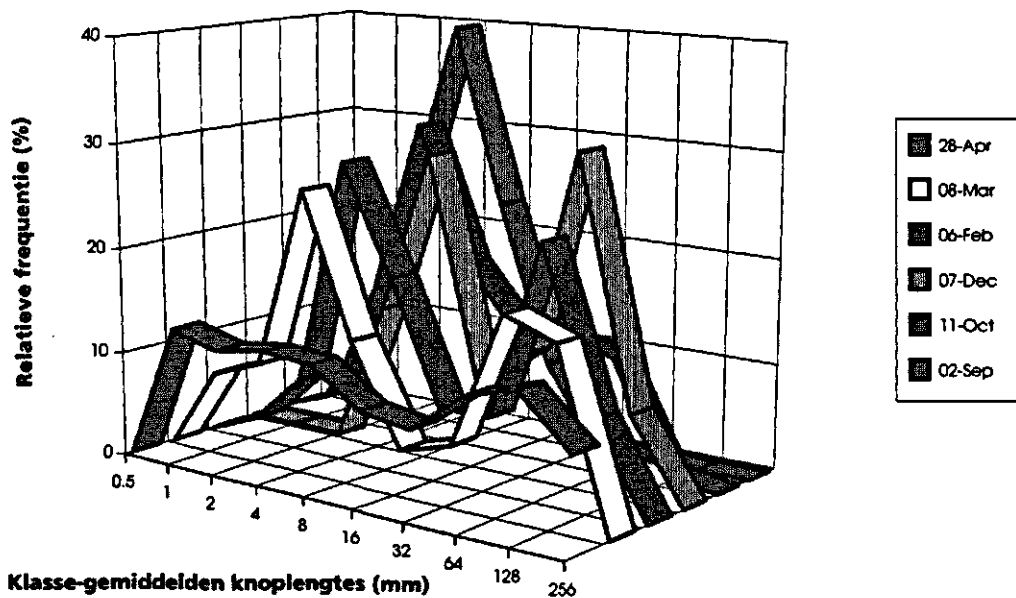
Drie weken na inzet heeft er een verschuiving plaats gevonden. Voor de hoge watergift zijn de aantallen die gevonden worden in de laag van 10-15 cm diepte niet significant verschillend meer van de aantallen in de laag 15-25 cm. Voor de lage watergift blijkt zowel tussen de lagen 5-10 cm en 10-15 cm als tussen de lagen 10-15 cm en 15-25 cm geen significantie in gevonden aantallen teliosporen meer te bestaan. De verwachting dat teliosporetransport plaatsvindt wordt bevestigd door een significante toename van het aantal sporen in de tijd in de laag 15-25 cm bij lage watergift. Dat dit verschil bij de hoge watergift niet optreedt, is te verklaren met de grotere standaard afwijkingen bij deze dagelijkse watergift. Herhaling van het experiment zal uit moeten wijzen of zonder deze grote standaard afwijkingen dit verschil bij 4 mm per dag inderdaad ook optreedt.

Van de aangebrachte aantallen teliosporen per kolom werd gemiddeld 44 % teruggevonden. Het verlies is toe te schrijven aan de analyse-methode. In een eerder uitgevoerd oriënterend experiment werd een ijklijn opgesteld voor de analysemethode. Hieruit kwam, voor een lichte kleigrond van het AB-DLO-terrein, een terugvind-percentages van 33 % (niet gepubliceerde data). De percentages bleken niet dichtheidsafhankelijk. Voor het bepalen van de inspoelingsgradiënt van teliosporen zijn deze terugvind-percentages toereikend.

### 3.3. Knopontwikkeling in het veld

**Materiaal en methoden.** Om een eerste indruk te krijgen wat de meest optimale periode is voor het toedienen van teliosporen werd de knopontwikkeling in het veld gevolgd. Hiertoe werd er op zes tijdstippen tussen september 1993 en april 1994 wortelmateriaal verzameld in het veld te Vlakte. De knoplengtes werden bepaald, alsmede het aantal knoppen per strekkende meter wortel. De knoppen werden ingedeeld in lengteklassen.

**Resultaten en discussie.** De frequentieverdeling van de knoplengtes per tijdstip is weergegeven in Fig. 4.



Figuur 4 Frequentie (%) van wortelknoppen van akkerdistel per lengteklasse en per tijdstip

In september was er sprake van één piek in de aantallen van 2-4 mm lengte. Deze piek was licht verschoven in oktober en in december was er sprake van twee pieken. De piek van september zat nu in de klasse 32-64 mm. Er was hier een nieuwe piek ontstaan van kleine knoppen. Tussen december en eind maart leek het systeem in rust. Eind april, toen de eerste scheuten bovengronds kwamen, bleek de verdeling over de knoplengteklassen ongeveer gelijk te zijn. De piek van de hoge knoplengtes gedurende de wintermaanden zorgde nu voor de eerste aanvoer van scheuten. De opvolgende piek (tijdens de wintermaanden) was nu gelijk verdeeld over de klassen tussen 4 en 32 mm. Deze zorgt vermoedelijk later in het groeiseizoen voor de aanvulling van scheuten.

De waarnemingen hebben betrekking op één periode en één veld. Voor beter inzicht in de knopontwikkeling is verder onderzoek over meerdere jaren en meerdere terreinen noodzakelijk.

Voor een geslaagde infectie van de akkerdistel dienen de knoppen kleiner te zijn dan 1 cm (10 mm). De klassen tot 8 mm zijn daarom interessant voor een bestrijding met teliosporen van *P. punctiformis*. Gedurende oktober zijn al veel knoppen groter dan 10 mm, zodat de eerste behandeling niet later uitgevoerd dient te worden dan in september.



Van het bovengenoemde wortelmateriaal werd tevens het aantal knoppen per strekkende meter wortel bepaald. De gegevens zijn vermeld in tabel 2.

Tabel 2 De ontwikkeling van het aantal knoppen per strekkende meter wortel in de tijd

| Tijdstip bemonstering          | 02/09 | 11/10 | 07/12 | 06/02 | 08/03 | 28/04 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Aantal knoppen.m <sup>-1</sup> | 3.4   | 10.8  | 21.8  | 18.3  | 15.1  | 20.3  |

De aantallen geven niet meer dan een indicatie van wat er werkelijk onder veldomstandigheden plaatsvindt. Het experiment werd ter oriëntatie uitgevoerd. Er valt uit op te maken dat er aan het einde van het groeiseizoen nog niet veel (nieuwe) knoppen waren. In het najaar komt de knopontwikkeling voor het nieuwe seizoen op gang. Gedurende de wintermaanden is er een lichte daling opgetreden in het aantal knoppen wat reeds gevormd was. De knoppen hebben, zoals eerder al opgemerkt, te lijden gehad van de vorstperiode en wateroverlast. Een deel hiervan is dus blijkbaar afgestorven. In april zijn er ook weer nieuw gevormde knoppen. Nader onderzoek is gewenst.

### 3.4. Ontwikkeling van systemische infectie na inbrengen in de bodem van teliosporen

*Proefopzet.* In het reeds onder 3.1 genoemde grasland werd een proefveld aangelegd met 36 veldjes van 1 m<sup>2</sup>. Ze werden voorzien van handgemaakte voren, door per veldje met een spade 10 sleuven te steken van 10 cm diepte. De helft van de veldjes werd bespoten met een waterige suspensie van 125 mg teliosporen in 0.67 volume % lecithine uitvloeier, de rest met water en de uitvloeier. De sporentoediening vond deels plaats in september en deels in oktober '93 voor het bepalen van het meest geschikte moment van toepassing in de praktijk. In het aansluitende voorjaar werden het aantal distelscheuten en het percentage systemische infectie per veldje gescoord. De veldjes werden hiertoe onderverdeeld in vlakjes van 10 cm<sup>2</sup>.

*Resultaten en discussie.* Ook in dit experiment speelden de extreme weersomstandigheden in het najaar van '93 ons parten. Het aantal opgekomen distelscheuten bleef ver achter ten opzichte van dat uit het seizoen 1993, terwijl de opkomst 3-4 weken werd vertraagd. Kennelijk zijn vooral de distelknoppen direct onder de zoden door het slechte weer afgestorven, zodat de scheuten in '94 afkomstig waren van knoppen uit diepere lagen.

Na de behandeling met teliosporen was de fractie systemisch aangetaste scheuten verwaarloosbaar klein. Slechts in één van de 36 veldjes werd een systemisch aangetaste scheut waargenomen. De systemische infectie was in het hele omliggende gebied erg laag. In het voorgaande jaar was het percentage systemisch aangetaste distelscheuten op het proefveld gemiddeld 3,5 %. een mogelijke verklaring is dat de teliosporen de diepere lagen niet hebben bereikt, zodat de ontwikkelde scheuten niet werden geïnfecteerd en er geen systemische infecties ontstaan.

Het experiment wordt in het najaar van '94 herhaald met een hogere teliosporendosis.

### 3.5. Sporenproductie en -bewaring

*Sporenproductie.* Een berekening werd gemaakt van het kostenplaatje voor de bestrijding van 1 ha akkerdistel met teliosporen van *P. punctiformis*. De kosten varieerden van Hfl. 3000,- tot Hfl. 30000,- per ha., afhankelijk van de gebruikte sporendichtheid.

De kosten zullen voor de praktijk tenminste met een factor 100 naar beneden moeten. Dit lijkt een technisch op te lossen probleem, wat eventueel door samenwerking met een commercieel bedrijf nader onderzocht kan worden. Er zijn mogelijkheden om de koudebehandeling, nodig voor de teliosporenvorming, te vervangen voor een infectie met behulp van een hyperparasiet. De verwachting is dat deze infectie teliosporenvorming stimuleert (Forrer, 1977). Daarnaast is gebleken uit het experiment met de geïnculeerde wortelstukken, dat het incuberen geen verhoging van het aantal systemisch geïnfekteerde scheuten te zien geeft. Dit werkt ook kostenbesparend voor de sporenproductie.

*Sporenbewaring.* Voor het bewaren van de teliosporen werd een bewaarproef uitgevoerd. Hierbij werden teliosporen in een koelkast bij 4 °C en in een kweekkast bij 20 °C weggezet. Op verschillende tijdstippen werd met een deel van de teliosporen een aantal kiemingsproeven uitgevoerd. Hiertoe werden de teliosporen over objectglaasjes met wateragar verspoten. De glaasjes werden in vochtige schalen gelegd al dan niet omringd met distelwortels. Het is namelijk bekend dat teliosporen door distelwortels en distelwortellexudaten uit kiemrust komen (French et al., 1988; Frantzen, 1994b). De schalen werden in kweekkasten bij 10 °C en 15 °C geplaatst. De teliosporen werden beoordeeld op het percentage kieming. Uit de resultaten blijkt dat de teliosporen zich niet in kiemrust bevonden. De teliosporen kiemden namelijk zowel bij aan- als afwezigheid van distelwortels. Na 31 weken bewaring kiemden de sporen nog. Ook was er geen duidelijk effect van de bewaartemperatuur op de kiemingspercentages van de teliosporen.

### 3.6. Conclusies van het experimentele onderzoek

Het onderzoek heeft weer nieuw licht geworpen op het systeem akkerdistel-*Puccinia punctiformis*. Een incubatieperiode na inoculatie is niet echt nodig gebleken. Verder is het duidelijk geworden dat de teliosporen in de bodem aangebracht dienen te worden. Transport van teliosporen vindt wel plaats, maar het gros van de bovengronds aangebrachte sporen spoelt niet in. Een antwoord op de onderzoeksvraag of bestrijding van akkerdistel met de roestschimmel mogelijk is, is nog niet te geven. Het misgaan van de veldproeven is mogelijk te wijten aan de extreem slechte weersomstandigheden van het afgelopen jaar, maar voor een effectieve praktische toepassing zouden zulke omstandigheden niet beperkend mogen zijn. Waar Frantzen en Van der Zwerde (1994a) onder geconditioneerde omstandigheden 50-60 % knop aantasting vonden, vinden wij in de kas een vergelijkbaar percentage potten met systemisch geïnfekteerde scheuten. Gezien het relatief grote aantal gezonde scheuten wat naast de systemisch geïnfekteerde scheuten opkwam, zal voor een effectieve praktische toepassing van het systeem akkerdistel-*P. punctiformis* een verhoging van het infectiepercentage nodig zijn. Om dit te bereiken zou gezocht kunnen worden naar agressievere stammen van de roest (Frantzen & Van der Zwerde, 1994a).

Uit de late opkomst van de distels in voorjaar 1994 blijkt dat door weersinvloeden de nieuwe scheuten uit diepere lagen zijn opgekomen. Vraag is of de aangebrachte teliosporen hier

terecht zijn gekomen. Nader onderzoek is nodig om vast te stellen hoe vaak ontsnapping plaatsvindt als de teliosporen direct onder de graszoden worden aangebracht.

Belangrijke nieuwe kennis die werd opgedaan met deze experimenten is het feit dat we aangetoond hebben dat er teliosporetransport plaatsvindt naar dieper gelegen lagen. De veronderstellingen die in eerder onderzoek hierover werden gedaan bleken dus waar (Van den Ende *et al.*, 1987; French & Lightfield, 1990). Uit de resultaten bleek, dat slechts 10 % van de aangebrachte teliosporen inspoelde naar dieper gelegen lagen. Dit is waarschijnlijk één van de redenen van het niet vinden van verhoogde systemische infectie na eerdere veldbespuitingen (Frantzen en Scheepens, 1993). Het gegeven dat het gros van de aangebrachte teliosporen in de bovenste laag achterbleef èn het feit dat in de diepere lagen in de tijd wel een verschuiving in de aantallen teliosporen plaats vond, is een ondersteuning voor onze veronderstelling dat in eerdere experimenten veel van de sporen aan het gras zijn blijven kleven. Een combinatie van (te) lage teliosporendosis en geringe inspoeling zou niet voldoende zijn geweest voor een significante toename in het aantal systemische scheuten.

Na de uitvoering van de boven beschreven experimenten kunnen we de conclusies in vier punten samenvatten:

- 1 Er vindt transport van teliosporen in de bodem plaats.
- 2 Bovengrondse toepassing in grasland is weinig effectief, omdat slechts een klein deel van de sporen inspoelt.
- 3 Het volgen van de knopontwikkeling in het veld heeft ons geleerd dat voor deze situatie de veldbehandeling niet later dan in september plaats moet vinden. De scheuten die in het voorjaar het eerst opkomen zijn dan namelijk als knop in aanleg reeds aanwezig.
- 4 Praktijktoepassing van *P. punctiformis* als mycoherbicide in grasland is nog niet in zicht. De resultaten zijn nog onvoorspelbaar en de productie van teliosporen gebeurt nog lang niet efficiënt genoeg.

## 4. Perspectieven en aanbevelingen

Door de extreme weersomstandigheden van najaar 1993, kan nog niets definitiefs worden gezegd over praktische toepassing van *P. punctiformis* tegen akkerdistel. De vraag blijft in hoeverre de weersomstandigheden in '93 werkelijk extreem waren. Om die vraag te beantwoorden werden de veldexperimenten in het najaar van '94 opnieuw aangelegd.

Ook als de nieuwe veldproeven succesvol zijn, verdient het sterke aanbeveling om biologische bestrijding van akkerdistel met *P. punctiformis* eerst in een akkerbouwsysteem verder uit te werken. Akkerbouwland biedt verscheidene voordelen in vergelijking met grasland.

Voorbeelden hiervan zijn: de waterstand, die in het algemeen beter beheerst kan worden; de knopvorming door distels, die door grondbewerking kunstmatig te manipuleren is; en het gegeven dat teliosporen van de roest gemakkelijker over de wortelzone van de akkerdistel zijn te verdelen.

Naast deze praktische overweging is er nog een reden om het aandachtsveld te verruimen. Er worden steeds meer signalen opgevangen vanuit de, in areaal groeiende, ecologische landbouwsector dat distelhaardvorming op akkerland een toenemend probleem aan het worden is. Later zal de dan in het akkerbouwland opgedane kennis teruggekoppeld kunnen worden naar graslanden.

Een belangrijke vraag blijft of door verhoogde infectiefrequentie voldoende schade aan distelhaarden wordt toegebracht. Deze vraag kan pas worden beantwoord als we het percentage systemisch aangetaste scheuten in het veld kunnen manipuleren. Feit is dat we onder geconditioneerde omstandigheden 'slechts' in 50-60 % van de potten één of meer systemische scheuten vonden. Voor een praktische toepassing zal dit percentage naar verwachting hoger moeten zijn. Om dit te bereiken moeten aggressievere stammen van de roest worden gezocht.

Toedienen van sporen aan de bodem en goede verdeling in de bodem impliceert, dat per oppervlakte-eenheid veel sporen nodig zullen zijn. Voor een economisch rendabele praktijktoepassing zal de produktiemethode van sporen nog sterk verbeterd moeten worden. Mogelijkheden hiertoe zijn wel aanwezig. De koudebehandeling, nodig voor de inductie van de teliosporenvorming, kan vervangen worden door een infectie van de systemisch geïnfecteerde distelscheut met een hyperparasiet. Daarnaast is het niet nodig gebleken om de geïnculeerde wortelstukken te incuberen. Een andere mogelijkheid met perspectief voor toepassing in de praktijk is het inbrengen van de teliosporen in de bodem. Het is gebleken dat de sporen zich, wanneer aangebracht onder de zodelaag, verspreiden door de bodem.



## Referenties

- Amor, R.L., & R.V. Harris, 1975. Seedling establishment and vegetative spread of *Cirsium arvense* (L.) Scop. in Victoria, Australia. *Weed Research* 15, 407-411.
- Bakker, D., 1960. A comparative life-history study of *Cirsium arvense* (L.) Scop. and *Tussilago farfara* L., the most troublesome weeds in the newly reclaimed polders of the former Zuiderzee. In: J.L. Harper (ed.), *The Biology of Weeds*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 205-222.
- Buller, A.H.R., 1950. *Researches on fungi VII*. Toronto University Press, Toronto, Canada, 344-388.
- Cockayne, A.H., 1915. Californian thistle rust. *The Journal of Agriculture* 12, 300-302.
- Ende, G. van den, J. Frantzen & T. Timmers, 1987. Teleutospores as origin of systemic infection of *Cirsium arvense* by *Puccinia punctiformis*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 93, 233-239.
- Forrer, H.R., 1977. Der Einfluß von Stoffwechselprodukten des Mycoparasiten *Aphanocladium album* auf die Teleutosporenbildung von Rostpilzen. *Phytopathologische Zeitschrift* 88, 306-311.
- Frantzen, P.A.M.J., 1994a. Studies on the weed pathosystem *Cirsium arvense* - *Puccinia punctiformis*. Dissertatie Landbouw Universiteit Wageningen, 90.
- Frantzen, P.A.M.J., 1994b. The effect of temperature on the germination of teliospores of *Puccinia punctiformis*. Geaccepteerd voor publikatie in *Phytopathology*.
- Frantzen, P.A.M.J. & P.C. Scheepens, 1993. Biologische bestrijding van akkerdistel met de roestschimmel *Puccinia punctiformis*. CABO - DLO publikatie 184, juli 1993, 31.
- Frantzen, P.A.M.J. & W. van der Zweerde, 1994a. Quantitative resistance of *Cirsium arvense* to root bud infection by *Puccinia punctiformis*. Geaccepteerd voor publikatie in *Biocontrol Science and Technology*.
- Frantzen, P.A.M.J. & W. Van der Zweerde, 1994b. Transport of teliospores of *Puccinia punctiformis* in the soil. Geaccepteerd voor publikatie in *Biocontrol Science and Technology*.
- French, R.C., S.K. Turner, P.E. Sonnett, P. Pfeffer & E. Piotrowski, 1988. Properties of an extract from Canada thistle roots that stimulates germination of dormant teliospores of Canada thistle rust (*Puccinia punctiformis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, 1043-1047.
- French, R.C. & A.R. Lightfield, 1990. Induction of systemic aecial infection in Canada thistle (*Cirsium arvense*) by teliospores of *Puccinia punctiformis*. *Phytopathology* 80, 872-877.
- Gäumann, E. 1959. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz. XII. Die Rostpilze Mitteleuropas. Böhler, Bern, 1071-1072.
- Menzies, B.P., 1953 Studies on the systemic fungus, *Puccinia suaveolens*. *Annals of Botany* 17, 551-568.
- Olive, E.W., 1913 Intermingling of perennial sporophytic and gametophytic generations in *Puccinia podophylli*, *P.obtegens* and *Uromyces glycyrrhizae*. *Annales Mycologici* 11, 295-311.
- Schimming, W.K. & C.G. Messersmith, 1988 Freezing resistance of overwintering buds of four perennial weeds. *Weed Science* 36, 568-573.