



Natuurlijke weerbaarheid tegen meeldauw

K Leiss, J Bac-Molenaar, E Hernandez Olesinski en M Noordam

Rapport WPR-1185



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



Glasuinbouw
Nederland
morgen groeit vandaag

Stichting
Kenniss in je Kas



TOPSECTOR
TUINBOUW & MITSANGSMATERIALEN



Royal
Flora
Holland

Referaat

Plantweerbaarheid vormt een belangrijk onderdeel van duurzame gewasbescherming. In dit project is de natuurlijke weerbaarheid tegen echte meeldauw, een economisch belangrijk ziekteprobleem in de glastuinbouw, onderzocht. Plantweerbaarheid is gebaseerd op morfologische eigenschappen zoals bladharen of waslagen op het blad. Daarnaast zijn planten rijk aan inhoudsstoffen, vooral aan secundaire metabolieten, welke betrokken zijn bij de afweer van planten tegen ziekten en plagen. Door vergelijking van vatbare en minder vatbare planten van dezelfde soort kunnen metabolietenpatronen, betrokken bij plantweerbaarheid, geïdentificeerd worden. Gerbera en roos zijn als modelgewassen voor dit onderzoek gebruikt. In gerbera zijn 4 chemische stoffen gevonden die aan weerbaarheid tegen meeldauw gerelateerd zijn in zowel jong als oud blad: gerberine, gerberinside, parasorboside en 5-hydroxyhexanolzuur. Hiervoor zijn in totaal 50 verschillende mini- en standaard rassen van verschillende herkomsten getoetst. Met deze stoffen is een voorspellend model gemaakt en gevalideerd. Met een nauwkeurigheid van 72% is het op basis van een metabolietenprofiel mogelijk de weerbaarheid van een gerberaras tegen meeldauw te voorspellen. Omdat er geen chemische verschillen zijn gevonden voor roos is besloten naar morfologische verschillen te kijken. Hiervoor is de compositie en sterkte van de waslaag van jong en oud blad onderzocht. Het jonge blad van meeldauw weerbare rassen vertoonde een uitgebreidere waslaag vergeleken met de meeldauw vatbare rassen. Vervolgens zijn er proeven uitgevoerd om de waslaag van vatbare rozenrassen te versterken. Dit is middels UV-B behandelingen gedaan. In vergelijking met de onbehandelde controle, welke sterke meeldauw aantasting liet zien, waren de UV-B behandelde planten vrij van meeldauw. Ook de bespuiting met was, was succesvol: bespuitingen met 2 % bijenwas (dierlijk was) of met 2 % carnaubawas (planten was) leidde tot significant minder meeldauw vergeleken met de onbehandelde controle.

Abstract

Plant resilience is an important part of sustainable crop protection. In this project, natural resilience to powdery mildew, an economically important disease problem in greenhouse horticulture, was investigated. Plant resilience is based on morphological properties such as leaf hairs or wax layers on the leaf. In addition, plants are rich in plant compounds, especially secondary metabolites that are involved in the defense of plants against diseases and pests. By comparing susceptible and less susceptible plants of the same species, metabolite patterns, involved in plant resilience, can be identified. Gerbera and rose were used as model crops for this research. In gerbera, 4 compounds have been found that are related to resistance to mildew in both young and old leaves: gerberin, gerberinside, parasorboside and 5-hydroxyhexanolzuur. For this purpose, a total of 50 different mini and standard varieties of different origins were tested. A predictive model, based on compounds, has been created and validated. With an accuracy of 72%, it is possible to predict the resilience of a gerbera variety to mildew on the basis of a metabolite profile. Because no chemical differences have been observed for roses, it was decided to look at morphological differences. For this purpose, the composition and strength of the wax layer of young and old leaves was investigated. The young leaves of mildew susceptible varieties showed a more extensive wax layer compared to the mildew susceptible varieties. Subsequently, tests were carried out to strengthen the wax layer of susceptible rose varieties. This has been done by means of UV-B treatments. Compared to the untreated control, which showed strong mildew infestation, the UV-B treated plants were free of mildew. The spraying with wax was also successful: spraying with 2 % beeswax (animal wax) or with 2 % carnauba wax (plant wax) led to significantly less mildew compared to the untreated control.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1185

DOI: <https://doi.org/10.18174/582000>

Projectnummer: 3742273200

Thema: Gewasbescherming

Dit project/onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Glastuinbouw Nederland, Stichting Kijk, Gewascoöperatie gerbera, Gewascoöperatie roos, en Coöperatie Royal Flora Holland.

Disclaimer

© 2022 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104. BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, 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 aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
2	Gerbera	9
2.1	Metabolomics basis data set van 4 gerbera rassen	9
2.1.1	Materiaal en Methoden	9
2.1.1.1	Extractie	9
2.1.1.2	NMR data acquisitie	9
2.1.1.3	NMR data analysis	9
2.2	Metabolomics uitgebreide dataset van 8 rassen	13
2.2.1	Materiaal en Methoden	13
2.2.2	Resultaten	14
2.3	Model voor de voorspelling van weerbaarheid tegen meeldauw	17
2.3.1	Materiaal en Methoden	17
2.3.2	Resultaten	17
2.4	Inductie van metabolieten gerelateerd aan weerbaarheid tegen meeldauw	19
2.4.1	Materiaal en Methoden elicitor basistoets	20
2.4.1.1	Elicitorbehandelingen en bio toetsen	20
2.4.1.2	Metabolomics	20
2.4.1.3	Genexpressie	20
2.4.2	Resultaten	21
2.4.3	Materiaal en Methoden elicitor vervolgtoets	24
2.4.4	Resultaten elicitor vervolgtoets	24
2.5	Discussie en conclusie gerbera	26
3	Roos	27
3.1	Metabolomics	27
3.1.1	Materiaal en Methoden	27
3.1.2	Resultaten	27
3.2	2 Morfologische kenmerken	30
3.2.1	Chemische compositie cuticula	30
3.2.1.1	Materiaal en methoden	30
3.2.1.2	Resultaten	31
3.2.2	Morfologische structuur cuticula	34
3.2.2.1	Materiaal en methoden	34
3.2.2.2	Resultaten	34
3.2.3	Versterking van de epicuticulaire waslaag	37
3.2.3.1	Behandeling met UV-B	37
3.3	Discussie en conclusie roos	41
4	Literatuur	43
	Bijlage 1 Gerbera rassen als validatiemodel	45

Samenvatting

Plantweerbaarheid kan constitutief zijn: het is genetisch gebaseerd en altijd aanwezig of het is geïnduceerd waardoor de weerbaarheid alleen ingeschakeld wordt op het moment dat de plant echt bedreigd wordt. Plantweerbaarheid is gebaseerd op morfologische eigenschappen zoals bladharen of waslagen op het blad. Daarnaast zijn planten rijk aan inhoudsstoffen, vooral aan secundaire metabolieten, welke betrokken zijn bij de afweer van planten tegen ziekten en plagen. Door vergelijking van vatbare en minder vatbare planten van dezelfde soort kunnen metabolietenpatronen, betrokken bij plantweerbaarheid, geïdentificeerd worden. Als de achterliggende kenmerken van de weerbaarheid bekend zijn kunnen deze op verschillende manieren in de gewasbescherming toegepast worden: verhoging van de weerbaarheid van vatbare rassen door teeltmaatregelen, ontwikkeling van markers voor plantweerbaarheid en externe toepassing als groen gewasbeschermingsmiddel. In dit project zijn de metabolietprofielen van gerbera en roos bekeken. Hiervoor zijn de profielen van meeldauwgevoelige- en weerbare rassen bekeken.

In gerbera zijn 4 chemische stoffen gevonden die aan weerbaarheid tegen meeldauw gerelateerd zijn in zowel jong als oud blad: gerberine, gerberinside, parasorboside en 5-hydroxyhexanolzuur. Hiervoor zijn in totaal 50 verschillende mini- en standaard rassen van verschillende herkomsten getoetst. Met deze stoffen is een voorspellend model gemaakt en gevalideerd. Met een nauwkeurigheid van 72% is het op basis van een metabolieten profiel mogelijk de weerbaarheid van een gerbera ras tegen meeldauw te voorspellen. Dit model levert de basis van een meeldauw resistentie verdelingsprogramma in gerbera. Vervolgens is gekeken of behandeling met elicitors (salicylzuur, jasmonzuur, Inssimo, FADO, Vacciplant) deze chemische stoffen in meeldauw vatbare gerbera rassen kon verhogen en meeldauw infectie verlagen. Inssimo en Vacciplant hadden een duidelijk remmend effect op meeldauw infectie, echter was er geen verhoging van de gerberine-achtige stoffen te observeren. Deze stoffen blijken dus constitutieve afweerstoffen te zijn die voornamelijk genetisch bepaald zijn en niet geïnduceerd kunnen worden.

De metabolietprofielen in roos lieten geen verschillen zien tussen meeldauw vatbare- en weerbare rassen in jong nog oud blad. Daarom is besloten naar morfologische verschillen te kijken. Hiervoor is de compositie en sterkte van de waslaag van jong en oud blad onderzocht. Onafhankelijk van de weerbaarheid leek jong blad meer waterafstotende was-gerelateerde stoffen te bevatten. Het jonge blad van meeldauw weerbare rassen vertoonde een uitgebreidere waslaag vergeleken met de meeldauw vatbare rassen. De waslaag metingen zijn oorspronkelijk met elektronenmicroscopische opnames gemaakt. Helaas zijn deze alleen voor onderzoek en relatief duur. Daarom is voor de telers een goedkope en robuuste manier ontwikkeld om de waslaag, middels de contacthoek van een vallende waterdruppel die op een bepaalde oppervlakte terechtkomt, te meten. Vervolgens zijn er proeven uitgevoerd om de waslaag van vatbare rozenrassen te versterken. Hiervoor is na een korte literatuurstudie samen met de partners voor UV-B behandelingen en wasbespuitingen gekozen. Planten zijn behandeld en daarna met meeldauw geïnfecteerd. Twee weken met 30 minuten 0.30 kJ/m²/dag UV-B per dag remde de meeldauwontwikkeling in een klimaatkamerproef volledig. In vergelijking met de onbehandelde controle, welke sterke meeldauw aantasting liet zien, waren de UV-B behandelde planten vrij van meeldauw. Een omzetting van deze eerste bemoedigende resultaten van de UV-B behandeling naar de kas is een nodige vervolgstap. Ook de bespuiting met was, was succesvol: bespuitingen met 2 % bijenwas (dierlijk was) of met 2 % carnaubawas (planten was) leidde tot significant minder meeldauw vergeleken met de onbehandelde controle. Toevoeging van de uitvloeier Silwet Gold aan carnaubawas versterkte het remmende effect en leidde tot meeldauw vrije planten. Op basis van deze resultaten is een 3 weken durende proef in een commerciële rozenkas uitgevoerd met verschillende concentraties carnaubawas (1, 2, en 4%) in combinatie met Silwet Gold. Planten zijn één keer per week behandeld. Meeldauwaantasting is een week voor en tijdens de proef wekelijks gemonitord. Ook hier lieten de wasbespuitingen al na een eerste behandeling een sterk effect op meeldauw aantasting zien, welke significant verminderde in relatie tot de meeldauwdruk in de nog niet behandelde week ervoor. Dit effect hield voor de hele proeftijd aan. Het effect was onafhankelijk van de gebruikte concentratie, dus 1% was net zo effectief in de meeldauw remming als 4% carnaubawas. Wellicht lieten eerste fotosynthesemetingen van enkele planten zien dat behandeling met carnaubawas tot lichte vermindering van fotosynthese in vergelijking met de controle kan leiden. Verder onderzoek is nodig om de frequentie van wasbespuiting te optimaliseren en de vermindering aan fotosynthese te minimaliseren.

1 Inleiding

Plantweerbaarheid vormt een belangrijk onderdeel van duurzame gewasbescherming. De verdere ontwikkeling en toepassing van duurzame gewasbescherming is cruciaal gezien de resistentie van plagen en ziekten tegen chemische gewasbeschermingsmiddelen en de nieuwe EU-regelgeving welke verschillende pesticiden in de ban doet. Daarnaast wil de sector de afhankelijkheid en de milieulast van gewasbeschermingsmiddelen duidelijk verlagen. In dit project wordt de natuurlijke weerbaarheid tegen echte meeldauw, een economisch belangrijk ziekteprobleem in de glastuinbouw, onderzocht. Laten wij van de natuur leren en onderzoeken welke morfologische- en chemische kenmerken achter de natuurlijke weerbaarheid zitten om deze vervolgens voor duurzame gewasbescherming van meeldauw in te zetten. Gerbera en roos dienen hierbij als modelgewassen.

Plantweerbaarheid kan constitutief zijn: het is genetisch gebaseerd en altijd aanwezig of het is geïnduceerd. In andere woorden, de weerbaarheid wordt alleen op het moment ingeschakeld dat de plant daadwerkelijk bedreigd wordt. Plantweerbaarheid is gebaseerd op morfologische kenmerken zoals bladharen of waslagen van het blad. Daarnaast zijn planten rijk aan inhoudsstoffen, vooral aan secundaire metabolieten welke betrokken zijn bij de afweer van planten tegen ziekten en plagen. Door vergelijking van vatbare en minder vatbare planten van dezelfde soort kunnen metabolieten patronen geïdentificeerd worden welke bij plantweerbaarheid betrokken zijn. Als de achterliggende kenmerken van de weerbaarheid bekend zijn kunnen deze op verschillende manieren in de gewasbescherming toegepast worden: verhoging van de weerbaarheid van vatbare rassen door teeltmaatregelen, ontwikkeling van markers voor plantweerbaarheid en externe toepassing als groen gewasbeschermingsmiddel. Oorspronkelijk is deze aanpak ontwikkeld om inhoudsstoffen te vinden die bij resistentie tegen trips betrokken zijn (Leiss *et al.* 2010; 2013). De aanpak is echter universeel en kan ook voor pathogenen gebruikt worden. Omdat echte meeldauw een biotrofe schimmel is, welke voor zijn voeding van de cel-inhoudsstoffen van zijn waardplant afhankelijk is, is de eco-metabolomics aanpak bij uitstek geschikt voor zo'n pathoegen.

Metabolomics gebruikt technieken om chemische patronen te relateren aan biologische vraagstukken en maakt de gelijktijdige detectie van een breed scala aan chemische stoffen mogelijk. Voor ons project is Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyse gebruikt. NMR-spectroscopie vergt relatief weinig monstervoorbereiding en kan chemische stoffen snel en reproduceerbaar identificeren en kwantificeren (Allwood *et al.* 2008; Verpoorte *et al.* 2008; Kim *et al.* 2010). In vergelijking met de meest voorkomende analytische metabolomics-technieken wordt NMR gekenmerkt door zijn hoge reproduceerbaarheid. Ook vereist NMR geen continue kalibratiecurve voor elke chemische verbinding die moet worden gekwantificeerd (Verpoorte *et al.* 2007). NMR is zeer geschikt voor high-throughput methodologie, inclusief de mogelijkheid van robotisering. Ondanks zijn lagere gevoeligheid worden de belangrijkste trends duidelijk (Verpoorte *et al.* 2007).

2 Gerbera

Voor identificatie van chemische stoffen die betrokken zijn bij de natuurlijke weerbaarheid tegen meeldauw in gerbera is eerst een set van 4 rassen met verschillende meeldauw gevoeligheden onderzocht. Vervolgens is deze set uitgebreid naar 12 rassen. Op basis van deze resultaten is een model gemaakt om aan de hand van de chemische NMR profielen van een gerbera ras zijn weerbaarheid tegen meeldauw te voorspellen. Vervolgens is dit model is gevalideerd met een set van onafhankelijke monsters van welke niet bekend was of deze meeldauw gevoelig waren of niet.

2.1 Metabolomics basis data set van 4 gerbera rassen

Voor een eerste analyse zijn in het voorjaar van 2019 4 verschillende gerbera rassen met verschillende gevoeligheden van echte meeldauw van de telers geselecteerd: Franky (Minigerbera, gevoelig); Evra (Minigerbera, minder gevoelig); Madeira (Standaard gerbera, gevoelig) en Snowking (Standaard gerbera, minder gevoelig). Van elk ras zijn 5 monsters jong en oud blad verzameld bij Schreurs, resulterend in 40 monsters. Bij verzameling zijn de monsters in vloeibare stikstof ingevroren en daarna gevriesdroogd om de chemische stoffen te bewaren.

2.1.1 Materiaal en Methoden

2.1.1.1 Extractie

Voor elk monster zijn 3 Gerbera bladeren gemalen en 50 mg van het fijne poeder werd onderworpen aan extractie in 50% deuterated methanol (MeOD) en D₂O, uitgevoerd volgens het standaardprotocol gepubliceerd door Kim *et al.* (2010). Het monster is overgebracht in een 1,5 ml eppendorf tube en aan elk monster werd 0,50 ml MeOD en 0,50 ml KH₂PO₄-buffer in D₂O (pH 6.0) met 0,01% TSP toegevoegd. Vervolgens zijn de monsters voor 1 minuut gemengd met een vortexoscillator, ultrasonicated voor 15 minuten en gecentrifugeerd bij 15.000 x g gedurende 10 minuten. Overtollig vloeistof werd overgebracht in een nieuwe microbuis en nog een keer gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 15.000 x g. In totaal werd 600 µl van de overtollige vloeistof overgebracht in een NMR-buis met een diameter van 5 mm.

2.1.1.2 NMR data acquisitie

NMR-spectra werden geregistreerd bij 298 K (25 °C) op een Bruker Avance III-spectrometer bij 500,23 MHz. Lock, tuning, topshim, 90° pulskalibratie en versterking werden gedaan door automatische tospin-routines. Elk ¹H NMR-experiment (*noesy1d-pulsprogramma*) met onderdrukking van het watersignaal bij 4,68 ppm werd verkregen op een tijdsdomein van 32 k reële datapunten met behulp van een spectrale breedte van 16 ppm, 128 scans, een ontspanningsvertraging van 1 seconde en een acquisitietijd van 4 seconden. Alle monsters werden automatisch verkregen en gekalibreerd volgens de interne standaard TSP bij 0 ppm, onder voorbehoud van een exponentiële apodisatie van 0,3 Hz een een nulvulling tot 64k. Fase- en basislijncorrectie werden uitgevoerd in de Mnova-softwareversie 14.1.0 met behulp van een Whitakker smoother algoritme. De parameters van 2D NMR-experimenten zoals J-resolved, COSY, HSQC en HMBC waren hetzelfde zoals beschreven door Kim *et al.* (2010).

2.1.1.3 NMR data analysis

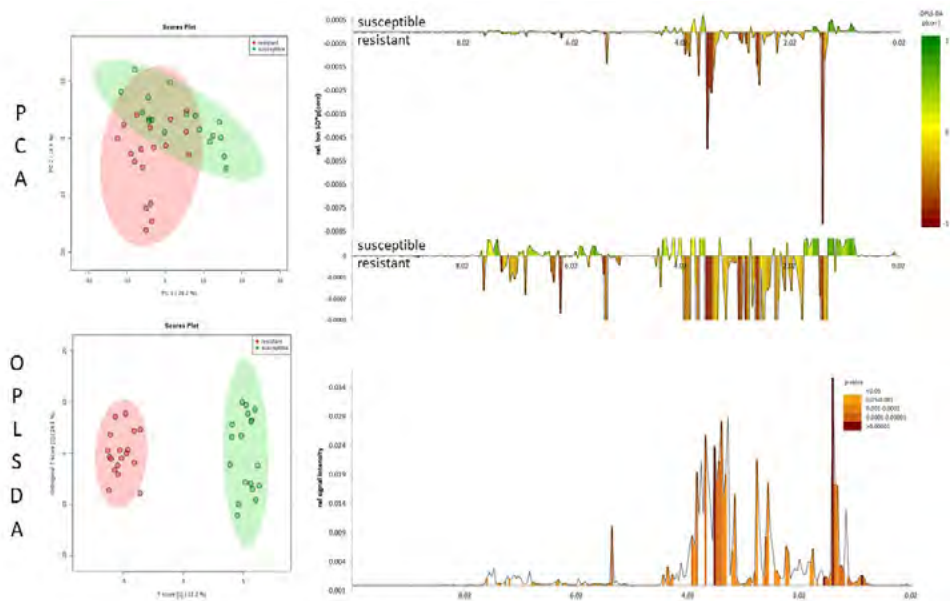
Het Noesy spectrum geeft ons de mogelijkheid om verbindingen te identificeren en te kwantificeren door protonschikking en piekintegratie door vergelijking met de referentiestandaard (TSP). De spectra werden verwerkt in Chenomx NMR suite 8.4-software om de metabolieten te identificeren met behulp van een database. 2D-experimenten (J-Res, COSY, TOCSY, HMBC en HSQC) werden gebruikt voor bevestiging of om onbekende pieken te identificeren.

Een tabel met 0,04 bins is samengesteld op basis van de som van de onbewerkte data.punten. Spectrale intensiteiten van $^1\text{H-NMR}$ spectra werden per som opgeschaald tot normalisatie en gereduceerd tot bins die overeenkomen met het gebied van δ -0,02- δ 8,50. Het gebied van δ 4,70- δ 5,00 is als restsignaal van water van de analyse uitgesloten. Multivariate statistische analyse werd uitgevoerd met behulp van Metaboanalyst online, na Probabilistic Quotient Normalization (PQN), logtransformatie en auto-scaling. Principal component analysis (PCA), Projection to Latent Structure-Discriminant Analysis (PLS-DA) en Orthogonal-Projection to Latent Structure-Discriminant Analysis (OrthoPLS-DA) werden uitgevoerd. Univariate statistische analyse met tweezijdige gepaarde t-tests werd uitgevoerd met een significantieniveau van $p \leq 0,05$.

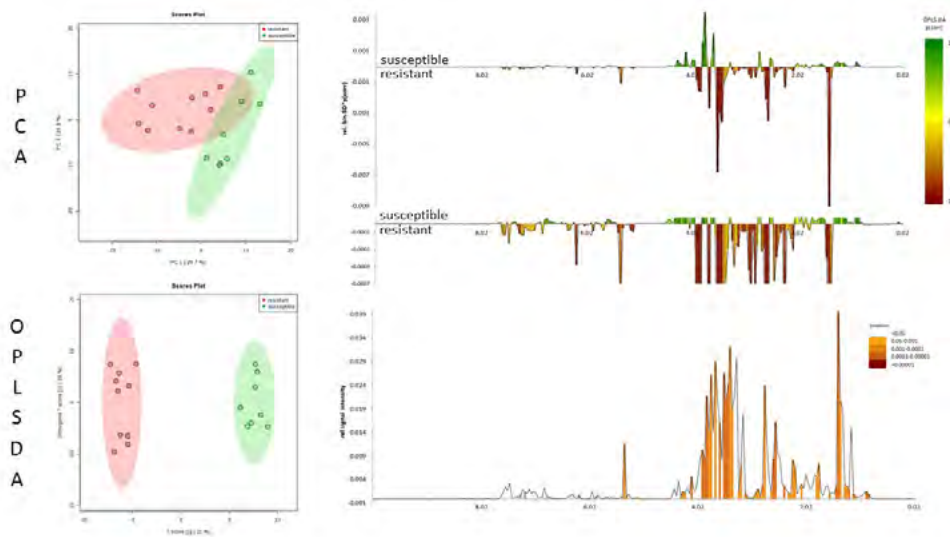
2.1.2 Resultaten

In alle 40 monsters werden de metaboliëprofielen van meeldauw resistente rassen met die van meeldauw gevoelige rassen vergeleken. Een principale componenten analyse (PCA) liet zien dat de eerste 2 hoofdcomponenten (PC) goed waren voor 45,8% van de totale variantie (29,2% en 16,6% voor PC1 en PC2) (Figuur 2.1A). Het PCA-model toont een goede scheiding over de horizontale as op PC1, welke het grootste deel van de variantie verklaart. Het PCA-model is ontworpen om uitschieters te identificeren en uit te sluiten voordat PLS-DA-modellen werden geconstrueerd welke met een klasse-identificatie werken. Vervolgens is partial least square discriminante analyse (PLS-DA) uitgevoerd (Figuur 2.1B). Het optimale PLS-DA-model werd gebouwd met slechts twee latente variabelen (LV) die goed zijn voor 28,8% van de variantie in x en 14,1% van de variantie in y . Modelvalidatie werd uitgevoerd op basis van de voorspellende capaciteit (goedheid van voorspelling) van het OPLS-DA-model met behulp van een kruisvalidatie waarbij de monsters willekeurig werden gesplitst naar trainings- en testdataset, met behulp van 100 permutaties. Dit leverde een R^2 waarde op van 0,97 en een Q^2 waarde van 0,81. De R^2 waarde beschrijft het percentage variatie welke door het model wordt verklaard en Q^2 toont het voorspellend vermogen van het model, waarbij waarden ≥ 0.5 een goed model representeren. P (corr) waarden gegenereerd door de OPLS-DA analyse werden geprojecteerd in grafieken welke de locatie van de pieken weergeeft als ook hun bijdrage aan de klassificatie voor meeldauw gevoeligheid, weergegeven door een kleurcode (Figuur 2.1C). Een paarwijze t-test is uitgevoerd op de bins en plots in de grafieken welke het gemiddelde spectrum aan de kleurcode als toekenning aan een meeldauwgevoelige of -ongevoelige klasse weergeven. (Figuur 2.1D). P-waarden $\leq 0,0001$ werden als significant beschouwd. Op deze manier zijn twee verschillende benaderingen gebruikt welke tot eenzelfde resultaat leiden.

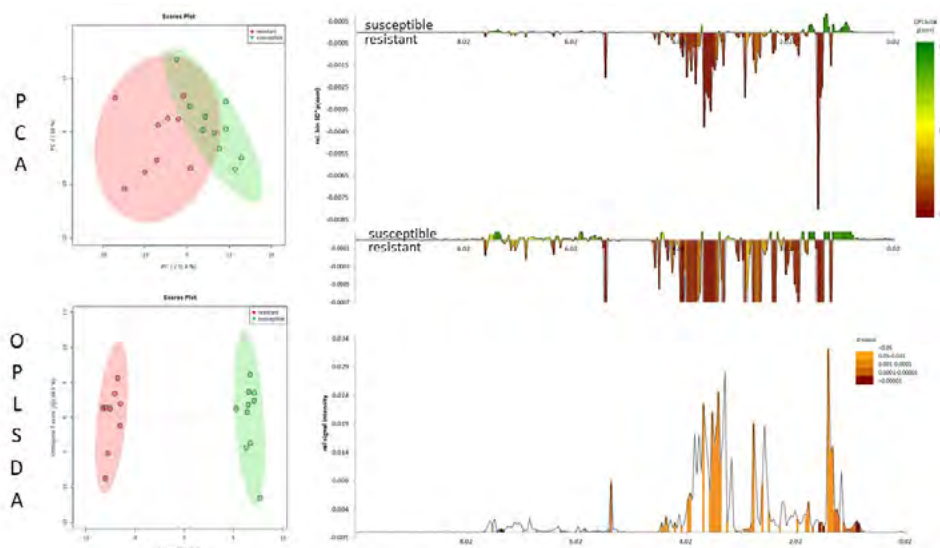
Beide benaderingen laten zien dat het profiel van chemische stoffen van de meeldauw gevoelige rassen heel verschillend is van het profiel van de minder gevoelige rassen (Figuren 2.1A,B). De groene- (meeldauwgevoelige rassen) en de rode cirkel (meeldauwresistente rassen) zijn duidelijk gescheiden. Ook zijn duidelijk significante pieksignalen aan de resistente rassen toe te schrijven die allen in mindere mate in de gevoelige rassen voorkomen (Figuren 2.1C,D). Deze duidelijke verschillen waren zowel in het jonge (Figuur 2.2) als ook het oude blad (Figuur 2.3) te zien.



Figuur 2.1 PCA-score plot (A), OPLS-DA score plot (B), spectrum loading plot kleurgecodeerd volgens $p(\text{corr})$ waarde (C) en spectrum kleurgecodeerd volgens p -waarde (D) in NMR extracten van jonge en oude gerbera bladeren (meeldauwgevoelig versus meeldauwresistent). Hoge statistische waarden van $Q^2 = 0,81$ en $R^2 = 0,97$ met behulp van 100-permutaties tonen een sterk OPLS-DA-model. Gevulde rode cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwresistente rassen, gevulde groene cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwgevoelige rassen. Gevulde rode stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwresistente rassen, gevulde groene stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwgevoelige rassen. Groen gekleurde bars zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Bruin gekleurde bars zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Oranje gekleurde balken staan voor p -waarden zoals getoond in de legende, waarbij $p \leq 0.05$ als significant beschouwd wordt.

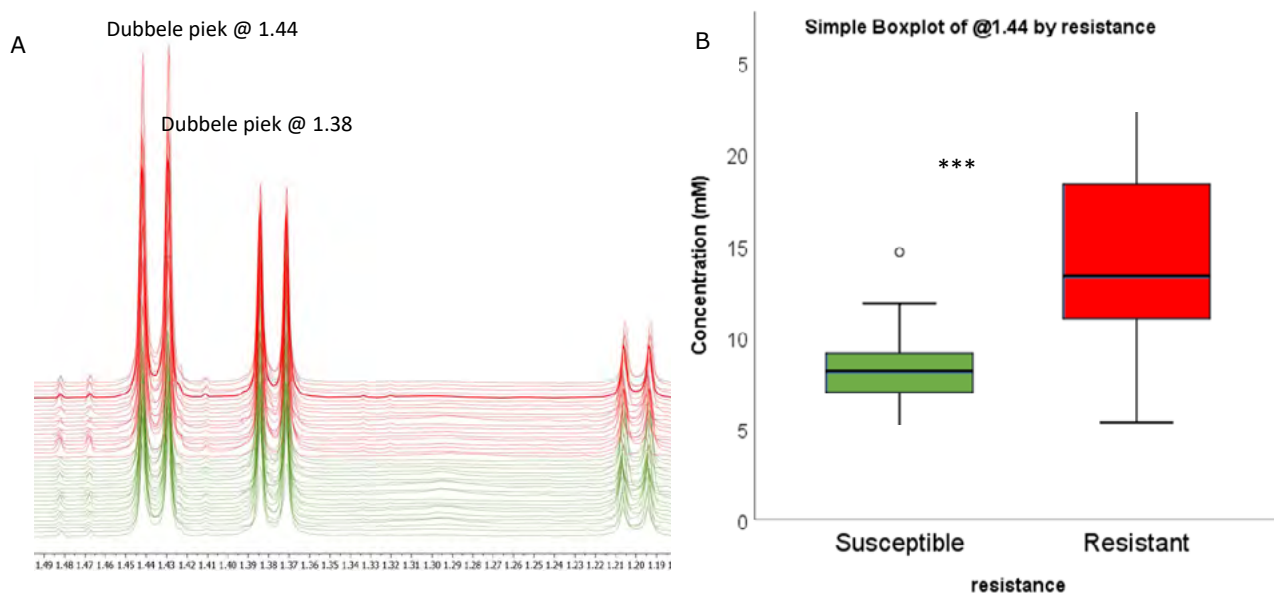


Figuur 2.2 PCA-score plot (A), OPLS-DA score plot (B), Spectrum loading plot kleurgecodeerd volgens $p(\text{corr})$ waarde (C) en spectrum kleurgecodeerd volgens p -waarde (D) in NMR extracten van jonge gerbera bladeren (meeldauwgevoelig versus meeldauwresistent). Hoge statistische waarden van $Q^2 = 0,81$ en $R^2 = 0,98$ met behulp van 100-permutaties tonen een sterk OPLS-DA-model. Gevulde rode cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwresistente rassen, gevulde groene cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwgevoelige rassen. Gevulde rode stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwresistente rassen, gevulde groene stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwgevoelige rassen. Groen gekleurde staven zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Bruin gekleurde staven zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Oranje gekleurde balken staan voor p -waarden zoals getoond in de legende waarbij $p \leq 0.05$ als significant beschouwd wordt.



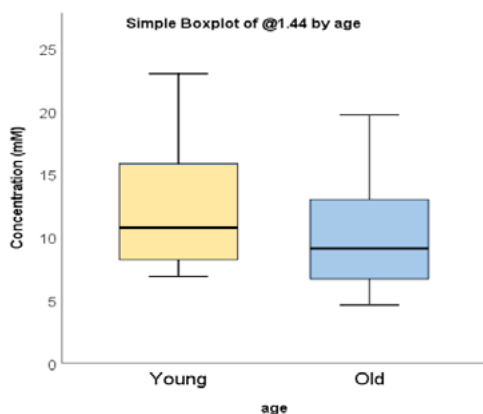
Figuur 2.3 PCA-score plot (A), OPLS-DA score plot (B), Spectrum loading plot kleurcodeerd volgens $p(\text{corr})$ waarde (C) en spectrum kleurcodeerd volgens p -waarde (D) NMR extracten van oude gerbera bladeren (meeldauwgevoelig versus meeldauwresistent). Hoge statistische waarden van $Q^2 = 0.72$ en $R^2 = 0.94$ met behulp van 100-permutaties tonen een sterk OPLS-DA-model. Gevulde rode cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwresistente rassen, gevulde groene cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwgevoelige rassen. Gevulde rode stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwresistente rassen, gevulde groene stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwgevoelige rassen. Groen gekleurde staven zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Bruin gekleurde staven zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Oranje gekleurde balken staan voor p -waarden zoals getoond in de legende waarbij $p \leq 0.05$ als significant beschouwd wordt.

In de 60 monsters zijn twee heel karakteristiek dubbele pieksignalen, welke in de meeldauwresistente rassen veel sterker waren gevonden (Figuur 2.4A). In NMR geeft de locatie van de pieken aan om wat voor een chemische stof het gaat en de hoogte van de pieken geeft de concentratie aan: hoe hoger de pieken hoe hoger de concentratie. Calculatie van de concentraties van de onderliggende chemische verbindingen van deze pieken laat duidelijk een significant hogere concentratie van deze stoffen in de meeldauwresistente rassen zien vergeleken met de meeldauwgevoelige rassen (Figuur 2.4B).



Figuur 2.4 Karakteristiek dubbele pieksignalen voor meeldauwresistente rassen (rode lijnen) in vergelijking to de vatbare rassen (groene lijnen) (A). Gemiddelde concentratie van de chemische stoffen gerelateerd aan deze signalen met standaardfout (B). Significantie is aangeven bij $p \leq 0.001$ aangegeven met ***.

Er zijn geen verschillen gevonden in de concentraties van deze metabolieten tussen jong en oud blad (Figuur 2.5).



Figuur 2.5 Concentratie van de chemische stoffen gerelateerd weerbaarheid tegen meeldauw in relatie tot jong (geel) en oud blad (blauw). Data zijn gemiddelden met standaardfout.

De dubbele pieken bij 1.44 zijn geïdentificeerd als gerberin en de pieken bij 1.38 als parasorboside. Beiden behoren tot de groep van glycosidische lactonen. Parasorboside wordt beschouwd als een voorloper van parasorbinezuur, de plantaardige vorm van het veelgebruikte conserveermiddel sorbinezuur (Koskela *et al.* 2011). Gerberine en parasorboside worden in alle weefsels van gerbera geproduceerd (Pietiäinen *et al.* 2016; Yrjinen *et al.* 2002) waarbij de hoogste concentraties van gerberine in de bloem en de hoogste concentraties van parasorboside in het blad voorkomen (Koskela *et al.* 2001). Wellicht variëren de concentraties tussen verschillende gerbera rassen (Koskela *et al.* 2001). Beide stoffen spelen een rol in de verdediging tegen ziekteverwekkers (Pietiäinen *et al.* 2016; Koskela *et al.* 2011; Koskela *et al.* 2001). Geberin remde de groei van *Botrytis cinerea*, *Heterobasidium annosum* en *Rhizoctonia solani* (Koskela *et al.* 2011). Gerbera planten waarin de synthese van gerberine en parasorboside door gebruik van antisense G2PS1 geremd was, vertoonden een verhoogde gevoeligheid voor *Botrytis* (Koskela *et al.* 2011). Daarnaast is aangetoond dat parasorboside voorkomt dat de schadelijke rupsen van de vlinder *Eurema hecabe mandarina* de planten nuttigen (Numata *et al.* 1990).

2.2 Metabolomics uitgebreide dataset van 8 rassen

Na de positieve resultaten van de eerste basis dataset zijn dezelfde rassen nog een keer geanalyseerd, maar deze keer bemonsterd in het najaar van 2019. Daarnaast is de dataset verder uitgebreid met 4 rassen die elk door twee verschillende telers zijn geleverd. De rassen verschillen in meeldauwgevoeligheid: Jumbo (Minigerbera, minder gevoelig) en Mokka (Minigerbera, gevoelig), als ook Passoa (Standaard gerbera, minder gevoelig) en Fahrenheit (Standaard gerbera, gevoelig). Van elk ras zijn 5 monsters jong- en oud blad bij Schreurs en het bedrijf van Ruud Batist genomen, resulterend in 80 monsters. Bij verzameling zijn de monsters in vloeibaar stikstof ingevroren en daarna gevriesdroogd om de chemische stoffen te bewaren.

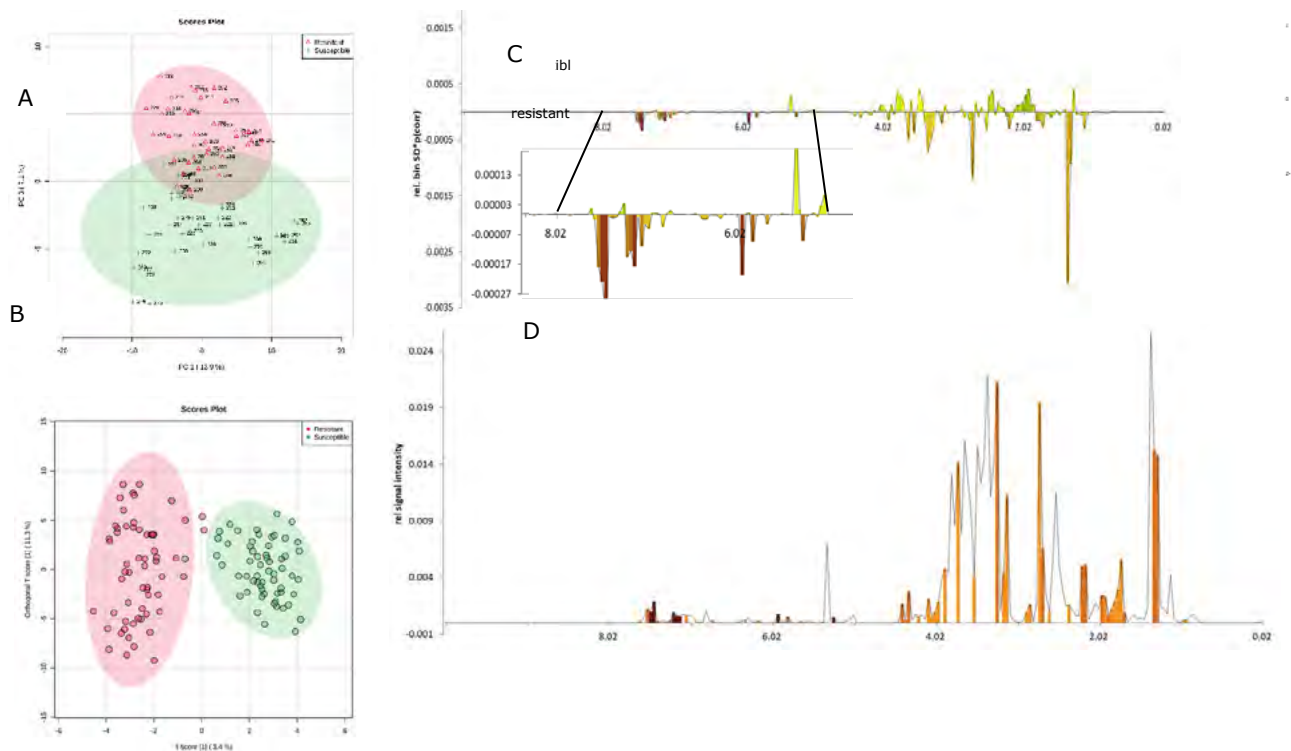
2.2.1 Materiaal en Methoden

Extractie, NMR data acquisitie en analyse zijn uitgevoerd zoals beschreven onder 2.1.1.

2.2.2 Resultaten

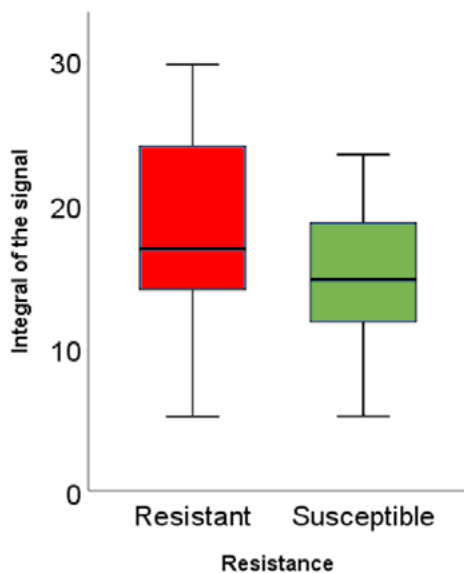
In alle 80 monsters werden de metabolietprofielen van meeldauwresistente rassen met die van meeldauwgevoelige rassen vergeleken. Omdat er zoals in de eerste dataset geen verschillen in jong en oud blad optraden zijn deze hier niet apart weergegeven maar als resultaat van de gemengde dataset van beiden. Een principale componenten analyse (PCA) liet zien dat de eerste 2 hoofdcomponenten (PC) goed waren voor 21% van de totale variantie (13.9% voor PC1 en 7.1% voor PC2) (Figuur 2.6A). Vervolgens is partieel least square discriminante analyse (PLS-DA) uitgevoerd. Het optimale PLS-DA-model werd gebouwd met slechts twee latente variabelen (LV) die goed zijn voor 10.8% van de variantie in x en 7.3% van de variantie in y (Figuur 2.6B). Modelvalidatie werd uitgevoerd op basis van de voorspellende capaciteit (goedheid van voorspelling) van het OPLS-DA-model met behulp van een kruisvalidatie waarbij de monsters willekeurig werden gesplitst naar trainings- en testdatasets, met behulp van 100 permutaties. Dit leverde een R^2 waarde op van 0,94 en een Q^2 waarde van 0,90.

Het profiel van chemische stoffen van de meeldauwgevoelige rassen is dus heel verschillend van het profiel van de minder gevoelige rassen (Figuur 2.6B). De groene- (meeldauwgevoelige rassen) en de rode cirkel (meeldauwresistente rassen) zijn duidelijk gescheiden. Ook zijn duidelijk significante pieksignalen aan de resistente rassen toe te schrijven die allen in mindere mate in de gevoelige rassen voorkomen (Figuren 2.6C, D).



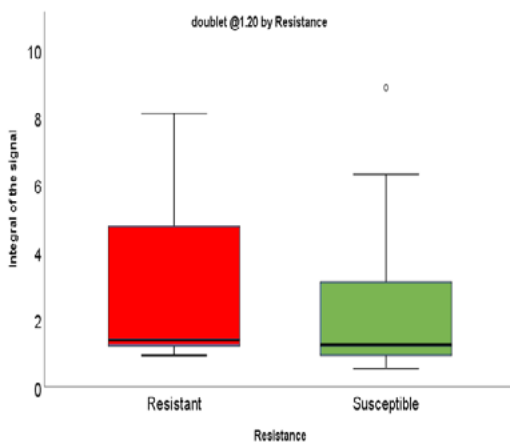
Figuur 2.6 PCA-score plot (A), OPLS-DA score plot (B), Spectrum loading plot kleurcodeerd volgens $p(\text{corr})$ waarde (C) en spectrum kleurcodeerd volgens p -waarde (D) in NMR extracten van oude gerbera bladeren (meeldauwgevoelig versus meeldauwresistent). Hoge statistische waarden van $Q^2 = 0.94$ en $R^2 = 0.90$ met behulp van 100-permutaties tonen een sterk OPLS-DA-model. Gevulde rode cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud- en jong blad van meeldauwresistente rassen, gevulde groene cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud- en jong blad van meeldauwgevoelige rassen. Gevulde rode stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwresistente rassen, gevulde groene stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwgevoelige rassen. Groen gekleurde balken zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Bruin gekleurde balken zijn kenmerkend voor meeldauwgevoelige rassen. Oranje gekleurde balken staan voor p -waarden gerelateerd aan de legende.

Ook in deze monsters was de concentratie van gerberine en parsoborside (Figuur 2.7) in de meeldauwresistente rassen significant hoger dan die van de meeldauw gevoelige rassen.



Figuur 2.7 Concentratie van de signalen gerelateerd aan gerberine (A) en parasorboside (B) in de meeldauwresistente rassen (rood) in vergelijking to de vatbare rassen (groen). Data zijn gemiddelden met standaardfout, significantie is aangegeven bij $p \leq 0.001$ aangegeven met ***.

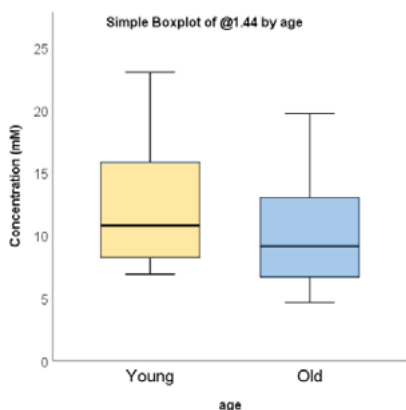
Naast deze twee signalen zijn er nog 2 nieuwe pieksignalen gerelateerd aan meeldauwresistentie gevonden: @1.20 en @7.54. De eerste is geïdentificeerd als gerberinside en de tweede als 5-hydroxyhexanolzuur. Voor beiden was de concentratie in de meeldauwresistente rassen hoger dan in de meeldauw gevoelige rassen (Figuur 2.8).



Figuur 2.8 Concentratie van de de signalen gerelateerd aan gerberinside (A) en 5-hydroxyhexanolzuur (B) in de meeldauwresistente rassen (rood) in vergelijking to de vatbare rassen (groen). Data zijn gemiddelden met standaardfout, significantie is aangegeven bij $p \leq 0.001$ aangegeven met *** en $p \leq 0.01$ aangegeven met **.

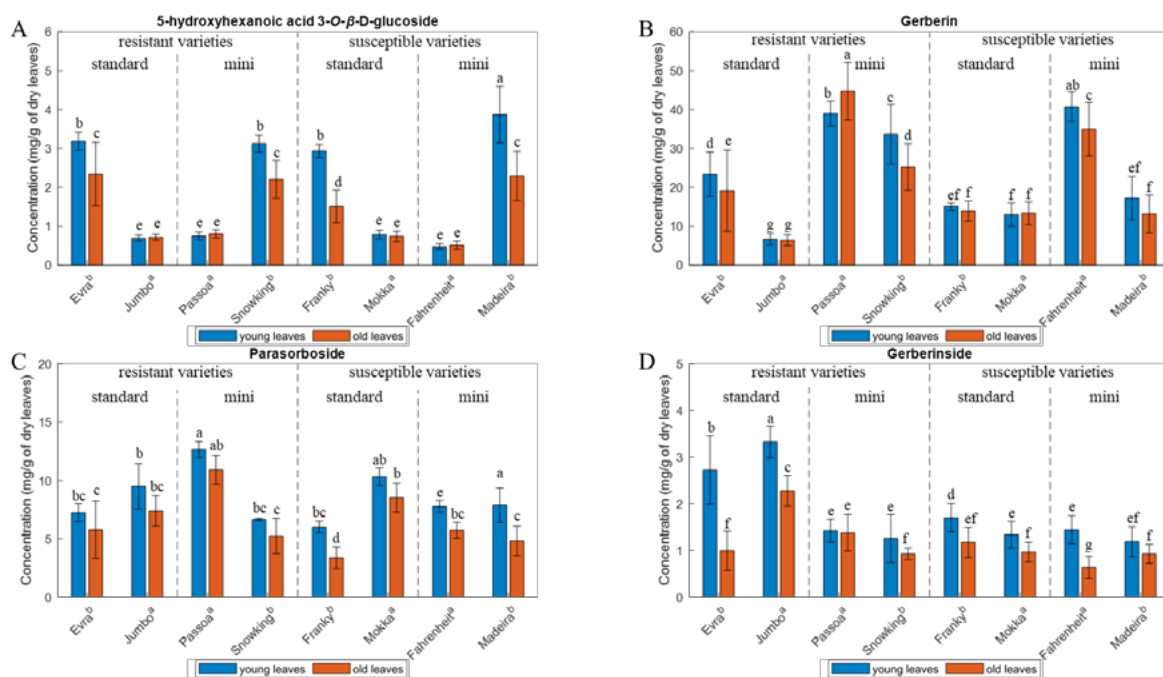
Gerberinside is verwant aan gerberine en zit in dezelfde synthese pathway (Pietiäinen *et al.* 2016). Gerberinside verbonden aan een suikermolecuul leek een sterk remmend effect op *Botrytis* en *Rhizocotonia* in *in-vitro* toetsen te hebben (Koskela *et al.* 2011). 5-hydroxyhexanolzuur is een organische zuur en er is tot nu toe niets verder over zijn functie bekend.

Er waren geen verschillen in de concentraties van de 4 chemische stoffen die gerelateerd waren aan weerbaarheid tegen meeldauw tussen jong- en oud blad (Figuur 2.9).



Figuur 2.9 Concentraties van 5-hydroxyhexanolzuur (A), gerberine (B), parasorboside (C) en gerberinside (D) in jong- (geel) en oud (blauw) blad. Data geven gemiddelden met standaardfout aan.

De data per ras laten wel zien dat er aanzienlijke variatie van de concentratie van deze 4 stoffen per ras optreden (Figuur 2.10). Als voorbeeld, het meeldauwresistente ras Jumbo bevat relatief weinig gerberin maar relatief veel parasorboside en gerberinside. Het meeldauwresistente ras Passoa bevat relatief veel gerberin en parasorboside maar relatief weinig gerberinside. Het blijkt dat naast de aanwezigheid van deze stoffen ook de concentratieverhoudingen een rol speelt voor weerbaarheid tegen meeldauw. Om dit wat duidelijker te krijgen is een beslisboom met de tweede datasets gebouwd. Deze geeft aan bij welke ratio aan chemische stoffen een ras weerbaar is tegen meeldauw en kan dus ook gebruikt worden om een voorspelling te maken van de weerbaarheid tegen meeldauw gebaseerd op een metabolietprofiel.



Figuur 2.10 Concentraties van 5-hydroxyhexanolzuur (A), gerberine (B), parasorboside (C) en gerberinside (D) in jong- (blauw) en oud (rood) blad van meeldauwresistente en -gevoelige rassen. Data geeft de gemiddelden met standaardfout aan. Significante verschillen tussen rassen zijn aangegeven met verschillende letters.

2.3 Model voor de voorspelling van weerbaarheid tegen meeldauw

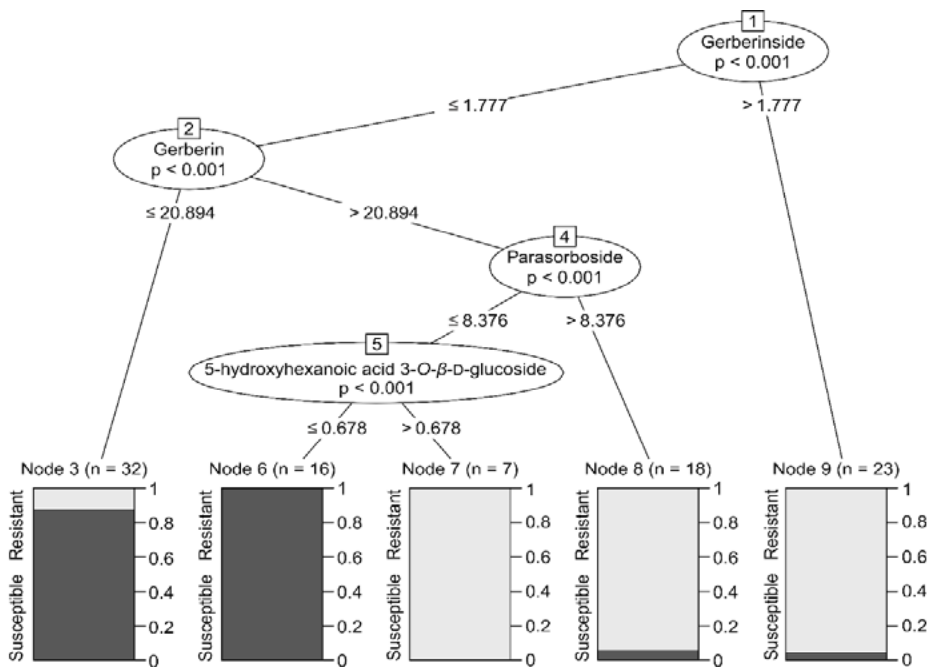
Op basis van de vier chemische stoffen, die gerelateerd zijn aan weerbaarheid tegen meeldauw, is een voorspellende beslissingsboom geconstrueerd. Beslisbomen zijn een van de meest populaire classificatiealgoritmen die momenteel gebruikt worden in datamining en machine learning. De algoritmen kunnen gemakkelijk omgaan met multi-class discriminatie en de geconstrueerde beslisboom heeft een structuur die gemakkelijk te begrijpen is als een stroomdiagram. De algoritmes zijn gebaseerd op een recursieve procedure die een opeenvolging van eenvoudige tests combineert (Kotsiantis, 2013). Elk monster werd alleen gekenmerkt door de concentraties van de vier chemische stoffen die gerelateerd zijn aan de weerbaarheid tegen meeldauw.

2.3.1 Materiaal en Methoden

De concentraties van gerberine, gerberinside, parasorboside en 5-hydroxyhexanolzuur zijn gebruikt om een voorwaardelijke interferentieboom in R (versie 4.0.0) te bouwen met de software Party (Hothorn *et al.* 2006). Van alle monsters werden 70% gebruikt voor training en de resterende 30% als testsubset. Nauwkeurigheid, gevoeligheid en specificiteit werden gebruikt om de prestaties van de beslisbomen te evalueren. Nauwkeurigheid is de algemene kans dat een monster correct wordt voorspeld. Gevoeligheid is de waarschijnlijkheid dat een resistent monster correct als resistent wordt voorspeld en specificiteit is de waarschijnlijkheid dat een gevoelig monster correct als gevoelig is geïdentificeerd.

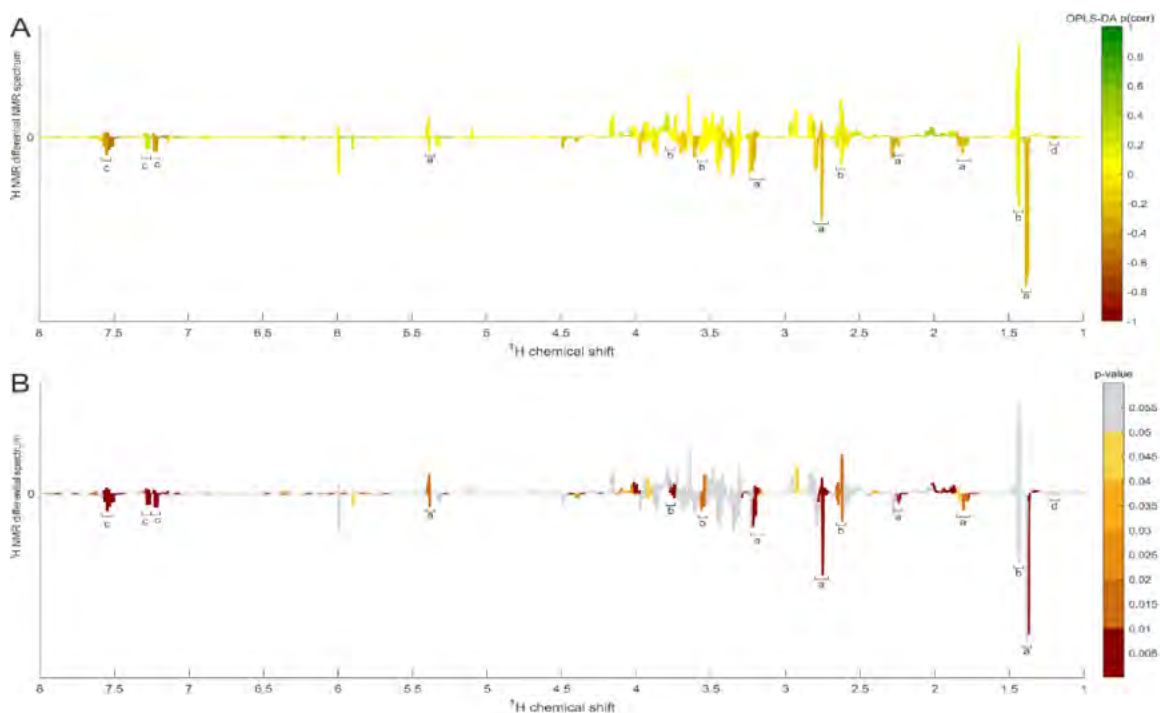
2.3.2 Resultaten

Het resulterend voorspellende model (Figuur 2.11) bereikte een nauwkeurigheid van 92,67%, een gevoeligheid van 90% en een specificiteit van 92,85%. Gerberinside was de belangrijkste chemische verbinding voor de klassendiscriminatie. Dus rassen met een hoge concentratie gerberinside (> 1.77) zijn altijd weerbaar tegen meeldauw. Het ras is ook weerbaar tegen meeldauw als de concentratie van gerberinside lager is (< 1.77) maar de concentraties aan gerberine (> 20.89) en parasorboside (> 8.37) hoger zijn. Als in dit geval de concentratie van parasorboside lager is (< 8.37) is de weerbaarheid afhankelijk van een hogere concentratie van 5-hydroxyhexanolzuur (> 0.67). Een lage concentratie van gerberinside (< 1.77) en een lage concentratie van gerberine (< 20.90) resulteert in een meeldauwgevoelig ras.



Figuur 2.11 Beslisboom met de concentraties (mg/g drooggewicht) van de geselecteerde metabolieten die verantwoordelijk zijn voor weerbaarheid tegen meeldauw op basis van de $1H$ NMR-spectra van gerberabladeren. De blokken geven de waarschijnlijkheid van weerbaarheid (grijs) en gevoeligheid (zwart) voor meeldauw aan.

Met een nauwkeurigheid van 93% bleek dit een uitstekend model. Wellicht is dezelfde dataset voor modellering en het testen van het model gebruikt. Om het model met een onafhankelijke dataset te evalueren is besloten een uitgebreide derde set aan monsters te verzamelen. Deze monsters zijn in het voorjaar van 2020 bij 3 verschillende telers verzameld (Schreurs, Ruud Batist en Barendse Gerberas) waarbij erop gelet is dat sommige gelijke rassen bij verschillende telers bemonsterd zijn als ook rassen uit de eerdere bemonsteringen nog een keer als positieve controle werden meegenomen. De bemonsterde rassen zijn in Appendix 1 weergegeven en omvatten 52 verschillende monsters. Met deze monsters is een NMR analyse gedaan zoals beschreven in 2.1.1. Dit resulteerde in metabolietprofielen in welke de vier chemische stoffen gerberine, gerberinside, parasorboside en 5-hydroxyhexanolzuur geïdentificeerd zijn (Figuur 2.12) en hun concentratie gemeten is.



Figuur 2.12 OPLS-DA (A) en *t*-test (B) coëfficiënt plot gebaseerd op NMR analyses van gerberabladeren. Parasorboside (a), gerberine (b), gerberinside (c) en 5-hydroxyhexanolzuur (d) worden getoond. Pieken in de negatieve richting zijn bij weerbaarheid tegen meeldauw betrokken. De kleurenbalk geeft de correlatie van de pieken met de voorspellende variatie (A) en statistieke *p*-waarde (B) aan waarbij waarden van ≤ 0.05 als significant beschouwd worden.

De concentraties aan gerberine, gerberinside, parasorboside en 5-hydroxyhexanolzuur zijn voor validatie in de beslisboom ingevoerd en resulteerden in een nauwkeurigheid van 56%, een sensitiviteit van 72% en een specificiteit van 44%. Het blijkt dat de algehele nauwkeurigheid minder was, wat toe te schrijven is aan een slechte voorspelling van de meeldauwgevoelige rassen met alleen 44% nauwkeurigheid. In tegenstelling tot de voorspelling van de meeldauwresistente rassen bij 72%. Dit betekent dat de weerbaarheid van rassen tegen meeldauw, gebaseerd op metabolietprofielen, in 72 van 100 rassen correct voorspeld kan worden. Dezelfde rassen bemonsterd bij verschillende telers zijn allen in dezelfde klasse voorspeld. De 4 rassen die al eerder gebruikt waren zijn allen correct als weerbaar of gevoelig voorspeld. De rassen die al in de eerste testset waren gebruikt, werden opgenomen in de validatieset.

2.4 Inductie van metabolieten gerelateerd aan weerbaarheid tegen meeldauw

Uit eerdere analyses van metabolieten van bladmonster uit de praktijk bleek dat gerberin en enkele afgeleide stoffen wel aanwezig zijn in gerbera rassen die minder gevoelig zijn voor echte meeldauw, maar afwezig zijn in gevoelige rassen. Het enzym verantwoordelijk voor de vorming van deze stoffen, 2-pyrone synthase 1, is zeer verwant aan het enzym calchone synthase dat heel algemeen in planten aanwezig is en wordt geïnduceerd als de plantafweer wordt getriggerd. In deze proef is daarom gekeken of het aanschakelen van de natuurlijke afweer in verschillende gerbera rassen (gevoelig en meer resistent) leidt tot verhoging van de plantweerbaarheid en of deze verhoging gepaard gaat met de inductie van gerberin.

2.4.1 Materiaal en Methoden elicitor basistoets

2.4.1.1 Elicitorbehandelingen en bio toetsen

Deze proef is uitgevoerd in het voorjaar van 2021 met 6 rassen van Schreurs: Pantani (resistent tegen meeldauw) (Bravia, Mokka en Madeira (gedeeltelijk gevoelig voor meeldauw, Pandora en Lido (heel gevoelig voor meeldauw)). We zijn gestart met planten die net beworteld waren. In de drie opeenvolgende weken zijn de planten bespoten met de volgende elicitorstoffen: Salicylzuur (2mM), Methyljasmonaat (1 mM, in 1% ethanol), BTH (product Inssimo 0,005%), COS-OGA (product FADO 250x verdund, met toevoeging van uitvloeier Hi-Wett), Laminarine (product Vacciplant 500x verdund) en een combinatie van Laminarine met *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713 (product Serenade, 75x verdund). Deze producten werden op de plant gespoten met een handspruit zodat elk blad bedekt was met druppels maar de vloeistof niet van de plant afliep. Als controle behandeling werd er water gespoten. Een week na de derde elicitor bespuiting werd van de rassen Bravia (gevoelig) en Lido (heel gevoelig) van 5 planten elk 1 volgroeid blad voor metabolomics analyse genomen alsook twee ponsen (4 mm doorsnede) van een volgroeid blad voor genexpressies. Deze zijn in een eppendorf tube direct in vloeibare stikstof geplaatst. Deze ponsen zijn gebruikt voor qPCR analyse. Ook werden per ras en per behandeling van 5 planten een deel van het jongst uitgevouwen blad voor een meeldauw bio toets gebruikt. Het bladdeel werd op agar gelegd (1% water-agar), en besproeid met sporensuspensie (10^5 sporen/ml; 0,22 ml per blad) van echte meeldauw. Na 13 dagen werd op elk blad het aantal meeldauwspots geteld en werd de meeldauwontwikkeling gescoord met de spencer-index index van 0 tot 5, waarbij 0 geen infectie en 5 een heel sterke infectie aangeeft. Op de dag dat de bladeren op de agar waren gelegd, werden ook alle planten in de kas bespoten met een sporensuspensie (10^5 sporen/ml) van echte meeldauw, waarna de RV werd verhoogd naar 90% voor 24 uur. De ontwikkeling van meeldauw op de planten werd over de tijd gevolgd. 16 en 27 dagen na inoculatie werd de meeldauw gescoord. 16 dagen na inoculatie werden de drie bladeren met de meeste meeldauw gescoord als percentage van het blad bedekt met meeldauw. Op dag 27 was de druk zo hoog dat de hele plant werd gescoord volgens de spencer index. De data zijn statistisch geanalyseerd met ANOVA.

2.4.1.2 Metabolomics

Extractie, NMR data acquisitie en analyse zijn uitgevoerd zoals beschreven onder 2.1.1. Gerberine, gerberinside, parasorboside en 5-hydroxyhexanolzuur zijn geïdentificeerd en hun concentratie is gemeten.

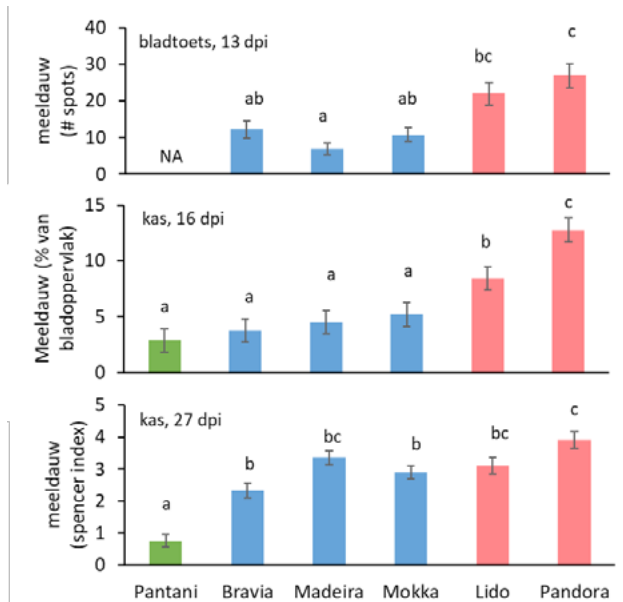
2.4.1.3 Genexpressie

Genexpressie van het gen 2-pyrone synthase 1 (G2PS1) is bepaald in planten van het ras Bravia en Lido die behandeld waren met Inssimo, Vacciplant of met water (controle). RNA-extractie is gedaan met de Qiagen Plantkit. Daarna is cDNA gemaakt met behulp van de Qiagen kit. qPCR is gedaan met SYBR Green met TaqPolymerase van Promega. Actine en GGAPDH zijn gebruikt als referentiegenen. De gebruikte primers waren:

	Gen		Sequentie (5'-3')
1	G2PS1	Forward	TGACGAGGTGAGGAAGAGATCTATG
1	G2PS1	Reverse	ATTGGCAACCGCAGCAGTAA
Referentie	GGAPDH	Forward	CCAGGAACCCAGAGGAGATACC
Referentie	GGAPDH	Reverse	GGAGCGGATATGATGACCTTCTTG
Referentie	Actin	Forward	AGGAAATCACTGCTCTTGCG
Referentie	Actin	Reverse	AACAAACTCAACCCTCCAAACC

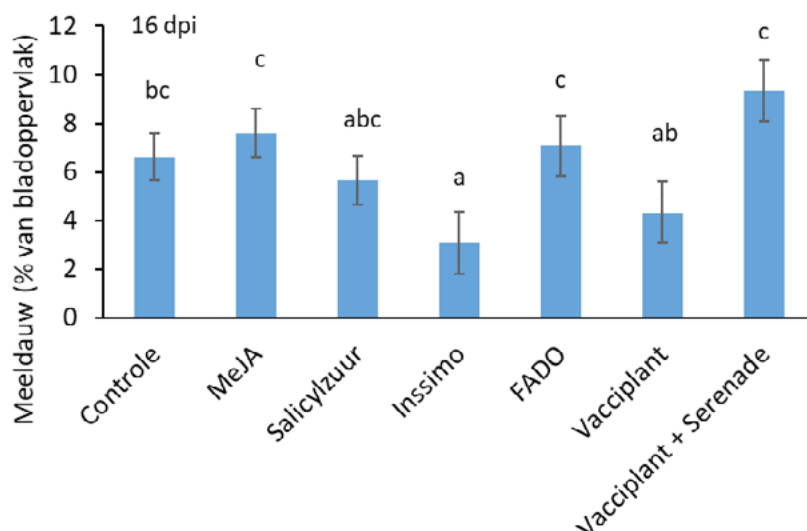
2.4.2 Resultaten

Er is een duidelijk verschil in gevoeligheid tussen de rassen (Figuur 2.13). Dit werd zowel duidelijk in de bladtoets als in de toets in de kas. Pantani is resistent, Bravia, Mokka en Madeira zijn minder gevoelig, Lido en Pandora zijn gevoelig. Bij het resistente ras vinden we bij lage (bladtoets en 16 dpi) en hoge meeldauwdruk (27 dpi) weinig meeldauw. Bij de rassen Lido en Pandora wordt al bij lage meeldauwdruk (bladtoets en 16 dpi) veel meeldauw gevonden. De minder gevoelige rassen hebben bij lage meeldauwdruk (bladtoets en 16 dpi) minder meeldauw dan de gevoelige rassen, maar op 27 dpi is de meeldauw aantasting niet meer verschillend van het gevoelige ras Lido.



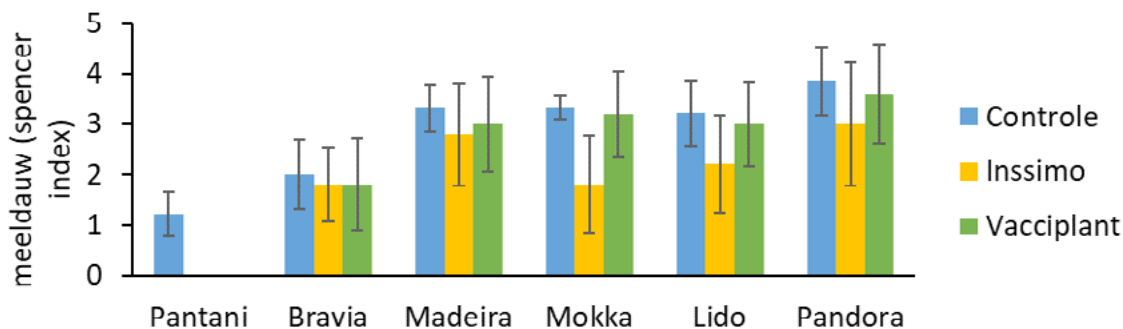
Figuur 2.13 Meeldauw score 16 en 27 dagen na inoculatie (dpi) per ras. Kleuren: groen = resistent, blauw = minder gevoelig, rood = gevoelig. In alle toetsen was er een significant verschil tussen rassen (Kruskal-Wallis test). De letters geven onderlinge toetsing van de rassen aan (pairwise comparison). Verschillende letters betekent dat de rassen onderling significant verschillen (er is gecorrigeerd voor multiple testing door middel van Bonferroni correctie).

We zien de duidelijkste verschillen tussen behandelingen bij de meting 16 dpi in de kas (Figuur 2.14). De behandeling met Inssimo resulteert in een verlaging van de meeldauwaantasting. Daarnaast is er een effect voor Vacciplant. Hier werd minder meeldauw gevonden dan bij de behandelingen methyljasmonaat (MeJA), FADO en Vacciplant + Serenade, maar dit effect was net niet significant in vergelijking met de controle planten.



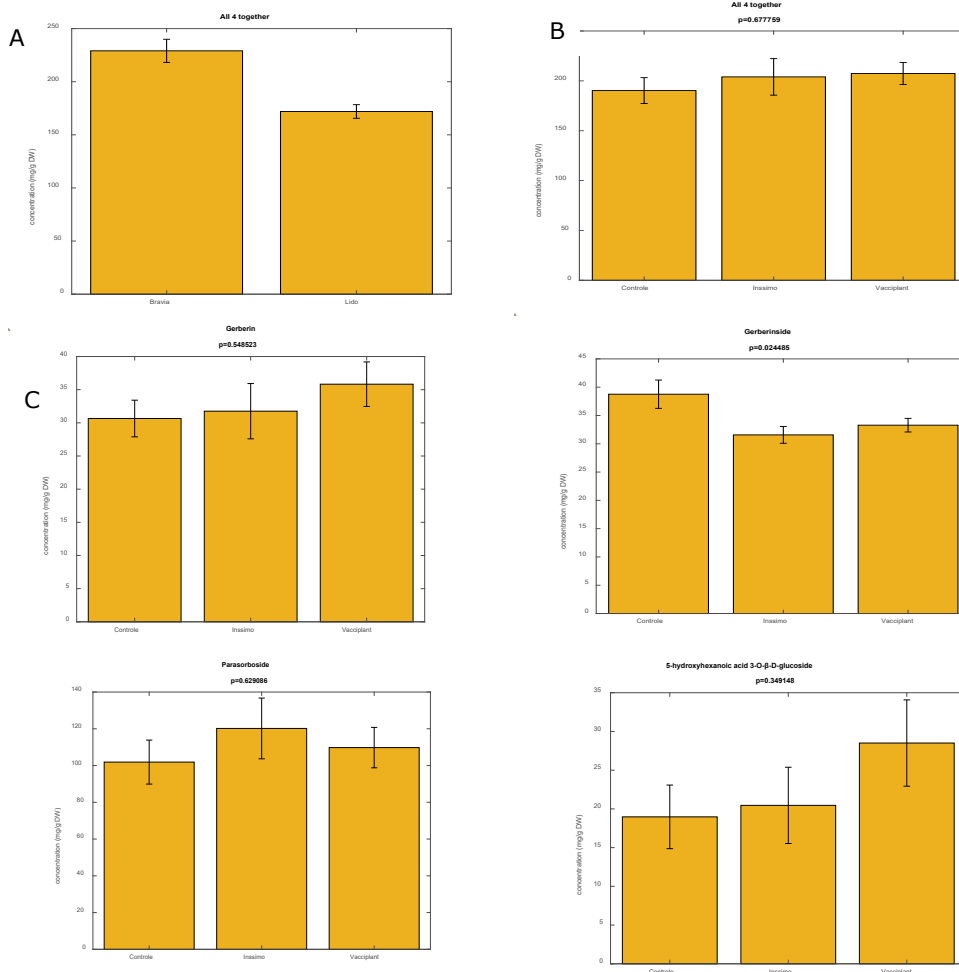
Figuur 2.14 Meeldauwaantasting per behandeling 16 dpi. Data zijn gemiddelden met standaardfout. Verschillende letters betekent dat de behandelingen onderling significant verschillen.

Wat opviel was dat het effect van Inssimo en Vacciplant niet significant was in de scoring 27 dpi. Dit lijkt te komen van een significante interactie tussen behandeling en ras. Sommige rassen reageerden wel op de behandeling maar anderen niet. Het effect van deze twee behandelingen was duidelijk te zien in het resistente ras Pantani wat in meeldauwvrije planten resulteerde. (Figuur 2.15). Verder was het effect van Inssimo ook te zien in de rassen Mokka en Lido. Dat we niet in alle rassen een effect vinden kan onder andere worden verklaard doordat we niet door zijn gegaan met de behandelingen na de inoculatie. Wellicht is de weerbaarheid door de behandelingen verhoogd, maar is dit effect weggeëbd in sommige rassen bij onze laatste metingen (5 weken na de laatste elicitor-behandeling).



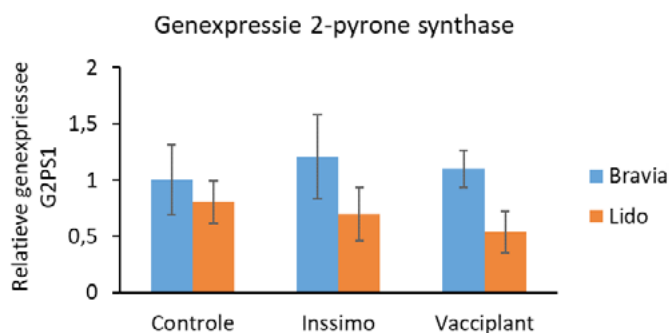
Figuur 2.15 Meeldauwaantasting per ras 27 dpi. Data zijn gemiddelden met standaardfout.

De concentraties van de chemische stoffen gerelateerd aan weerbaarheid tegen meeldauw laten een duidelijk hogere concentratie van deze stoffen in het minder gevoelige ras Bravia zien dan in het gevoelige ras Lido (Figuur 2.16A). De elicitorbehandelingen met Inssimo en Vacciplant tonen geen verhoging van de gemiddelde concentratie van alle vier de stoffen (Figuur 2.16B) noch van de individuele stoffen (Figuur 2.16C). Het blijkt dus dat deze stoffen constitutieve afweerstoffen zijn: ze zijn voornamelijk genetisch bepaald en kunnen niet geïnduceerd worden.



Figuur 2.16 Concentraties van de vier chemische stoffen samen die gerelateerd zijn aan weerbaarheid tegen meeldauw per ras (A), per elicitorbehandeling (B) en van de vier individuele stoffen per elicitorbehandeling (C). Data zijn gemiddelden met standaardfout.

Het gen 2-pyrone synthase 1 codeert voor een enzym dat zorgt voor de vorming van gerberin en afgeleide moleculen. Expressie van dit gen is bepaald in twee cultivars, Bravia en Lido. Expressie van G2PS1 is hoger in Bravia dan in Lido. Dit is in lijn met eerdere waarnemingen die minder gerberin en afgeleide stoffen vonden in gevoelige cultivars (onder andere Lido), dan in minder gevoelige cultivars (Bravia). Tussen de behandelingen zijn er geen verschillen gevonden (Figuur 2.17), wat aangeeft dat elicitors de chemische stoffen die bij weerbaarheid tegen meeldauw betrokken zijn niet kan verhogen. Dit bevestigt de resultaten van de NMR analyse.



Figuur 2.17 Genexpressie 2-pyrone synthase van het meeldauwgevoelige ras Lido en het weerbare ras Bravia. Data zijn gemiddelden met standaardfout.

Er is veel verschil in gevoeligheid tussen rassen. Alleen op het ras Pantani was weinig meeldauw te zien bij hoge meeldauwdruk. De rassen Bravura, Madeira en Mokka laten duidelijk minder meeldauwsymptomen zien bij lage meeldauwdruk, maar dit verschil verdwijnt bij hoge meeldauwdruk.

Inssimo verhoogt de weerbaarheid tegen meeldauw. Dit effect is te zien in zowel de gevoelige als minder gevoelige rassen en zelfs in het resistente ras. Het effect was het best zichtbaar bij lage meeldauwdruk. Ook Vacciplant leek een effect te hebben, maar die was net niet significant. Daarom is besloten het effect van Inssimo en Vacciplant te bevestigen in een vervolgproef.

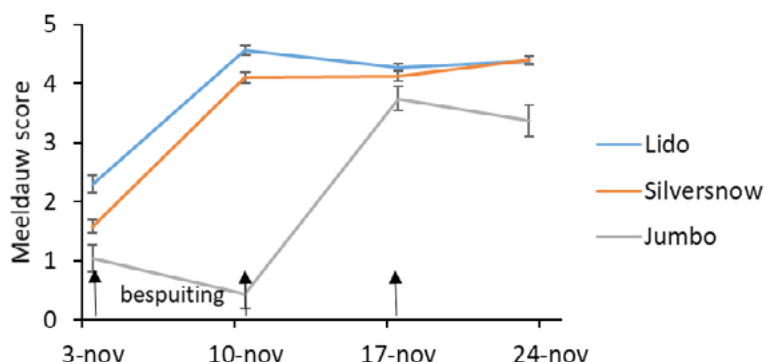
2.4.3 Materiaal en Methoden elicitor vervolgtoets

In het najaar 2021 is een vervolgtoets gedaan. We hebben in deze toets met minder rassen en minder behandelingen gewerkt, zodat er meer planten per ras per herhalingen waren. Hierdoor kunnen verschillen beter gevonden worden. In deze proef was de meeldauwdruk onverminderd hoog, omdat de planten die binnenkwamen al meeldauw infecties bleken te hebben.

In deze proef hebben we 2 rassen van Schreurs getoetst: Lido (heel gevoelig) en Silversnow (gevoelig). We zijn begonnen met planten die goed beworteld waren en de eerste bloemen aan het vormen waren. De planten zijn verdeeld over drie tafels, in groepjes van 5 planten per ras. In de drie opeenvolgende weken zijn per tafel 5 planten per ras, per behandeling bespoten en van de volgende elicitorstoffen: Salicylzuur (4mM), BTH (product Inssimo 0,005%), Laminarine (product Vacciplant 500x verdund) en sorbinezuur (0.1%). Deze producten werden op de plant gespoten met een handsprit, zodat op elk blad bedekt was met druppels, maar de vloeistof niet van de plant afliet. Als controle werden er ook planten niet behandeld en alleen met water bespoten. Direct na de eerste behandelingen en daarna wekelijks net voor de behandelingen werd de meeldauw gescoord in de drie jongst ontvouwen bladeren. Elk blad kreeg een score volgens de spencer index van 0 tot 5 waarbij 0 geen infectie en 5 een heel sterke infectie aangeeft. Naast de planten van het ras Lido en Silversnow waren er enkele planten van het ras Jumbo, dat minder gevoelig is voor meeldauw. Deze zijn ook over de tafels verdeeld en 8 planten zijn niet behandeld (controle) en 7 planten behandeld met Inssimo.

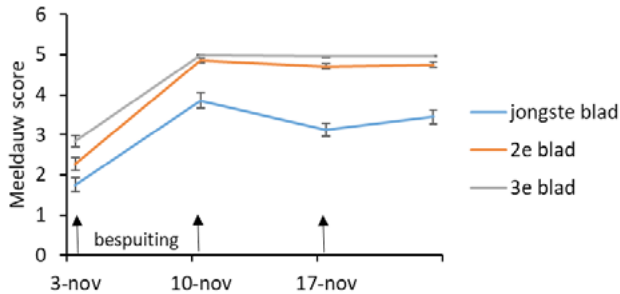
2.4.4 Resultaten elicitor vervolgtoets

De scoring van de meeldauw over tijd liet zien dat de meeldauwdruk een week na de eerste bespuiting al hoog was (Figuur 2.18). Toch komt duidelijk naar voren dat het ras Jumbo minder gevoelig is voor meeldauw dan de andere twee rassen.



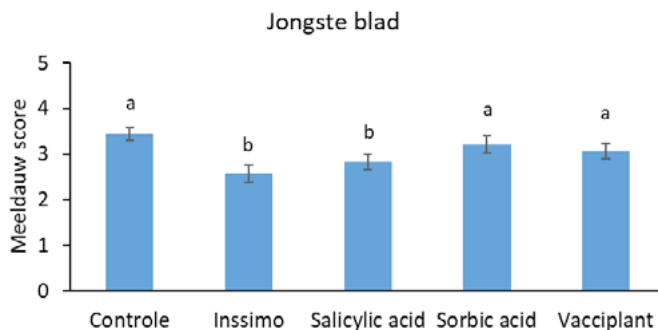
Figuur 2.18 Meeldauw score (spencer index) in vier opeenvolgende weken van het experiment. De scoring is telkens gedaan net voor de bespuiting met elicitors. De laatste beoordeling is een week na de laatste elicitor bespuiting.

De scoring is gedaan aan de 3 jongste uitgevouwen bladeren. Het jongste blad heeft altijd minder meeldauw dan de twee oudere bladeren (Figuur 2.19). Omdat de oudere bladeren voor het grootste deel meeldauwsymptomen laten zien die bij de hoogste meeldauwscores hoort (score 4 en 5) hebben we in de analyse gefocust op het jongste blad. De meeldauw die op het jongste blad met het oog zichtbaar is heeft zich de week voor de scoring ontwikkeld. Op dit blad zien we dus effect van de behandeling als dit een preventieve werking (via plantweerbaarheid) heeft.



Figuur 2.19 Meeldauw score (spencer index) in vier opeenvolgende weken van het experiment uitgesplitst in de 3 jongste uitgevouwen bladeren.

Als we de score op het jongste blad over de tijd vergelijken tussen de behandelingen, dan zien we kleine verschillen op elk moment dat we scoren in alle rassen. Bij analyse van de data van 10 november, 17 november en 23 november samen zien we dat behandeling met Inssimo en salicylzuur resulteert in statistisch lagere meeldauwaantasting (Figuur 2.20). Omdat BTH, de actieve component in Inssimo, een analoog is van salicylzuur verwachten wij hier eenzelfde effect te zien. Alhoewel dit effect in het voorjaar niet zo duidelijk te zien was.



Figuur 2.20 Gemiddelde meeldauw score (spencer index) van het jongste blad per behandeling. Kruskal-Wallis test tussen behandelingen: $p < 0.001$, letters op basis van onderlinge vergelijking gecorrigeerd voor multiple testing (Bonferroni correctie).

2.5 Discussie en conclusie gerbera

Met NMR-gebaseerde metabolomics was het mogelijk plantmetabolieten te detecteren die betrokken zijn bij resistentie tegen echte meeldauw in gerbera. Op basis van de inhoud van gerberine, parasorboside, gerberinside en 5-hydroxyhexanolzuur werd een model voor de voorspelling van weerbaarheid tegen echte meeldauw ontwikkeld. Dit model is gevalideerd met 52 onafhankelijke monsters en met 72% nauwkeurigheid is hiermee de weerbaarheid tegen meeldauw op basis van een gerbera metabolietprofiel te voorspellen. Hiermee is een waardevolle screeningstool voor de veredeling van weerbaarheid tegen meeldauw ontwikkeld welke in veredelingsprogramma's zou kunnen worden opgenomen en verder worden ontwikkeld. Screeningsprogramma's op basis van metabolietprofielen zouden ingezet kunnen worden om op weerbaarheid tegen meeldauw te kunnen selecteren. Nu moeten hiervoor tijdrovende en kostbare biotoetsen ingezet worden. NMR metabolomics is tot nu toe hoofdzakelijk een methode die in het onderzoek gebruikt wordt en die minder commercieel en op grotere schaal ingezet wordt omdat voor de interpretatie van data tamelijk specialistische kennis nodig is. Wellicht gaat de ontwikkeling op dit gebied steeds meer naar opslag van profielen in (openbare) databanken en zal dit een grootschaliger gebruik ondersteunen. Inductie van deze weerbaarheidsgerelateerde stoffen door gebruik van elictoren was niet mogelijk, wat aangeeft dat deze stoffen voornamelijk genetisch bepaald zijn. Als volgende stap dient dus de overerving van deze stoffen onderzocht te worden om als alternatief voor de screening van metabolietprofielen genetische markers voor de meeldauw gerelateerde stoffen te ontwikkelen. Alhoewel deze stoffen in de meeldauw gevoelige gerbera rassen niet door toepassing van elictors verhoogd konden worden, lieten de behandelingen met de elictors Inissimo en Vacciplant, beiden geregistreerde producten, een duidelijke vermindering van meeldauw zien. Welke stoffen hierdoor geïnduceerd zijn is in dit project niet verder onderzocht, maar deze kennis zou van waarde zijn voor verder onderzoek naar inductie van afweerbaarheid tegen meeldauw.

3 Roos

Voor identificatie van chemische stoffen die betrokken zijn bij natuurlijke weerbaarheid tegen meeldauw in roos is een set van 12 rassen met verschillende meeldauwgevoeligheden onderzocht. Vatbaarheid tegen meeldauw was van de telers (Schreurs en van den Berg) aangegeven als: Angelina, Trevi, white Naomi, red Naomi, Avalanche, Aqua, Illios als gevoelig en Savannah, Anna Karina, Jumilia, Mylena, Sansa en Leila als weerbaar. Avalanche en Jumilia zijn bij beide telers bemonsterd.

3.1 Metabolomics

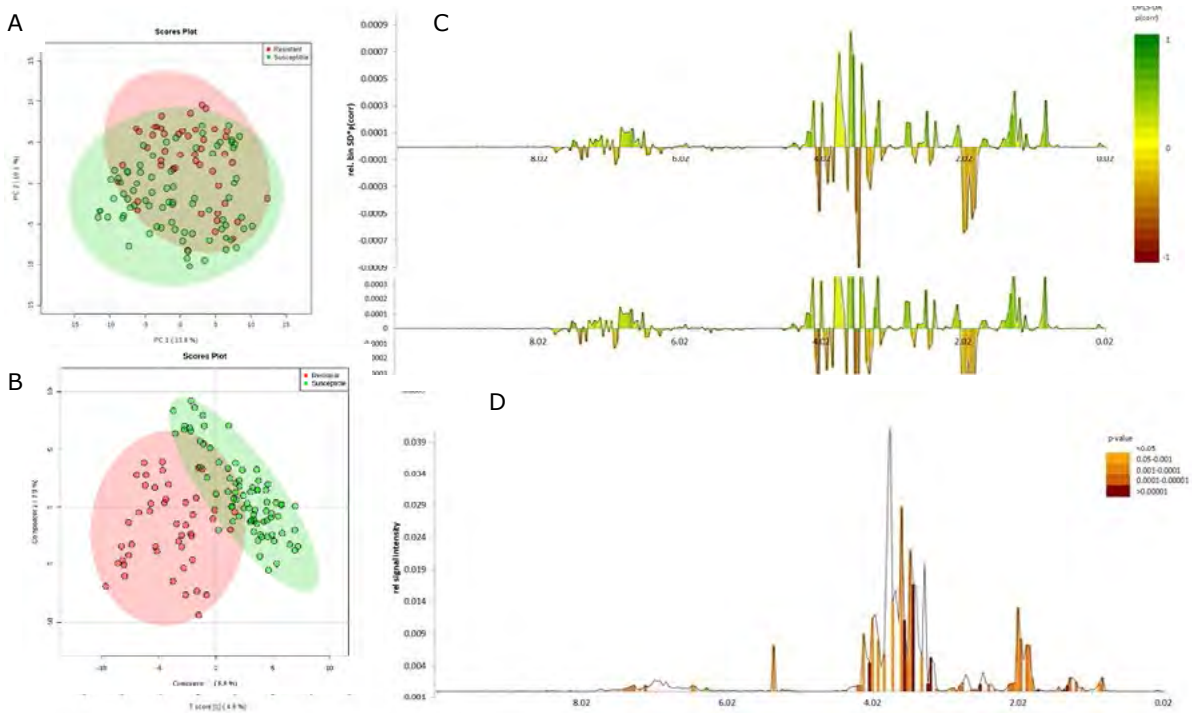
3.1.1 Materiaal en Methoden

Extractie, NMR data acquisitie en analyse zijn uitgevoerd zoals beschreven onder 2.1.1.

Van elk ras zijn 5 monsters elk van jong en oud blad per ras verzameld, resulterend in 140 monsters. Bij verzameling zijn de monsters in vloeibaar stikstof ingevroren en daarna gevriesdroogd om de chemische stoffen te bewaren.

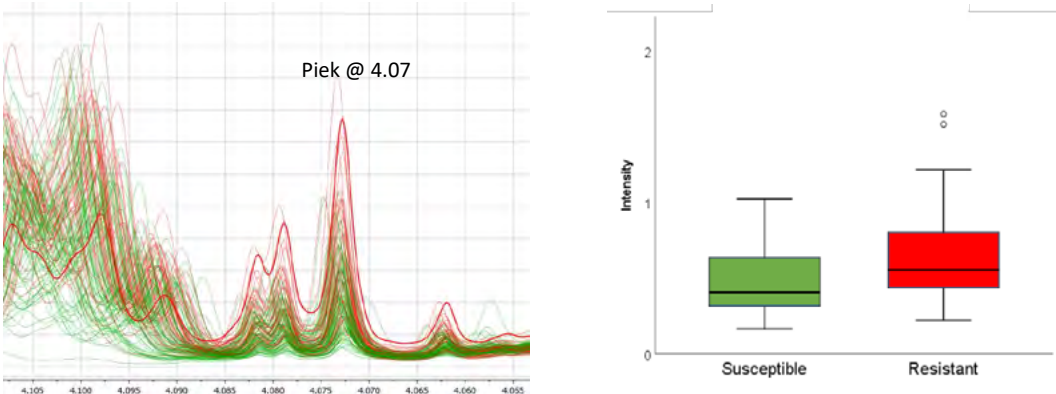
3.1.2 Resultaten

In alle 140 monsters werden de metabolietenprofielen van meeldauwresistente rassen met die van meeldauwgevoelige rassen vergeleken. Een principale componenten analyse (PCA) liet zien dat de eerste 2 hoofdcomponenten (PC) goed waren voor 45.8% van de totale variantie, 16.6% voor PC2 en 29.2% voor PC2 (Figuur 3.1A). Vervolgens is partieel least square discriminante analyse (PLS-DA) uitgevoerd. Het optimale PLS-DA-model werd gebouwd met slechts twee latente variabelen (LV) die goed zijn voor 24.9% van de variantie in x en 16.8% van de variantie in y (Figuur 3.1B). Modelvalidatie werd uitgevoerd op basis van de voorspellende capaciteit (goedheid van voorspelling) van het OPLS-DA-model met behulp van een kruisvalidatie waarbij de monsters willekeurig werden gesplitst naar trainings- en testdatasets, met behulp van 100 permutaties. Dit leverde een R^2 waarde op van 0,65 en een Q^2 waarde van 0,49. Daarmee was dit geen goed model, zoals te zien is in de overlappende rode- (meeldauw weerbaar) en groene (meeldauwgevoelig) cirkels. Dit geeft aan dat er geen grote verschillen zijn in de profielen van chemische stoffen tussen meeldauwgevoelige en -weerbare rassen. Er zijn een paar significante pieksignalen aan de resistente rassen toe te schrijven die allen in mindere mate in de gevoelige rassen voorkomen (Figuren 3.1C, D).



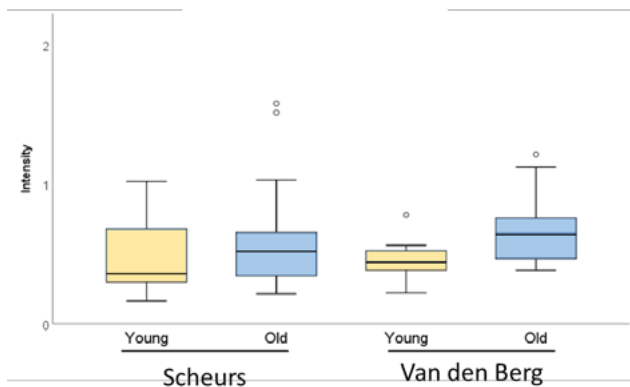
Figuur 3.1 PCA-score plot (A), OPLS-DA score plot (B), Spectrum loading plot kleurgecodeerd volgens $p(\text{corr})$ waarde (C) en spectrum kleurgecodeerd volgens p -waarde (D) in NMR extracten van oude rozenbladeren (meeldauwgevoelig versus meeldauwresistent). Statistische waarden van $Q^2 = 0.49$ en $R^2 = 0.65$ met behulp van 100-permutaties tonen een zwak OPLS-DA-model. Gevulde rode cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwresistente rassen, gevulde groene cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van meeldauwgevoelige rassen. Gevulde rode stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwresistente rassen, gevulde groene stippen: monsters oude en jonge bladeren van meeldauwgevoelige rassen. Groen gekleurde bars zijn kenmerkend voor meeldauw gevoeligheid. Bruin gekleurde bars zijn kenmerkend voor weerbaarheid tegen Oranje gekleurde balken staan voor p -waarden gerelateerd aan de legende.

Er is een piek bij 4.07 gevonden, die kon worden gerelateerd aan weerbaarheid tegen meeldauw (Figuur 3.2A) en waarvan de concentratie in de resistente rassen net iets hoger bleek dan in de gevoelige rassen maar niet significant was (Figuur 3.2B). Deze piek leek onderdeel van een complexere chemische stof te zijn, maar de overlappende signalen maakten het onmogelijk deze stof te identificeren.



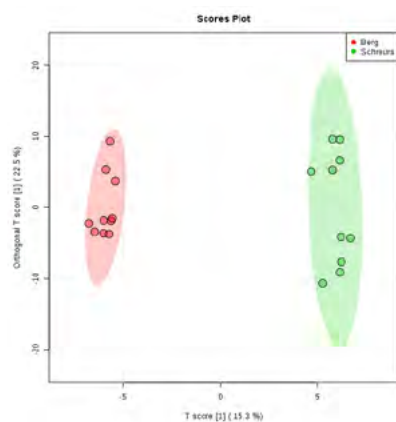
Figuur 3.2 Karakteristieke piek voor meeldauwresistente rassen (rode lijnen) in vergelijking tot de gevoelige rassen (groene lijnen) (A) en gemiddelde concentratie gerelateerd aan deze piek met standaardfout (B).

In de rassen van Schreurs zijn geen verschillen in de concentratie gerelateerd aan deze piek tussen jong en oud blad gevonden (Figuur 3.3) terwijl in de rassen van Van den Berg de oude bladeren een hogere concentratie vertoonden vergeleken met de jonge bladeren.



Figuur 3.3 Concentraties gerelateerd aan piek 4.07 in jong (geel) en oud (blauw) blad. Data geven gemiddelden met standaardfout aan.

Ingegeven door dit verschil in locaties is er ook een OPLS-DA analyse van de metabolietprofielen van de twee rassen gedaan welke beiden bij Schreurs en Van den Berg zijn bemonsterd. Dit liet zien dat de metabolietprofielen inderdaad tussen de twee locaties duidelijk verschillend waren wat door de gescheide rode (van den Berg) en groene (Schreurs) cirkels wordt aangegeven (Figuur 3.4). Dit betekent dat de variatie in metabolietprofielen tussen locaties groter lijkt dan tussen weerbare en gevoelige rassen.



Figuur 3.4 OPLS-DA plot van de metabolietprofielen van twee rassen die bij Van den Berg (rode cirkels) en Schreurs (groen cirkels) zijn bemonsterd.

Metabolomics voor de identificatie van chemische stoffen gerelateerd aan weerbaarheid tegen meeldauw in roos lijkt niet tot een goede scheiding van gevoelige en weerbare rassen te leiden. Daarnaast zit er grotere variatie in de metabolietprofielen van oud en jong blad alsook tussen rassen van verschillende locaties. Hierom is besloten morfologische kenmerken voor weerbaarheid tegen meeldauw in roos te verkennen in plaats van chemische kenmerken.

3.2 2 Morfologische kenmerken

Het is algemeen bekend dat meeldauw meestal lager in de plant zit. Dit is mogelijk omdat hier vanwege de hogere bladdichtheid een donkerder en vochtiger klimaat heerst, maar daarnaast is duidelijk waar te nemen dat jong blad een heel andere structuur en kleur heeft vergeleken met oud blad (Figuur 3.5). Jong blad lijkt meer glans te hebben en voelt gladder dan oud blad. Daarom is besloten te onderzoeken of de uiterste laag van het blad (cuticula) van jong en oud blad te relateren is aan weerbaarheid tegen meeldauw.



Figuur 3.5 Jonge (A) en oude roos bladeren (B).

De cuticula is een extra laag op de uiterste bladcellaag (epidermis) en bestaat uit een buitenlaag met was, een laag met lineaire alsook met verschillend gevormde wassen eronder (Schreiber en Schönherr 2009) (Figuur 3.6). Hierdoor landen de sporen vóór de kieming op de cuticula en moeten ze de cuticula binnendringen om toegang te krijgen tot de epidermale cellen. Het is bij verschillende planten soorten aangetoond dat de cuticula een cruciale rol kan spelen bij de bescherming van planten tegen micro-organismen (Martin, 1964). Een dikkere (epidermale) waslaag van de cuticula zou de kieming en penetratie van meeldauwsporen tegen kunnen gaan (Tomaszewsky, 2004; ten Hove *et al.* 2019). Om de cuticula van meeldauwgevoelige en weerbare rassen te vergelijken is de chemische compositie van de uiterste waslaag en van de complete waslaag bekeken. Daarnaast zijn elektronenmicroscopische opnames gemaakt om de dikte en structuur van de uiterste epidermale waslaag te onderzoeken.



Figuur 3.6 Schematische kaart van een cuticula. ECW: Epicuticular was, CP: Cuticula CL: Cuticulaire laag (Fagerström 2014).

3.2.1 Chemische compositie cuticula

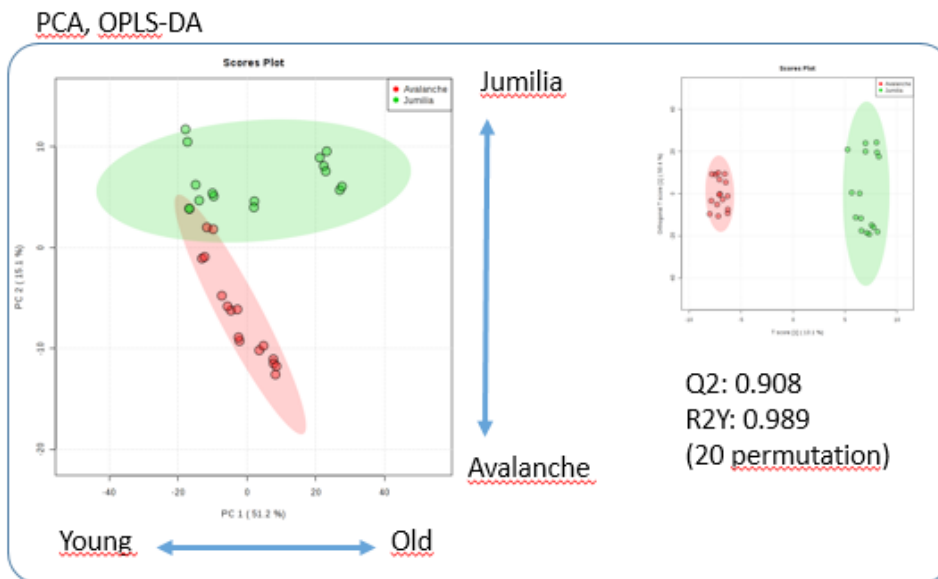
3.2.1.1 Materiaal en methoden

Voor het onderzoek van de cuticulaire waslaag zijn jong en oud blad van de rassen Avalanche (meeldauwgevoelig) en Jumilia (meeldauw weerbaar) gebruikt. Het totale was is geëxtraheerd met chloroform. Hiervoor zijn per 5 bladpansen elk van jong en oud blad overnacht in 20 ml chloroform. De uiterste epicuticulaire waslaag is met het chemische stof collodion geëxtraheerd. Deze werd drie keer met een fijn penseel op de cuticula aangebracht, gedroogd en daarna kan de uiterste waslaag als een soort film van de cuticula afgetrokken worden. De monsters zijn vervolgens met gaschromatografie gekoppeld aan een vlamionisatiedetector (GC-FID) voor kwantitatieve metingen en gaschromatografie in combinatie met massaspectrometrie (GC/MS) voor kwalitatieve metingen geanalyseerd. Hiervoor is het protocol, geschreven door Zeisler en Schreiber (2016), gebruikt. Tetracosaan is als een interne standaard voor waskwantificering gebruikt. Monsters zijn behandeld met N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide en pyridine gedurende 45 minuten bij 70 °C. Daarna is 1 µL monster in de GC-FID geïnjecteerd.

3.2.1.2 Resultaten

Data zijn geanalyseerd met de XC-MS software met een intensiteitsdrempel van 20000 cps en een 95% betrouwbaarheidsniveau. Pieken zijn na 5 minuten retentietijd geselecteerd en geordend na p-waarden. P-waarden ≤ 0.05 zijn verder met de MetaboAnalyst Software bewerkt voor een PCA en OPLS-DA analyse zoals beschreven onder 2.1.2.

De chemische compositie van de gehele waslaag was duidelijk verschillend tussen het meeldauwgevoelige- en weerbare ras zoals te zien is door de duidelijk gescheiden rode (Avalanche, gevoelig) en groene cirkels (Jumilia, weerbaar) (Figuur 3.7). De OPLS-DA leverde een R^2 waarde op van 0,99 en een Q^2 waarde van 0,91. De R^2 waarde beschrijft het percentage variatie welke door het model wordt verklaard en Q^2 toont het voorspellend vermogen van het model, waarbij waarden ≥ 0.5 een goed model representeren.



Figuur 3.7 PCA-score plot (A) en OPLS-DA score plot (B) van GC-MS NMR extracten van jonge en oude rozenbladeren (meeldauwgevoelig versus meeldauwresistent). Gevulde rode cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van het meeldauwresistente ras, gevulde groene cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van het meeldauwgevoelige ras. Gevulde rode stippen: monsters oude en jonge bladeren van het meeldauwresistente ras, gevulde groene stippen: monsters oude en jonge bladeren van het meeldauwgevoelige ras.

Er zijn verschillende stoffen geïdentificeerd die met de deze scheiding van weerbare en gevoelige monsters betrokken waren. Deze zijn weergegeven in Tabel 3.1.

Tabel 3.1

Chemische stoffen betrokken bij weerbaarheid tegen meeldauw van de gehele waslaag. Stoffen zijn gekarakteriseerd door hun verhouding massa (m) /lading (z), retentietijd (RT) en verhouding concentratie weerbaar/vatbaar (R/S).

Chemische stof	m/z	RT	FC (R/S)	p<0.05
Ferulinezuur, 2TMS derivatief	338.1	11.7	87.7	0.034
Boscalid	139.9	25.9	4.6	0.018
Triacosaan	57.0	27.7	3.2	0.009
Tetracosaan	57.0	29.8	3.1	0.016
Hentriacosaan	67.0	31.9	2.8	<0.001
Tetraconsanol	496.5	36.7	2.7	0.014
Onbekend-1	320.2	40.8	23.2	0.016
Onbekend-2	73.0	41.7	5.7	0.009
Onbekend-3	203.1	43.9	48.3	0.001
Onbekend-4	237.1	44.2	40.8	0.02
Onbekend-5	73.0	48.3	5.1	<0.001

De gehele waslaag van het meeldauw weerbare ras *Jumilia* bevatte aanzienlijk hogere concentratie (x 88) aan ferulinezuur vergeleken met het meeldauwgevoelige ras *Avalanche*. Ferulinezuur hoort bij de fenolen, welke bekend staan om hun functie als plantafweerstoffen. Een verhoogd gehalte aan hentriacosaan in *Jumilia* samen met hogere gehalten aan n-alkanen (triacosaan, tetracosaan) vormen een waterafstotend oppervlak. Daarmee wordt voorkomen dat waterdruppels en pathogenen zich aan het bladoppervlak hechten. Ook is gevonden dat de *Jumilia* monsters significant meer van het stof boscalid bevatten, welke een actief stof vormt van fungiciden in de meeldauwbestrijding. Het is dus een fungicide welke is ingezet in de bestrijding van meeldauw tegen *Jumilia* teruggevonden. Daarmee wordt het helaas onduidelijk of de bovengenoemde stoffen in *Jumilia* per se betrokken zijn bij weerbaarheid tegen meeldauw of dat er een interactie met de actieve antischimmel stof boscalid bestaat.

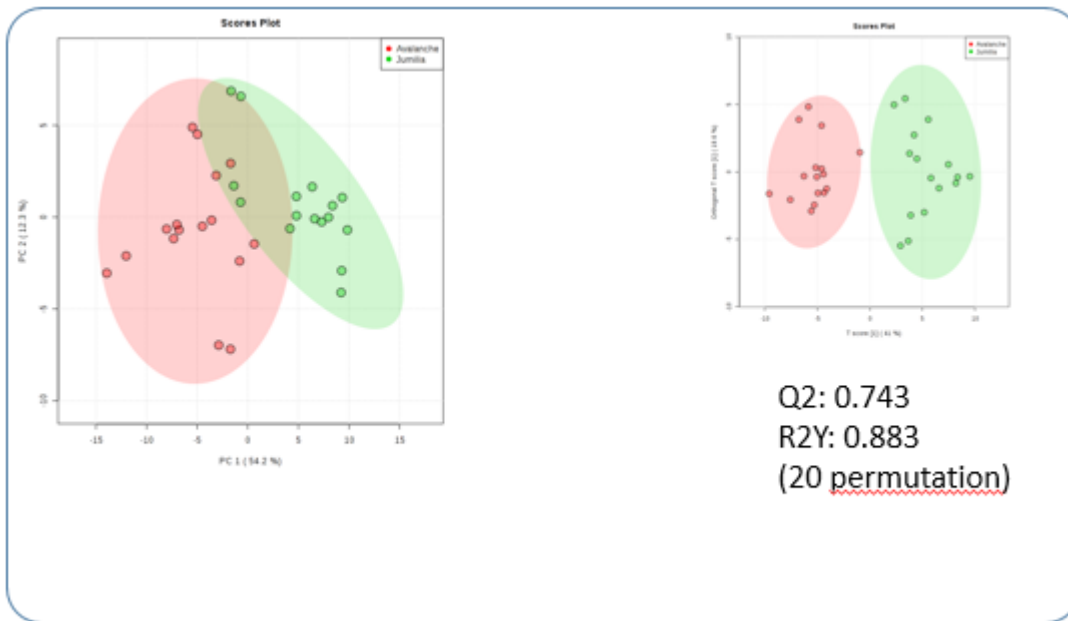
Tabel 3.2

Chemische stoffen betrokken bij weerbaarheid tegen meeldauw van de gehele waslaag van jong en oud blad. Stoffen zijn gekarakteriseerd door hun verhouding massa (m) /lading (z), retentietijd (RT) en verhouding concentratie jong/oud (O/J).

Chemische verbinding	m/z	Rt	FC (R/S)	p<0.05
Tetracosaan	57	17.09	3.2	<0.001
Tetraconsanol	411.4	24.61	3.0	0.003

Jong blad, onafhankelijk van weerbaarheid, leek meer was en was-gerelateerde stoffen te bevatten dan oud blad (Tabel 3.2) en is daarmee meer waterafstotend dan oud blad.

De chemische compositie van de epicutculaire waslaag was ook verschillend tussen het meeldauwresistente en gevoelige ras zoals te zien is door de duidelijk gescheiden rode (*Avalanche*, gevoelig) en groen cirkels (*Jumilia*, weerbaar) (Figuur 3.8). De OPLS-DA leverde een R² waarde op van 0,88 en een Q² waarde van 0,74.



Figuur 3.8 PCA-score plot (A) en OPLS-DA score plot (B) van GC-MS NMR extracten van jonge en oude rozenbladeren (meeldauwgevoelig versus meeldauwresistent). Gevulde rode cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van het meeldauwresistente ras, gevulde groene cirkels: 95% betrouwbaarheidsgebieden oud en jong blad van het meeldauwgevoelige ras. Gevulde rode stippen: monsters oude en jonge bladeren van het meeldauwresistente ras, gevulde groene stippen: monsters oude en jonge bladeren van het meeldauwgevoelige ras.

Er zijn verschillende stoffen geïdentificeerd die met de deze scheiding van weerbare en gevoelige monsters betrokken waren. Deze zijn weergegeven in Tabel 3.3.

Tabel 3.3

Chemische stoffen betrokken bij weerbaarheid tegen meeldauw van de epicuticulaire waslaag. Stoffen zijn gekarakteriseerd door hun verhouding massa (m) /lading (z), retentietijd (RT) en verhouding concentratie weerbaar/vatbaar (R/S).

Chemische stof	m/z	RT	FC (R/S)	$p < 0.05$
Palmitine, TMS derivatief	117.0	10.89	0.38	0,021
Stearine, TMS derivatief	117.0	14.11	0.28	0,009
Tetracosaan	57.0	17.09	2.04	0,022
Heptacosaan	57.0	23.44	0.26	0,006
Onbekend	74.0	28.80	0.37	0,003
1-Hexacosanol, TMS derivatief	441.4	28.82	0.39	0,045
Pentatriacosaan	57.0	35.84	0.17	0,002

Vergeleken met de totale waslaag zijn er in de epicuticulaire monsters minder chemische verbindingen geïdentificeerd. De hoogste concentratie werd in de wasverbinding tetracosane gemeten waarvan de concentratie in het weerbare ras Jumilia hoger was dan in het gevoelige ras Avalanche. Daarnaast zijn twee vetzuren gevonden: palmitine en stearine. Deze zijn vaak onderdeel van plantaardig lipiden. De concentraties aan deze vetzuren waren hoger in het gevoelige ras Avalanche.

Tabel 3.4

Chemische stoffen betrokken bij weerbaarheid tegen meeldauw van de epicuticulaire waslaag van jong en oud blad. Stoffen zijn gekarakteriseerd door hun verhouding massa (*m*) /lading (*z*), retentietijd (*RT*) en verhouding concentratie oud/jong (*O/J*).

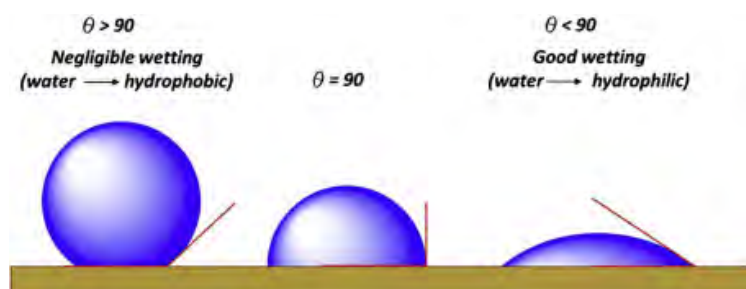
Chemische verbinding	m/z	Rt	FC (O/J)	p<0.05
Tetracosaan	57	17.09	2.22	0.045
Unknown	74	28.80	0.36	0.028
Pentatriacosaan	57	35.84	0.21	0.037

De epicuticulaire waslaag van jong blad, onafhankelijk van weerbaarheid, bleek meer van het was tetracosane te bevatten (Tabel 3.4) net zoals de gehele waslaag van het jong blad en is daarmee meer waterafstotend dan oud blad.

3.2.2 Morfologische structuur cuticula

3.2.2.1 Materiaal en methoden

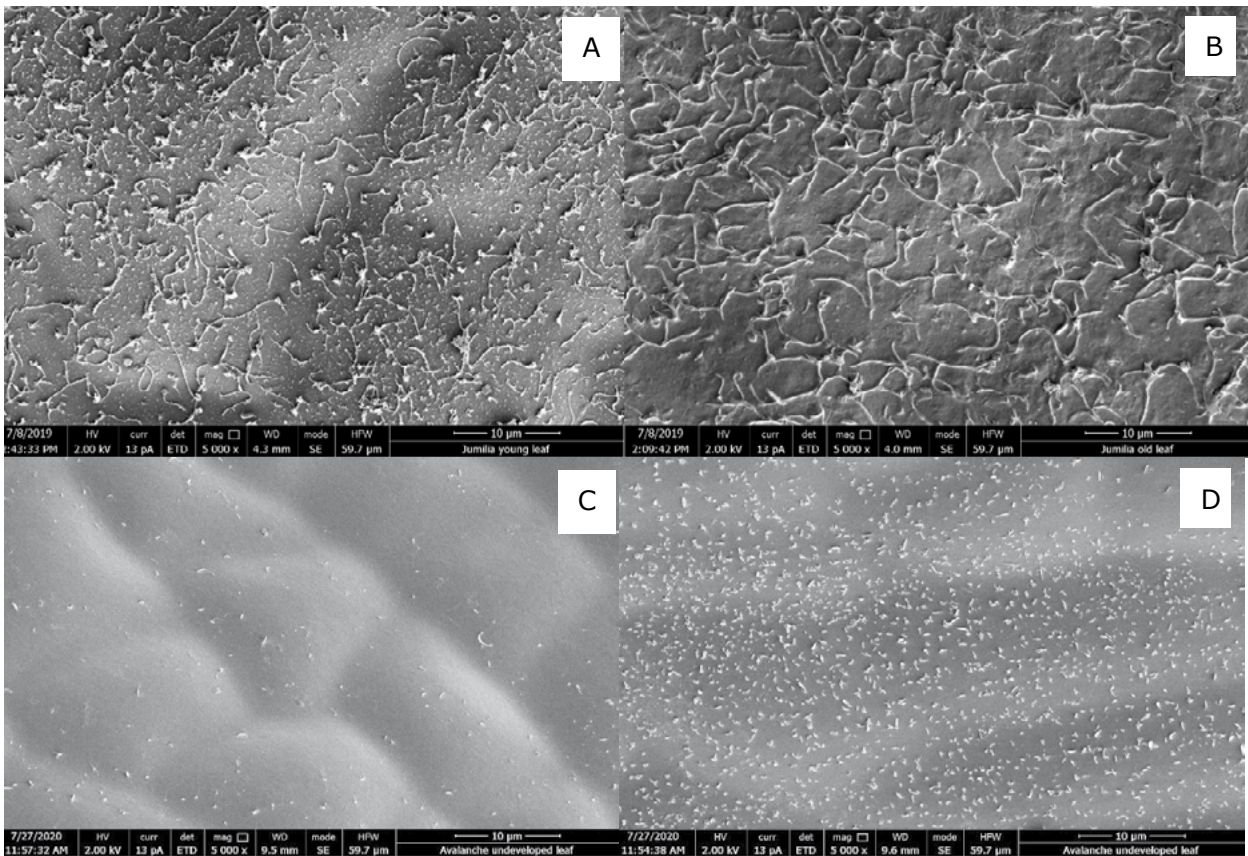
Voor dit onderzoek zijn voor metingen aan jong en oud blad van het meeldauw weerbare ras *Jumilia* en het gevoelige ras *Avalanche* in het voorjaar 2020 gedaan. Om de sterkte van de epicuticulaire waslaag en morfologische verschillen te analyseren zijn 5 opnamen gemaakt elk van jong en oud blad met een scanning electronen microscoop (SEM). Hiervoor zijn monsters gevriesdroogd en vastgezet in aluminiumhouders. Vervolgens zijn deze met een coat voorzien en bij een spanning van 20 keV gemeten. Door inkleuring van de wasstructuren in het softwarepakket Image J was het mogelijk de oppervlakte van de waslaag te meten. Dit is wellicht een directe methode om de wasstructuur te bestuderen maar relatief werkintensief en duur. Daarom is naast deze SEM methode ook een snellere en goedkopere methode middels een goniometer ontwikkeld. Deze meet de contacthoek van een vallende waterdruppel die op en bepaalde oppervlakte terecht komt. Bij een hoek van $>90^\circ$ rolt de waterdruppel van de oppervlakte af en is deze waterafstotend (hydrofoob). Dit is het geval bij sterkere epicuticulaire waslaag. In tegenstelling, bij een hoek van $< 90^\circ$ blijft de waterdruppel op het blad liggen en is deze niet waterafstotend (hydrofiel) (Figuur 3.9).



Figuur 3.9 Bevochtigbaarheid van oppervlakken: Contacthoek onder de 90° wordt beschouwd als een hydrofiel oppervlak. Contacthoek boven 90° wordt beschouwd als een hydrofoob oppervlak.

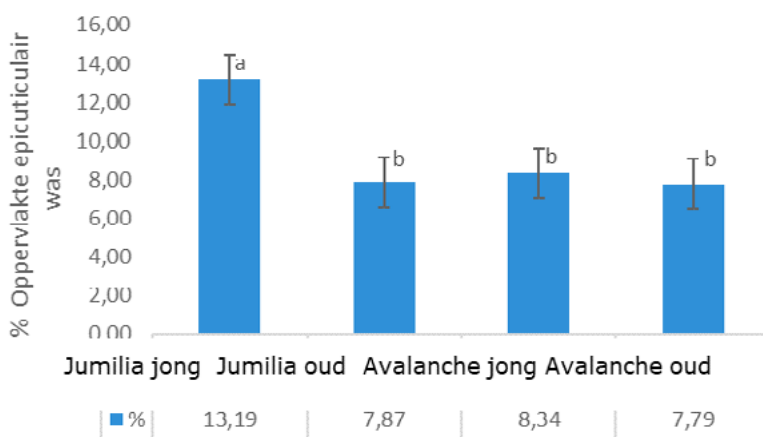
3.2.2.2 Resultaten

Het meeldauwweerbare ras *Jumilia* bleek een heel andere was structuur te hebben dan het gevoelige ras *Avalanche* (Figuur 3.10). Terwijl *Jumilia* was slierten vertoont, zijn bij *Avalanche* meer was stippen te zien. Het ras *Jumilia* lijkt meer epicuticulair was te hebben dan het ras *Avalanche*. Voor beide rassen lijkt het jonge blad een duidelijk grotere was oppervlak te vertonen vergeleken met het oude blad.



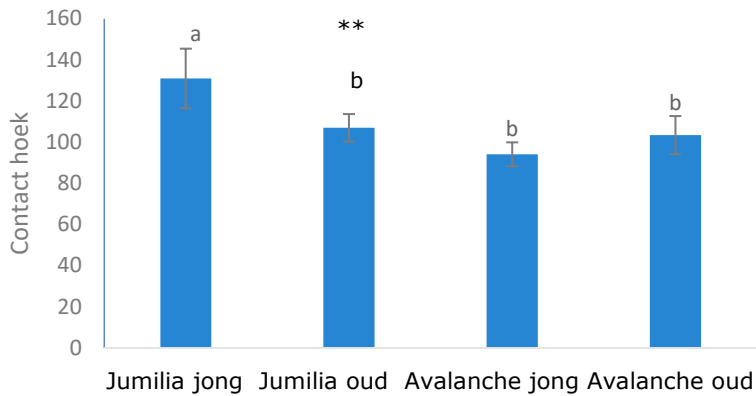
Figuur 3.10 Scanning elektronenmicroscopie opnames van het was oppervlak van oud (A) en jong (B) blad van het meeldauw weerbare ras Jumilia en van oud (C) en jong (D) blad van het meeldauwgevoelige ras Avalanche.

De epicuticulaire wasmetingen, met behulp van van image J, laten inderdaad zien dat in het ras Jumilia een groter deel van het blad met was bedekt is dan bij Avalanche (Figuur 3.11). Ook hebben de jonge bladeren van Jumilia duidelijk meer was dan de oude bladeren. Wellicht is dit in het ras Avalanche niet te zien. Blijkbaar zat hier nog wat aan variatie tussen de monsters.



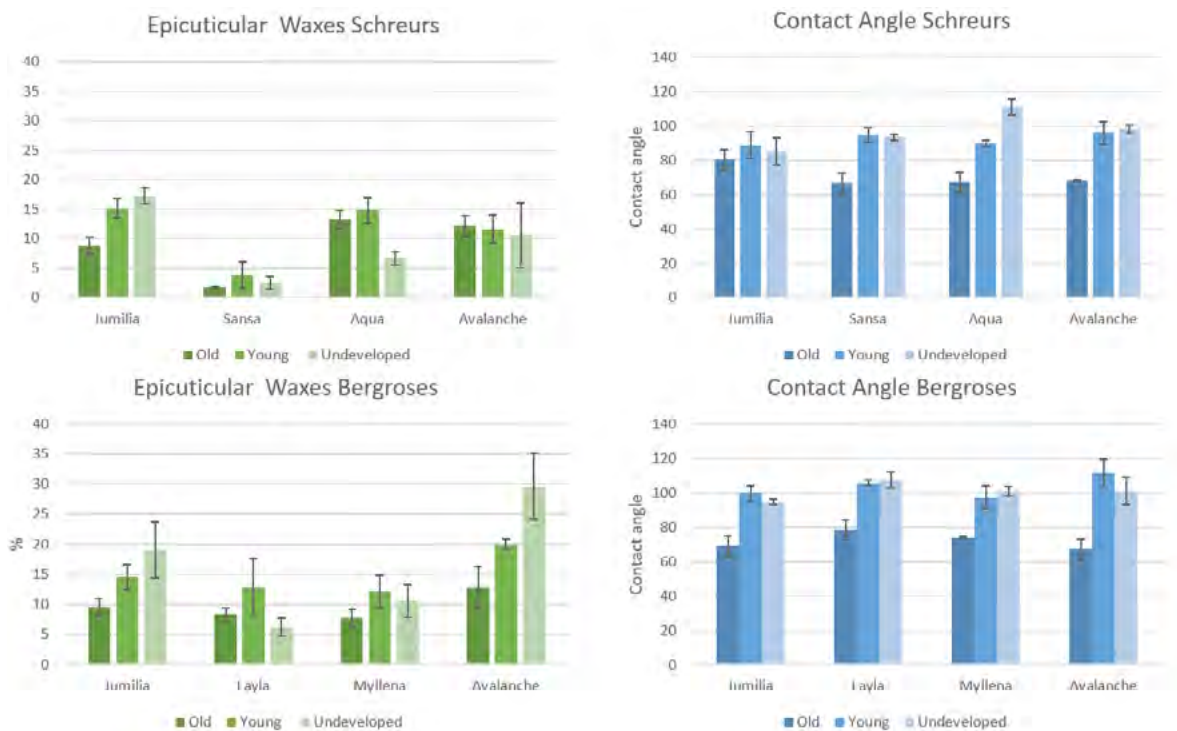
Figuur 3.11 Oppervlakte epicuticulair was bij jong en oud blad in het meeldauw weerbare ras Jumilia en het meeldauwgevoelige ras Avalanche. Data zijn gemiddelden met standaardfout. Significantie is aangegeven met ** $p \leq 0.001$. Verschillen tussen metingen zijn aangegeven met verschillende letters.

De epicuticulaire was metingen met behulp van de goniometer lieten dezelfde resultaten zien (Figuur 3.12).



Figuur 3.12 Contacthoek van jong en oud blad in het meeldauw weerbare ras Jumilia en het meeldauwgevoelige ras Avalanche. Data zijn gemiddelden met standaardfout. Significantie is aangegeven met ** $p \leq 0.001$. Verschillen tussen metingen zijn aangegeven met verschillende letters.

Vervolgens zijn deze eerste metingen tweemaal in het najaar 2020 herhaald en bij verschillende rassen op verschillende locaties: 4 rassen van Schreurs (Avalanche, Jumilia, Sansa, Aqua) en Van den Berg (Avalanche, Jumilia, Lyla, Mylena) gebruikt. Avalanche, Sansa en Aqua zijn meeldauwgevoelig en Jumilia, Leila en Mylena meeldauw weerbaar. Jong en oud blad is gemeten en ook een heel jong met niet volledig ontvouwen bladeren.



Figuur 3.13 Epicutulaire was metingen met SEM en image J van rassen afkomstig van Schreurs (A) en Van den Berg (C) als ook met de contacthoek van rassen afkomstig van Schreurs (B) en Van den Berg (D). Data zijn gemiddelden met standaardfout.

Zoals bij de eerste metingen laten zowel de epicuticulaire was metingen met SME als ook de meting met het contacthoek duidelijk zien dat het jonge blad meer was bevat dan het oude (Figuur 3.13). Daarmee is jong blad weerbaarder tegen meeldauw dan oud blad. De verschillen bij de contacthoekmeting zijn duidelijker dan bij de SME-meting waar nog wat variatie in de monsters per ras inzit. Deze variatie is ook terug te zien bij de rassen die bij beide telers Schreurs en Van den Berg zijn gemeten: terwijl duidelijke verschillen tussen jong en oud blad bij het ras Avalanche bij Van den Berg is gevonden is dit niet het geval bij Schreurs. Helaas zijn geen duidelijke verschillen in de waslaag tussen meeldauwgevoelige en weerbare rassen voor beide telers gevonden.

3.2.3 Versterking van de epicuticulaire waslaag

Uit het onderzoek na chemische en morfologische kenmerken van de waslaag kwam naar voren dat jong blad sterk verschilt van oud blad en dat deze verschillen tot een hogere weerbaarheid tegen meeldauw leiden. Vervolgens is gekeken welke behandelingen toegepast zouden kunnen worden om de waslaag in het oude blad te verhogen en daarmee weerbaarder te maken.

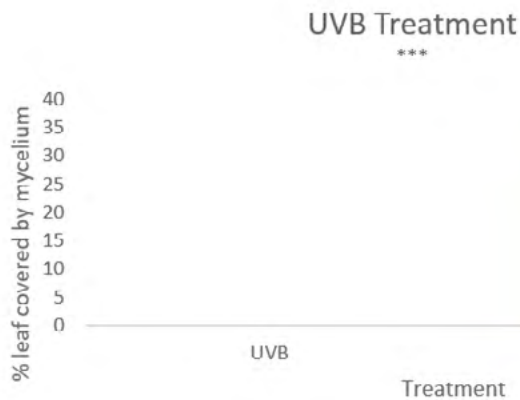
In de literatuur is bekend dat de waslaag door verschillende uiterlijke omgevingsfactoren, zoals UV-licht, hoge lichtintensiteit, relatieve luchtvochtigheid lage temperatuur, zout en droogtestress, beïnvloedt kan worden. Blootstelling aan UV-B licht leidt tot een 20-28% hogere wasgehalte in komkommerbladeren en in bladeren van bonen en gerst (Steinmüller en Tevini 1985). Uit eigen recente onderzoek is gebleken dat UV-B ook een sterk direct effect heeft op reductie van meeldauwinfectie (Leiss en Kruidhof, 2020). Een afname van de RV leidde tot een wastoename van 17 tot 50% in kool en Eucalyptus gewassen (Koch, *et al.* 2006). De hoeveelheid cuticulaire was nam ongeveer 4- tot 6-voudig toe als reactie op hoge lichtintensiteit en lage temperatuur in bladeren van boerenkool en koolraap (Shepherd *et al.* 1995). Het verhoogde wasgehalte werd ook waargenomen bij pinda's, kool en jojoba als reactie op zoutstress behandeling (Shepherd en Griffiths 2006). Cuticulaire wasafzetting nam met ongeveer 1,5- tot 2,5-voudig toe door droogte of watertekort in bladeren van verschillende plantensoorten waaronder dennen, sojabonen, sesam, sorghum, tarwe, maïs, haver, katoen en tabak (Cameron *et al.* 2006; Shepherd en Griffiths 2006; Kosma en Jenks 2007). Abscisinezuur (ABA) is in tuinkers gebruikt als stressopwekker van droogte en resulteerde in veranderingen in de chemische samenstelling van de waslaag, maar niet in verschillende hoeveelheden. (Macková *et al.* 2013). Het stimuleren van de productie van cuticulaire wassen in potrozen is bestudeerd door Jenska *et al.* 2001. De toepassing van het groeivertragende paclobutrazol (PBZ) verhoogde de totale hoeveelheid wassen met 12% en gecombineerd met droogtestressomstandigheden met 16%. Om de functie van de waslaag als mechanische barrière na te bootsen wordt silicium gebruikt. Een laag van silicium wordt op de epidermis aangebracht (Fauteux *et al.* 2005; Datnoff *et al.* 2007; Van *et al.* 2013). In pot miniaturrozen bleek de behandeling met silicium infectie met echte meeldauw tot 50% te reduceren. (Shetty *et al.* 2012).

Gebaseerd op deze mogelijkheden is ervoor gekozen om de behandeling met UV-B licht als ook spuitbehandelingen met was te onderzoeken.

3.2.3.1 Behandeling met UV-B

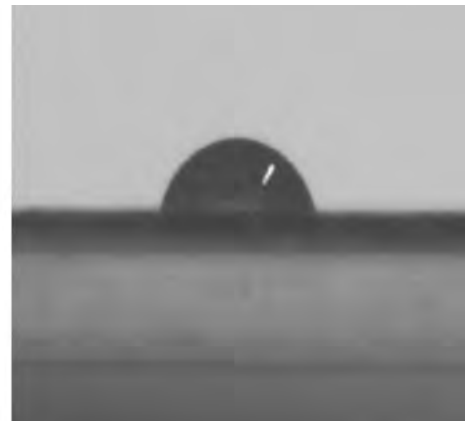
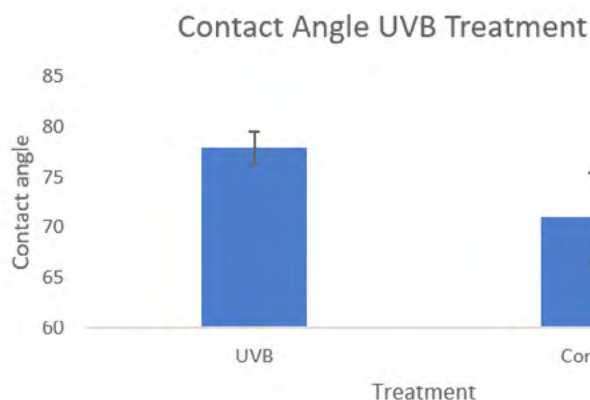
Om het effect van UV-B behandelingen te testen is een klimaatkamer proef uitgevoerd.

Twintig Avalanche rozenplanten zijn in een klimaatkast met twee planken geplaatst: 10 boven en 10 beneden. De planten zijn voor 3 weken in de kamer gegroeid (22 C, 85% RV, 450 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ PAR, 18 uur licht/6 uur donker; 800 ppm CO₂). De planten op de bovenste plank zijn daarna twee weken lang voor 30 minuten elke dag met UV-B (0.30 kJ/m²/dag) behandeld. De onderste plank bevatte tien controle planten zonder UV-B licht. Na twee weken UV-B behandeling zijn de planten met meeldauw geïnfecteerd. Hiervoor zijn de planten met een concentratie van 10⁵ sporen/ml geïnoculeerd.



Figuur 3.14 Effect UV-B behandeling op meeldauwinfectie in roos (A). Data zijn gemiddelden met standaardfout. Foto rozenplant in klimaatkamer (B). Significantie tussen de twee behandelingen is aangegeven met *** $p \leq 0.001$.

UV-B behandeling had een sterk remmend effect op meeldauw infectie (Figuur 3.14). Terwijl de controle planten zonder UV-B een meeldauwinfectie opliepen, bleven de planten met UV-B behandeling vrij van meeldauw. Deze remming was toe te schrijven aan een toename van de epicuticulaire waslaag door UV-B behandeling (Figuur 3.15).



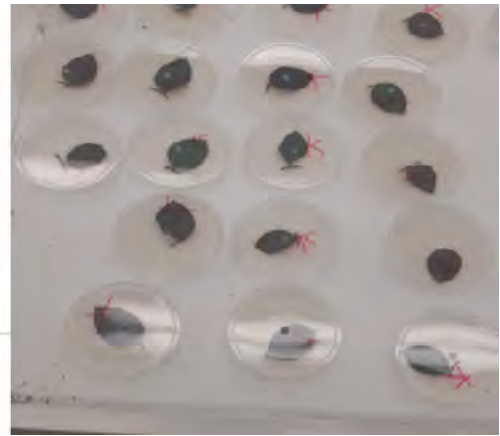
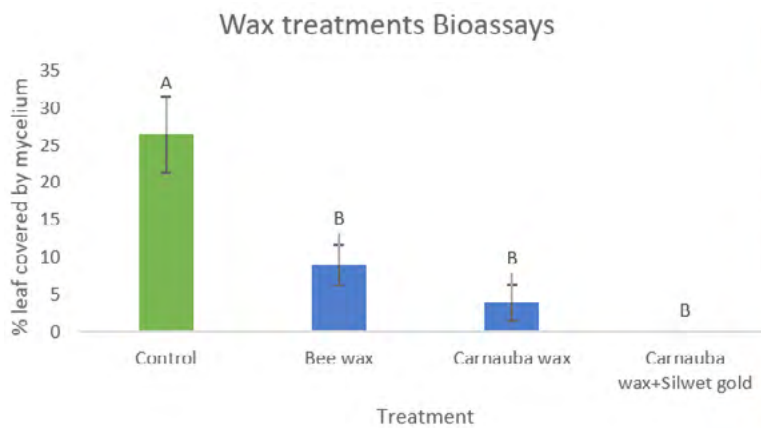
Figuur 3.15 Effect van UVB-behandeling op dikte van de waslaag gemeten als contacthoek (A). Data zijn gemiddelden met standaardfout. Significantie tussen de twee behandelingen is aangegeven met * $p \leq 0.05$. Foto van een contacthoek meting (B).

3.2.3.2 Behandeling met was

Om het effect van wasbespuitingen te testen, zijn kasproeven bij de WUR als ook in een commerciële rozenkas bij Meewisse roses uitgevoerd.

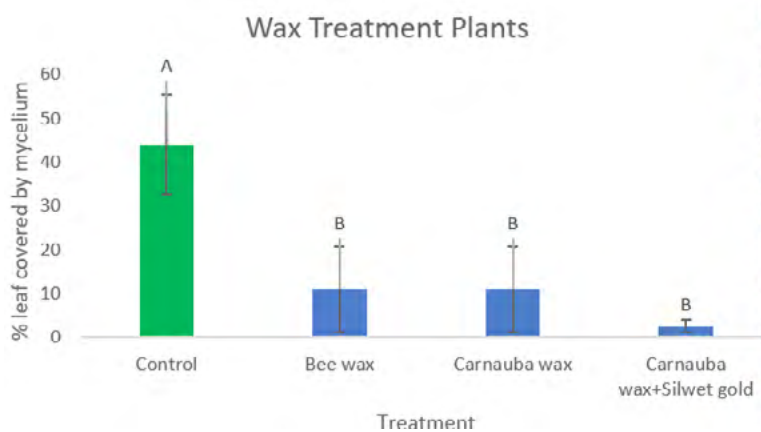
3.2.3.2.1 Kasproef WUR

Voor drie weken zijn 120 Avalanche rozen in een kaskompartiment in Bleiswijk geteelt. Vanaf de vierde week zijn voor twee weken vier verschillende behandelingen elke week toegepast: bespuiting met 2% (0.77g/l) bijenwas (dierlijk was), bespuiting met 2% (0.77g/l) carnauba was (plantenwas), bespuiting 2% carnauba was met toevoeging van de uitvloeier silwetgold (in de door de producent aanbevolen hoeveelheid) en controle zonder wasbespuiting. Om eventuele effecten van wasbehandeling op fotosynthese te bekijken zijn fotosynthesemetingen uitgevoerd op een batch van 5 planten die met 2% carnaubawas behandeld waren en vergeleken met de controle. Na twee weken behandeling zijn de planten met meeldauw geïnfecteerd. Hiervoor zijn de planten met een concentratie van 10^5 sporen/ml geïnoculeerd. Er is een meeldauw bladtoets en hele plantentoets uitgevoerd.

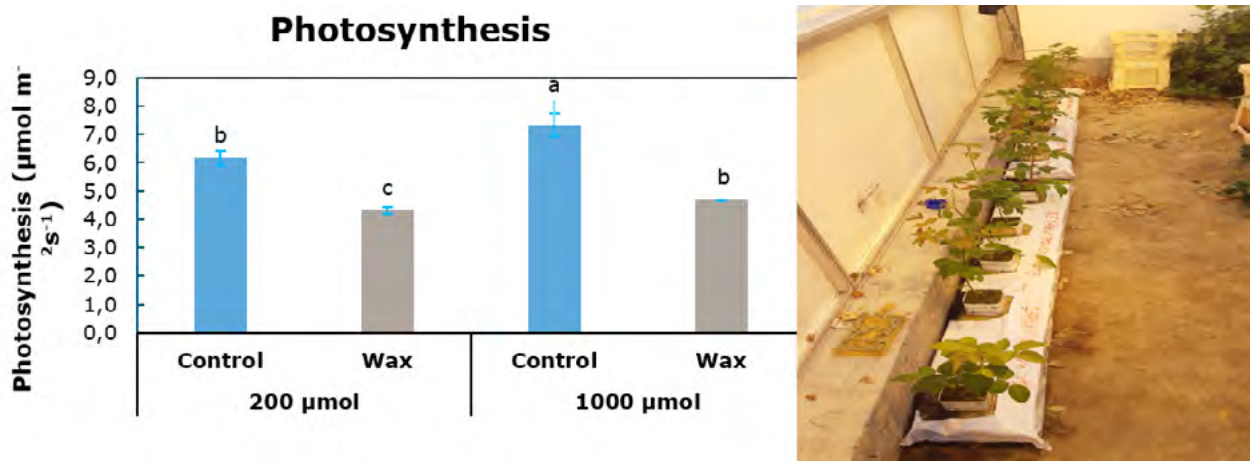


Figuur 3.16 Effect van wasbehandeling op meeldauw infectie in roos gemeten als meeldauw bladtoets(A). Data zijn gemiddelden met standaardfout. Significantie is aangegeven met *** $p \leq 0.001$. Verschillen tussen metingen zijn aangegeven met verschillende letters. Foto van de meeldauw bladtoets (B).

Bespuitingen met was hadden een sterk verlagend effect op meeldauw zowel in blad- (Figuur 3.16) als hele plantentoets (3.17). Beide bio toetsen laten zien dat de controle sterk met meeldauw geïnfecteerd raakt terwijl de bijenwas en carnaubawas behandeling significant veel minder meeldauw infectie laten zien. De behandeling met carnaubawas in combinatie met een uitvloeier blijkt een meeldauw infectie totaal te voorkomen: er is bijna geen meeldauw te zien.



Figuur 3.17 Effect van wasbehandeling op meeldauw infectie in roos gemeten als meeldauw hele planttoets(A). Data zijn gemiddelden met standaardfout. Significantie is aangegeven met *** $p \leq 0.001$. Verschillen tussen metingen zijn aangegeven met verschillende letters. Foto van de meeldauw hele planten toets. (B).

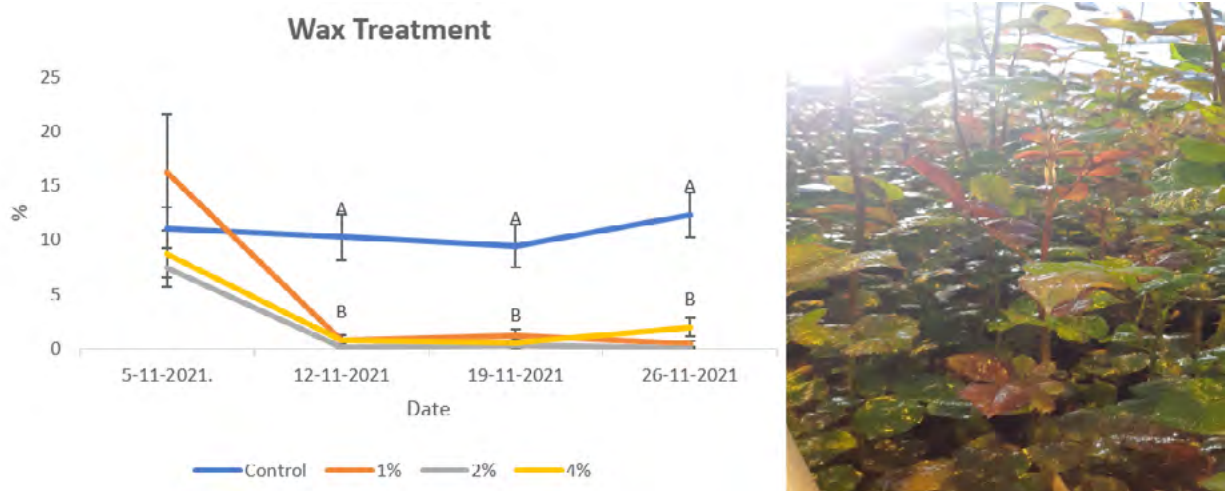


Figuur 3.18 Effect van wasbehandeling op fotosynthese bij twee verschillende lichtintensiteiten. Data zijn gemiddelden met standaardfout. Significantie is aangegeven met * $p \leq 0.05$. Verschillen tussen metingen zijn aangegeven met verschillende letters.

De fotosynthese capaciteit bij de wasbehandelingen was lager vergeleken met de controle (Figuur 3.18). Wellicht was het niet zo dat deze verlaging afhankelijk was van de lichtintensiteit. Het blijkt dat bespuiting met was de fotosynthese zou kunnen verminderen. Was zou de huidmondjes kunnen verklevan.

3.2.3.2.2 Commerciële kasproef Meewisse

Omdat in de WUR kastoets de behandeling met carnaubawas in combinatie met uitvloeier het beste resultaat op meeldauw infectie bleek te hebben is deze behandeling met verschillende wasconcentraties toegepast. In 4 meter lange rijen zijn voor drie weken vier verschillende behandelingen elke week toegepast: bespuitingen met 1, 2 of 4% carnaubawas combineerd met de uitvloeier silwetgold. Meeldauwaantasting is een week voor de start van de behandelingen en in de 3 opeenvolgende weken wekelijks als percentage meeldauw infectie gemonitord.



Figuur 3.19 Effect van carnaubawasconcentraties in combinatie met uitvloeier op meeldauwinfectie in een commerciële rozenkas A) Data zijn gemiddelden met standaardfout. Foto van rozenplanten na wasbehandeling (B).

Behandeling met carnaubawas laat een sterk effect op verlaging van meeldauw zien (Figuur 3.19). Dit effect treedt al bij de eerste behandeling op wat tot een bijna meeldauw vrij gewas leidt in vergelijking met de week voor de behandeling. Dit effect blijft over de gehele drie behandelingen aanhouden. Het effect is onafhankelijk van de gebruikte wasconcentratie, dus bij 1% was is al een sterke remming van meeldauw te observeren.

3.3 Discussie en conclusie roos

Helaas is gebleken dat er onvoldoende verschillen in de metabolietprofielen van meeldauw weerbare en meeldauwgevoelige rozenrassen waren. Er zijn verschillen in de metabolietprofielen gevonden van rozen van verschillende herkomst. Het blijkt dat de verschillen tussen omgevingsfactoren groter zijn dan de verschillen tussen de rassen. Daarom is besloten naar morfologische kenmerken van de afweer tegen meeldauw te kijken in plaats van naar chemische afweerstoffen. Uit de praktijk was bekend dat oud blad veel meer door meeldauw geïnfecteerd wordt dan jong blad. Jong blad heeft een andere kleur en structuur dan oud blad. Daarom is hier naar de compositie en uitbreiding van de waslaag gekeken. Jong blad leek meer was-gerelateerde waterafstotende stoffen te bevatten dan oud blad. Ook had jong blad een uitgebreidere waslaag dan oud blad. Dit was het geval voor zowel meeldauwgevoelige als -weerbare rozenrassen. Wellicht hadden weerbare rassen in het algemeen een uitgebreidere waslaag wat de sporenkieming en de hechting van de ontkiemende sporen belemmert. Voor het onderzoek zijn voor de metingen van de waslaag elektronenmicroscopische opnamen gebruikt. Deze zijn tamelijk specialistisch en duur. Daarom is voor de telers een goedkope robuuste manier ontwikkeld om de waslaag, middels de contacthoek van een vallende waterdruppel die op en bepaalde oppervlakte terechtkomt, te meten. Dit is een screeningstool die relatief eenvoudig bedrijfsmatig zou kunnen worden opgepakt. Daarnaast is gekeken naar manieren om de waslaag van gevoelige rassen te versterken. In een proef in een klimaatkast met UV-B leek deze behandeling heel succesvol. UV-B is hier onder relatief gecontroleerde omstandigheden toegepast en moet dit wellicht als een eerste proof of principle beschouwd worden. Als vervolg zou de behandeling met UV-B naar kasomstandigheden omgezet moeten worden. Dit is wel met de wasbehandeling gedaan die onder proefkas- als ook commerciële kasomstandigheden zijn getoetst. In beide gevallen leek een concentratie van 1-2% was gecombineerd met een uitvloeier, om het was gelijkmatig over het blad te verdelen, de meeldauw bijna volledig te remmen (en dit al na alleen een toediening). Daarmee lijkt was een veelbelovende behandeling om de sporenkieming van meeldauw te voorkomen. Wellicht zou een dikkere waslaag op het blad de opening van de stomata kunnen belemmeren. Inderdaad lijkt toediening van was een iets lagere fotosynthese ter gevolg te hebben. Verder onderzoek is nodig hoe wasbehandelingen over langere tijdperiodes en met welke frequenties toegepast kunnen worden om afweer tegen meeldauw te maximaliseren en potentiële afname van fotosynthese (en dus opbrengst) te minimaliseren. Ook een behandeling van alleen het oude blad zal hier een optie voor kunnen zijn.

4 Literatuur

- Allwood JW, Ellis DI, Goodacre R (2008)
Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiol. Plant.* 132, 117–135.
- Cameron KD, Teece MA, Smart LB (2006)
Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.* 140, 176–183.
- Datnoff, L. E., Elmer, W. H., and Huber, D. M. (2007)
Mineral Nutrition and Plant Disease. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.
- Fauteux, F., Remus-Borel, W., Menzies, J. G., and Belanger, R. R. (2005)
Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 1–6.
- Fagerström A (2014)
Effects of surfactant adjuvants on plant leaf cuticle barrier properties. PhD thesis Malmö University, Sweden.
- Hothorn T, Hornik K, Zeileis A (2006)
Unbiased recursive partitioning: A conditional inference framework. *J. Comput. Graph. Stat.* 15, 651–674
- Jenksa M, Andersend L, Teusinka R, Williams M (2001)
Leaf cuticular waxes of potted rose cultivars as affected by plant development, drought and paclobutrazol treatments. *Physiol. Plantarum* 112: 62-70.
- Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2010).
NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* 5, 536–549.
- Koch K, Hartmann K, Schreiber L, Barthlott W, Neinhuis C. (2006)
Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. *Environ. Exper. Bot.* 56, 1–9
- Koskela S, Elomaa He P, Iariutta Y, Kilpeläinen I, Harjunpää T, Teeri, TH, Söderholm P, Vuorela P (2001)
Two bioactive compounds and a novel chalcone synthaselike enzyme identified in gerbera hybrida. *Acta Hortic.*, 560, 271–274.
- Koskela S, Söderholm PP, Ainasoja M, et al. (2011)
Polyketide derivatives active against *Botrytis cinerea* in *Gerbera hybrida*. *Planta*, 233, 37–48.
- Kosma DK, Jenks MA (2007)
Eco-physiological and molecular, genetic determinants of plant cuticle function in drought and salt stress tolerance. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds) *Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, Dordrecht, pp 91–120
- Lee S and Suh M (2015)
Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. *Plant Cell Rep* 34:557–572
- Kotsiantis, SB (2013)
Decision trees: A recent overview. *Artif. Intell. Rev.*, 39, 261–283.
- Leiss KA, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PGL (2010)
An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. *Phytochem. Rev.* 10: 205-2016.
- Leiss KA, Cristofori G, van Steenis R, Verpoorte R, Klinkhamer, PGL (2013)
An eco-metabolomic study of host plant resistance to Western flower thrips in cultivated, biofortified and wild carrots. *Phytochem. Rev.* 93, 63–70.
- Leiss K.A., Kruidhof M. (2020)
LED-kleur heeft invloed op natuurlijke vijanden en plantweerbaarheid. *Onder Glas* 5.
- Macková J, Sková M, Macek P, Hronková M, Schreiber L, Santrucek J (2013).
Plant response to drought stress simulated by ABA application: Changes in chemical composition of cuticular waxes. *Environ. Exper. Bot.* 86, 70– 75.
- Martin, JT (1964)
Role of cuticle in the defense against plant disease. *Phytopathology* 2,81-100.
- Numata A, Takahashi C, Fujiki R, Kitano E, Kitajima A (1990)
Plant constituents biologically active to insects. VI. Antifeedants for larvae of the yellow butterfly *Eurema hecabe mandarina* in *Osmunda japonica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 2862–2865.

- Pietiäinen M, Kontturi J, Paasela T, Deng X, Ainasoja M, Nyberg P, Hotti H, Teeri TH (2016)
Two polyketide synthases are necessary for 4-hydroxy-5-methylcoumarin biosynthesis in *Gerbera hybrida*. *Plant J.*, 87, 548–558.
- Schreiber L, Schönherr J (2009)
Water and solute permeability of plant cuticles. Springer Verlag, Heidelberg.
- Shepherd T, Griffiths DW (2006)
The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* 171,469–499.
- Shepherd T, Robertson GW, Griffiths DW *et al.* (1995)
Effects of environment on the composition of epicuticular wax from Kale and Swede. *Phytochemistry* 40, 407–417.
- Shetty, R., Jensen, B., Shetty, N. P., Hansen, M., Hansen, C. W., Starkey, K. R., *et al.* (2012)
Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. *Plant Pathol.* 61, 120–131.
- Steinmüller D, Tevini M (1985)
Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta* 164, 557–564.
- Ten Hove R-J (2019)
Morphological characterization and development of a standardized inoculation protocol of *Podosphaera* mildew on rose. Wageningen University & Research 1-17.
- Tomaszewski D (2004)
The wax layer and its morphological variability in four European *Salix* species. *Flora* 199, 320-326.
- Van BJ, De Vleeschauwer D, Hofte M (2013).
Towards establishing broad spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *J. Exp. Bot.* 64, 1281–1293.
- Verpoorte R, Choi YH, Kim HK (2007)
NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem. Rev.* 6, 3–14.
- Verpoorte R, Choi YH, Mustafa NR, Kim HK (2008)
Metabolomics: Back to basics. *Phytochem. Rev.* 7, 525–537.
- Yrjöinen T, Vuorela P, Klika KD, Pihlaja K, Teeri TH, Vuorela H (2002)
Application of centrifugal force to the extraction and separation of parasorboside and gerberin from *Gerbera hybrida*. *Phytochem. Anal.*, 13, 349–353.
- Zeisler V, Schreiber L (2016)
Epicuticular wax on cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves does not constitute the cuticular transpiration barrier. *Planta* 243, 65–81.

Bijlage 1 Gerbera rassen als validatiemodel

Ras	Type	Weerbaarheid volgens teler	Teler
Clasico	Standaard	Vatbaar	Teler A
Cream Beach	Standaard	Vatbaar	Teler A
Dark Diamond	Standaard	Resistent	Teler A
Don Leo	Standaard	Resistent	Teler A
Evi	Standaard	Vatbaar	Teler A
Full moon	Standaard	Resistent	Teler A
Mandarina	Standaard	Vatbaar	Teler A
Peptalk	Standaard	Vatbaar	Teler A
Mango	Standaard	Vatbaar	Teler A
Red Explosion	Standaard	Resistent	Teler A
Rodeo	Standaard	Resistent	Teler A
Romance	Standaard	Vatbaar	Teler A
Submarine	Standaard	Resistent	Teler A
White House	Standaard	Vatbaar	Teler A
Albino	Mini	Resistent	Teler A
Allure	Mini	Vatbaar	Teler A
Banana	Mini	Vatbaar	Teler A
Cafe	Mini	Resistent	Teler A
Cassis	Mini	Resistent	Teler A
Delmonte	Mini	Resistent	Teler A
Noud	Mini	Vatbaar	Teler A
Dorito	Mini	Vatbaar	Teler A
Kimsey	Mini	Resistent	Teler A
Suri	Mini	Vatbaar	Teler A
Navelino	Mini	Resistent	Teler A
Delphi	Mini	Resistent	Teler B
Kimsey	Standaard	Vatbaar	Teler B
Jumbo	Mini	Resistent	Teler B
Mokka	Mini	Vatbaar	Teler B
Passoa	Standaard	Resistent	Teler B
Madeira	Standaard	Vatbaar	Teler B
Flamenco	Standaard	Vatbaar	Teler B
Contigo	Standaard	Vatbaar	Teler B
Betty Boop	Mini	Vatbaar	Teler B
Lido	Mini	Vatbaar	Teler B
Cafe del mar	Standaard	Resistent	Teler B
Monza	Mini	Resistent	Teler B

Ras	Type	Weerbaarheid volgens teler	Teler
Bravia	Mini	Resistent	Teler B
Petticoat	Mini	Resistent	Teler B
Franky	Mini	Resistent	Teler B
Suri	Standaard	Vatbaar	Teler C
Cafe	Standaard	Resistent	Teler C
Prosecco	Mini	Vatbaar	Teler C
Caramba	Standaard	Resistent	Teler C
Nirvana	Mini	Resistent	Teler C
Maserati	Mini	Vatbaar	Teler C
Dixon	Standaard	Resistent	Teler C
Caprise	Standaard	Vatbaar	Teler C
Huski	Standaard	Vatbaar	Teler C
Waakita	Standaard	Resistent	Teler C
Kimsey	Standaard	Vatbaar	Teler C
Kimsey	Standaard	Vatbaar	Teler D

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-1185

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, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 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.