
Handelingsperspectieven voor Zwarte Roest

Literatuuronderzoek en kennisinventarisatie praktijk

R. Peters¹, M. Riemens¹

¹ Wageningen University & Research

Dit onderzoek is in opdracht van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), business unit Open Teelten, afdeling Plantgezondheid in het kader van beleidsondersteunend onderzoeksthema Gezonde, robuuste bodem en teeltsystemen (projectnummer 3710481100)

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen

Wageningen, december 2021

Rapport WPR-3710481100

R. Peters, M. Riemens, 2021. *Handelingsperspectieven voor Zwarte roest*, Wageningen Research, Rapport WPR-3710481100. 44 blz.; 4 fig.; 4 tab.; 53 ref.

Trefwoorden: Zwarte roest, *Puccinia graminis* subsp. *graminicola*, graszaadteelt

© 2021 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Open Teelten, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; T 0317 48 07 00; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Rapport WPR-3710481100

Inhoud

Inhoud	3	
Syllabus	4	
Samenvatting		5
Dankwoord	7	
1	Inleiding	8
	1.1 Achtergrond	8
	1.2 Probleemstelling	8
	1.3 Opbouw van het rapport	9
2	Aanknopingspunten voor de beheersing van zwarte roest in de literatuur	10
	2.1 Levenscyclus	10
	2.2 Het infectieproces	12
	2.3 Genetische diversiteit en pathotypen	13
	2.4 Identificatie van resistentiegenen	13
	2.5 Resistente rassen	14
	2.6 Teeltmaatregelen	15
	2.7 Biologische gewasbeschermingsmiddelen en biostimulanten	16
	2.8 Synthetische gewasbeschermingsmiddelen	17
	2.9 Modellen verspreiding urediniosporen	18
3	Kennisinventarisatie praktijk	20
	3.1 Graszaadteelt in Nederland	20
	3.2 Rasgevoeligheid voor zwarte roest	21
	3.3 Mogelijke oorzaken voor toegenomen problematiek	21
	3.4 Aantasting	22
	3.5 Alternatieve middelen en maatregelen	22
	3.6 Overige knelpunten graszaadteelt	23
4	Discussie en conclusie	24
	4.1 Levenscyclus, pathotypen en verspreiding	24
	4.2 Resistenties, rassen en veredeling	24
	4.3 Teeltmaatregelen	25
	4.4 Gewasbeschermingsmiddelen, biocontrol en biostimulanten	26
	4.5 Samenvattend	26
5	Literatuur	28

Syllabus

Bochtige/buigzame hyfen = Onderdeel van het pycnium van macrocyclische roestschimmels die dienst doen als vrouwelijk geslachtsorgaan

F₁-populatie = Tijdens het veredelingsproces gebruikte aanduiding voor de eerste generatie planten die uit een kruising van ouderlijnen is ontstaan

Formae specialis (f.sp.) = Een onderverdeling van een schimmelsoort naar (een groep van) waardplanten waarop een bepaalde stam zich fysiologisch heeft gespecialiseerd. Voor zwarte roest is overigens niet sprake van een f.sp. maar van een subsoort, zoals aangeduid door de afkorting 'subsp.' van het Engels 'subspecies'

Heteroecious = Benaming voor een schimmel die meer dan één waardplant nodig heeft om zijn volledige levenscyclus (dus met inbegrip van seksuele vermeerdering) te voltooien

Internal Transcribed Spacer (ITS) = Benaming voor een stukje niet-coderend DNA tussen de stukken rRNA coderend voor de grote en kleine 'subunits' van een ribosoom

Macrocyclisch = Een roestschimmel wordt macrocyclisch genoemd wanneer deze binnen zijn volledige levenscyclus (dus met inbegrip van seksuele vermeerdering) vijf sporentypen vormt

Quantitative Trait Loci (QTL) = Een chromosomale regio, oftewel een bepaald gedeelte van het genetische materiaal op moleculair niveau wat een of meerdere genen bevat die samen een bepaalde eigenschap van een organisme reguleren

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) = Een methode om genetisch onderscheid te maken tussen organismen. Hierbij wordt met een aantal willekeurig gesynthetiseerde (maar wel werkzame) primers een aantal delen van het DNA vermeerderd, waarna op basis van het voorkomen en de grootte van de ontstane fragmenten onderscheid tussen de organismen waarvan het DNA afkomstig is wordt gemaakt

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) = Een methode om genetisch onderscheid te maken tussen organismen. Hierbij wordt met behulp van bepaalde enzymen het DNA 'in stukjes geknipt' waarna op basis van het voorkomen en de grootte van de ontstane fragmenten onderscheid tussen de organismen waarvan het DNA afkomstig is wordt gemaakt

Ribosomaal DNA (rDNA) = DNA dat codeert voor (de vorming van) een ribosoom, een celonderdeel dat RNA vertaalt naar eiwitten en deze vormt

+/- of a/b-typen = Dit zijn aanduidingen voor zogenaamde parentypen, deze bepalen of twee schimmelisolaten zich samen wel of niet seksueel kunnen vermeerderen (dus met uitwisseling van genetisch materiaal). Als de twee isolaten van hetzelfde parentype zijn kunnen ze zich niet seksueel met elkaar voortplanten

Samenvatting

Het onderzoek in dit rapport is uitgevoerd in het kader van het Uitvoeringsprogramma Gewasbescherming 2030

(<https://www.rijksoverheid.nl/documenten/kamerstukken/2020/09/28/uitvoeringsprogramma-toekomstvisie-gewasbescherming-2030>). Het onderzoek draagt bij aan het Meerjarige Missiegedreven Innovatieprogramma (MMIP) A2 Gezonde robuuste bodem en teeltsystemen gebaseerd op agro-ecologie en zonder schadelijke emissies naar grond- en oppervlaktewater (<https://kia-landbouwwatervoedsel.nl/wp-content/uploads/Schemas-Theory-of-Change.pdf>).

Dit rapport maakt deel uit van de casus Graszaadteelt, onderdeel van de Kennisimpuls BO Groene gewasbescherming en bestuivers (<https://www.wur.nl/nl/project/Groene-Gewasbescherming-1.htm>). Zwarte roest (*Puccinia graminis* f.sp. *graminicola*) vormt een probleem in de graszaadteelt. Dit geldt in het bijzonder voor de teelt van Engels raaigras (*Lolium perenne*), hoewel in warme en droge jaren ook rietzwenkgras, struisgras, Italiaans- en Westerwolds raaigras, festulolium en beemdlangbloem vatbaar en kwetsbaar zijn. In deze studie zijn wetenschappelijke en praktijk kennis opgehaald om potentiële oplossingsrichtingen voor de beheersing van zwarte roest te identificeren. Daarbij is specifiek gericht op aanknopingspunten vanuit de levenscyclus van zwarte roest, het infectieproces, aanwezige genetische diversiteit en pathotypen, resistentiegenen, resistente rassen en teeltmaatregelen in zijn algemeenheid.

De volgende potentiële oplossingsrichtingen voor beheersing van zwarte roest zijn gevonden:

- Het beperken of verminderen van de ontwikkeling van dikwandige teliosporen zou een mogelijk aangrijpingspunt in de levenscyclus kunnen zijn om door teeltmaatregelen zoals gewasrestmanagement (bijvoorbeeld licht branden ter voorkoming van hergroei na de oogst) het inoculum te verminderen.
- Natuurlijke en inkruisbare resistenties zijn aanwezig tegen zwarte roest, en deze zijn aanwezig in een aantal commerciële rassen Engels raaigras in Europa. In geen enkel geval is een absolute resistentie gevonden. Bij Nederlandse veredelaars wordt aan (meer) resistente rassen gewerkt, maar deze komen naar verwachting niet op korte termijn beschikbaar.
- Er lijken verschillende mogelijkheden te zijn om (de impact van) zwarte roest middels teeltmaatregelen te onderdrukken. Door licht te branden kan te snelle hergroei na het oogsten de vermeerdering van zwarte roest verminderen, en door later in te zaaien (begin november i.p.v. half augustus) wordt de groei en verspreiding van zwarte roest ook sterk geremd vanwege de lagere temperaturen. Tot slot kan de hoogte/concentratie van en aantal stikstofgiften/toepassingen van groeiremmers de aantasting door zwarte roest sterk verminderen, maar in de tot dusver onderzochte toepassingen gaat dit, afhankelijk van bodemtype, gepaard met een significant lagere zaadopbrengst. Dit laatste heeft te maken met een hogere stikstofbehoefte op zandgronden, en uit zich het sterkst bij een stikstoftekort in het voorjaar.
- Gewasbeschermingsmiddelen op basis van micro-organismen gelden als laag-risico middelen en kunnen een waardevolle aanvulling zijn in een weerbaar teeltsysteem. Qua (potentiële) micro-organismen voor biocontrol zijn er verschillende opties die op hun werkzaamheid in de Nederlandse context onderzocht kunnen worden. De meeste werking is te verwachten van organismen die van nature ook op het blad voorkomen, en niet van organismen uit de wortelzone die op het blad worden toegepast. Drie organismen komen duidelijk uit de wetenschappelijke literatuur naar voren: *Lecanicillium lecanii* (voormalig *Verticillium lecanii*), *Aphanocladium album* en *Sphaerellopsis filum*. Van deze drie is *L. lecanii* al gecommercialiseerd vanwege zijn entomopathogene werking en wordt ingezet tegen tripslarven en witte vlieg. Echter *L. lecanii* zou bij grootschalig gebruik in open teelten vanwege zijn entomopathogeniciteit waarschijnlijk problemen veroorzaken met de

insectenpopulaties en daarmee ook met bestuiving, biodiversiteit in de breedte en mogelijk zelfs op voedselweb-niveau. De andere twee mycoparasieten (*A. album* en *S. filum*) zijn zwakker in werking en nog niet ontwikkeld tot commercieel product. Alle drie hebben een hoge luchtvochtigheid nodig om te groeien ($RV > 80$) en zouden dus vooral moeten worden ingezet voorafgaand aan een nacht met hoge infectiekansen.

- De werking van biostimulanten is vergelijkbaar tegen zwarte roest als tegen andere schimmelziekten. De biostimulanten oefenen wel hun abiotische stress-regulerende werking uit, maar dit heeft slechts zeer weinig invloed op infectieverloop en schade. Overigens moet hier goed gelet worden op de nieuwe richtlijn voor biostimulanten van de EU die medio volgend jaar ingaat.
- Beslisregels zouden telers kunnen helpen om de juiste maatregel te kiezen om zwarte roest aantasting te voorkomen of om zwarte roest gericht te beheersen. Modellen voor de momenten van uitbraak, het verloop van de epidemie en de relatie tussen aantasting en schade kunnen bij voldoende beschikbaarheid en samenhang van data worden ontwikkeld tot beslisregels. Verschillende modellen zijn in de Verenigde Staten ontwikkeld die infectieperiode, infectiekans, verspreiding van urediniosporen, potentieel verloop van een zwarte roest-epidemie en potentiële opbrengstderving voorspellen. Deze modellen zijn nog niet benut voor de ontwikkeling van een beslisregel en zijn ook nog niet getest onder Nederlandse omstandigheden. Desalniettemin zouden deze modellen bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van beslisregels voor de beheersing van zwarte roest bij gebruik van gewasbeschermingsmiddelen.
- Zwarte roest kent net als vele andere roesten een pathotype-specifieke interactie, wat wil zeggen dat er variatie kan bestaan in hoe sporen afkomstig van een specifiek uredinium reageren op bepaalde maatregelen genomen in de teelt van een bepaald ras. Er zijn vanuit de praktijk nog geen gevallen van pathotype-specifieke interacties (bijvoorbeeld afwijkend aantastingsbeeld) bekend. Wel belangrijk om dit gegeven mee te nemen in eventuele vervolgstappen of onderzoek.

Conclusie:

Een betere beheersing van zwarte roest lijkt een kwestie van veel kleine ingrepen die samen een voldoende onderdrukkend effect moeten hebben. Vroeger inzaaien, een gesplitste stikstofgift, gebruik van de juiste groeiremmers en eventueel gebruik van abiotische stress-regulerende biostimulanten zijn het snelst haalbaar.

Resistentiegenen en QTL's zijn goed gedefinieerd maar op korte termijn zijn er nog geen Nederlandse rassen met verhoogde resistentie te verwachten, deels omdat zwarte roest geen probleem vormt voor de eindgebruiker. Het genetisch potentieel is er wel.

Dankwoord

De auteurs willen de leden van de vakwerkgroep 'Graszaden en Graszoden' graag bedanken voor hun bereidheid mee te werken en te denken, alsook voor het invullen van de vragenlijst om de zwarte roest-problematiek zoals deze door de praktijk ervaren wordt in beeld te brengen.

Dank ook aan Lise Nistrup Jørgensen en Mogens Støvring Hovmøller van de Aarhus Universiteit in Denemarken voor de gegeven informatie over de situatie rondom zwarte roest aldaar.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Het onderzoek in dit rapport is uitgevoerd in het kader van het Uitvoeringsprogramma Gewasbescherming 2030 (<https://www.rijksoverheid.nl/documenten/kamerstukken/2020/09/28/uitvoeringsprogramma-toekomstvisie-gewasbescherming-2030>). Het onderzoek draagt bij aan het Meerjarige Missiegedreven Innovatieprogramma (MMIP) A2 Gezonde robuuste bodem en teeltsystemen gebaseerd op agro-ecologie en zonder schadelijke emissies naar grond- en oppervlaktewater (<https://kia-landbouwwatervoedsel.nl/wp-content/uploads/Schemas-Theory-of-Change.pdf>).

Dit rapport maakt deel uit van de casus Graszaadteelt, onderdeel van de Kennisimpuls BO Groene gewasbescherming en bestuivers (<https://www.wur.nl/nl/project/Groene-Gewasbescherming-1.htm>). De Kennisimpuls Groene gewasbescherming is gericht op het versnellen van de verduurzaming van gewasbescherming door de ontwikkeling van toepasbare weerbare teeltsystemen die alle mogelijkheden voor verduurzaming benutten, van innovatieve technieken tot gebruik van de natuur. De teeltsystemen moeten de marktpositie van Nederlandse telers verder kunnen versterken. In de kennisimpuls Groene gewasbescherming en bestuivers is een breed toepasbare werkwijze ontwikkeld om tot de ontwikkeling van nieuwe teeltsystemen te komen. De werkwijze bestaat uit vier pijlers: omgevingsfactoren die de levenscyclus van een ziekte blokkeren, gewasrotatie, robuuste rassen, optimale groeiomstandigheden voor het betreffende ras.

1.2 Probleemstelling

Voor graszaadteelt is een geheel nieuw systeem niet noodzakelijk. Het voorkomen en bestrijden van zwarte roest (*Puccinia graminis* f.sp. *graminicola*), vormt hier een groot knelpunt. Dit geldt in het bijzonder voor de teelt van Engels raaigras (*Lolium perenne*), hoewel in warme en droge jaren ook rietzwenkgras, struisgras, Italiaans- en Westerwolds raaigras, festulolium en beemdlangbloem vatbaar en kwetsbaar zijn. Zwarte roest komt in recentere jaren vaker voor en veroorzaakt in de teelt van Engels raaigras ernstige kwalitatieve en kwantitatieve schade die volgens de werkgroep 'Graszaden en Graszoden' onder voor de roest gunstige omstandigheden 50-70% verlies van opbrengst kan veroorzaken. Hoe groot de schade is in andere grassoorten is niet precies bekend, maar het is beduidend minder.

Het grote verschil in schade tussen zwarte roest en andere roesten (oranje strepenroest, kroonroest), zit hem in het feit dat zwarte roest vaker de stengels en halmen aantast waardoor de sapstroom wordt geblokkeerd en vulling van de zaden stagneert of zelfs de hele halm afsterft. De schimmel is dan ook vooral schadelijk wanneer deze voorkomt in een eerstejaars gewas (geen ouderdomsresistentie), tijdens warme en droge jaren (snellere groei van de schimmel, meer droogtestress voor de plant) en tijdens de periode dat de zaden gevuld worden.

Daarnaast bestaat het grootste deel van de Nederlandse graszaadteelt uit Engels raaigras en deze wordt tot eind augustus geoogst, waardoor de schimmel in veel jaren verzekerd is van een warme periode. Het is deze combinatie van eigenschappen en factoren die zwarte roest tot zo'n groot knelpunt maakt.

In deze studie is gekeken naar mogelijke oplossingsrichtingen voor de beheersing van zwarte roest. Daartoe is een literatuurstudie uitgevoerd waarin is gekeken naar preventie en potentiële oplossingen (hoofdstuk 2) en zijn experts bevroegd om praktijkkennis te verzamelen (hoofdstuk 3).

1.3 Opbouw van het rapport

In deze studie is gezocht naar oplossingsrichtingen voor de beheersing van zwarte roest die aansluiten bij de pijlers die zijn ontwikkeld in de kennisimpuls groene gewasbescherming (zie ook paragraaf 1.1). Meer specifiek is gericht op aanknopingspunten vanuit de levenscyclus van zwarte roest, het infectieproces, aanwezige genetische diversiteit en pathotypen, resistentiegenen, resistente rassen en teeltmaatregelen in zijn algemeenheid. Hoofdstuk 2, paragraaf 2.1 t/m 2.6 beschrijft de gevonden kennis uit de literatuurstudie op deze aspecten. Er is gezocht naar mogelijke handvaten die deze aspecten kunnen bieden om de rust en of kiemfase te doorbreken, en de weerbaarheid van plant en/of teeltsysteem te verhogen tegen zwarte roest.

Daarnaast wordt in Groene Gewasbescherming en bestuivers gewerkt met een back up systeem gebaseerd op monitoring en -indien volgens een gevalideerd beslissingssysteem aangegeven - een aanvullende curatieve ingreep op basis van de best passende kennis en (innovatieve) technologie. Chemische bestrijding (op basis van middelen met laag risicoprofiel) is slechts een optie als daarvoor geen passend alternatief is. In deze studie is in paragrafen 2.7 t/m 2.9 onderzocht welke mogelijke biologische middelen, biostimulanten en chemische middelen bieden, en welke modellen geschikt zijn voor ondersteuning van zo'n back up systeem.

In hoofdstuk 3 wordt beschreven welke rassen specifiek in de Nederlandse praktijk gebruikt worden, en welke pathotypen zwarte roest tot de grootste knelpunten i.r.t. gewasbescherming leiden (indicatoren: veel gewasbeschermingsmiddelen-gebruik, het aantal vrijstellingen en de mate van schade in gewas).

In hoofdstuk 4 worden ten slotte conclusies ten aanzien van oplossingsrichtingen en eventuele bijbehorende witte vlekken gericht op de beheersing van zwarte roest in graszaadteelt beschreven.

2 Aanknopingspunten voor de beheersing van zwarte roest in de literatuur

Dit hoofdstuk beschrijft de resultaten uit de literatuurstudie gericht op aanknopingspunten voor de beheersing van zwarte roest (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*) die aansluiten bij de pijlers uit de kennisimpuls groene gewasbescherming en bestuivers. Paragraaf 2.1 t/m paragraaf 2.6 beschrijven de gevonden informatie uit de literatuur over de levenscyclus van zwarte roest, het infectieproces, genetische diversiteit en pathotypen, resistentiegenen, resistente rassen en teeltmaatregelen in zijn algemeenheid. Er is gezocht naar mogelijke handvaten die deze aspecten kunnen bieden om de rust en of kiemfase te doorbreken, en de weerbaarheid van plant en/of teeltsysteem te verhogen.

Daarnaast is, de systematiek in Groene Gewasbescherming en bestuivers volgend, onderzocht welke informatie beschikbaar is voor de onderdelen van een back up systeem. Paragrafen 2.7 t/m 2.9 beschrijven de gevonden informatie over de inzetbaarheid van biologische middelen, biostimulanten en chemische middelen, en beschikbare modellen voor gebruik in zo'n back up systeem.

2.1 Levenscyclus

Er zijn verschillende aantastingen van grassen veroorzaakt door *Puccinia* spp. waarnaar simpelweg wordt verwezen met de term 'roest'. Voor de namen van de schimmels die deze aantastingen veroorzaken zijn vaak ook verschillende synoniemen die in de wetenschappelijke literatuur nog wel eens door elkaar worden gebruikt. Hier hanteren we de afbakening en soortnamen zoals die zijn voorgesteld door (G. Boerema & Verhoeven, 1977) en aangevuld en gecorrigeerd in (G. H. Boerema, Pieters, & Hamers, 1992). De *Puccinia* spp. die pathogeen zijn voor grassen zijn volgens deze naamgeving:

'Gewone' roest: *Puccinia brachypodii* (var. *poae-nemoralis*)

Oranje-strepenroest: *Puccinia poarum*

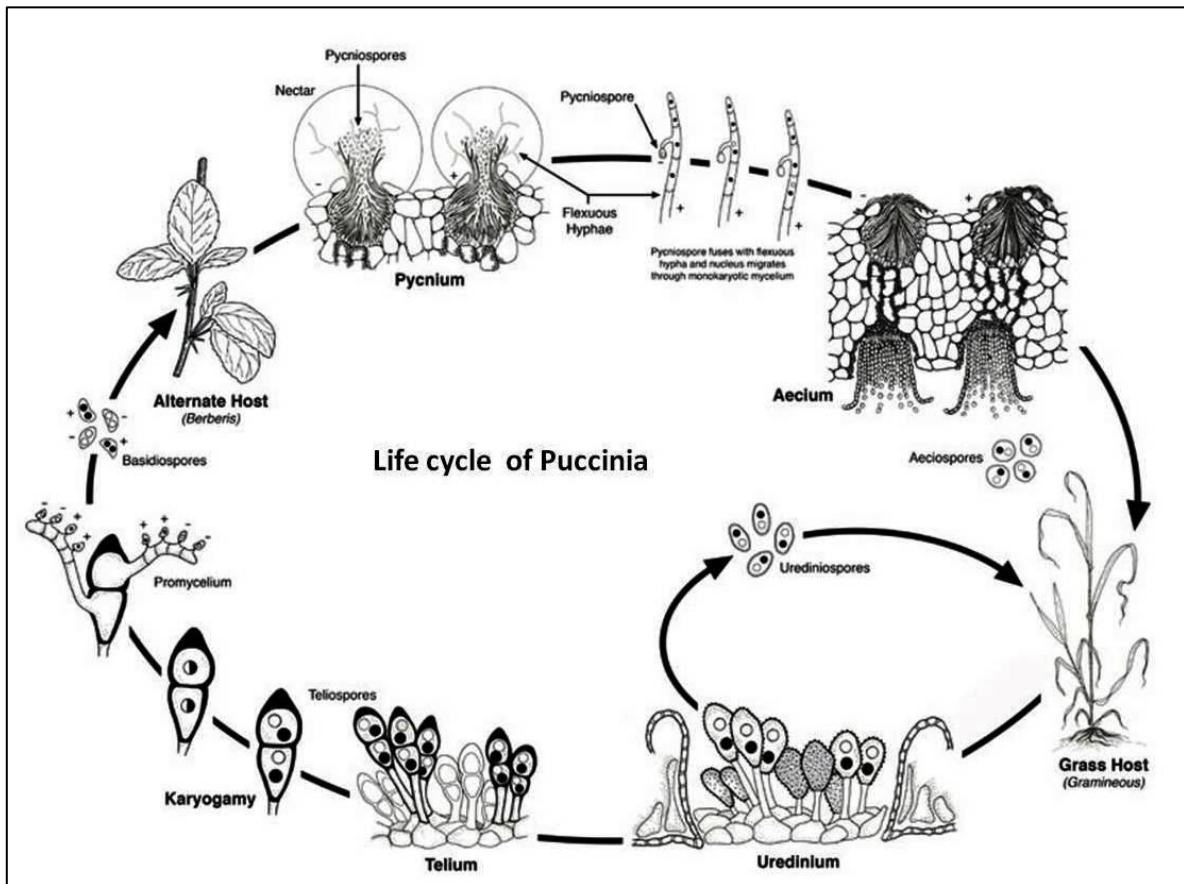
Kroonroest: *Puccinia coronata* (var. *coronata*)

Zwarte roest van grassen: *Puccinia graminis* subsp. *graminicola*

Met name in oudere literatuur wordt zwarte roest nog aan een aantal *formae speciales* toegekend die in de huidige taxonomie echter allemaal als synoniemen zijn bestempeld. Ook zou nog verwarring op kunnen treden met zwarte roest van granen: *Puccinia graminis* subsp. *graminis*. Dit rapport heeft alleen betrekking op zwarte roest van grassen (hierboven dikgedrukt aangegeven), welke hierna zal worden aangeduid met de afkorting *Pgg* in een taxonomische context en in overige gevallen simpelweg als 'zwarte roest'.

Het kennen van de levenscyclus van een pathogeen is de sleutel naar een effectieve bestrijding. Aan de hand van de levenscyclus kan namelijk bepaald worden wanneer een pathogeen het meest kwetsbaar is, of in potentie het gemakkelijkste te verwijderen. Kennis over de levenscyclus van zwarte roest zoals type en tijdstip van sporenvorming, waardplantbehoefte, ruststadia en verspreiding van sporen zijn hier beknopt beschreven aan de hand van Afb. 1. Voor de gedetailleerde beschrijving van de levenscyclus, zie Bijlage 1.

Zwarte roest van granen en grassen (*P. graminis*) is een macrocyclische, heterocieuze schimmel. Dit wil zeggen dat deze roest alle vijf bekende vormen van sporen produceert tijdens zijn levenscyclus (macrocyclisch). Verder betekent het dat deze roest een alternatieve waardplant (dus anders dan granen of grassen) nodig heeft om zijn levenscyclus volledig (d.w.z. inclusief het seksuele stadium) te doorlopen. Voor *P. graminis* zijn de alternatieve waardplanten planten uit de geslachten *Berberis* (bijvoorbeeld de Japanse zuurbes) en *Mahonia*. In Nederland zijn de gewone zuurbes (*Berberis vulgaris*) en mahonie (*Mahonia aquifolium*) de meest voorkomende alternatieve waardplanten voor zwarte roest.



Afb. 1: Schematische weergave van de levenscyclus van *Puccinia graminis* (Leonard et al., 2005)

In gematigde klimaten zoals Nederland worden dikwandige teliosporen (Afb.1, onderin links) gevormd in telia (enkelvoud: telium) die zich vormen op het graan of gras tegen het einde van hun groeiseizoen. In het voorjaar kiemen de teliosporen en vormen ze basidiosporen. Na het wegschieten van de sporen laten deze zich meevoeren op luchtstromen naar een alternatieve waardplant (zoals *Berberis* of *Mahonia* spp.). Succesvolle infectie resulteert in het ontstaan van kolfvormige pycnidiën (Afb. 1, bovenin links) welke zich meestal op de bovenzijde van blad bevinden. De pycniosporen worden op de bodem van de structuur gevormd, terwijl de buigzame hyfen uit de structuur steken. De pycniosporen worden uitgescheiden in een nectar-achtige substantie die aantrekkelijk is voor insecten, en hen zodoende, samen met spattend water, doet bijdragen aan de verspreiding.

Wanneer een pycniospoor van het ene paringstype contact maakt met de buigzame hyfen van het andere paringstype fuseren de cellen en als reactie op de gedeeltelijke bevruchting worden, ditmaal op de onderzijde van het blad, komvormige aecia (enkelvoud aecium) (Afb. 1, bovenin rechts).

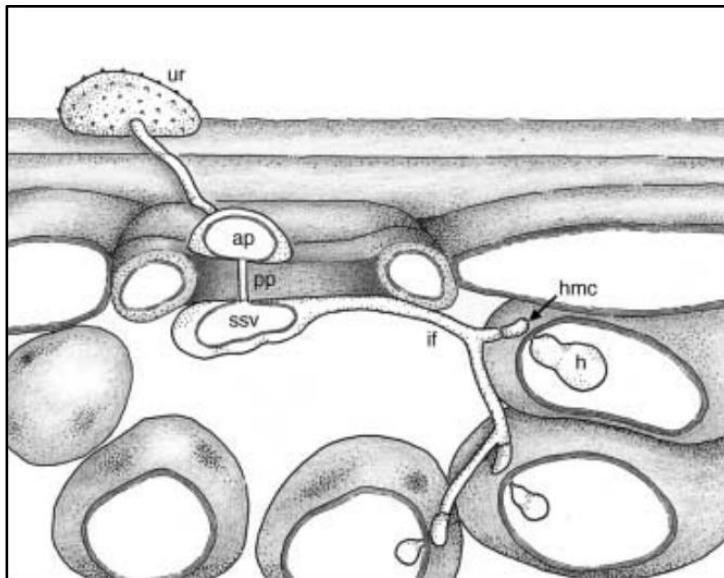
In deze structuren worden kettingen van aeciosporen gevormd, welke worden verspreid door wind (Schmidt, Carey, & Hollis, 1982), opspattend water (Peterson, 1973) en bijen, hoewel deze laatste verspreidingsvorm weinig voorkomt (Shaw, 1999). Bij succesvolle infectie van de grasachtige waardplant worden uredinia gevormd (enkelvoud: uredinium) (Afb. 1, onderin rechts), waarin urediniosporen groeien. Deze worden verspreid via wind en water en zorgen voor uitbreiding van de schimmel binnen het seizoen.

Per jaar worden afhankelijk van temperatuur en beschikbaarheid van waardplanten meerdere cycli gevormd (Teng & Close, 1978; Tomerlin, Eversmeyer, Browder, & Kramer, 1983).

Gezien de manier van verspreiding (wind, water, insecten) en de potentieel zeer grote afstanden die sporen van roestschimmels kunnen overbruggen (Fischer, Stolze-Rybczynski, Cui, & Money, 2010) zijn hier weinig mogelijkheden tot voorkomen of bestrijden. Het seksuele stadium van de levenscyclus (en daarmee het ontstaan van nieuwe pathotypen tegengaan door verwijdering van de alternatieve waardplant werd in het verleden wel als strategie gebruikt (Saunders Diane, Pretorius, & Hovmøller, 2019). Echter is dit vanuit het oogpunt van biodiversiteit en flora- en faunabescherming onwenselijk en praktisch lastig uitvoerbaar. Daarnaast kunnen nieuwe rassen van zeer grote afstanden via de wind verspreid worden (Brown & Hovmøller, 2002).

Het voorkomen of verminderen van de ontwikkeling van dikwandige teliosporen zou een mogelijke optie kunnen zijn voor bestrijding. Tegengaan van de ontwikkeling van urediniosporen en daarmee de uitbreiding in het gewas door fungicidenbespuitingen is momenteel de enige gebruikte methode.

2.2 Het infectieproces



Afb. 4: Het infectieproces van een urediniospore van zwarte roest in een grasachtige waardplant. Voor de betekenis van de afkortingen, zie onderstaande tekst (Leonard et al., 2005)

Het onderzoek aan het infectieproces van zwarte roest focust zich vrijwel uitsluitend op het infectieproces van urediniosporen in de grasachtige waardplanten, omdat deze planten economisch het meest belangrijk zijn. Infectie vindt vrijwel altijd s' nachts plaats, wanneer de urediniosporen door dauwvorming in een waterfilm op de plant liggen. De urediniosporen (*ur*) kiemen en vormen een kiembuis, waarbij een oriëntatie loodrecht op de lengte van de plantencellen ideaal is. Deze oriëntatie vergroot namelijk de kans dat de kiembuis een huidmondje (stoma) tegenkomt waardoor de penetratie kan plaatsvinden. Op dit punt verlengt de kiembuis niet langer en vormt een appressorium (*ap*). Na het vormen van een appressorium stopt het infectieproces tot aan zonsopkomst. (Yirgou & Caldwell, 1963) bewezen dat de penetratie van stomata door een penetratiepijp van zwarte roest verhinderd wordt door hoge CO₂-concentraties, ongeacht de hoeveelheid licht. Licht is echter nodig voor het fotosynthesep proces van de waardplant, wat dan vervolgens de CO₂-concentratie verlaagt waardoor de kans op een succesvolle infectie wordt vergroot.

Wanneer de CO₂-concentratie voldoende laag is wordt een penetratiepijp (*pp*) gevormd die tussen de wachercellen van de stoma doorgroeit en een substomataal infectieblaasje (*ssv*) vormt. Vanuit het infectieblaasje worden infectieuze hyfen (*if*) gevormd die bij contact met een plantencel een haustoriale moedercel (*hmc*) vormen.

Deze haustoriale moedercel vormt een penetratiepen die door middel van zowel druk als enzymen (Chong & Harder, 1982) door de celwand van de plant groeit, maar het celmembraan intact laten. Wanneer de celwand is doorbroken groeit een gespecialiseerde hyfe de cel binnen en ontwikkelt zich daar tot een haustorium (*h*) (parasitaire voedingsstructuur) in de periplasmatische ruimte (de ruimte tussen celwand en celmembraan). Dit proces van haustoriumvorming kan zich tot driemaal herhalen met het reservevoedsel dat in de urediniosporen aanwezig is. Hierna is de verdere voorziening van voedingsstoffen afhankelijk van een correcte werking van de reeds gevormde haustoria.

Uit de wetenschappelijke literatuur komt niet duidelijk naar voren of het moment van infectie een goed moment is om de schimmel te bestrijden. Mogelijk kan door middel van de toepassing van antagonisten of mycoparasieten de kiembuis dermate verstoord worden in zijn ontwikkeling dat deze het infectieproces niet kan voltooien.

2.3 Genetische diversiteit en pathotypen

Zowel het pathogeen in kwestie (*Pgg*) als de waardplant waarop hij economische schade veroorzaakt (Engels raaigras) zijn genetisch zeer divers (Abbasi, Goodwin, & Scholler, 2005; WF Pfender, Saha, Johnson, & Slabaugh, 2011). Bij zwarte roest wordt deze genetische diversiteit veroorzaakt doordat seksuele vermeerdering alleen tussen (+)- en (-)-typen (of *a* en *b*-typen voor roesten specifiek) kan plaatsvinden en niet daarbinnen. Deze 'typen' correleren met genen die verschillend van allelen moeten zijn, anders ontstaat er of geen verbinding tussen de cellen of wordt het genetisch materiaal niet uitgewisseld. In Engels raaigras is zelf-incompatibiliteit de oorzaak. Door deze hoge mate van heterozygositeit binnen populaties van pathogeen en waardplant kan een variabel en inconsequent ziektebeeld ontstaan. We spreken in dit geval van een pathotype-specifieke aantasting. In onderzoek van (W. F. Pfender, 2009) worden urediniosporen afkomstig van een enkel uredinium gebruikt om genetisch diverse, vegetatief (dus klonaal) vermeerderde Engels raaigrasplanten te inoculeren. Het zeer diverse patroon van aantasting dat ontstaat noteert hij als bewijs dat pathotype specificiteit inderdaad bestaat in de zwarte roest – waardplant interacties. Voor een uitgebreidere beschrijving van de taxonomie van zwarte roest en het onderzoek naar pathotypen, zie Bijlage 2.

Voor het toetsen van maatregelen betekent het optreden van pathotypen dat, zelfs als het inoculum van dezelfde populatie zwarte roest afkomstig is en de toetsplanten allemaal van hetzelfde ras zijn, er een ongelijkmatig ziektebeeld kan ontstaan. Hier zal dan in de waarnemingen op enige wijze voor moeten worden gecorrigeerd. In hoeverre dit soort pathotype-specifieke interacties een rol spelen bij de in Nederland geteelde rassen is niet beschreven in de wetenschappelijke literatuur.

2.4 Identificatie van resistentiegenen

Het meeste onderzoek aan resistentiegenen en verschillen in vatbaarheid tussen rassen is uitgevoerd voor zwarte roest van granen, in het bijzonder zwarte roest van tarwe (*Puccinia graminis* subsp. *graminis* f. sp. *tritici*) vanwege het grotere economische belang. Afgaande op de onderzoeken van (Johnson, 1949; Zambino & Szabo, 1993) en (W. F. Pfender, 2009) is het allerminst zeker dat het werk verricht aan de zwarte roest van tarwe één op één vertaald kan worden naar zwarte roest van grassen, met de focus op Engels raaigras waar de problemen het grootst zijn. Hieronder is kort weergegeven welke resistentiegenen er al geïdentificeerd zijn en wat voor resistentie het betreft. Voor een uitgebreide beschrijving van het onderzoek naar resistentiegenen, zie Bijlage 3. Voor de identificatie van resistentiegenen zijn verschillende, genetisch goed in kaart gebrachte populaties van Engels raaigras gebruikt die technisch gezien representatief zouden moeten zijn voor Engels raaigrasrassen in de breedte. Dit betekent dat de resultaten niet exact zijn toegespitst op de Nederlandse rassen.

Vroeg onderzoek naar overerving van weerbaarheid tegen zwarte roest werd uitgevoerd door (Rose-Fricker, Meyer, & Kronstad, 1986). Uit hun kruisingsexperimenten leidden zij af dat de vatbaarheid deels monogenetisch (via een enkel gen) en deels kwantitatief/additief (bijvoorbeeld via Quantitative Trait Loci, QTL's) overerfde. Bijkomend ontdekten zij dat vroege selectie op vatbaarheid voor zwarte roest lastig zou zijn, omdat sterk vatbare zaailingen met regelmaat licht vatbare volwassen planten opleverde en omgekeerd, een effect dat zij toeschreven aan de sterkte van de afweerreactie naarmate de inoculumdruk hoger werd.

Hieronder een kort overzicht van onderzoek waarin resistentiegenen of QTL's zijn geïdentificeerd of dat een belangrijke bijdrage heeft geleverd op dit onderwerp, in chronologische volgorde:

- De eerste QTL die kwantitatieve weerstand gaf tegen zwarte roest (*qSR-GC-4*), Linkage Group (LG) 4 werd geïdentificeerd door (Jo et al., 2008). De lengte van de QTL betrof 19 centiMorgan (cM), oftewel 1,9 miljoen baseparen.
- In 2010 publiceerden (Studer et al., 2010) de eerste raaigras (*Lolium* spp.) brede 'Linkage map' (een kaart waarop de locaties van genen relatief t.o.v. elkaar liggen) op basis van acht door genetisch goed in kaart gebrachte populaties van Italiaans en Engels raaigras. Zij plaatsten daarna op deze kaart 284 Short Sequence Repeat (SSR) merkers.
- In hetzelfde jaar ontdekten (Beckmann et al., 2010) de eerste monogenetische resistentie in een populatie van Engels raaigras. Het gen *LpPg1* (LG 4) werd ontdekt in planten die als meest resistente uit veldproeven van 3 locaties in Duitsland kwamen (Freising, Zürich en Steinach).
- (WF Pfender et al., 2011) bouwden ook op zoek naar QTL's, voort op het onderzoek van (Jo et al., 2008) en identificeerden drie nieuwe QTL's die gedeeltelijke weerstand gaven tegen zwarte roest, *qLpPg2* (LG 1), *qLpPg3* (LG 6) en *qLpPg1* (LG 7).
- (Bojahr et al., 2016) identificeerden een Exclusive Transcript in Resistant bulk (ETR) merker (*LpETR_18*, homoloog van het RPP8-gen) co-segregeerde met het resistentiegen *LpPg1* dat destijds geïdentificeerd was door (Beckmann et al., 2010), en kan dus met hoge zekerheid gebruikt worden om het te herkennen.

2.5 Resistente rassen

De Nederlandse graszaadteelt bestaat voor het grootste deel uit teelt van Engels raaigras. Zowel uit de wetenschappelijke literatuur (Schubiger et al., 2010) als uit de inventarisatie van de werkgroep 'Graszaden en Graszoden' blijkt dat het probleem van zwarte roest verreweg het grootste is in Engels raaigras, hoewel in warme en droge jaren ook rietzwenkgras, struisgras, Italiaans- en Westerwolds raaigras, festulolium en beemdlangbloem vatbaar en kwetsbaar zijn.

Uit het werk van (Jo et al., 2008), (Beckmann et al., 2010), (WF Pfender et al., 2011) en (Bojahr et al., 2016) is af te leiden dat de Engels raaigrasrassen 'Manhattan', 'Kingston', 'Weigra' en 'Fennema' in ieder geval in enige mate resistent waren, waarbij in ieder geval in 'Weigra' en 'Fennema' ook monogenetische resistentie voorkomt (afkomstig van het *LpPg1*-gen).

Een inventarisatie van (Schubiger et al., 2010) naar de gevoeligheid van Europese raaigrasrassen voor kroon- (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*) en zwarte (*Pgg*) roest levert nog enkele (hoog)resistente rassen van zowel Italiaans als Engels raaigras op. Ook werd de gevoeligheid van drie hybride rassen (*Lolium boucheanum*) onderzocht. In de veldproeven die in 2001, 2004 en 2007 werden uitgevoerd werd helaas te weinig zwarte roest aangetroffen in de Italiaanse en hybride raaigrasrassen om er een goede uitspraak over te kunnen doen. In de Engelse raaigrasrassen kwam zwarte roest wel regelmatig voor. Volledig resistente rassen werden niet gevonden, maar wel een 12-tal rassen (Tabel 2) met een disease index (DI) score <3 uit 9 (slechts sporadische aantasting, <5%).

Desgevraagd lieten twee senior-onderzoekers (Lise Nistrup Jørgensen en Mogens Støvring Hovmøller) van de Aarhus Universiteit in Denemarken, waar vanwege het grote aandeel graszaadteelt veel onderzoek wordt gedaan, weten dat er niet speciaal naar zwarte roest wordt gekeken in hun rassenonderzoeken. De reden hiervoor is dat zwarte roest in Denemarken zelden voorkomt, en als het (laat in de zomer) toch voorkomt doet het weinig economische schade omdat de halmen al afgerijpt zijn.

Tabel 2: Meest resistente Engels raaigras (*L. perenne*) rassen met hun ploëdieniveau, veredelaar/kweker en hun gemiddelde score van aantasting (schaal 1= resistent tot 9= vatbaar) (Schubiger, 2010)

Cultivar	Ploëdieniveau	Veredelaar	Gem. DI score
Gwendal	4n	RAGT SA	2.2
Pastoral	4n	RAGT SA	2.3
Bocage	4n	Carneau	2.4
Elgon	4n	Advanta/DLF	2.7
Aubisque	4n	Advanta/DLF	2.7
Orval	2n	GIE REGA	2.8
Roy	4n	ILVO	2.8
Kentaur	4n	Zivotice/DLF	2.9
Lacerta	4n	ART/DSP	2.9
Tivoli	4n	DLF	2.9
Terry	4n	Svalöf Weibull	2.9
Carrera	2n	Carneau	2.9

(Macháč & Cagaš, 2014) voerden een soortgelijk onderzoek uit maar met kleine plots in Tsjechië waarbij alleen werd gekeken naar de vatbaarheid van Engelse raaigrasrassen. De proef werd zowel in het veld als in de kas uitgevoerd. De DI liep van 1= >75% bezet met uredinia tot 9= geen uredinia. In de veldproeven die in 2011 en 2012 werden uitgevoerd trad onvoldoende zwarte roest op om een goede uitspraak te doen over de vatbaarheid van de verschillende rassen. In de kasproef werd de vatbaarheid gescoord via het % aangetaste planten (uit 300) en gaven de rassen 'Score', 'Socomo' en 'Advent' het beste resultaat met respectievelijk >1, 4 en 28% van de planten aangetast. Deze rassen lieten matige resistentie zien tegen kroonroest (*P. coronata* f. sp. *loli*), wat uitgelegd zou kunnen worden als een bevestiging van een van de conclusies uit het onderzoek van (Jo et al., 2008) dat er geen correlatie is tussen de resistentie voor deze twee soorten roest.

Uit bovenstaande blijkt dat er natuurlijke en inkruisbare resistenties bestaan tegen zwarte roest en dat deze ook al aanwezig zijn in een aantal commerciële rassen Engels raaigras in Europa. Bij Nederlandse veredelaars wordt aan (meer) resistente rassen gewerkt maar er komen op de korte termijn geen resistente commerciële rassen beschikbaar. Overigens is in geen enkel geval een absolute resistentie gevonden, infectie komt nog wel voor maar het aantal, de afmetingen en de productiviteit (hoeveelheid gevormde urediniosporen) van de gevormde uredinia zijn sterk beperkt bij aanwezigheid van bepaalde QTL's.

2.6 Teeltmaatregelen

Er is slechts beperkt aandacht besteed aan het beheersen van zwarte roest via teeltmaatregelen. Teeltmaatregelen waar melding van gedaan wordt in de literatuur zijn de effecten van zaaitijdstippen, maaibeheer en bemesting (stikstofgift). Grijze literatuur geeft melding van de inzet van fungiciden, toepassing van ultraviolet licht, branden, maar zwarte roest was nooit het doelorganisme. Het onderzoek van het 'Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.' (PAGV) dat is uitgevoerd aan graszaadteelt tussen 1980 en 2000 richt zich vrijwel volledig op de optimalisatie van de teelt qua opbrengst, maar niet op beheersing van ziekten.

In twee publicaties waarin wel specifiek naar roestziekten in Engels raaigras en veldbeemd (Horeman, 1989; Postma, 1985) is alleen gekeken naar het bestrijden van zwarte roest middels fungicidebespuitingen op verschillende momenten tijdens de teelt.

Ook in de teelthandleidingen graszaadteelt uit deze periode: (G.E.L. Borm, Wander, & Zwanepol, 1995; Vreeke et al., 1988) en ook nog daarna (G. E. L. Borm, 2005) wordt het voorkomen van zwarte roest gezien als een uitzondering, en wordt in 2005 slechts vermeld dat er meer gegevens nodig zijn over deze roest. Er is later nog wel een literatuurstudie uitgevoerd naar de bestrijding van ziekten in de akkerbouw door middel van ultraviolet licht (UV-licht) (Lamers & van Rozen, 2009). Hieruit bleek dat gepigmenteerde sporen doorgaans minder gevoelig zijn, maar dat dit afhankelijk is van het soort pigment. Er werd geen literatuur gevonden betreffende het effect van UV-licht op roesten.

(Hardison, 1980) schrijft over 30 jaar ervaring met branden van meerjarige percelen in de graszaadteelt waarbij ook gedeeltelijke controle van zwarte roest optrad. In een uitgebreider artikel (Hardison, 1976) beschrijft hij dat licht branden van graspercelen in de herfst te vroege hergroei voorkomt, waarmee destijds een ziekte als moederkoren (*Claviceps purpurea*), maar dus ook zwarte roest werd bestreden.

(WF Pfender, 2004) onderzocht ook of er verschillen waren in aantasting van zwarte roest tussen zaaitijdstippen. Nieuw aangelegde plotjes van Engels raaigras (*Lolium perenne*) ingezaaid op 3 november hadden maar 3% van de zwarte roest aantasting van de nieuw aangelegde plotjes ingezaaid op 16 september (beide beoordeeld op 6 juni van het volgende teeltseizoen). Als de planten bleven staan verdween dit effect van later inplanten voor het tweede teeltjaar, waarschijnlijk door weerbaarheid afkomstig van de (fysiologische) leeftijd van de planten.

(Koeritz, Watkins, & Ehlke, 2013) onderzochten de invloed van de hoogte en frequentie van stikstofgiften (zie tabel 3) en verschillende groeiregulatoren in enkele of herhaalde applicatie op zaadopbrengst en voorkomen en ernst van aantasting door ziekten. Zij zagen de sterkste, significante daling van roestaantasting bij een stikstofgift van 56 kg/ha in het voorjaar in combinatie met driemaal een gift van 33 kg/ha. Deze behandeling leverde, afhankelijk van het bodemtype, wel of niet significant minder zaad op dan de andere behandelingen. Verder viel op dat het tweemaal (2 x 134,5 gram actieve stof) toepassen van de groeiregulator Prohexadione-Ca aantasting van zwarte roest significant verhoogde.

Tabel 3: Verschillende hoeveelheid en verdeling van stikstofgiften (Koeritz, 2013)

Aantal giften	Hoeveelheid N kg/ha (laag)	Hoeveelheid N Kg/ha (hoog)	Datum giften	Graaddagen giften
1	56	100	14 mei	247
2	28	56	14 mei/14 juni	247/650
3	18.7	33.3	14 mei/14 juni/1 juli	247/650/944

Er lijken verschillende mogelijkheden te zijn om (de impact van) zwarte roest middels teeltmaatregelen te onderdrukken. Door licht te branden kan te snelle hergroei na het oogsten de vermeerdering van zwarte roest verminderen, en door later in te zaaien (begin november i.p.v. half augustus) wordt de groei en verspreiding van zwarte roest ook sterk geremd vanwege de lagere temperaturen. Tot slot kan de hoogte/concentratie van en aantal stikstofgiften/toepassingen van groeiremmers de aantasting door zwarte roest sterk verminderen, maar in de tot dusver onderzochte toepassingen gaat dit, afhankelijk van bodemtype, gepaard met een significant lagere zaadopbrengst. Dit laatste heeft te maken met een hogere stikstofbehoefte op zandgronden, en uit zich het sterkst bij een stikstoftekort in het voorjaar.

2.7 Biologische gewasbeschermingsmiddelen en biostimulanten

Gewasbeschermingsmiddelen op basis van micro-organismen gelden als laag-risico middelen en zijn een waardevolle aanvulling op het ontwerpen van weerbare teeltsystemen. Tegen schimmels lijken met name hyperparasieten en directe antagonisten veelbelovend.

Een deel van de middelen kennen echter beperkingen bij de inzet tegen roest, bijvoorbeeld omdat ze alleen ondergronds werken (*Trichoderma* spp., *Streptomyces* spp.), of omdat ze specifiek tegen sclerotien werken (*Coniothyrium minitans*). Overigens toont onderzoek van (El-Sharkawy, Rashad, & Ibrahim, 2018) aan dat een combinatie van arbusculaire mycorrhiza en *Trichoderma* spp. onder ideale omstandigheden wel een significante vermindering van de aantasting door zwarte roest geeft.

Middelen met micro-organismen die in het wortelmilieu voorkomen maar ook het blad kunnen koloniseren (*Gliocladium catenulatum*, *Bacillus amololyquifaciens*) zijn relatief weinig getest tegen bladziekten. Bovendien is roest in veel gevallen ook niet een van de eerste ziekten waartegen middelen getest worden, omdat het in veel gewassen geen schade van betekenis doet.

Twee mogelijke biocontrol organismen die verschillende roestsoorten infecteerden werden beschreven door (Srivastava & Boller, 1985; Srivastava, D fago, & Kern, 1985), *Lecanicillium lecanii* en *Aphanocladium album*. *L. lecanii* is inmiddels verworpen tot een biopesticide, het is onduidelijk of *A. album* ooit verder is ontwikkeld. Echter *L. lecanii* zou bij grootschalig gebruik in open teelten vanwege zijn entomopathogeniciteit waarschijnlijk problemen veroorzaken met de insectenpopulaties en daarmee ook met bestuiving, biodiversiteit in de breedte en mogelijk zelfs op voedselwebniveau. (Gordon & Pfender, 2012) onderzochten de werking van een andere mycoparasiet (*Sphaerellops filum*) specifiek tegen zwarte roest. *S. filum* bleek niet in staat de ontwikkeling van uredinia te voorkomen, maar halveerde de periode waarin de geïnficeerde uredinia sporen vormen.

Qua (potentiële) biocontrol organismen zijn er dus verschillende opties waarnaar gekeken kan worden of ze ook werkzaam zijn in de Nederlandse context. Kijkend naar de literatuur is de meeste werking te verwachten van organismen die van nature ook op het blad voorkomen, en niet van organismen uit de wortelzone die op het blad worden toegepast. Wat betreft biostimulanten lijkt vrijwel uitsluitend onderzoek te zijn verricht aan zwarte roest van granen. Hieruit blijkt dat de werking van biostimulanten als chitosan, glycine-betaine en salicylzuur eenzelfde soort werking hebben tegen zwarte roest als tegen andere schimmelziekten. Overigens moet hier goed gelet worden op de nieuwe richtlijn voor biostimulanten van de EU die medio volgend jaar ingaat en een scherpere grens trekt tussen wat geldt als biocontrol en wat geldt als biostimulant.

2.8 Synthetische gewasbeschermingsmiddelen

Omdat zwarte roest pas in recentere jaren een probleem is geworden in Nederland is er tot dusver weinig aandacht aan besteed in onderzoek. Onderzoek voor de ziektebeheersing in graszaadteelt, uitgevoerd door de PAVG hield zich vooral bezig met kroonroest (*Puccinia coronata*) en oranje-strepenroest (*Puccinia poarum*). In twee publicaties waarin wel specifiek naar roestziekten in Engels raaigras en veldbeemd (Horeman, 1989; Postma, 1985) is gekeken, werden alleen fungicidebespuitingen op verschillende momenten tijdens de teelt onderzocht. Hieruit bleken vooral de actieve stoffen fenpropimorf) en propiconazol effectief, welke beide geen goedkeuring meer hebben.

In Denemarken wordt door SEGES veel veldonderzoek naar grassen gedaan. Om de stand van het onderzoek qua beheersing van zwarte roest in Denemarken te achterhalen is contact opgenomen met twee senior-onderzoekers (Lise Nistrup J rgensen en Mogens Støvring Hovmøller) van de Aarhus Universiteit in Denemarken welke ook betrokken zijn bij het SEGES-project dat vele van deze 'field trials' uitvoert. Zij gaven aan dat zwarte roest daar zelden het onderwerp van onderzoek is omdat de ziekte er niet problematisch voorkomt (treed te laat op tijdens het groeiseizoen om opbrengstderving te veroorzaken).

Gebaseerd op onderzoek van de PAVG (Postma, 1985), de Aarhus Universiteit (Denemarken) (Jorgensen & Rodriguez-Algaba, 2017; Jorgensen, Rodriguez-Algaba, & Boelt, 2016) en onderzoek van de werkgroep 'Graszaden en Graszoden' is een overzicht gemaakt van middelen met verschillende actieve stoffen die werkzaam zijn tegen zwarte roest. Een deel hiervan heeft inmiddels geen goedkeuring meer in Nederland en een ander deel is wel goedgekeurd maar staat op de Candidates for Substitution-lijst (CfS). Hieronder (Tabel 4) is een overzicht gegeven van actieve stoffen die werkzaam zijn en nog w l zijn beschikbaar zijn voor de Nederlandse markt.

Tabel 4 Overzicht werkzame actieve stoffen met CfS-status en goedkeuring

Actieve stof	Op CfS-lijst	Momenteel goedgekeurd in teelt van graszaad
Tebuconazool	Ja	Nee
Prothioconazool	Nee	Nee, wel in granen
Azoxystrobine	Ja	Nee, wel in granen en zaadteelt van kruiden
Isopyrazam	Ja	Nee, wel in granen
Benzovindiflupyr	Nee	Nee, wel in granen

In afgelopen jaren is de goedkeuring van verschillende middelen ingetrokken/vervallen of valt de graszaadteelt buiten de vernieuwde goedkeuring. Daarnaast is een aantal actieve stoffen als geheel niet langer goedgekeurd in Europa en dus ook niet in Nederland. Een aantal van de goedgekeurde actieve stoffen staan op de CfS-lijst. Desalniettemin zijn er nog actieve stoffen die zowel werkzaam zijn als goedgekeurd in Nederland. Momenteel is geen van de middelen met deze betreffende actieve stoffen echter goedgekeurd in de teelt van graszaad.

2.9 Modellen verspreiding urediniosporen

Modellen voor de momenten van uitbraak, het verloop van de epidemie en de relatie tussen aantasting en schade kunnen bij voldoende beschikbaarheid en samenhang van data worden ontwikkeld tot een beslisregel. Deze systemen helpen telers om op het juiste moment de juiste maatregelen te treffen en zijn in die zin een belangrijk onderdeel van een weerbaar teeltsysteem. Voor zwarte roest zijn momenteel geen beslisregels beschikbaar.

Oregon State University heeft uitgebreid onderzoek verricht aan zwarte roest van raigrassen en heeft met behulp van de deze data verschillende modellen ontwikkeld voor de verspreiding van zwarte roest. Hieronder zijn onderzoek en de ontwikkeling van de modellen in chronologische volgorde weergegeven:

- Model ontwikkeld voor latente periode van zwarte roest op basis van de omgevingstemperatuur. De tijd van aantasting tot 50% volledig gevormde uredinia bedroef 54 dagen bij 3,5 °C tot 6 dagen bij 26,5 °C. Er bleek sprake te zijn van een vrijwel lineaire toename (WF Pfender, 2001b).
- Model ontwikkeld voor de voorspelling van infectie door zwarte roest op basis van bladnat-duratie en temperatuur, samengevoegd tot een functie 'vochtige graaduren'. Het model houdt ook rekening met het verschil in kieming in de nacht (donker) en in de morgen (licht). Bij proeven met drie onafhankelijke datasets verklaarde het model 80% van de variatie in kieming van urediniosporen (WF Pfender, 2003).
- Complex model ontwikkeld voor de verspreiding van urediniosporen van zwarte roest op landschappelijk niveau. Het model neemt windsnelheden voor het neerkomen van zowel losse sporen als sporenklompjes mee. De invloed van de afmeting van het geïnfecteerde perceel bleken slechts een kleine invloed te hebben op de reikwijdte van de verspreiding. De meeste sporen(klompjes) werden afgezet binnen 6 km van de bron bij windsnelheden tussen 2 en 6 km/uur (William Pfender, Graw, Bradley, Carney, & Maxwell, 2006).
- Model ontwikkeld voor de opbrengstderving bij een aantasting van zwarte roest, gebaseerd op het moment van infectie. Schatting van de opbrengstderving op basis van het aandeel geïnfecteerd en de toename van het aandeel geïnfecteerd in de tijd was het meest accuraat tussen het zetten van het zaad en de oogst (ca. 170 dagen na opkomst) (W. Pfender, 2009).
- STEMRUST_G, een model voor de simulering van een epidemie van zwarte roest is ontwikkeld. Het model gebruikt weerdata, waarneming van aantasting, latente en infectieve periode, ontwikkelingsstadium van het gewas en toepassing van fungicide. Verschillen tussen

daadwerkelijke data en voorspelde data waren gemiddeld gelijk, maar hadden een variatie groter dan eenmaal de standaardafwijking (SD).

- Validatie van het model vond in hetzelfde jaar plaats met data van 35 epidemieën van zwarte roest (WF Pfender et al., 2015). De waarden van het model kwamen in >80% overeen met de daadwerkelijk geobserveerde data, met een lichte variatie in de tijd (WF Pfender & Upper, 2015).

Er zijn door de Oregon State University verschillende modellen ontwikkeld die infectieperiode, infectiekans, verspreiding van urediniosporen, potentieel verloop van een zwarte roest-epidemie en potentiële opbrengstderving voorspellen. Deze modellen zijn nog niet verworden tot een beslisregel en zijn ook niet direct te extrapoleren naar de Nederlandse klimatologische en teelttechnische omstandigheden. Desalniettemin zou een deel van deze modellen wel bij kunnen dragen aan de optimalisatie van de beheersing van zwarte roest door de beschrijving van de levenscyclus van zwarte roest. In het bijzonder het model voor voorspelling van infectie (WF Pfender, 2003) en de functie voor het berekenen van de opbrengstderving bij een gegeven percentage aangetast gewas (W. Pfender, 2009) zijn hiervoor geschikt omdat ze relatief simpel zijn en niet heel specifiek gebonden zijn aan (de omstandigheden van) graszaadteelt zoals deze in de Verenigde Staten plaatsvindt.

3 Kennisinventarisatie praktijk

Om inzicht te verkrijgen in de zwarte roest problematiek in de Nederlandse graszaadteelt is een vragenlijst opgesteld welke door vier aangewezen inhoudelijke experts (Jos Maljaars, Barenbrug; Jan Vogelaar, DLF; Vincent Enting, VanDinter Semo; Nicole Gijzel, DSV) van de werkgroep 'Graszaden & Graszoden' is ingevuld.

Kennis uit de praktijk is opgehaald over de graszaadteelt in Nederland, waarbij de grootste problematiek met zwarte roest in Engels raaigras wordt ervaren. In warme droge jaren blijken ook soorten als rietzwenkgras, struisgras, Italiaans- en Westerwolds raaigras, festulolium en beemdlangbloem vatbaar en kwetsbaar voor zwarte roest te zijn, tot nu toe weliswaar in mindere mate.

3.1 Graszaadteelt in Nederland

De graszaadteelt in Nederland bestaat voor het grootste deel uit Engels raaigras. Daarnaast worden er ook andere grassoorten voor zaad in NL geteeld, te weten: Italiaans, gekruist en Westerwolds raaigras, rietzwenkgras, roodzwenk-, hardzwenk- en schapengras, veldbeemd- en bosbeemdgras, struisgras, festulolium, koeleria en incidenteel ook kropbaar, beemdlangbloem en timothee. Rietzwenk (ca 50% areaal), Veldbeemd- en roodzwenkgras worden meestal onder een dekvrucht gezaaid (najaar wintertarwe / voorjaar vlas of erwt), zodat ze in het najaar voldoende ontwikkeld de winter in gaan (zodat deze spruiten vormen voor de winter die voldoende zijn ontwikkeld om in het daarop volgende voorjaar zaadstengels te produceren). De andere soorten worden veelal in open land gezaaid vanaf juli t/m oktober afhankelijk van de vroegheid van het soort.

In de loop van het najaar, voorafgaand aan het seizoen waarin de opbrengst geoogst zal worden, wordt advies gegeven over onkruidbestrijding en zo nodig ziektebestrijding. Dit alles met het doel de spruiten de kans te geven zo te ontwikkelen dat deze tot een optimale zaadopbrengst komen. De zaadopbrengst per hectare is afhankelijk van het soort en het ras dat gezaaid is.

Omdat zwarte roest in Engels raaigras de grootste bedreiging is, volgt hieronder kort het teeltverloop van deze soort (voor de andere soorten gelden min of meer dezelfde teelthandelingen, per specifieke soort zijn er nuance verschillen):

Eerste jaars teelt:

Inzaai: van 1 september t/m 1 november met 10-20 kg/ha afhankelijk van ras en zaaimoment. Ploegen/rotor-zaai of bouwvoorlichter/rotor-zaai. Na zaai vaak aandrukken met een Cambridge rol voor vlakligging en verbeterde opkomst.

Onkruidbestrijding: na zaai met 1-1,5 ltr Trammat 500. Bij vroege inzaai in oktober een primus/primstar combi tegen breedbladigen.

Bemesting: voor de vroege soorten in het najaar een startgift van 30-60 kg N / ha. In het voorjaar in 1 of 2x 150-170 kg N /ha afhankelijk van ras.

Onkruidbestrijding: in het vroege voorjaar primus/primstar/tapir/fox combi tegen breedbladigen. eventueel in april puma tegen onkruidgrassen. Eventueel tapir combi in mei tegen distelachtigen.

Halmverkorting: 1 of 2x vanaf 1^{ste} knoop tot doorschieten (2^{de} helft april t/m eind mei) met 0,5-0,9 ltr Trimaxx/Moddus Evo, afhankelijk van ras.

Ziektebestrijding: vanaf mei 2x Amistar en 1x Prosaro (2-3 x afhankelijk van ras en roest druk)

Oogst: bij voldoende afrijping van het gewas wordt er voorgemaaid met 3,8 m brede schijvenmaaiers. Na ca 5 dagen kan droog gedorst worden. (De oogst van graszaad begint half juni met het schapengras en eindigt begin augustus met de laatste rassen Engels raaigras en struisgras)

Na de oogst: Eventueel drogen tot onder 14% vocht. Daarna op transport naar depot of bedrijf van handelshuis.

Overjarige teelt:

Na de oogst kan een perceel blijven liggen voor een 2^{de} oogstjaar.

Najaarsbehandeling: 30-50 N bemesting na de oogst. Nadien een snede afvoeren of schapen inscharen. De schapen kunnen t/m eind maart blijven lopen om het gewas kort de winter uit te laten komen en om het gewas uit te dunnen (opslag van uitgevallen zaad voorkomen).

Voorjaar: vroeg bemesten met drijfmest en kunstmest gift 180-200 kg N/ha

Onkruidbestrijding: in april eventueel tegen onkruidgrassen met Puma en eventueel in mei tegen distelachtigen met Tapir.

Ziektebestrijding: vanaf mei 2x Amistar en 1x Prosaro (1-3 x afhankelijk van ras en roest druk). Over het algemeen heeft een overjarig gewas ouderdomsresistentie. 1 of 2 x een ziektebestrijding is meestal voldoende.

Oogst: idem als eerstejaars gewas.

3.2 Rasgevoeligheid voor zwarte roest

In de loop van de jaren is gebleken dat een aantal rassen meer kwetsbaar zijn voor zwarte roest dan andere rassen. Hiermee wordt in de teelt rekening gehouden door deze rassen zoveel mogelijk te weren. Om commerciële redenen kan echter de productie van die rassen wenselijk zijn. Dit geldt voor zowel voedergrassen als grassen voor de recreatiemarkt. Hieruit blijkt ook dat zwarte roest een ziekte is die zich specifiek voordoet tijdens de afrijpingsperiode van het zaad. Voor het gebruiksdoel kan het gebeuren dat deze rassen in weiland of sportveld juist beter presteren en meer gezonde eigenschappen vertonen binnen het gebruiksdoel, zodat het belang om deze rassen te produceren groot is. Dit is in het bijzonder lastig omdat juist de diploïde gazon- en recreatierassen over het algemeen gevoeliger zijn dan de veelal tetraploïde voedergrassen.

Vanuit milieutechnisch oogpunt is het dan ook beter een zwarte roest-gevoelig gras-ras te produceren voor toepassingen waarbij zaadproductie niet de hoofdfunctie is, zoals in weilanden of sportvelden. Bij deze toepassingen is zaadvorming niet belangrijk waardoor ook geen gewasbeschermingsmiddelen hoeven te worden toegepast voor de bestrijding van zwarte roest. Dientengevolge vragen deze toepassingen jarenlang minder chemie in het onderhoud. Het belang (de veredeling) van gras-rassen die meer resistentie hebben tegen zwarte roest ligt dus bij de vermeerderaar/teler.

De vatbaarheid van de rassen zit hem vooral in de vroegheid van de besmetting. Zonder bestrijding worden alle rassen vroeg of laat besmet met dezelfde grote opbrengst dervende gevolgen.

3.3 Mogelijke oorzaken voor toegenomen problematiek

De laatste jaren zien we een verhoogde druk van zwarte roest. Wat precies de oorzaak is van de toenemende agressiviteit van de schimmel is niet met zekerheid te zeggen. Er worden 3 factoren genoemd die bijdragen aan de problematiek:

- Slinken van het gewasbeschermingsmiddelenpakket;
- Klimaatverandering en de verhoogde temperatuur die dat met zich meebrengt;
- Stress omstandigheden.

Deze 3 oorzaken houden ook duidelijk verband met elkaar. Door de klimaatveranderingen zijn er meer stressmomenten in het gewas (een gezond groeiend gewas is beter bestand tegen schimmelinfecties zoals zwarte roest). Hierdoor zijn de planten vatbaarder voor een aantasting. Met het gekrompen middelen pakket kan daarmee de bestrijding extra onder druk zijn komen te staan waardoor resistentie in de hand wordt gewerkt.

Momenteel is het zo dat alle Engels raaigras percelen in Nederland zowel 1 of 2 behandelingen met Amistar als een behandeling met Prosaro krijgen of hebben gekregen. Dat betekent dat stammen of sporen die niet of minder vatbaar zijn voor deze middelen volgend jaar in toenemende mate voor zullen komen. Om resistentie van middelen tegen te gaan is het belangrijk dat er minimaal 2 maar liever meerdere (curatieve) middelen voor handen zijn.

3.4 Aantasting

De aantasting van zwarte roest wordt beschreven als aanvankelijk 'vlekkerig' (meerdere kleine haarden) die zich in zeer korte tijd (enkele dagen tot een week) uit kunnen spreiden over het gehele perceel. Hierbij worden voornamelijk stengel en aar aangetast en kleuren deze in een later stadium grijs.

Het schadebeeld van zwarte roest vertaalt zich in minder (goed) gevulde pakjes, en daardoor minder netto zaad. Doordat de schimmel op de stengel zit wordt de sapstroom volledig of deels onderbroken. Daarnaast blijkt dat bij het schonen van het eindproduct een vrij grote fractie lichte en onvolwaardige zaden verwijderd worden, wat resulteert in een nog lagere opbrengst.

Uit proeven van de laatste jaren zien we, afhankelijk van de aantasting een opbrengstderving tot wel 50%.

3.5 Alternatieve middelen en maatregelen

In de teelt wordt het gebruik van biostimulanten en het toepassen van spoorelementen aanvullend aan een fungicide bespuiting geadviseerd. Hierdoor worden de planten meer weerbaar voor infecties van roest en meeldauw. Ook het specifiek gebruik van bladmeststoffen vindt steeds meer plaats. Dit alles met het doel het gebruik van fungiciden te minimaliseren. De resultaten laten echter nog te wensen over en het blijkt iedere keer weer opnieuw dat actief inzetten van fungiciden noodzakelijk is en blijft om een desastreuze roest aantasting te voorkomen. Het is wel zo dat ook de toeleverende bedrijven actief bezig zijn producten samen te stellen, gericht op het voorkomen van ziekten. De verwachting van de praktijk voor de toekomst is dan ook dat er ooit een moment komt dat werkelijk met minder chemie een maximale opbrengst gerealiseerd kan worden. Zonder chemie lijkt nu nog een utopie zo geven de praktijkexperts aan.

De specifieke toepassing van biostimulanten en bladvoeding (spoorelementen) evt. in combinatie met fungiciden zou een mogelijke oplossingsrichting zijn. Er is onvoldoende bekend over de effectiviteit van de gecombineerde inzet van deze maatregelen op dit moment.

Daarnaast weten we dat er bij overjarige gewassen ouderdomsresistentie optreedt. Een overjarig gewas is veel minder snel vatbaar voor zwarte roest. Ook een open gewas stand zorgt voor een verlaagde vatbaarheid. Dit zien we met name bij percelen die laat in het najaar ingezaaid worden. Dit zijn echter twee maatregelen die niet als standaard opgenomen kunnen worden in de teeltmaatregelen. Om een overjarig perceel te verkrijgen zal er een eerste oogstjaar nodig zijn. En late inzaai is bouwplan breed geen gewenste maatregel. De kans op verdichting en verslemping van de grond is bij late inzaai (meestal veroorzaakt door laat rooibare gewassen) een groot risico. Voor een duurzaam teeltsysteem en een vruchtbare bodem zal eerder naar een vroege inzaai (dus ook vroege oogst van rooigewassen) gestreefd moeten worden.

3.6 Overige knelpunten graszaadteelt

Naast de bestrijding van roest vormt de toename van de onkruiden melganzevoet en heermoes een bedreiging voor de graszaadteelt. Er zijn sinds enkele jaren (door de intrekking van de goedkeuring van MCPA) onvoldoende effectieve herbiciden voor genoemde onkruiden in de graszaadteelt beschikbaar.

In de zwenkgrassen speelt zwarte roest nauwelijks een rol, maar is meeldauw wel een groot punt van aandacht. Iedere grassoort heeft zo zijn eigen problematiek qua schimmels.

Muizenschade is een toenemend probleem in met name overjarige percelen. Er zijn geen bestrijdingsmogelijkheden meer. Alleen natuurlijke vijanden die de populatie onder controle zouden moeten houden.

4 Discussie en conclusie

In dit hoofdstuk worden de kennis verkregen uit de wetenschappelijke literatuur (Hoofdstuk 2) en de kennis opgehaald uit de praktijk (Hoofdstuk 3) met elkaar vergeleken en worden mogelijke oplossingsrichtingen bediscussieerd.

4.1 Levenscyclus, pathotypen en verspreiding

Doordat de verschillende sporenvormen van zwarte roest (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*) veel vormen van transport kennen (water, wind, insecten) (Fischer et al., 2010), en potentieel zeer grote afstanden af kunnen leggen (Brown & Hovmøller, 2002) is het tegengaan van het verspreiden van de sporen geen optie. In het verleden werden nieuwe uitbraken van zwarte roest deels beperkt door het op grote schaal verwijderen van de alternatieve waardplant, de zuurbes (*Berberis vulgaris*) (Saunders Diane et al., 2019), maar dit is door moderne flora- en faunawetgeving niet meer mogelijk. Hoge CO₂-concentraties voorkomen dat kiembuizen van de sporen een appressorium en penetratiepen vormen (Yirgou & Caldwell, 1963), maar alleen bij continue aanwezigheid. Dit is om een veelvoud aan technische en praktische redenen geen goede beheersingsoptie.

Zwarte roest kent net als vele andere roesten een pathotype-specifieke interactie, wat wil zeggen dat er variatie kan bestaan in hoe sporen afkomstig van een specifiek uredinium reageren op bepaalde maatregelen genomen in de teelt van een bepaald ras. Er zijn vanuit de praktijk nog geen gevallen van pathotype-specifieke interacties (bijvoorbeeld afwijkend aantastingsbeeld) bekend. Het is belangrijk om vast te stellen of pathotype-specifieke interacties een rol spelen in Nederland bij het vaststellen van de effectiviteit van teeltmaatregelen in de beheersing van zwarte roest. Bij het toetsen van maatregelen en ook tijdens de (praktijk) teelt kunnen pathotype-specifieke interacties namelijk een extra bron van variatie zijn in de reactie van zwarte roest op een gegeven maatregel.

Op basis van de levenscyclus is het tegengaan van vorming en verspreiding van uredinio- en teliosporen de beste optie. Verschillende handelingen, beschreven in onderstaande paragrafen, kunnen hieraan bijdragen. Verder kunnen de verschillende modellen die zijn ontwikkeld aan de Oregon State University een belangrijke rol spelen als ze toepasbaar worden bevonden in Nederlandse omstandigheden. Het zou dan gaan om het optimale moment om een maatregel uit te voeren, en in het bijzonder wanneer de eerste maatregel uitgevoerd zou moeten worden, bijvoorbeeld op basis van hoe dicht in de buurt een besmetting is waargenomen en in welk groeistadium de planten zich op dat moment bevinden. Als zwarte roest al aanwezig is tijdens de halmvorming (zetten van het zaad) is de verwachte inkomstderving het grootst. Onderzoekers van de Aarhus Universiteit in Denemarken gaven aan dat aantasting van zwarte roest na het vullen van het zaad geen economische schade van betekenis meer veroorzaakt.

4.2 Resistenties, rassen en veredeling

Naar resistentie(genen) voor zwarte roest in raaigrassen wordt sinds halverwege de jaren '80 onderzoek gedaan. Er zijn sindsdien verschillende Quantative Trait Loci (QTL's) geïdentificeerd die een mate van resistentie geven tegen zwarte roest. In het bijzonder werd door (Beckmann et al., 2010) een monogenetische (op één gen gebaseerde) resistentie gevonden, en in hetzelfde jaar kwam een raaigras (*Lolium* spp.) brede genetische kaart beschikbaar (Studer et al., 2010). Sinds enkele jaren is er voor de monogenetische resistentie een goede merker beschikbaar (Bojahr et al., 2016).

Er zijn verschillende proeven gedaan met rassen Engels raaigras (*Lolium perenne*) waaruit blijkt dat er rassen zijn met een hoge mate van resistentie, hoewel er geen gevallen bekend zijn van rassen met een volledige resistentie. Wat betreft de verdeling van resistente rassen in Nederland zijn de bij de werkgroep 'Graszaden en Graszoden' aangesloten veredelaars terughoudend met het geven van informatie, omdat deze concurrentiegevoelig is. Wel geven zij desgevraagd te kennen dat het probleem bekend is en dat er gewerkt wordt aan rassen met een (hogere mate van) resistentie, maar deze niet op korte termijn beschikbaar komen.

Hierbij speelt het aspect mee dat zwarte roest een probleem is voor de zaadteelt, oftewel de vermeerderaar, maar niet zozeer de eindgebruiker (voedergewas of recreatief). Het economisch belang komt dus maar van een deel van de keten, en het is dan ook om commerciële redenen soms gunstiger om rassen te zaaien die meer kwetsbaar zijn voor zwarte roest.

Er bestaan dus verschillende (regio's van (QTL's)) resistentiegenen, en deze komen ook voor in reeds commerciële rassen, maar nog niet in Nederland. Vanwege de duur van het veredelingsproces komen deze ook niet op korte termijn beschikbaar, en daarna is er nog het verschil in belang tussen vermeerderaar en eindgebruiker voor het gebruik van (meer) resistente rassen. Een (meer) resistent ras kan eigenlijk alleen een goede bijdrage aan de beheersing van zwarte roest leveren als het ook vanuit commercieel oogpunt aan de eisen van de eindgebruiker voldoet. Dit is in het bijzonder lastig omdat juist de diploïde gazon- en recreatierassen over het algemeen gevoeliger zijn dan de veelal tetraploïde voedergassen.

4.3 Teeltmaatregelen

Beheersing van zwarte roest door middel van teeltmaatregelen is niet heel uitgebreid onderzocht. Hoewel in de wetenschappelijke literatuur verschillende mogelijkheden worden aangehaald zijn deze vrijwel altijd gebaseerd op een enkele studie. Ook de teelthandleidingen graszaad van de PAVG tussen 1988 en 2005 het voorkomen van zwarte roest 'een uitzondering' en geven slechts aan dat er meer informatie nodig is. Een literatuurstudie over beheersing van schimmels met UV-licht (Lamers & van Rozen, 2009) leverde geen informatie op over roestsporen, maar vermeldt wel dat sporen die meer pigment vormen minder gevoelig zijn. Gezien de kleur van urediniosporen van zwarte roest (eerst roestbruin, later zwart) is beheersing van zwarte roest met UV-licht waarschijnlijk geen oplossing.

Branden van meerjarige percelen of 1-jarige percelen na de oogst kan ongewenste hergroei en aantasting van zwarte roest enigszins verminderen (Hardison, 1980). De praktijk geeft echter aan dat na het eerste teeltjaar ouderdomsresistentie ontstaat, waardoor branden na de eerste oogst alleen zin lijkt te hebben als zeer kortbij een perceel is wat het jaar daarna vers ingezaaid wordt. Tevens verschilt de teelt van graszaad in Nederland ook fundamenteel van de teelt in Amerika (waarop de resultaten van het branden zijn gebaseerd) omdat in Nederland percelen niet langjarig (denk 4 jaar of langer) voor graszaadteelt worden gebruikt.

Later inzaaien (november i.p.v. augustus) kan aantasting van zwarte roest sterk verminderen (WF Pfender, 2004) maar stuit in de praktijk op weerstand vanwege het risico op bodemverdichting, verslemping en andere structuurschade. Zij zien juist meer in vroeger inzaaien, wat dan weer betekent dat rooigewassen eerder de grond uit moeten. Ook verandering in de hoogte en verdeling van stikstofgiften kan zwarte roest verminderen. In de proeven van (Koeritz et al., 2013) gaf een voorjaarsgift van 56 kg/ha N met driemaal een gift van 33 kg/ha N in de loop van de teelt de minste aantasting. In de praktijk wordt momenteel een- of tweemaal 150-170 kg/ha N gegeven met een voorjaarsgift van 30-60 kg/ha. Op zandgronden kan een verminderde stikstofgift, in het bijzonder in het voorjaar, mogelijk tot verlies van opbrengst leiden, iets wat vanwege de kleine marges van de teelt niet wenselijk is. Het effect van groeiremmers voor het kort houden van de stengels (voorkomen van hangen) kan een robuustere plant opleveren maar kan ook een negatief effect hebben dat per actieve stof anders is. Prohexadione-Ca in het bijzonder verhoogde de aantasting van zwarte roest.

Er zijn verschillende opties voor oplossingsrichtingen op basis van teeltmaatregelen die verder uitgediept zouden kunnen worden, waarbij later inzaaien in de literatuur tot de sterkste reductie van aantasting leidt. Een gesplitste stikstofgift is relatief makkelijk te bewerkstelligen en daardoor mogelijk ook interessant.

Van het effect van groeiremmers op de aantasting door zwarte roest is op prohexadione-Ca na weinig bekend. Omdat vroeger inzaaien op bezwaren vanuit de praktijk stuit en er van de werking van groeiremmers op zwarte roest momenteel nog weinig bekend is zijn dit vooralsnog oplossingsrichtingen met een lage potentie

4.4 Gewasbeschermingsmiddelen, biocontrol en biostimulanten

In Europa zijn nog verschillende actieve stoffen goedgekeurd met een werkzaamheid tegen zwarte roest. Op de Nederlandse markt zijn middelen beschikbaar op basis van de volgende actieve stoffen: tebuconazool, prothioconazool, azoxystrobine, isopyrazam en benzovindiflupyr. Hiervan staan tebuconazool, azoxystrobine en isopyrazam op de CfS-lijst. De middelen die een of een combinatie van deze stoffen bevatten zijn momenteel echter niet toegestaan in de teelt van graszaad in Nederland.

Wat betreft biocontrol organismen zijn er drie die duidelijk uit de wetenschappelijke literatuur naar voren komen: *Lecanicillium lecanii* (voormalig *Verticillium lecanii*), *Aphanocladium album* en *Sphaerellopsis filum*. Van deze drie is *L. lecanii* al gecommercialiseerd vanwege zijn entomopathogene werking en wordt ingezet tegen tripslarven en witte vlieg. De andere twee mycoparasieten (*A. album* en *S. filum*) zijn zwakker in werking en nog niet ontwikkeld tot commercieel product. Alle drie hebben een hoge luchtvochtigheid nodig om te groeien (RV>80) en zouden dus vooral moeten worden ingezet voorafgaand aan een nacht met hoge infectiekansen.

Van de werking van biostimulanten tegen zwarte roest in de teelt van graszaad is nog maar weinig bekend. De praktijk geeft aan dat gebruik van biostimulanten en bladmeststoffen gestimuleerd wordt en ook steeds meer voorkomt maar dat resultaten in het algemeen nog op zich laten wachten. Zij zeggen wel dat toeleverende bedrijven werken aan producten die beter samenwerken maar verwachten hier weinig van op de korte termijn. Resultaten van proeven met biostimulanten tegen zwarte roest in granen laten vooral zien dat de biostimulanten wel hun abiotische stress-regulerende werking uitoefenen, maar dat dit slechts zeer weinig invloed heeft op infectieverloop en schade.

4.5 Samenvattend

Een betere beheersing van zwarte roest lijkt (op het op de markt brengen van resistente rassen na) een kwestie van veel kleine ingrepen die samen een voldoende onderdrukkend effect moeten hebben. Vroeger inzaaien, een gesplitste stikstofgift, gebruik van de juiste groeiremmers en eventueel gebruik abiotische stress-regulerende biostimulanten zijn het snelst haalbaar maar zijn niet zonder nadelen en ook ontbreekt het op verschillen vlakken nog aan kennis, bijvoorbeeld welke groeiremmers welk effect hebben en welke biostimulanten het meest effectief zijn.

De praktijk geeft aan dat het middelenpakket te klein is en vreest voor middelenresistenties, maar andere middelen met werkzame en in Nederland goedgekeurde actieve stoffen hebben momenteel geen toepassingen in de teelt van graszaad. *L. lecanii* is al commercieel beschikbaar maar niet als fungicide en zou bij grootschalig gebruik in open teelten vanwege zijn entomopathogeniciteit waarschijnlijk problemen veroorzaken met de insectenpopulaties en daarmee ook met bestuiving, biodiversiteit in de breedte en mogelijk zelfs op voedselwebniveau.

Resistentiegenen en QTL`s zijn goed gedefinieerd maar op korte termijn zijn er nog geen Nederlandse rassen met verhoogde resistentie te verwachten, hier wordt wel aan gewerkt maar dit kost verscheidene jaren. Bovendien ligt het belang van (de veredeling) van gras-rassen die meer resistentie hebben tegen zwarte roest echt bij de vermeerderaar/teler. Bij recreatieve toepassingen zoals in weiland of sportveld is zaadvorming namelijk niet belangrijk. De eindgebruiker heeft in dit geval dus geen commercieel belang bij het gebruik van meer zwarte roest-resistente rassen.

5 Literatuur

- Abbasi, M., Goodwin, S. B., & Scholler, M. (2005). Taxonomy, phylogeny, and distribution of *Puccinia graminis*, the black stem rust: new insights based on rDNA sequence data. *Mycoscience*, 46(4), 241-247.
- Beckmann, K., Eickmeyer, F., Lellbach, H., Schubiger, F., Hartmann, S., & Wehling, P. (2010). Development of molecular markers for stem-rust resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and their utilisation in breeding programmes. *60. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 24-26 November 2009, Raumberg-Gumpenstein.*, 101-104.
- Boerema, G., & Verhoeven, A. A. (1977). Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 2b: Fungi on field crops: cereals and grasses. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83(5), 165-204.
- Boerema, G. H., Pieters, R., & Hamers, M. E. (1992). Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Supplement Series 2b (additions and corrections): Fungi on field crops: Cereals and grasses. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98(1), 1-32.
- Bojahr, J., Nhengiwa, O., Krezdorn, N., Rotter, B., Saal, B., Ruge-Wehling, B., . . . Winter, P. (2016). Massive analysis of cDNA ends (MACE) reveals a co-segregating candidate gene for LpPg1 stem rust resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Theoretical and Applied Genetics*, 129(10), 1915-1932.
- Borm, G. E. L. (2005). [Teelthandleiding graszaad - schimmelziekten].
- Borm, G. E. L., Wander, J. G. N., & Zwanepol, S. (1995). *Teelt van Graszaad*. Retrieved from Lelystad:
- Brown, J. K., & Hovmøller, M. S. (2002). Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, 297(5581), 537-541.
- Cagas, B. (1975). Host Specialization of *Puccinia graminis* ssp. *graminicola* Urb. *Phytopathologische Zeitschrift*, 84(1), 57-65.
- Chong, J., & Harder, D. (1982). Ultrastructure of haustorium development in *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: cytochemistry and energy dispersive X-ray analysis of the haustorial mother cells. *Phytopathology*, 72, 1518-1526.
- El-Sharkawy, H. H., Rashad, Y. M., & Ibrahim, S. A. (2018). Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. *Physiological and molecular plant pathology*, 103, 84-91.
- Fischer, M. W., Stolze-Rybczynski, J. L., Cui, Y., & Money, N. P. (2010). How far and how fast can mushroom spores fly? Physical limits on ballistospore size and discharge distance in the Basidiomycota. *Fungal biology*, 114(8), 669-675.
- Gordon, T., & Pfender, W. (2012). Effects of the mycoparasite *Sphaerellopsis filum* on overwintering survival of stem rust in perennial ryegrass. *Plant disease*, 96(10), 1471-1481.
- Hardison, J. R. (1976). Fire and flame for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 14(1), 355-379.
- Hardison, J. R. (1980). Role of fire for disease control in grass seed production. *Plant disease*, 64(7), 641-645.
- Horeman, G. (1989). *Noodzaak van roestbestrijding in Engels raai-, en veldbeemdgras*. Retrieved from Jo, Y.-K., Barker, R., Pfender, W., Warnke, S., Sim, S.-C., & Jung, G. (2008). Comparative analysis of multiple disease resistance in ryegrass and cereal crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 531-543.
- Johnson, T. (1949). Intervarietal crosses in *Puccinia graminis*. *Canadian Journal of Research*, 27(3), 45-65.
- Jorgensen, L. N., & Rodriguez-Algaba, J. (2017). *Importance of ruse diseases in seed production of perennial ryegrass*. Paper presented at the 9th International Herbage Seed Group Conference, Pergamina, Argentinië.
- Jorgensen, L. N., Rodriguez-Algaba, J., & Boelt, B. (2016). *Applied Crop Protection - Disease control in grass seed crops* (94). Retrieved from
- Koeritz, E. J., Watkins, E., & Ehlke, N. J. (2013). A split application approach to nitrogen and growth regulator management for perennial ryegrass seed production. *Crop Science*, 53(4), 1762-1777.
- Lamers, J., & van Rozen, K. (2009). De mogelijkheden van UV-C straling voor de bestrijding van ziekten en plagen in de akkerbouw: een literatuurstudie.
- Leonard, K. J., & Szabo, L. J. (2005). Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular plant pathology*, 6(2), 99-111.

- Macháč, R., & Cagaš, B. (2014). Resistance of Perennial Ryegrass to Crown and Stem Rust Under Field and Greenhouse Conditions. In *Quantitative Traits Breeding for Multifunctional Grasslands and Turf* (pp. 177-182): Springer.
- Peterson, G. W. (1973). Dispersal of aeciospores of *Peridermium harknessii* in central Nebraska. *Phytopathology*, 63(1), 170-172.
- Pfender, W. (2001a). Host range differences between populations of *Puccinia graminis* subsp. *graminicola* obtained from perennial ryegrass and tall fescue. *Plant disease*, 85(9), 993-998.
- Pfender, W. (2001b). A temperature-based model for latent-period duration in stem rust of perennial ryegrass and tall fescue. *Phytopathology*, 91(1), 111-116.
- Pfender, W. (2003). Prediction of stem rust infection favorability, by means of degree-hour wetness duration, for perennial ryegrass seed crops. *Phytopathology*, 93(4), 467-477.
- Pfender, W. (2004). Effect of autumn planting date and stand age on severity of stem rust in seed crops of perennial ryegrass. *Plant disease*, 88(9), 1017-1020.
- Pfender, W. (2009). A damage function for stem rust of perennial ryegrass seed crops. *Phytopathology*, 99(5), 498-505.
- Pfender, W., Coop, L., Seguin, S., Mellbye, M., Gingrich, G., & Silberstein, T. (2015). Evaluation of the ryegrass stem rust model STEMRUST_G and its implementation as a decision aid. *Phytopathology*, 105(1), 35-44.
- Pfender, W., Graw, R., Bradley, W., Carney, M., & Maxwell, L. (2006). Use of a complex air pollution model to estimate dispersal and deposition of grass stem rust urediniospores at landscape scale. *Agricultural and forest meteorology*, 139(1-2), 138-153.
- Pfender, W., Saha, M., Johnson, E., & Slabaugh, M. (2011). Mapping with RAD (restriction-site associated DNA) markers to rapidly identify QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(8), 1467-1480.
- Pfender, W., & Upper, D. (2015). A simulation model for epidemics of stem rust in ryegrass seed crops. *Phytopathology*, 105(1), 45-56.
- Pfender, W., & Vollmer, S. (1999). Freezing temperature effect on survival of *Puccinia graminis* subsp. *graminicola* in *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *Plant disease*, 83(11), 1058-1062.
- Pfender, W. F. (2009). Demonstration of pathotype specificity in stem rust of perennial ryegrass. *Phytopathology*, 99(10), 1185-1189.
- Postma, J. (1985). *Roest- en meeldauwbestrijding in veldbeemd en Engels raai gras*. Retrieved from Wageningen:
- Rose-Fricker, C., Meyer, W., & Kronstad, W. (1986). Inheritance of resistance to stem rust (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*) in six perennial ryegrass (*Lolium perenne*) crosses. *Plant disease*, 70(7), 678-681.
- Saunders Diane, G. O., Pretorius, Z. A., & Hovmøller, M. S. (2019). Tackling the re-emergence of wheat stem rust in Western Europe. *Communications Biology*, 2(1). doi:<http://dx.doi.org/10.1038/s42003-019-0294-9>
- Schmidt, R. A., Carey, W. A., & Hollis, C. A. (1982). Disease gradients of fusiform rust on oak seedlings exposed to a natural source of aeciospore inoculum. *Phytopathology*, 72(11), 1485-1489.
- Schubiger, F., Baert, J., Bayle, B., Bourdon, P., Cagas, B., Cernoch, V., . . . Hartmann, S. (2010). Susceptibility of European cultivars of Italian and perennial ryegrass to crown and stem rust. *Euphytica*, 176(2), 167-181.
- Shaw, D. (1999). 1999 Daniel McAlpine memorial lecture. *Australasian Plant Pathology*, 28(4), 269-282.
- Srivastava, A. K., & Boller, T. (1985). Secretion of chitinase by *Aphanocladium album*, a hyperparasite of wheat rust. *Experientia*, 41(12), 1612-1613.
- Srivastava, A. K., Défago, G., & Kern, H. (1985). Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. *Journal of Phytopathology*, 114(1), 73-78.
- Studer, B., Kölliker, R., Muylle, H., Asp, T., Frei, U., Roldán-Ruiz, I., . . . Barth, S. (2010). EST-derived SSR markers used as anchor loci for the construction of a consensus linkage map in ryegrass (*Lolium* spp.). *BMC Plant Biology*, 10(1), 1-10.
- Teng, P., & Close, R. C. (1978). Effect of temperature and uredinium density on urediniospore production, latent period, and infectious period of *Puccinia hordei* Otth. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21(2), 287-296.
- Tomerlin, J., Eversmeyer, M., Browder, L., & Kramer, C. (1983). Temperature and host effects on latent and infectious periods and on urediniospore production of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, 73(3), 414-419.
- Urban, Z. (1967). The taxonomy of some European graminicolous rusts. *Ceska mykologie*, 21(1), 12-16.
- Vreeke, S., Bosch, H. K. J., Vlot, C., Haenen, J. A. H., Staal, J., & Bakker, A. (1988). *Teelt van Graszaad*. Retrieved from Lelystad:
- Yirgou, D., & Caldwell, R. M. (1963). Stomatal penetration of wheat seedlings by stem and leaf rust: effect of light and carbon dioxide. *Science*, 141(3577), 272-273.

Zambino, P. J., & Szabo, L. J. (1993). Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. *Mycologia*, 85(3), 401-414.

Bijlage 1 Vragenlijst kennisinventarisatie praktijk

Deel I: Zwarte roest (*Puccinia graminis* (subsp. *graminicola*) f.sp. *lolii/poae*)

Zwarte roest is geïdentificeerd als momenteel zijnde het grootste knelpunt voor de graszaadteelt. Voor het onderzoeken van de mogelijkheden en de implementatie van (nieuwe) maatregelen, is het vooraleerst belangrijk een goed beeld te hebben van de graszaadteelt. Beschrijf hieronder hoe de graszaadteelt verloopt, graag zo uitgebreid mogelijk, dus van de eerste grondbewerking tot aan de oogst. Benoem waar mogelijk specifieke zaken als ras, zaaidichtheid, gewasstadia, momenten van (bij)bemesten etc. Indien u wilt/kunt verwijzen naar een publicatie, openbare digitale bron of een eigen document graag een link of referentie plaatsen. Eigen documentatie kunt u ook via de mail naar de betrokken contactpersoon sturen.

Plantum heeft een verzoek tot vrijstelling, conform art. 38 van de WGB, ingediend bij het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit voor het middel Amistar. De NVWA heeft als onderdeel hiervan een Landbouwkundige onderbouwing geschreven waarin zwarte roest met name als belemmering wordt genoemd voor de teelt van Engels raaigras (*Lolium perenne*). Is zwarte roest naar uw mening ook (teelt)bedreigend voor andere grassoorten? Zo ja, geeft u dan aan welke soorten en waarom.

Plantum noemt als onderdeel van haar knelpuntonderbouwing dat er te weinig verschil is tussen rassen wat betreft de gevoeligheid voor zwarte roest. Hoe is uw ervaring met verschillende rassen? Heeft u rassen gezien die (zeer) veel schade ondervonden, of juist (zeer) weinig? Zo ja, geeft u dan aan of er eventuele andere factoren van invloed zouden kunnen zijn geweest, bijvoorbeeld het weer, een bespuiting of een mestgift.

Zaken die meermaals worden aangewezen als oorzaak van de toegenomen problematiek met zwarte roest zijn het kleiner worden van het toegestane middelenpakket en klimaatverandering. Zijn deze factoren naar uw mening ook (de) belangrijk(st) oorzaken van de problemen met zwarte roest, zijn er volgens u nog andere factoren die een rol spelen die ook nadrukkelijk moeten worden benoemd? Geeft u ook aan waarom.

De aantasting van zwarte roest wordt beschreven als aanvankelijk 'vlekkerig' (meerdere kleine haarden) die zich in zeer korte tijd (enkele dagen tot een week) uit kunnen spreiden over het gehele perceel. Hierbij worden voornamelijk stengel en aar aangetast en kleuren deze in een later stadium grauw. Komt deze beschrijving overeen met uw eigen ervaringen? Zo nee, beschrijft u dan waarin en in welke mate de aantasting zoals u die hebt waargenomen anders is.

Zwarte roest heeft voor zijn seksuele voortplanting (waarbij eigenschappen zoals virulentie kunnen worden uitgewisseld) een alternatieve waardplant nodig. Het kan voorkomen dat na seksuele voortplanting de agressiviteit van de schimmel (in voorkomen of schade) sterk toeneemt. Is er naar uw inzicht sprake van toegenomen virulentie (snellere verspreiding, meer ernstige schade) van zwarte roest de afgelopen teeltjaren? En zo ja, waarom denk u dat? Laat dit zich bijvoorbeeld vertalen naar verlies van gewicht na opschonen of snellere wegval?

Er wordt voor de bestrijding van zwarte roest in sterke mate gekeken naar de beschikbare middelen. Heeft u ervaring met andere maatregelen of middelen, of begeleidt u telers die deze hebben toegepast (bijvoorbeeld gebruik van biostimulanten, vroeg oosten, dunnen van het gewas, alternatieve

soort/type bemesting)? Geef waar mogelijk ook de redenering achter de maatregel. Indien u wilt/kunt verwijzen naar een publicatie, openbare digitale bron of een eigen document graag een link of referentie plaatsen. Eigen documentatie kunt u ook via de mail naar de betrokken contactpersoon sturen.

Deel II: Overige vragen/knelpunten

Zijn er qua zwarte roest of andere zaken nog knelpunten of kennisvragen waar u mee zit? Zijn er bijvoorbeeld problemen waarvan u vind of vermoed dat er niet of onvoldoende aandacht aan wordt geschonken? Als u meerdere punten heeft, deze graag op volgorde van prioriteit/urgentie aangeven.

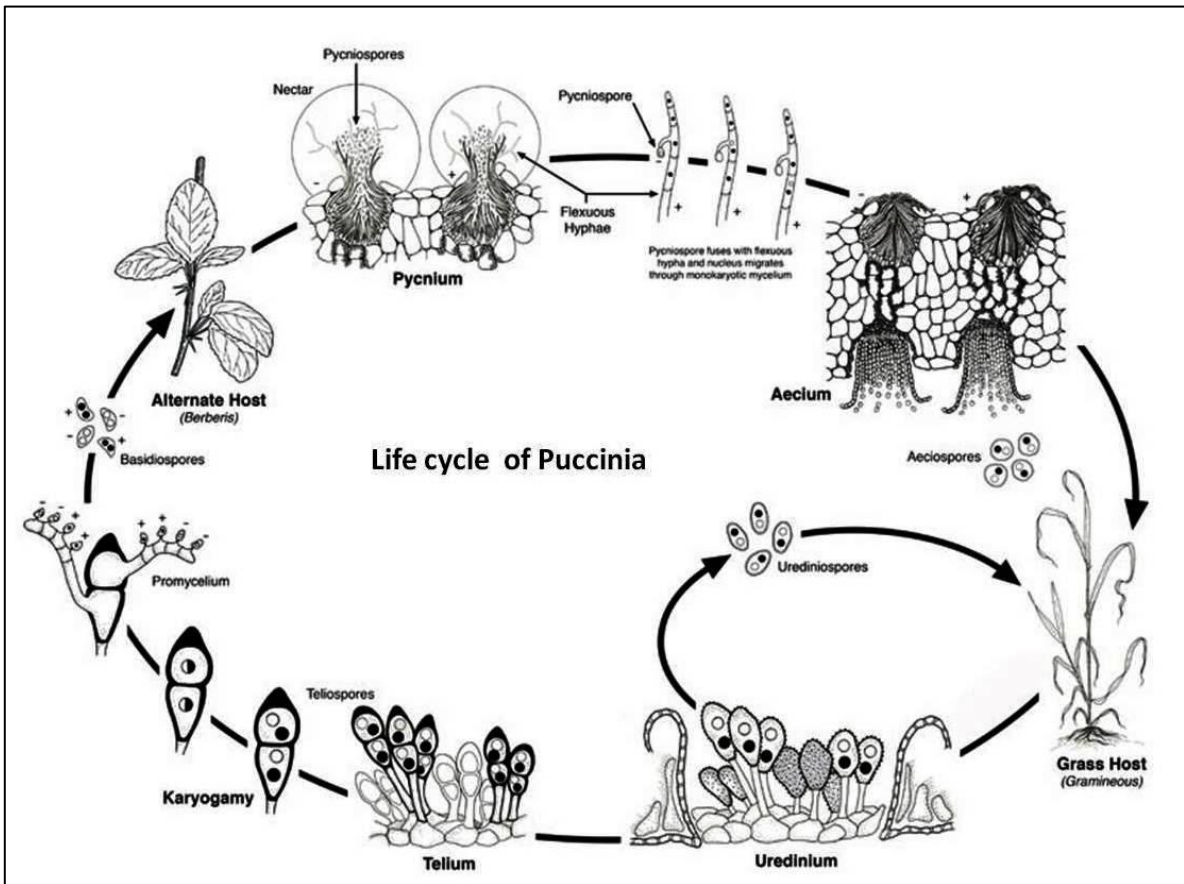
Als u een plan mocht bedenken voor een praktijkproef aangaande graszaadteelt met een looptijd van minimaal 4 jaar, waar zou deze proef zich dan op richten (middelen, grondbewerking, rassen, rotatie, andere)?

Bijlage 2 Levenscyclus (uitgebreid)

Qua taxonomische indeling is zwarte roest (*Puccinia graminis*) de hoofdsoort, en zijn er twee geaccepteerde subsoorten, subsp. *graminis* bij granen en subsp. *graminicola* bij grassen. Omdat er tussen deze twee subsoorten geen verschil in levenscyclus lijkt te bestaan anders dan hun waardplanten wordt deze hoofdzakelijk beschreven middels een publicatie over de hoofdsoort *P. graminis* door (Leonard & Szabo, 2005).

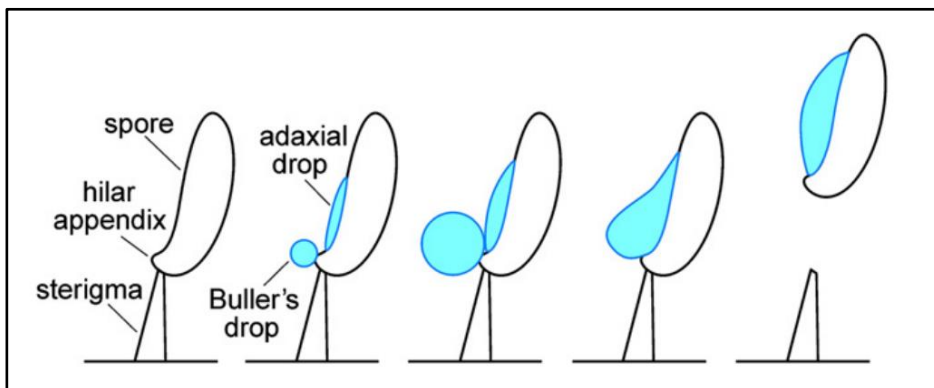
Zwarte roest van granen en grassen (*P. graminis*) is een macrocyclische, heterocieuze schimmel. Dit wil zeggen dat deze roest alle vijf bekende vormen van sporen produceert tijdens zijn levenscyclus (macrocyclisch), in tegenstelling tot sommige roestsoorten die er slechts twee produceren (microcyclisch). Verder betekent het dat deze roest een alternatieve waardplant (dus anders dan granen of grassen) nodig heeft om zijn levenscyclus volledig (d.w.z. inclusief het seksuele stadium) te doorlopen. Voor *P. graminis* zijn de alternatieve waardplanten planten uit de geslachten *Berberis* (bijvoorbeeld de Japanse zuurbes) en *Mahonia*. Beide geslachten zijn lid van de Berberisfamilie (*Berberidaceae*). In Nederland zijn de gewone zuurbes (*Berberis vulgaris*) en mahonie (*Mahonia aquifolium*) de meest voorkomende alternatieve waardplanten voor zwarte roest. Tevens is *M. aquifolium* volgens de FLORON Verspreidingsatlas de enige in Nederland algemeen voorkomende plant van het geslacht *Mahonia*.

Ten behoeve van de leesbaarheid is het ruststadium (de teliosporen) gekozen als punt van waaruit de levenscyclus begint in deze beschrijving. Daarnaast zal het ploïdieniveau slechts beperkt en de genetische eigenschappen niet als deel van de beschrijving van de levenscyclus worden meegenomen. Deze worden verderop in dit overzicht beschreven.



Afb. 1: Schematische weergave van de levenscyclus van *Puccinia graminis* (Leonard et al., 2005)

In gematigde klimaten zoals Nederland worden dikwandige teliosporen (Afb.1, onderin links) gevormd in telia (enkelvoud: telium) die zich vormen op het graan of gras tegen het einde van hun groeiseizoen. In deze teliosporen vindt de versmelting van de celkernen, uitgewisseld tijdens de vorige vermeerderingsronde op de alternatieve waardplant, plaats. De roest gaat nu een monokaryotische (eenkernige) fase in. Als de teliosporen volledig gevormd zijn breken de 'stengels' niet af zoals bij de andere sporenvormen maar blijven juist intact. De teliosporen overwinteren in de kleine krater waarin ze gevormd zijn en kiemen vervolgens in de lente gedurende dezelfde tijd als waarin de alternatieve waardplanten nieuw blad beginnen te vormen. Deze synchronisatie is waarschijnlijk het gevolg van jarenlange co-evolutie, en niet het gevolg van een interactie van de schimmel met de alternatieve waardplant. Gedurende deze tijd vormen één of beide cellen van de teliospoor een verdikte schimmeldraad (basidium) waarop de basidiosporen, staande op een kort steeltje (sterigma) gevormd worden. Voor het verspreiden van de basidiosporen is een hoge luchtvochtigheid nodig omdat het mechanisme waarmee de sporen 'gekatapulteerd' worden (Buller's Drop, afb. 2) afhankelijk is van condensatie van vocht op de sporen.



Afb. 2 Schematische weergave van het 'katapult' mechanisme van *Puccinia* spp. (Fischer et al., 2010)

Tijdens dit proces gaat de zogenaamde Buller's Drop (een waterdruppel onderaan de spoor) samen met een andere waterdruppel (breking oppervlaktenspanning) die zich in de 'kom' van de spoor vormt. Deze plotselinge, snelle verplaatsing van massa produceert de benodigde kinetische energie voor het wegschieten van de sporen (Fischer et al., 2010).

Na het wegschieten van de sporen laten deze zich meevoeren op luchtstromen naar een alternatieve waardplant (*Berberis* of *Mahonia* spp.). Het blad van beide waardplantfamilies wordt na het uitlopen van de knoppen met de tijd weerbaarder door de vorming van een waslaag (cuticulum) op het blad, die het infectieproces van de kiembuis vertragen. Succesvolle infectie resulteert in het ontstaan van kolfvormige pycnidiën (Afb. 1, bovenin links en Afb. 3, links) welke zich meestal op de bovenzijde van blad bevinden. In deze structuren ontstaan zowel de pycniosporen (de 'mannelijke' geslachtscellen) als de zogenaamde 'bochtige' of 'buigzame' hyfen, welke dienst doen als de 'vrouwelijke' geslachtscellen. De pycniosporen worden op de bodem van de structuur gevormd, terwijl de buigzame hyfen uit de structuur steken. De pycniosporen worden uitgescheiden in een nectar-achtige substantie die aantrekkelijk is voor insecten, en hen zodoende, samen met spattend water, doet bijdragen aan de verspreiding. Bij roest worden, zoals bij meer schimmels, zogenaamde +- en - 'paringstypen onderscheiden, die alleen elkaar en niet zichzelf kunnen bevruchten. Dit mechanisme wordt gereguleerd door een eiwitcomplex dat aanwezig is in de 'nectar'.



Afb. 3 Pycnidiën op de bovenzijde (links) en aecia op de onderzijde (rechts) van een blad van de zuurbes (*Berberis* spp.) (Leonard et al., 2005)

Wanneer een pycniospoor van het ene paringstype contact maakt met de buigzame hyfen van het andere paringstype fuseren de cellen en migreert de celkern van de pycniospoor door de buigzame hyfen naar het protoaecium, aan de basis van het pycnium. Er vindt nog geen versmelting van de celkernen plaats, waarmee de roest zijn dikaryotische (tweekernig) fase in gaat. Als reactie op de gedeeltelijke bevruchting worden, ditmaal op de onderzijde van het blad, komvormige aecia (enkelvoud aecium) (Afb. 1, bovenin rechts en Afb. 3, rechts) gevormd. In deze structuren worden kettingen van aeciosporen gevormd, die wel infectieus zijn op de grasachtige waardplant, maar niet meer op de alternatieve waardplant. De aeciosporen worden verspreid door wind (Schmidt et al., 1982), opspattend water (Peterson, 1973) en bijen, hoewel deze laatste verspreidingsvorm weinig voorkomt (Shaw, 1999).

Bij succesvolle infectie van de grasachtige waardplant (meestal op de stengel of de bladschede) door een aeciospoor vormt de schimmel een dikke laag hyfen onder de epidermis. Uit deze hyfenlaag groeien sporoforen waarop eencellige, dikaryotische urediniosporen worden gevormd. Deze barsten door de epidermis heen en heten dan uredinia (enkelvoud: uredinium) (Afb. 1, onderin rechts). Urediniosporen worden makkelijk verspreid door de wind en zorgen voor de verdere verspreiding van de roest. Per jaar vinden er meerdere cycli plaats van infectie en productie van nieuwe urediniosporen. Hoeveel cycli er zijn is onder andere afhankelijk van de temperatuur en de beschikbaarheid van infecteerbare planten(delen) (Teng & Close, 1978; Tomerlin et al., 1983).

(WF Pfender & Vollmer, 1999) onderzochten tot welke temperatuur in de winter uredinia levensvatbaar bleven door ze bloot te stellen aan temperaturen van -3, -6, -10 en -13 °C en daarna in de kas te bekijken hoeveel % van de uredinia nog sporuleerden na 21 dagen. De temperaturen van -3 en -6 °C hadden geen enkel effect op de levensvatbaarheid, bij -10 °C stierven 75-90% van de uredinia en bij -13 °C was <1% van de uredinia nog levensvatbaar.

Verder viel op dat, na plaatsing in de kas, er nog nieuwe uredinia bijkwamen die ook nog levensvatbaar waren. Blijkbaar overleeft zwarte roest zowel als reeds gevormde uredinia als latente infectie.

Bijlage 3 Genetische diversiteit en pathotypen (uitgebreid)

De genetische diversiteit van roest-schimmels is over het algemeen hoog, en houdt taxonomen en houdt fytopathologen die roest-schimmels bestuderen al lang bezig. Voor zwarte roest (*Puccinia graminis*) werden ergens begin vorige eeuw aanvankelijk zes *formae speciales* (*ff. sp.*, enkelvoud *f. sp.*) (fysiologische gespecialiseerde vormen) beschreven. Dit waren *tritici* (tarwe), *secalis* (rogge), *avenae* (haver), *agrostidis* (*Agrostis* sp., struisgrassen), *poae* (*Poa* sp., beemdgrassen) en *airae* (*Aira caespitosa*, ruwe smele. Later werd *epigaei* (*Calamagrostis* sp., struisriet) daar nog aan toegevoegd. Op dat moment was zwarte roest van doddengras (*Phleum* sp.) taxonomisch gezien nog een aparte soort (*Puccinia phlei-pratensis*) hoewel deze ook wel als *f. sp.* van *P. graminis* werd beschouwd (Leonard & Szabo, 2005).

(Johnson, 1949) voerde verschillende kruisingsexperimenten uit met de op dat moment beschreven vormen van *f. sp.* en kwam tot de conclusie dat de huidige indeling wellicht niet correct was. Hij baseerde zich hierbij op het meer of minder succesvol kunnen kruisen van verschillende *f. sp.* een methode die uitgaat van de aanname dat soorten die genetische gezien dichter bij elkaar staan beter kruisen. (Urban, 1967) splitste de hoofdsoort (*Puccinia graminis*) in de subsoorten voor granen (*Puccinia graminis* subsp. *graminis*) en gras (*Puccinia graminis* subsp. *graminicola*) zoals die nu nog gebruikt wordt op basis van waardplanten en morfologische kenmerken van met name de sporen. Later ontdekten (Zambino & Szabo, 1993) dat de DNA sequenties van de Internal Transcribed Spacer (ITS) regio's van het rDNA (ribosomaal DNA) identiek was voor sommige *f. sp.* die in verschillende subsoorten waren geplaatst. Uit hun werk kan ook worden afgeleid dat de *f. sp.* van raaigras en beemdgrassen nauwer verwant is aan de *f. sp.* van haver dan aan die van rogge en tarwe.

Meer recent heeft (WF Pfender, 2001a) onderzoek verricht naar de waardplantstatus van *Pgg*-isolaten afkomstig van Engels raaigras (*L. perenne*) of rietzwenkgras (*Festuca arundinaceae*). De resultaten voor normale of zwakke virulentie zijn hieronder weergegeven.

Tabel 1: Overzicht van aantasting van verschillende grasachtige planten door urediniosporen van isolaten van oftewel Engels raaigras of rietzwenkgras. Het verschil tussen normale en zwakke virulentie is gebaseerd op het aantal en de grootte van de gevormde uredinia. (-) betekent 'kwam niet voor'

Isolaat afkomstig van	Normaal virulent op (Latijnse naam)	Nederlandse naam	Zwak virulent op (Latijnse naam)	Nederlandse naam
<i>Lolium perenne</i>	<i>Lolium perenne</i>	Engels raaigras	<i>Festuca arundinaceae</i>	Rietzwenkgras
	<i>Dactylis glomerata</i>	Kropaar	<i>Festuca ovina</i> subsp. <i>hirtula</i>	Ruig schapengras
	<i>Lolium multiflorum</i>	Italiaans raaigras	<i>Poa annua</i>	Straatgras
	<i>Poa pratensis</i>	Veldbeemdgras	<i>Hordeum vulgare</i>	Gerst
	<i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	Rood zwenkgras	<i>Secale cereale</i>	Rogge
<i>Festuca arundinaceae</i>	<i>Festuca rubra</i> subsp. <i>commutata</i>	Kauwzwenkgras	-	-
	<i>Festuca arundinaceae</i>	Rietzwenkgras	-	-
	<i>Dactylis glomerata</i>	Kropaar	-	-
	<i>Lolium perenne</i>	Engels raaigras	-	-
	<i>Lolium multiflorum</i>	Italiaans raaigras	-	-
	<i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	Rood zwenkgras	-	-
	<i>Festuca rubra</i> subsp. <i>commutata</i>	Kauwzwenkgras	-	-

Urediniosporen van de isolaten afkomstig van rietzwenkgras (*F. arundinacae*) slaagden er niet in om nieuwe urediniosporen te vormen op planten van beemdgrassen (*Poa* sp.), rogge (*S. cereale*) of gerst (*H. vulgare*). Urediniosporen van de isolaten afkomstig van rietzwenkgras noch Engels raaigras (*L. perenne*) slaagden erin nieuwe urediniosporen te vormen op tarwe (*Triticum aestivum*) of haver (*Avena sativa*). Dus ondanks dat het werk van (Zambino & Szabo, 1993) aantoonde dat de *f. sp.* van raaigras en beemdgrassen nauwer verwant is aan de *f. sp.* van haver dan aan die van rogge en tarwe is haver in ieder geval niet in alle gevallen waardplant voor de *f. sp.* van raaigras en beemdgrassen.

Bovenstaande schijnbare tegenstrijdigheid in genetische eigenschappen en waardplantstatus lijkt te wijzen op het bestaan van specifieke pathotypen in de aantasting van *Pgg*. Het bestaan van pathotypen, waarvan sprake is als een gegeven isolaat met een bepaalde moleculaire opmaak op een specifieke waardplant een specifiek ziektebeeld geeft, is voor zwarte roest van grassen in het verleden slecht onderzocht. (Cagas) benoemt dit in 1975 al als een probleem, wat ook het veredelen van resistente grasrassen parten speelt. In het onderzoek wordt vastgesteld dat er verschillen zijn in de aantasting in zowel kwalitatieve (vindt infectie überhaupt plaats) als kwantitatieve zin (hoeveel uredinia worden er gevormd en hoe groot zijn deze). In onderzoek van (W. F. Pfender, 2009) worden urediniosporen afkomstig van een enkel uredinium gebruikt om genetisch diverse, vegetatief (dus klonaal) vermeerderde Engels raaigrasplanten te inoculeren. Het zeer diverse patroon van aantasting dat ontstaat noteert hij als bewijs dat pathotype specificiteit inderdaad bestaat in de zwarte roest – waardplant interacties.

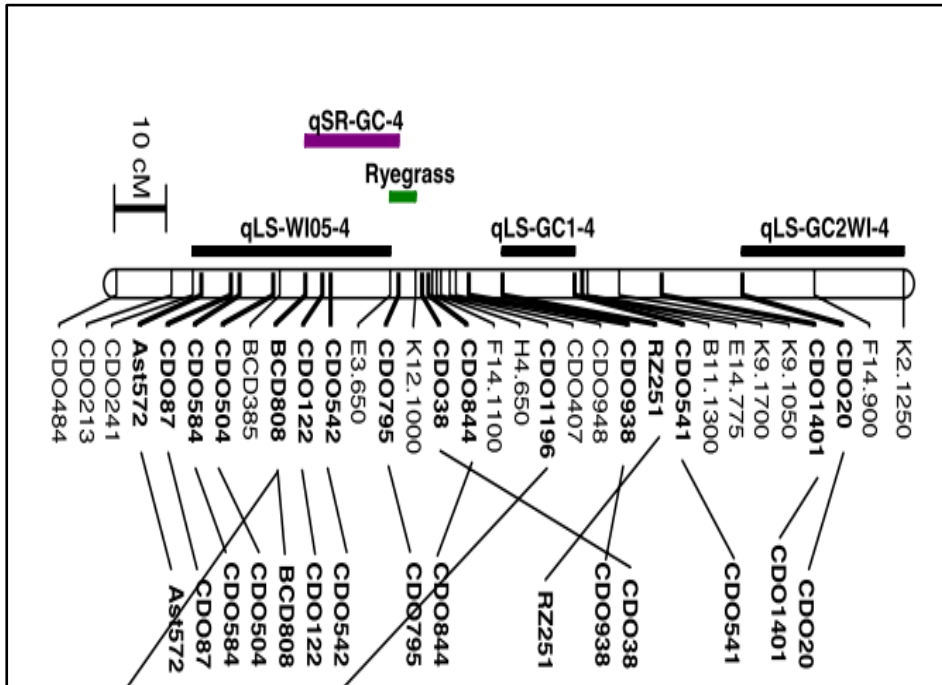
Bijlage 4 Identificatie van resistentiegenen

Het meeste onderzoek aan resistentiegenen en verschillen in vatbaarheid tussen rassen is uitgevoerd voor zwarte roest van granen, in het bijzonder zwarte roest van tarwe (*Puccinia graminis* subsp. *graminis* f. sp. *tritici*) vanwege het grotere economische belang. Afgaande op de onderzoeken van (Johnson, 1949; Zambino & Szabo, 1993) en (W. F. Pfender, 2009) is het allerminst zeker dat het werk verricht aan de zwarte roest van tarwe één op één vertaald kan worden naar zwarte roest van grassen, met de focus op Engels raaigras waar de problemen het grootst zijn.

(Cagas, 1975) merkte al op dat er weinig informatie beschikbaar was over resistentie in commerciële rassen van grassen. Hij stelde in zijn kruisbesmettingsproeven dat er duidelijke aanwijzingen waren voor pathotypen, wat later door (W. F. Pfender, 2009) werd bevestigd. (Rose-Fricker et al., 1986) onderzochten de overerving van veldresistentie in vier ouderlijnen van Engels raaigras. Deze veldresistentie werd gescoord aan de hand van het aantal uredinia en het percentage afsterfing. Zij bereikten een hoge mate van kunstmatige inoculatie (98%) en uit de resultaten bleek dat de ouderlijnen duidelijk verschilden in vatbaarheid, hoewel geen van hen volledig resistent was. Hun experiment had drie belangrijke uitkomsten: Een kruising van de twee minst vatbare ouderlijnen leverde gemiddeld een F₁-populatie op die vatbaarder was dan de ouders; een kruising van een licht vatbare ouderlijn met een matige of sterk vatbare ouderlijn leverde een F₁-populatie op met een verdeling van vatbaarheid die vrijwel normaal verdeeld was; kruisingen met in ieder geval één matig vatbare ouderlijn leverde F₁-populaties op die of duidelijk vatbaarder of minder vatbaar werden. Zij leidden hieruit af dat de vatbaarheid deels monogenetisch (via een enkel gen) en deels kwantitatief/additief (bijvoorbeeld via Quantitative Trait Loci, QTL's) overerfde. Bijkomend ontdekten zij dat vroege selectie op vatbaarheid voor zwarte roest lastig zou zijn, omdat sterk vatbare zaailingen met regelmaat licht vatbare volwassen planten opleverde en omgekeerd, een effect dat zij toeschreven aan de sterkte van de afweerreactie naarmate de inoculumdruk hoger werd.

Het vermoeden van kwantitatief overervende weerstand tegen zwarte roest werd bevestigd door (Jo et al., 2008) die de eerste QTL met weerstand tegen zwarte roest identificeerden. Zij gebruikten hiervoor een lijn met als ouders Italiaans raaigras (cv. Floregon) en Engels raaigras (cv. Manhattan). Er werd zowel een biotoets uitgevoerd met kunstmatige inoculatie in de kas als een genetische analyse op basis van markers voor Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) en Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Voor het bepalen van de weerstand van een bepaalde plant werd gekeken naar het aantal gevormde uredinia per plant. De resultaten van de biotoets toonden aan dat, zoals (Rose-Fricker et al., 1986) ook al had vastgesteld, de overerving van de weerstand tegen zwarte roest transgressief was. Dat wil zeggen dat het genotype van een gegeven populatie de neiging heeft te splitsen naar extremen van vatbaarheid of resistentie naarmate deze vaker gekruist worden.

De zogenaamde 'broad sense heritability' (een geschatte waarde voor welk deel van het fenotype bepaald wordt door het genotype) was 0.833, dus de weerstand tegen zwarte roest was in ieder geval voor de kasproef in hoge mate afhankelijk van het genotype. Er was geen correlatie tussen het tonen van weerstand tegen zwarte roest en het hebben van weerstand tegen enkele andere onderzochte ziekten: kroonroest (*Puccinia coronata*), gewone bladvlekkenziekte (*Bipolaris sorokiniana*) en grijze bladvlekkenziekte (*Magnaporthe oryzae*). De betreffende QTL die kwantitatieve weerstand gaf tegen zwarte roest (*qSR-GC-4*) bevindt zich in Linkage Group (LG) 4 (Afb. 5, links bovenin, blauwe balkje). De lengte van de QTL betrof 19 centiMorgan (cM), oftewel 1,9 miljoen baseparen.

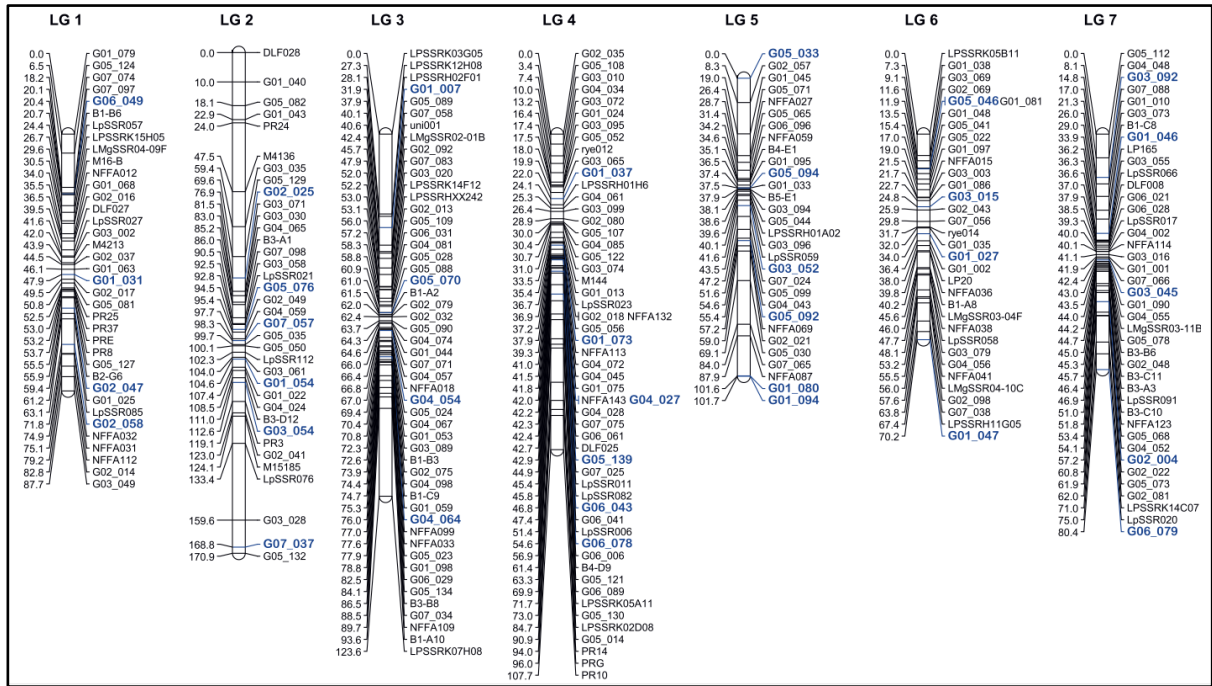


Afb. 5: Fysieke kaart van Linkage Group 4 met daarop aangegeven de verschillende QTL-regio's voor weerstand tegen enkele bladziekten (Jo et al., 2008)

In 2010 publiceerden (Studer et al., 2010) de eerste raaigras (*Lolium* spp.) brede 'Linkage map' (een kaart waarop de locaties van genen relatief t.o.v. elkaar liggen) op basis van acht door genetisch goed in kaart gebrachte populaties van Italiaans en Engels raaigras. Zij plaatsten daarna op deze kaart 284 Short Sequence Repeat (SSR) merkers (Afb. 6, volgende pagina). Hoewel deze kaart niet specifiek ingaat op resistentiegenen voor zwarte roest, zijn de merkers zeer bruikbaar om genen of QTL's aan te wijzen in genotypen als hun relatieve positie bekend is.

In hetzelfde jaar ontdekten (Beckmann et al., 2010) de eerste monogenetische resistentie in een populatie van Engels raaigras. Het gen *LpPg1* (LG 4) werd ontdekt in planten die als meest resistente uit veldproeven van 3 locaties in Duitsland kwamen (Freising, Zürich en Steinach). De planten waren afkomstig uit de LPSR1001-populatie en werden kunstmatig geïnoculeerd met genetisch diverse urediniosporen. Helaas kozen de onderzoekers ervoor de meest naastgelegen SSR-merkers geheim te houden.

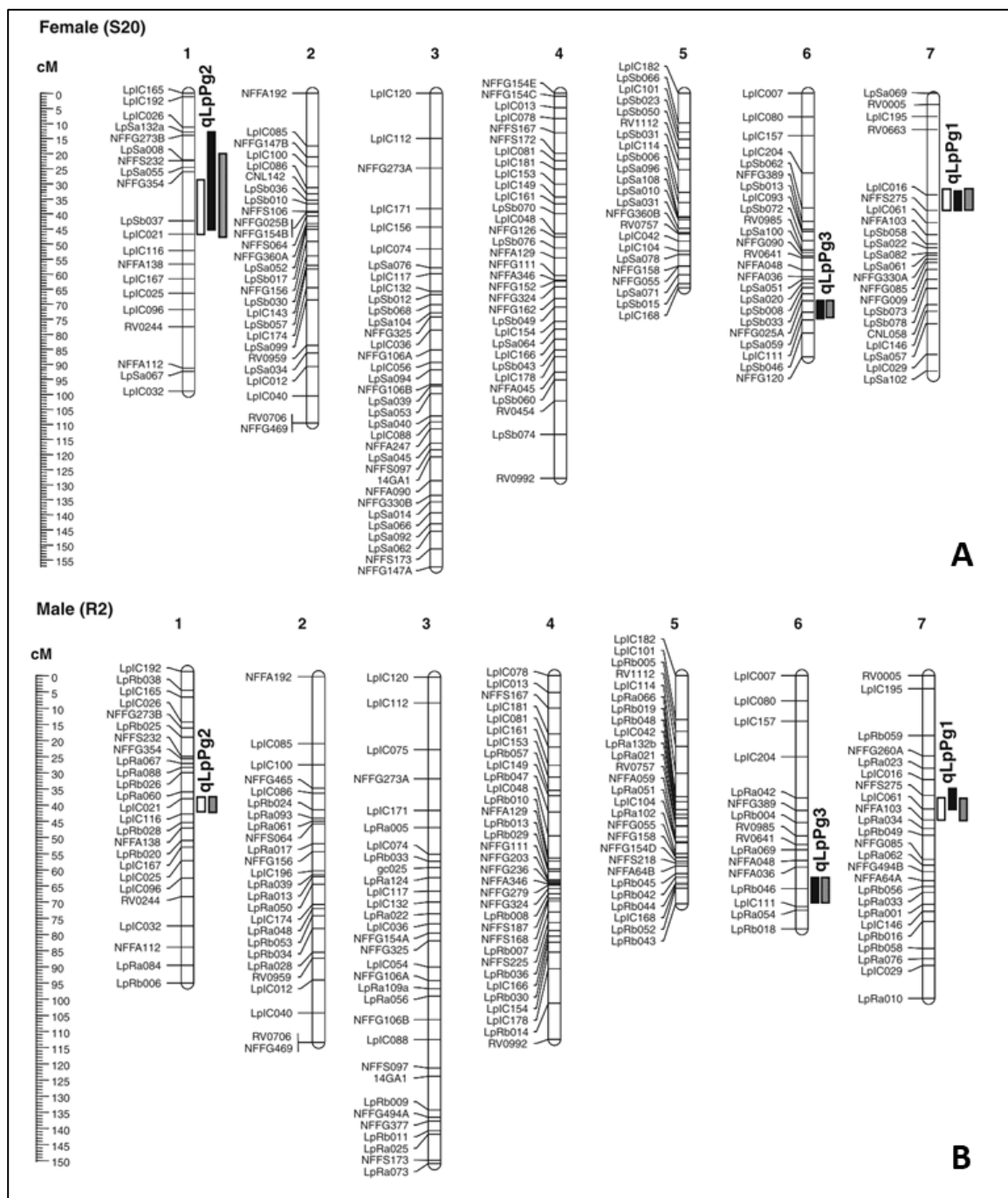
(WF Pfender et al., 2011) bouwde, ook op zoek naar QTL's, voort op het onderzoek van (Jo et al., 2008). Een onderscheidend punt van dit onderzoek was dat bij dit onderzoek van alle planten van de onderzochte populatie rassen waren van Engels raaigras (cv Kingston). Deze planten R2 (mannelijk) en S20 (vrouwelijk), die respectievelijk resistent en vatbaar waren, werden geselecteerd uit een populatie die besmet was met een genetisch divers inoculum van zwarte roest. Ook in dit onderzoek werd een biotoets uitgevoerd in de kas met kunstmatige besmetting naast het genetische werk. Het niveau van resistentie werd gemeten aan de hand van het aantal gevormde uredinia. Voor het bepalen van de fysieke locaties van de QTL's werd gebruikt gemaakt van Restriction site Associated DNA (RAD) merkers, oftewel merkers die de plaats in het DNA waar restrictie-enzymen een 'knip' maken flankeren. Daarnaast werd ook gezocht naar Single Nucleotide Polymorphism (SNP) merkers.



Afb. 6: Fysieke kaart van de chromosomen van raaigras (*Lolium spp.*) op basis van acht populaties met daarop aangegeven de locaties van 284 SSR-merkers (rechterkant chromosomen) en hun relatieve positie in centiMorgan (cM) (linkerkant chromosomen) (Studer et al., 2010)

Uit de resultaten van de biotoets kon worden geconcludeerd dat er sprake was van transgressieve overerving, zoals eerder gerapporteerd door (Rose-Fricker et al., 1986) en (Jo et al., 2008). De schattingen voor de broad sense heritability waren 0.780 en 0.750 respectievelijk, voor de twee malen dat de biotoets was uitgevoerd. Er werden drie nieuwe QTL's gevonden die gedeeltelijke weerstand gaven tegen zwarte roest, *qLpPg2* (LG 1), *qLpPg3* (LG 6) en *qLpPg1* (LG 7) (Afb. 7, volgende pagina).

Onderzoek naar het *LpPg1*-resistentiegen ontdekt door (Beckmann et al., 2010) werd pas jaren later weer opgepakt middels het onderzoek van (Bojahr et al., 2016). Zij gebruikten hier ook de LPSR1001-populatie voor, afkomstig van een kruising van de Engels raaigrasrassen 'Weigra' en 'Fennema'. Hier werd een combinatie van 'bulk segregant analysis' (het analyseren van genetisch materiaal van twee groepen individuen met tegenovergestelde eigenschappen, in dit geval vatbaar vs. resistent) met Next Generation Sequencing (NGS) analysemethoden van 'complementary' of 'copy' DNA (cDNA). Dit leverde 330 resistentie-specifieke SNP's op en 341 transcripties die alleen door resistentie planten gevormd waren. Van deze transcripties lagen er 30 in de buurt van het *LpPg1*-resistentiegen. Eén Exclusive Transcript in Resistant bulk (ETR) merker (*LpETR_18*, homologo van het RPP8-gen) co-segregeerde met het resistentiegen, en kon dus met hoge zekerheid gebruikt worden om het te herkennen. De ETR-merkers *LpETR_17* (homoloog van het RPM1-gen) en *LpETR_19* (homoloog van het RGA1-gen) flankerden het resistentiegen. Hun onderzoek beschrijft ook de functies van andere, kandidaat-resistentiegenen, maar het voert te ver deze hier allemaal te beschrijven. Hiervoor wordt verwezen naar de publicatie zelf.



Afb. 7: Fysieke kaart van de LG's en gevonden QTL's in het genotype van de geselecteerde planten met A) De vrouwelijke, meer vatbare plant en B) De mannelijke, meer resistente plant. De witte, zwarte en grijze balken geven respectievelijk de 1^e en 2^e analyses en de waarden van beide analyses samengevoegd weer. De verschillende merkers zijn links van de chromosomen weergegeven (Pfender., 2011)

Opvallend was dat *qLpPg1* (LG 7) in de onderzochte planten steeds afkomstig was van de mannelijke plant. De andere twee QTL's konden zowel van de vrouwelijke als de mannelijke plant overerven. *qLpPg1* (LG 7) bleek ook de meeste invloed te hebben op de variatie in weerstand tegen zwarte roest (26-37% van de variantie verklaard door de betreffende QTL). De overige twee verklaarden elk 6-12%. Het is niet met zekerheid te stellen waarom de vrouwelijke plant ondanks het hebben van de drie QTL's vatbaarder was. Dit kan zowel met verschillen binnen de QTL-regio's te maken hebben als met pathotype-specifieke interacties.

Correspondentie adres voor dit rapport:

Postbus 16
6700 AA Wageningen
T 0317 48 07 00
www.wur.nl/plant-research

Rapport WPR-3710481100

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.500 medewerkers (5.500 fte) en 12.500 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

