

KRUISINGSPROEVEN MET RASSEN VAN MELAMPSORA LARICI-POPULINA KLEBAHN

*With a summary: Crossing experiments with strains
of Melampsora larici-populina Klebahn*

DOOR

Dr Ir H. VAN VLOTEN

1. INLEIDING

Bij het onderzoek naar de verschillen in vatbaarheid van populieren voor soorten van *Melampsora* werd aan het Laboratorium voor Mycologie en Aardappel-onderzoek van de Landbouwhogeschool een methode uitgewerkt, waardoor het mogelijk is, rassen van de roest te onderscheiden. Een korte beschrijving met illustratie van deze methode verscheen in het Tijdschrift over Plantenziekten (5:56). De *Melampsora*-soorten en -rassen werden elk jaar uit teleutosporen op speciaal verzamelde en overwinterde bladeren van populieren opnieuw gekweekt na spontane bevruchting op de tussenwaardplanten (5: afb. 3).

Bij deze proeven kon in de jaren 1939, 1940 en 1941 o.a. een oranje-kleurig ras van *M. larici-populina* KLEB., „C 4 or”, worden aangetoond, geïsoleerd van de volgende populieren:

× *Populus serotina* HART., × *P. marilandica* BOSC, × *P. robusta* SCHNEIDER, *P. trichocarpa* TORREY and GRAY, × *P. generosa* HENRY en de „Oxford poplar”, een kruising tussen *P. Maximowiczii* HENRY en × *P. berolinensis* DIPPEL van STOUT en SCHREINER.

De proeven met bladschijfjes van populieren in petrischalen (5: afb. 2, 4, 5 en 6) gaven het volgende resultaat:

P. serotina (B 11), *P. marilandica* (B 14), *P. robusta* (B 27) en *P. generosa* (C 4) bleken voor de isolatie van de roest in de jaren 1939–1941 vatbaar of zeer vatbaar, *P. regenerata* (B 13), *P. Eugenei* (B 15), *P. gelrica* (B 22) en *P. candicans* (C 2) daarentegen reageerden met resistent tot onvatbaar (Tabel 1).

In de zomer van 1941 verschenen op *P. candicans* AITON oranje-kleurige uredosporen van een ander ras. Voor dit nieuwe ras, in 1942 en 1943 uit teleutosporen op *P. candicans* opnieuw gekweekt en verder aangeduid met „C 2 or”, is – in tegenstelling tot het vorige – *P. candicans* wél vatbaar (Tab. 1).

In het jaar 1942 werd bovendien van × *P. Eugenei* SIM. LOUIS, en × *P. gelrica* HOUTZ. een derde ras geïsoleerd met afwijkende reactie van hetzelfde sortiment populieren. Dit ras, waarvoor de *P. regenerata*, *P. Eugenei* en *P. gelrica* zeer vatbaar zijn ¹⁾, *P. candicans* daarentegen onvatbaar is, wordt verder aangeduid met „B 15 or”, „B 22 or” of „B 13 or”, al naar de populier waarvan het werd geïsoleerd.

¹⁾ Ook de B 23 uit de collectie van de Nederlandsche Heidemaatschappij een × *P. regenerata* Henry var. *erecta* (volgens Houtzagers (2, p. 228) = *P. Carriereana*, no 84 uit Kew Gardens), de × *P. brabantica* Houtz., B 24, en een Franse „régénéré”, B 25, gedragen zich ten opzichte van de roeststrassen als *P. regenerata*, *P. Eugenei* en *P. gelrica*.

TABEL 1

Reactie-typen van populieren voor rassen van M. larici-populina¹⁾
Types of reaction of poplars for strains of M. larici-populina¹⁾

		Populus							
		serotina B 11	marilandica B 14	robusta B 27	generosa C 4	regenerata B 13	Eugenei B 15	gelrica B 22	candicans C 2
„C 4 or”	1939 ²⁾		3	4	4		0-1		i
	1940	3-4	3-4	4	4	0-1		0-1	i-0
	1941	4	4	4	4	1-2	1		0
„C 2 or”	1941 ²⁾			4		i-0			4
	1942	4	2	4	2-3	0-1	0	0-i	4
	1943	4	3	4	4	i-0	0	0	4
„C 2 wit”	1942	4	3	4	1-3	0	0-1	0-i	4
	1943	4	3	3-4	2-3	0-i	0	0	4
„B 22 or”	1942	4	4	4	2	4	4	3-4	i-0
	1943	4	3-4	3-4	2-3	4	4	4	i

¹⁾ Analooq met de onderscheiding bij andere roesten zijn de volgende zes typen van reactie gebruikt:

onvatbaar: i = geen reactie;

uiterst resistent: 0 = lichtgroene tot gele vlekken, soms enige bruinkleuring, geen sporen;

resistent: 1 = als 0, maar met weinig sporen;

matig vatbaar: 2 = duidelijke reactie met verkleuring, meer sporen;

vatbaar: 3 = reactie minder duidelijk, hoewel nog zichtbaar, vrij veel sporen;

zeer vatbaar: 4 = geen verkleuring, overvloedige vorming van sporen.

²⁾ Uit uredosporen gekweekt.

In 1942 werd bij de laboratorium-proeven tevens op *P. candicans* AITON een kleurloze, witte roest ontdekt, die in zijn pathogene eigenschappen voor hetzelfde sortiment van populieren vrijwel gelijk was aan het oranjekeurige ras „C 2 or”, zoals uit tabel 1 blijkt.

Dit ras wordt verder aangeduid met „C 2 wit”. Deze variant van het oranjekeurige ras „C 2 or” mist in al zijn stadia de oranje-keurige druppels in de protoplast, die de normale roesten hun roestkleur verlenen. Dit geldt dus voor het mycelium, de aecidiosporen en de uredosporen. De teliën hebben daarentegen de donkerbruine tot zwarte kleur zoals de normale vormen. De kleur van de teleutosporen zetelt ook niet in de protoplast, doch in hun wand, die het kleurloze karakter camoufleert tot de promycelia worden gevormd, die weer ongekleurd blijken te zijn evenals het haploide mycelium.

2. DE METHODE

De kruisingen werden in hoofdzaak uitgevoerd met „C 2 wit” en „B 22 or” c.s., omdat hun tegengestelde kleur en pathogeniteit voor bepaalde populieren interessante resultaten waarschijnlijk maakten. De wederzijds exclusieve vatbaarheid van bepaalde populieren werd gebruikt, om de rassen na de winter uit teleutosporen te kweken ³⁾. Zoals reeds eerder beschreven (5) werd *M. larici-*

³⁾ De voor verschillende rassen vatbare *P. serotina*, *P. marilandica*, *P. robusta* en andere kunnen hiervoor niet dienen!

populina uit overwinterde teliën gekweekt op pas uitgelopen lariks in een plantenkas. De tabletten waren door éénruiters in hokken verdeeld, om de roest van elke soort of variëteit van populier te isoleren. Ook op het gebrek van deze methode, waarbij de isolaties van de roest slechts gedurende één seizoen vegetatief in stand worden gehouden, maar zich in opeenvolgende jaren telkens generatief voortplanten, werd toen reeds gewezen. Men is op deze wijze voor verrassingen niet gevrijwaard (zie ook onder 3, resultaten van het kruisen).

Bij een behoorlijke kieming verschijnen na 8 à 9 dagen vlekken op de naalden van de behandelde lariks en enige dagen later zijn pycniden en druppels van pycnosporen op de boven- en onderkant der naalden zichtbaar (fig. 1). Na nog eens 3 tot 5 dagen verschijnen de caemata aan de onderkant der naalden (fig. 2).

De infecties met pycniden, afkomstig van de witte variant, zijn duidelijk aan hun wit-groene kleur te onderscheiden van de geel-groene vlekken, die de oranje-kleurige rassen teweegbrengen.

Het is niet gelukt, om microscopisch gecontroleerde één-spore-isolaties te verkrijgen van de aan de promycelia gevormde sporidiën. Daarom werd voor het kruisen de gewone methode van kweken toegepast, waarbij de kiemende teleutosporen boven de te inoculeren planten werden gebracht (5). Maar dit geschiedde slechts gedurende korte tijd, zodat weinig sporidiën op de planten konden vallen en daardoor de kans op infecties door één enkel sporidium per naald werd vergroot. Dit bleek in een beperkt aantal gevallen inderdaad bereikbaar te zijn.

De pycnosporen, die moesten worden overgebracht, werden met een fijne in een gasvlam uitgetrokken capillair opgezogen van een aantal (5 tot 10) verschillende infecties per gebruikte isolatie. Hierdoor werden dus met grote waarschijnlijkheid + en - pycnosporen op de te behandelen infectie overgebracht. Dat dit, gezien het betrekkelijk geringe aantal geïsoleerde infecties nuttig moet zijn geweest kan blijken uit een proef met 7 naalden van lariks 70, die in 1943 werden uitgezocht en elk één geïsoleerde infectie van „C 2 wit” hadden. Op 16 Juni, toen de normaal geïnfecteerde naalden, reeds sedert 3 weken rijpe caemata hadden gevormd, waren op deze 7 naalden nog slechts pycniden met pycnosporen te vinden. Zij werden toen „bestoven” met pycnosporen, afkomstig van één en dezelfde geïsoleerde infectie van het ras „B 13 or” (lariks 72, waarop overigens geen enkele andere infectie was te vinden). Terwijl op

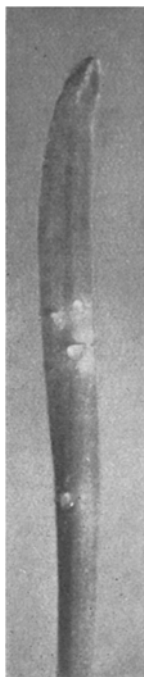


Fig. 1

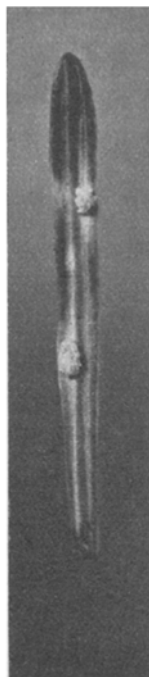


Fig. 2

Fig. 1. Naald van *Larix decidua* met druppels van pycnosporen van *M. larici-populina* (April 1940)

Fig. 2. Naald van *Larix decidua* met caemata van *M. larici-populina* (April 1940)

deze wijze theoretisch in de helft van de gevallen caeomata hadden moeten ontstaan, werd slechts op 1 van de 7 naalden één wit caeoma gevormd (22 Juni), dat zoals onder 3 nader zal blijken aan een verontreiniging met pycnosporen van de witte isolatie moet worden toegeschreven. De andere 6 infecties bleven tot 23 Juni doorgaan met het vormen van pycnosporen, caeomata ontstonden niet.

De enige infectie van „B 13 or” op lariks 72 werd na het afzuigen der pycnosporen voor de „bestuiving” van de genoemde naalden zelf bestoven met een mengsel van pycnosporen van „C 2 wit” en gaf na 4 dagen een caeoma met oranje-kleurige aecidiosporen.

De lariks werd in het tweede jaar, waarin kruisingen werden uitgevoerd, onder kooien van kaasdoek geplaatst, om bezoek door insecten uit te sluiten.

3. RESULTATEN VAN HET KRUISEN

A. De kleur van de F_1

In 1943 werden de volgende kruisingen uitgevoerd met de daarachter vermelde resultaten.

- | | | |
|-----------------------|--------|--|
| „C 2 wit” × „C 2 wit” | 9 × : | in 2 gevallen slechts ontwikkeling van pycnosporen (blijkbaar heeft hier toch + of - ontbroken);
in 1 geval witte en oranje sporen gemengd (dit moet een vergissing bij het uitzoeken of een verontreiniging zijn geweest);
in 6 gevallen caeomata met witte sporen. |
| „C 2 wit” × „C 2 or” | 8 × : | in 2 gevallen slechts ontwikkeling van pycnosporen, geen caeomata (+ of - ontbroken);
in 1 geval 3 caeomata, 1 met witte en 2 met oranje sporen (vergissing of verontreiniging)
in 5 gevallen caeomata met oranje sporen. |
| „C 2 wit” × „B 15 or” | 6 × : | in 6 gevallen caeomata met oranje sporen. |
| „C 2 wit” × „B 22 or” | 16 × : | 1 naald ging ontijdig dood; in 15 gevallen caeomata met oranje sporen. |
| „B 13 or” × „C 2 wit” | 1 × : | caeomata met oranje sporen. |
| „B 20 or” × „C 2 wit” | 2 × : | in beide gevallen caeomata met oranje sporen. |
| „C 4 or” × „C 2 wit” | 4 × : | in 1 geval geen caeoma;
in 3 gevallen caeomata met oranje sporen. |

Van de 33 combinaties wit × oranje of oranje × wit, waarbij caeomata werden gevormd, leverden 32 zuiver oranje aecidiosporen (97 %). De combinatie wit × wit gaf in 6 van de 7 gevallen, waarbij caeomata ontstonden, witte aecidiosporen (86 %). De factor voor de oranje kleur is dus dominant en die voor het ontbreken van de kleur, wit, is recessief. De witte aecidio- en uredosporen zijn dus homozygoot voor de factor van de kleur, terwijl de oranjekleurige sporen slechts voor een deel homozygoot voor de kleur zijn. Aan de oranje sporen kan men zonder nader onderzoek niet zien, of zij genotypisch ook een factor voor wit camoufleren.

Dit resultaat komt overeen met dat van COTTER (1) bij *Puccinia graminis agrostidis* ERIKS; hij vond nl. in de loop van een onderzoek naar de verschillen in vatbaarheid van soorten, variëteiten en hybriden van *Berberis* voor deze roest

witte pycniden en aecidiën. Na een eerste proef, waarbij geen aecidiën ontstonden, kreeg hij aecidiën met witte sporen bij 3 van 7 kruisingen wit $\times$ wit, bij 5 van 23 combinaties geel $\times$ wit werden aecidiën met gele sporen gevormd en in één geval van een kruising wit $\times$ geel bleef de vorming van aecidiën achterwege. Ook hier was dus blijkbaar „geel” dominant en „wit” recessief. De ontwikkeling van deze witte Puccinia op Gramineëën werd niet beschreven, omdat bij overbrenging van de witte aecidiosporen op *Agrostis alba* L. en „Manchuria” gerst geen urediniën ontstonden.

Een ander geval van optreden van een witte vorm van roest werd door PIESCHEL (3) beschreven bij *Melampsora euphorbiae* f. sp. *pepli* W. MÜLLER op *Euphorbia Peplus*. Interessant is, dat PIESCHEL ook gele en witte sporen in éénzelfde uredinium vond resp. urediniën met sectoren van de kleurloze vorm. Iets dergelijks kwam ook bij de caemata van *M. larici-populina* KLEB. voor. De waarschijnlijkste verklaring van dit verschijnsel is, dat door een plaatselijk groot aantal infecties van sporidiën, die dicht bij elkaar neervallen, de diploide fase uit gebrek aan ruimte gemengd tot ontwikkeling komt. De veronderstelling van PIESCHEL overigens, dat niet zonder grond het verschijnen van de witte vorm aan een mutatie kan worden toegeschreven (l.c. 396), kan beter worden vervangen door een verklaring, waarbij rekening wordt gehouden met de dominantie van de kleur. In de natuur zal de kans op het optreden van de combinatie wit $\times$ wit als gevolg van het aantal infecties in het algemeen niet groot genoeg zijn. De factor kleurloos is wel aanwezig in de voor de kleur heterozygote oranje (of geel) gekleurde sporen, maar kan zich niet manifesteren. Pas bij het vergroten van deze kans, zoals dit bij experimenteel werk plaats vindt, zal wit $\times$ wit kunnen optreden.

B. De pathogeniteit van de F_1 en F_2

De beschikbare gegevens zijn slechts gering in aantal en het is niet mogelijk, om vergaande conclusies te trekken. Het onderzoek werd nl. in 1944 door oorlogshandelingen ontijdig afgebroken en kon niet worden hervat en voortgezet. Maar voor een eventuele herhaling en uitbreiding is het vastleggen der verkregen gegevens belangrijk genoeg.

De door opzettelijke kruisingen gekweekte aecidiosporen werden in de eerste plaats als F_1 op bladschijfjes in petrischalen gebracht. Daarop gevormde uredosporen werden in de loop van de zomer op vatbare populieren in de kas overgeënt om teliën te verkrijgen. Van enkele kruisingen is dit gelukt. Zo konden F_2 -aecidiosporen worden gewonnen en onderzocht. Bovendien werden in enkele gevallen geïsoleerde infecties van de haploide fase van de F_1 -hybriden teruggekruist met een van de „ouders”.

De F_1

De kruising „C2 or” $\times$ „C 2 or” werd in 1944 twee maal uitgevoerd; zij gaf in beide gevallen oranje aecidiosporen. De reactie van het sortiment van populieren was als in tabel 2 vermeld.

De hybride kruising α veroorzaakte dus vrijwel dezelfde reacties als het ras van uitgang. Bij β is het reactie-type van B 13 afwijkend. Dit krijgt vooral betekenis als wij het gedrag der populieren tegenover het in 1944 op normale wijze verkregen ras „C 2 or” beschouwen. Het reactie-type van *P. regenerata* (B 13) is in 1944 = 4, terwijl de B 13 in 1943 met 0 reageerde. Hier treedt het gebrek

TABEL 2 *Reactietypen voor de F₁ van „C 2 or” × „C 2 or” vergeleken met die voor het na spontane bevruchting geïsoleerde ras „C 2 or”*
Types of reaction for the F₁ of „C 2 or” × „C 2 or” as compared with those of „C 2 or”

			Populus					
			serotina B 11	regenerata B 13	Eugenei B 15	gelrica B 22	brabantica B 24	candicans C 2
F ₁ „C 2 or” × „C 2 or”	<i>a</i>		4	0-1	i-0	0	i-0	4
	<i>β</i>		4	0,2	0	0		4
„C 2 or”	1943		4	0	0	0-1	0	4
	1944		4	4	0-1	0	i-0	4

van de methode met inschakeling van de generatiewisseling, waarop werd ge-
doeld in hoofdstuk 2 duidelijk aan het licht. Bij vegetatieve instandhouding
zijn dergelijke verrassingen minder waarschijnlijk.

De kruisingen „C 2 wit” × „B 15 or” of „B 22 or” die oranje aecidiosporen
gaven, werden in 1943 en 1944 in totaal 7 maal uitgevoerd met het volgende
resultaat (tab. 3).

TABEL 3 *Reactie-typen voor andere F₁'s*
Types of reaction for other F₁'s

			Populus						
F ₁			serotina B 11	robusta B 27	regene- rata B 13	Eugenei B 13	gelrica B 22	braban- tica B 24	candi- cans C 2
„C 2 wit” × „B 15 or”	1943 <i>a</i>		4	3	0	0	0		4
	1943 <i>b</i>			3		0	0	i-0	4
	1943 <i>c</i>			4		i(-0)	i		4
	1943 <i>d</i>						0-i		(4)
„C 2 wit” × „B 15 or”	1944 <i>e</i>		4	4	2	0		0	i
	1944 <i>f</i>		3-4	3	2-3	0		0	i
	1943 <i>g</i>		4		i	0	i-0	0-i	0-i
„B 15 or” × „C 2 wit”	1944 <i>h</i>		4	4	i-0	i-0		0	4
	1944 <i>i</i> I		4	3-4	0-1	i-0		0	4
	1944 <i>i</i> II		4	3-4	3-4	3-4			i

De kleur van deze hybriden is dus afkomstig van de „B 15 or” of „B 22 or”,
de pathogeniteit voor de C 2, *P. candicans*, werd in 4 van de 7 gevallen over-
genomen van de „C 2 wit”, 3 van de 7 kruisingen konden echter de C 2 niet aan-
tasten en geleken in *dit* opzicht op de andere „ouder”.

De reciproke kruising „B 15 or” × „C 2 wit” werd in 1944 twee maal uitge-
voerd (tab. 3). Het resultaat was als volgt: De hybride *i* geleeke vrijwel op *h* en
vertoonde net als deze het met het ras „C 2 wit” overeenkomende pathogene karak-
ter met een ogenschijnlijk kleine uitzondering. Van de weinige uredosporen nl. die
op de B 13 waren gevormd (reactie-type 0-1) werden overentingen in petrischalen
gemaakt (*i*₁₁) en daaruit bleek dat op de B 13 een „ras” was geselecteerd, dat
geheel andere reacties veroorzaakte: op C 2 = *i*, op B 13 en B 15 = 3-4. Een-
zelfde contrôle werd met de *h* in 2 latere series uitgevoerd. Deze bleef volkomen
constant.

De hybride *h* laat in elk geval zien, dat bij deze kruising de hybride de kleur

heeft overgenomen van de ene ouder, de „B 15 or”, de pathogeniteit echter van de andere, de „C 2 wit”.

Het afwijkende resultaat van de hybride i zou op een verontreiniging kunnen wijzen. Een kritische beschouwing leidt tot de conclusie, dat de hier gebruikte methode, waarbij x-sporen van één aecidium werden gebruikt niet alle complicaties kan oplossen. Bij een herhaling zou dan ook beter een aantal één-spore-isolaties van de aecidiosporen kunnen worden gemaakt, om na vermenigvuldiging het materiaal voor de vergelijkende proef te leveren.

De F_2

Van de in 1943 verkregen hybriden werden in enkele gevallen teliën verkregen waaruit na overwintering in het voorjaar 1944 een F_2 -generatie werd gewonnen.

Dit was het geval met de kruising „C 2 wit” $\times$ „B 15 or” (die overigens in de hierboven genoemde lijst van 7 kruisingen niet voorkomt). Van de geïsoleerd ontwikkelde, echter niet na opzettelijke kruising verkregen, aecidiën werden twee met witte sporen (a' en b') op hun pathogeniteit onderzocht (tab. 4). Beide gedroegen zich als de ene oorspronkelijke ouder de „C 2 wit”, maar zij konden zich in tegenstelling tot de „C 2 wit” 1943 ook op $\times$ P. regenerata, B 13, meer of minder goed ontwikkelen en komen hierin overeen met de normaal geïsoleerde „C 2 wit” 1944. Met deze F_2 te vergelijken zijn de nakomelingen van de kruising „C 2 wit” $\times$ „B 22 or” van 1943. Hiervan werden 5 maal oranje (g'-l') en 4 maal witte aecidiosporen (c'-f') geïsoleerd en onderzocht (tab. 4).

TABEL 4 *Reactietypen voor de F_2 van enige kruisingen*
Types of reaction for the F_2 's of some crosses

F_2	Populus							
	serotina B 11	robusta B 19	trichocarpa C 3	regenerata B 13	Eugenei B 15	gelrica B 22	brabantica B 24	candicans C 2
„C 2 wit” $\times$ „B 15 or” a' wit		3		1	0		0	4
„C 2 wit” $\times$ „B 15 or” b' „		4		3	0		(0)	4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” c' wit			3-4	4	0			4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” d' „			3	4	i(-0)			4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” e' „			3	3	0			3
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” f' „				3-4	i			4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” g' or			4	4	i			4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” h' „			4	4	1-2?			4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” i' „			(3)	3-4	i			4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” k' „			3	3	0			4
„C 2 wit” $\times$ „B 22 or” l' „			4	4	0			4
„B 22 or” $\times$ „C 2 wit” m' wit	4			i-0	0	0	i	4

Alle 6 witte (a'-f') en alle 5 oranje (g'-l') isolaties bleken zich dus op de P. candicans (C 2) goed te kunnen ontwikkelen, maar hadden in tegenstelling tot de F_1 het vermogen om ook de $\times$ P. regenerata aan te tasten. Van de reciproke kruising „B 22 or” $\times$ „C 2 wit” van 1943 werd één witte isolatie uit de F_2 onderzocht (tabel 4, m'). De reactie van het sortiment populieren voor m' klopt met die van de oorspronkelijke „C 2 wit” in 1943 en vroeger.

C. Terugkruisingen

Met de haploïde fase van de overwinterde F_1 -hybriden werden nog enige terugkruisingen uitgevoerd (tab. 5). De kruising („C 2 wit” $\times$ „B 22 or” 1943)

or $\times$ „C 2 wit”, waaruit oranje aecidiosporen werden verkregen gedroeg zich in zijn pathogeen effect als de ouder, waarmede werd teruggekruist, maar bewaarde de kleur van de andere ouder, wiens pathogene eigenschappen niet tot uiting kwamen.

TABEL 5 *Reactie-typen voor enkele terugkruisingen*
Types of reaction for some back crosses

	Populus						
	serotina B 11	robusta B 19	regenerata B 13	Eugenei B 15	gelrica B 22	brabantica B 24	candicans C 2
(„C 2 wit” $\times$ „B 22 or”) ’43 or $\times$ „C 2 wit”	3-4			0	i		3-4
(„B 13 or” $\times$ „C 2 wit”) ’43 wit $\times$ „B 13 or” α	4		4	4	4	(4)	i
(„B 13 or” $\times$ „C 2 wit”), 1943 F ₁ , β		4	2?	4		4	i
			0-i	i			4

Tenslotte werd nog een overwinterde F₁-hybride uit 1943 teruggekruist met één der ouders. Dit was „B 13 or” $\times$ „C 2 wit”. Deze had, zoals boven reeds vermeld, oranje aecidiosporen opgeleverd. De inoculaties op bladschijfjes van populieren in 1943 leerden, dat de F₁ van deze hybride *P. candicans* kon aantasten en dat *P. regenerata* en *P. Eugenei* onvatbaar tot zeer resistent waren (tab. 5). De terugkruising kon op twee geïsoleerde infecties met witte pycniden worden uitgevoerd met „B 13 or”. Beide gaven oranje aecidiën (tab. 5, α en β).

De F₁ had dus de kleur overgenomen van de ene „ouder” („B 13 or”), de pathogeniteit van de andere („C 2 wit”); de reductiedeling leverde twee sporidiën, die de factor „wit” of kleurloos bezaten. De terugkruising van beide met de oranjekleurige „ouder” „B 13 or” gaf opnieuw de oranje kleur aan de nieuwe hybride en tegelijkertijd het zuivere pathogene karakter van de „B 13 or”.

Helaas kon het onderzoek niet lang genoeg worden voortgezet. Maar de reeds verkregen uitkomsten wettigen de reeds eerder geopperde stelling, dat de steeds voorkomende generatiewisseling de mogelijkheid tot het ontstaan van nieuwe rassen biedt.

Dit wordt nog bevestigd door de resultaten van de uit de collectie van populieren bij het Lab. van Mycologie van de L.H. in 1944 gewonnen isolaties.

Het witte ras „C 2 wit” kwam sedert zijn eerste optreden regelmatig in de collectie voor op de daarvoor vatbare populieren zoals C 2, B 11, B 14, B 19. Het werd niet gevonden op de niet ervoor vatbare B 13, B 15, B 22, B 23, B 24 en B 25.

Zoals eerder medegedeeld waren in het najaar van 1940 tussen de populieren van de collectie enige rijen van lariks geplant, waarop in de vroege zomer regelmatig de caemata van *M. larici-populina* konden worden gevonden (4).

Men kan nu beredeneren dat een hybride tussen het witte ras met agressiviteit (A) voor *P. candicans*, wit + A_{C2} en het oranje ras met agressiviteit (A) voor *P. gelrica*, oranje + A_{B22}, bij kieming van de teleutosporen vier verschillende soorten van de haploïde fase (sporidiën en pycnosporen) kan opleveren:

wit + A_{C2}, wit + A_{B2}, oranje + A_{C2} en oranje + A_{B22}.

De in de F_2 uit zelfbevruchting te verwachten aecidiosporen zullen dus in 12 van de 16 gevallen oranje-kleurig zijn. Van deze 12 combinaties is er 1 homozygoot voor kleur en A_{C2} , dus gelijk aan „C 2 or”; 2 van hen lijken op „C 2 or”, zij zijn homozygoot voor A_{C2} , maar heterozygoot voor kleur; 1 van de 12 oranje combinaties is homozygoot voor kleur en A_{B22} , dus gelijk aan „B 22 or”; 2 andere zijn phaenotypisch gelijk aan „B 22 or”, agressief voor *P. gelrica* c.s., maar voor de kleur heterozygoot; bovendien zijn er nog 6, die voor agressiviteit heterozygoot zijn, waarvan 2 homozygoot en 4 heterozygoot oranje. 4 van de 16 gevallen zullen homozygoot kleurloos = wit zijn. 2 van deze zijn wat hun agressiviteit betreft heterozygoot. Tenslotte zal 1 van de 4 witte combinaties tevens homozygoot zijn voor A_{C2} en dus gelijk aan „C 2 wit” en zal als laatste een combinatie verschijnen, waarvoor *P. gelrica* c.s. vatbaar is, de *P. candicans* echter niet; dit is de kruising (wit $\times A_{B22}$) $\times$ (wit $\times A_{B22}$).

Helaas was het niet mogelijk, om uit de F_2 van de kruising „C 2 wit” $\times$ „B 22 or” (resp. „B 15 or”) van 1943 in 1944 een witte isolatie te verkrijgen, die deze eigenschap bezat. Het aantal onderzochte gevallen (6) is daarvoor te klein geweest.

Des te interessanter is echter het resultaat met de in 1943/1944 overwinterde bladeren met teliën van verschillende populieren, waarop voordien gedurende 5 jaren geen witte roest gevonden werd (tab. 6).

TABEL 6 *Reactie-typen voor na spontane kruising geïsoleerde rassen*
Types of reaction for the following strains

	Populus					
	serotina B 11	regenerata B 13	Eugenei B 15	gelrica B 22	brabantica B 24	candicans C 2
„C 2 wit”	4	3-4	0	0		4
„C 2 or”	4	4	0-1	0	i-0	4
„B 13 wit”	4	3-4	3-4	3-4	3-4	i
„B 13 or”	4	3-4	3-4	4	3-4	i
„B 15 wit”	4	4	4	4	4	i
„B 15 or”	4	3-4	4		4	i
„B 22 or”		3-4	3-4		3-4	i
„B 25 wit”	4	3	3-4	3-4	3	i
„B 25 or”		4	4			i

Er kon inderdaad van de populieren B 13, B 15, B 25 in 1944 sporadisch een nieuwe witte variant worden geïsoleerd, die kleurloos is gelijk het witte ras op *Populus candicans*, maar die andere pathogene eigenschappen bezit dan de witte vorm, die in 1942 voor de eerste maal werd gevonden.

Deze nieuwe witte variant behoeft echter geenszins te zijn ontstaan door kruising van het oranje gekleurde ras van B 15, B 22 of B 25 met de witte variant van *P. candicans* „C 2 wit”.

Het is, evenals dit hierboven onder 3.A voor „C 2 wit” wordt verondersteld, mogelijk, dat de factor kleurloos ook reeds in het oranje ras „B 22 or” aanwezig was, doch slechts heterozygoot. Dan zou dus pas in 1944 de geringere kans op zijn (homozygote) manifestatie verwerkelijk zijn geweest.

4. CONCLUSIES EN SAMENVATTING

Vroegere onderzoekingen met behulp van een laboratoriummethode toonden aan, dat physiologische rassen van *Melampsora larici-populina* KLEB. voorkomen. Als voorbeelden worden hier 3 rassen en 1 witte (kleurloze) variant aangehaald. De reactie-typen van een sortiment van populieren maken de onderscheiding van de rassen mogelijk. De gebruikte populieren kunnen, wat hun reactie op de 4 rassen betreft, in 3 rubrieken worden ondergebracht:

1. × *P. serotina* HART. (B 11)
 × *P. robusta* SCHN. (B 19)
2. a. × *P. regenerata* HENRY (B 13)
 b. × *P. Eugenei* SIM. LOUIS (B 15)
 × *P. gelrica* HOUTZ. (B 22)
 × *P. brabantica* HOUTZ. (B 24)
3. *P. candicans* AITON (C 2)

TABEL 7 *Reactie van de groepen van populieren op verschillende rassen van M. larici-populina KLEB. (+ vatbaar, – resistent of onvatbaar)*
Reaction of groups of poplars for different races of rust

Ras van de roest	Rubriek van populieren			
	1	2		3
		a	b	
„C 4 or”	+	–	–	–
„C 2 or”	+	–	–	+
„C 2 wit”	+	–	–	+
„B 22 or” e.a.	+	+	+	–

De populieren van rubriek 1 zijn voor alle rassen vatbaar en kunnen voor differentiatie van de rassen niet worden gebruikt. De populieren van de rubrieken 2 en 3 zijn voor „C 4 or” beide onvatbaar of resistent; voor de andere 3 rassen zijn òf de vertegenwoordigers van rubriek 2 onvatbaar en dan is de vertegenwoordiger van rubriek 3 vatbaar, òf omgekeerd. De kruisingen werden in hoofdzaak uitgevoerd met de rassen „C 2 wit” geïsoleerd van *P. candicans* (C 2) en „B 22 or” geïsoleerd van *P. Eugenei* (B 15), *P. gelrica* (B 22) of *P. regenerata* (B 13), rassen dus met tegenstellingen wat kleur en pathogeniteit betreft.

Kleur van de kruisingen

De factor voor kleur is dominant, die voor kleurloos recessief. Er bestaan dus homozygote en heterozygote oranje-kleurige sporen, die niet van elkaar zijn te onderscheiden.

*Pathogeniteit van de kruisingen**De F₁-generatie van de hybriden*

Bij de kruising „C 2 wit” × „B 15 or” of „B 22 or” werd in alle gevallen (7 ×) de kleur van het „vader”-ras, „B 15 or” resp. „B 22 or” overgenomen. Voor alle 7 hybriden waren de B 15 en B 22 echter, die voor het „vader”-ras zeer vatbaar zijn, zeer resistent of onvatbaar. De C 2 daarentegen bleek voor 4 van de hybriden vatbaar, voor de 3 andere niet.

Bij de reciproke kruising „B 15 or” $\times$ „C 2 wit” werd de kleur van het „moeder”-ras overgenomen. De B 15, vatbaar voor het „moeder”-ras, was voor deze hybride niet vatbaar, de voor het „vader”-ras vatbare C 2 wel. De pycnosporen van het witte ras, afkomstig van de C 2, hebben dus de kleurloosheid van hun ras in het phaenotype van de heterozygote combinatie niet tot uiting kunnen brengen, maar zij hebben het pathogene karakter van de „vader” wel overgedragen. Precies hetzelfde gebeurde bij de kruising „B 13 or” $\times$ „C 2 wit”; ook hier werd de kleur door het „moeder”-ras „B 13 or” bepaald, maar was de vatbaarheid van de B 13 verdwenen; anderzijds werd de vatbaarheid van de C 2 voor de hybride door middel van de pycnosporen van het „vader”-ras, „C 2 wit” teweeggebracht.

De F₂-generatie van de hybriden

In de F₂ van de hybride „C 2 wit” $\times$ „B 15 or” of „B 22 or” verschenen pycniden van oranje en van witte kleur. Bij „zelfbevruchting”, die niet opzettelijk werd uitgevoerd, werden caeomata met oranje en caeomata met witte sporen gevormd. Van deze werden 6 witte en 5 oranje isolaties gemaakt. Voor alle isolaties, de witte en oranje gelijkelijk was de C 2 vatbaar, terwijl de B 15 onvatbaar of resistent bleek te zijn. Alle 11 nakomelingen toonden de pathogeniteit van de „moeder” van de F₁; het pathogene karakter van de „vader” van de F₁ kon (door het geringe aantal gevallen?) in de F₂ niet worden teruggevonden.

Uit de F₂ van de reciproke kruising „B 22 or” $\times$ „C 2 wit” werd 1 witte isolatie onderzocht. De F₁-generatie was dus afkomstig van een hybride ontstaan uit een infectie door 1 sporidium van een ras van *Melampsora* waarvoor de B 22 vatbaar is, de C 2 niet. In de F₂ werd hier een voor kleurloos homozygote nakomeling geïsoleerd. De pathogeniteit van deze bleek overeen te komen met die van de „vader” van de F₁-generatie, het ras „C 2 wit”.

Terugkruisingen in de F₂-generatie

Van kiemende teleutosporen van de hybride „B 13 or” $\times$ „C 2 wit” werden 2 geïsoleerde infecties met witte pycniden verkregen. Beide gaven bij terugkruising met de „B 13 or”, zoals te verwachten, oranje gekleurde aecidiosporen; de pathogeniteit van het product van beide terugkruisingen kwam overeen met die van de „B 13 or”, terwijl in de F₁-generatie de B 13 onvatbaar, en de C 2 toen vatbaar was. Verder werd nog een geïsoleerde infectie afkomstig van kiemende teleutosporen van de hybride „C 2 wit” $\times$ „B 22 or” met oranje kleur teruggekruisd met „C 2 wit”. Hieruit resulteerde een nakomeling van de hybride, waarvoor de C 2 vatbaar, de B 15 en B 22 onvatbaar of zeer resistent bleken te zijn.

Isolatie van een witte variant van het ras „B 22 or” c.s.

Bij de her-isolatie van de rassen door middel van hun teliën, gevormd op populieren in de proef-aanplant, werden in het voorjaar van 1944 na spontane bevruchting ook witte caeomata gevonden van verschillende populieren van groep 2 (tabel 8). Er is dus in 1944 ook een witte variant gevonden, die zich op de rubriek 3 (C 2) niet, maar op rubriek 2, ook op de populieren van 2 b, wel kan ontwikkelen.

Men zou het ontstaan kunnen toeschrijven aan uitmending in de F₂-generatie van de kruising „C 2 wit” $\times$ „B 22 or” resp. „B 22 or” $\times$ „C 2 wit”. Maar het

TABEL 8

Reactie-typen van de groepen van populieren voor de rassen van *M. larici-populina* KLEB., die in 1944 van verschillende populieren in de proef-aanplant uit de teliën van 1943 werden gekweekt

Reaction types of groups of poplars for strains of rust, isolated outdoors

Ras van de roest	Rubriek van populieren			
	1	2		3
		a	b	
„C 2 or”	+	+	—	+
„C 2 wit”	+	+	—	+
„B 13 or”	+	+	+	—
„B 13 wit”	+	+	+	—
„B 15 or”	+	+	+	—
„B 15 wit”	+	+	+	—
„B 22 or”	+	+	+	—
„B 25 or”	+	+	+	—
„B 25 wit”	+	+	+	—

is ook mogelijk, dat de factor kleurloos reeds heterozygoot in de oorspronkelijke oranje gekleurde „B 22 or” voorkwam en de kans op zijn homozygoot aan de dag treden pas in het voorjaar van 1944 werd verwerkelijk.

Het feit dat in tegenstelling tot de voorafgaande jaren van het onderzoek in 1944 de rassen „C 2 or” en „C 2 wit” zich ook op de rubriek 2a kunnen ontwikkelen, is een bewijs voor de ontoereikendheid van de methode, waarbij de rassen niet vegetatief maar met inschakelen van de generatiewisseling worden in stand gehouden.

Het onderzoek werd aan het Laboratorium voor Mycologie en Aardappel-onderzoek der Landbouwhogeschool te Wageningen uitgevoerd. De opname van deze publicatie in het herdenkingsnummer ter eere van de nu aftredende directeur van dit laboratorium, Prof. Dr H. M. QUANJER is een dubbele reden, deze gelegenheid te gebruiken, om met dankbaarheid zijn stimulerende invloed te herdenken.

5. SUMMARY

Previous experiments have shown that physiological strains of *Melampsora larici-populina* KLEB. exist; four such strains, including one white variant, are dealt with in the present paper. It is possible to differentiate them by comparing the reaction types of different poplars. The poplars used may be divided into 3 groups according to their reaction (Tables 1 and 7). Group 1 consists of poplars which are equally susceptible (+) to the four strains. They therefore cannot serve to distinguish the strains used here. The poplars belonging to group 2 have been shown to be resistant (—) to 2 of the strains, both of which are able to develop freely on the single representative of group 3, *Populus candicans* AITON (C 2). On the other hand, group 3 is resistant to a strain which develops freely on the poplars of group 2.

The majority of crosses has been made between the white form „C2 wit” isolated from *P. candicans* (C 2), and „B 22 or”, the orange coloured strain isolated from $\times P. g\acute{e}lrica$ HOUTZ. (B 22), $\times P. Eugenei$ SIM. LOUIS (B 15),

or $\times$ *P. regenerata* HENRY (B 13). It will be noted that the two strains differed in colour and pathogenic character.

Colour of hybrids

The cross orange $\times$ orange resulted in orange-coloured spores and mycelium. White $\times$ white produced white spores. The combinations white $\times$ orange and orange $\times$ white developed caeomata with orange spores. The factor causing colour therefore is dominant while „colourless” is recessive. Orange spores may be homozygous or heterozygous as to colour.

Pathogenicity of hybrids

F₁ generation (Tables 2 and 3)

The 7 hybrids obtained from the crosses „C 2 wit” $\times$ „B 22 or” and „C 2 wit” $\times$ „B 15 or” took their colour from the paternal strain. However, they proved to be unable to develop on poplars B 22 and B 15 which are susceptible to the paternal strain. *P. candicans* (C 2) was susceptible to four out of 7 hybrids and resistant to 3 of them.

The spores from the reciprocal cross „B 15 or” $\times$ „C 2 wit”, derived their colour from the maternal strain. *P. Eugenei* (B 15), susceptible to the maternal strain, proved to be resistant to the hybrid. *P. candicans* (C 2), susceptible for the paternal strain, was susceptible also to the hybrid. The factor „colourless” being recessive, the pycnospores of the white paternal strain did not give evidence of its white character, but they determined, nevertheless, the pathogenicity of the hybrid, which was like that of the paternal strain. The same thing occurred with a cross „B 13 or” $\times$ „C 2 wit”. The hybrid derived colour from the maternal strain and its pathogenic character from the paternal strain (Tables).

F₂ generation of hybrids (Table 4)

Some of the hybrids produced telia on poplars in the greenhouse. They could therefore be grown on larch again during the next spring. The crosses „C 2 wit” $\times$ „B 15 or”, or $\times$ „B 22 or”, formed orange and white pycnia. From caeomata with orange and those with white spores, (the result of natural self-fertilization), 6 white and 5 orange isolations were made and tested on disks of poplar leaves in petri-dishes (Table 4). They showed a pathogenic character identical with that of the „grandmother” strain. *P. candicans* (C 2) was susceptible. None of these isolations were able to develop on *P. Eugenei* (B 15).

One isolation of white aecidiospores produced by the reciprocal hybrid „B 22 or” $\times$ „C 2 wit” resembled its „grandfather” strain „C 2 wit”. *P. candicans* proved to be susceptible; all the poplars of group 2 were resistant.

Back-crosses with parents of hybrids (Table 5)

The hybrid „B 13 or” $\times$ „C 2 wit” caused two isolated infections by sporidia which formed white pycnia. These were both back-crossed with pycnospores of „B 13 or”. Both became orange-coloured. The F₁ generation of the hybrid had been able to develop on *P. candicans* (C 2); *P. regenerata* (B 13) and *P. Eugenei* (B 15) had been resistant (Table 5). The hybrid, therefore, got its colour from the „mother” strain, its pathogenicity from the „father”. As to the back-crosses the pycnia of their „mother” strain showed the white character of their „grand-

father", „C₂ wit", their pollination with pycnosporos of „B 13 or" resulted in orange coloured aecidiospores with the pathogenic character of the „grandmother" strain.

Another isolated infection obtained from germinating teleutospores of the hybrid „C 2 wit" × „B 22 or" with orange pycnia was back-crossed with „C 2 wit". The pycnia which were fertilized (with pycnosporos of the maternal strain of the F₁ generation), had shown the colour of the paternal strain. The factor orange being dominant, the paternal strain determined also the colour of the F₂ generation. However, the pathogenic effect of the back-cross on the poplars was the same as that of the „grandmother" and „father" strain (C 2 susceptible, B 15 and B 22 resistant).

Isolation of a white variant of „B 22 or"

Species and strains of *Melampsora* have been re-isolated regularly, from poplars growing in a plantation of the Institute and in a nursery, by keeping the leaves with teleutospores separately. In 1944, by this method, a new white variant of *M. larici-populina* KLEB. was isolated from × *P. Eugeni* SIM. LOUIS (B 15), × *P. regenerata* HENRY (B 13) and also from a „peuplier régénéré" (B 25) (Tables 6 and 8). Differing in its pathogenic character from „C 2 wit" it might be supposed to be the F₂ generation of a hybrid between „C 2 wit" and „B 22 or". It had, in fact, been expected to be one of the results of these experiments, but it had not appeared (Table 4). A reasonable explanation of its appearance on the poplars of the plantation could be given also by taking into consideration that the factor „white" is a recessive one. This factor may have been present in the orange „B 22 or" but suppressed by the dominant factor of the colour. There would therefore have been only a small chance that the recessive white factors would combine. This combination may have been realised in 1944.

The re-isolation of *Melampsora*, not by its vegetative state, but by using a new generation, proved to be inconvenient for the study of certain aspects of the present problems. One has to realise that new strains may develop and that strains may disappear or change in some way. Such changes took place with the strains „C 2 or" and „C 2 wit". In 1943, and previously, *P. regenerata* (B 13) had been resistant; in 1944 it proved to be susceptible to both strains (Tables 1 and 8).

6. LITERATUUR

1. COTTER, RALPH U., White pycnia and aecia of *Puccinia graminis* Pers. *Phytopathol.* 24: 1121–1122, 1934.
2. HOUTZAGERS, G., Het geslacht *Populus*. Diss. Wageningen 1937.
3. PIESCHEL, E., Über eine weissporige Uredoform eines Rostpilzes und über die Entstehung zusammengesetzter Uredopusteln. *Phytopath. Z.* 7 : 393–408, 1934.
4. VLOTEN, H. VAN, Roest van populieren. *Ned. Boschb. Tijdschr.* 15: 339, 1942.
5. ———, Is verrijking van de mycoflora mogelijk? *Tijdschr. Pl. ziekten* 50: 49–62, 1944.