

BEOORDELING VAN LIJNZAAD OP *BOTRYTIS**With a summary: Judging flax seed for Botrytis*

DOOR

J. DE TEMPE

Rijksproefstation voor Zaadcontrôle, Wageningen

INLEIDING

Bij de gezondheidstoestand van Nederlands lijnzaad speelt de grauwe schimmel, *Botrytis cinerea* Fr., een overheersende rol. Andere pathogenen zijn bij dit zaad van minder belang en in sommige jaren worden ze in het geheel niet aangetroffen.

De betekenis van de *Botrytis*-infectie in vergelijking met enkele andere factoren die de kwaliteit van het zaad bepalen en waarnaar regelmatig laboratoriumonderzoek wordt verricht, blijkt uit fig. 1. Daarin is voor 159 lijnzaadmonsters de invloed van de kiemkracht, de dorsbeschadiging en de *Botrytis*-

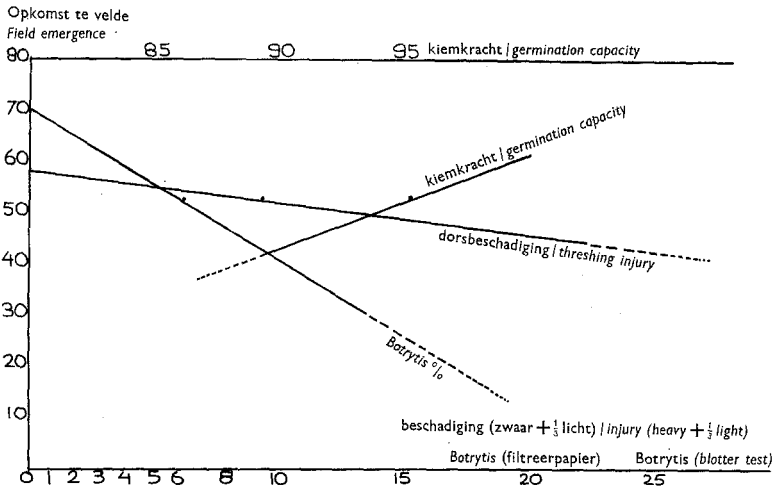


Fig. 1. De invloed van *Botrytis*-infectie, dorsbeschadiging en kiemkracht van 159 lijnzaadmonsters op de veldopkomst (regressie-lijnen).

Influence of seed-borne Botrytis, threshing injury and germination capacity on field emergence of 159 fibre flax samples (regression lines).

Lijnzaad veldproef R.P.v.Z. 1953. *Flax field experiment.*

Botrytis regressie — 2,91, correlatie 0,84;

Botrytis regression „ „ correlation

Beschadiging „ — 0,58, „ 0,21;

Threshing injury

Kiemkracht „ + 1,81, „ 0,35;

Germination capacity

infectie op de opkomst te velde weergegeven. Reeds in het jeugd stadium van het gewas bleek *Botrytis* de belangrijkste factor te zijn en in tegenstelling tot de beide andere factoren kan de schimmel zijn invloed tijdens de latere ontwikkeling van het gewas nog versterken. Eén en ander is natuurlijk sterk afhankelijk van bodem- en weersomstandigheden.

In verschillende landen worden voor het gezondheidsonderzoek van lijnzaad-monsters verschillende methoden gebruikt. In Nederland legt men de zaden uit op vochtig filtreerpapier en worden zaden en kiemplanten op *Botrytis* beoordeeld na 6 dagen verblijf in een vochtige, donkere kiemkast van 20°C. Uit talrijke proeven is gebleken, dat de zo gevonden infectiepercentages grote praktische waarde hebben (DE TEMPE, 1958). In andere landen gebruikt men de agar-methode voor gezondheidsonderzoek van lijnzaad. Daarbij blijkt het soms nodig de zaden vóór het uitleggen oppervlakkig te ontsmetten, wat echter in principe te verwerpen is.

Uit vroeger onderzoek was gebleken, dat de met de verschillende methoden

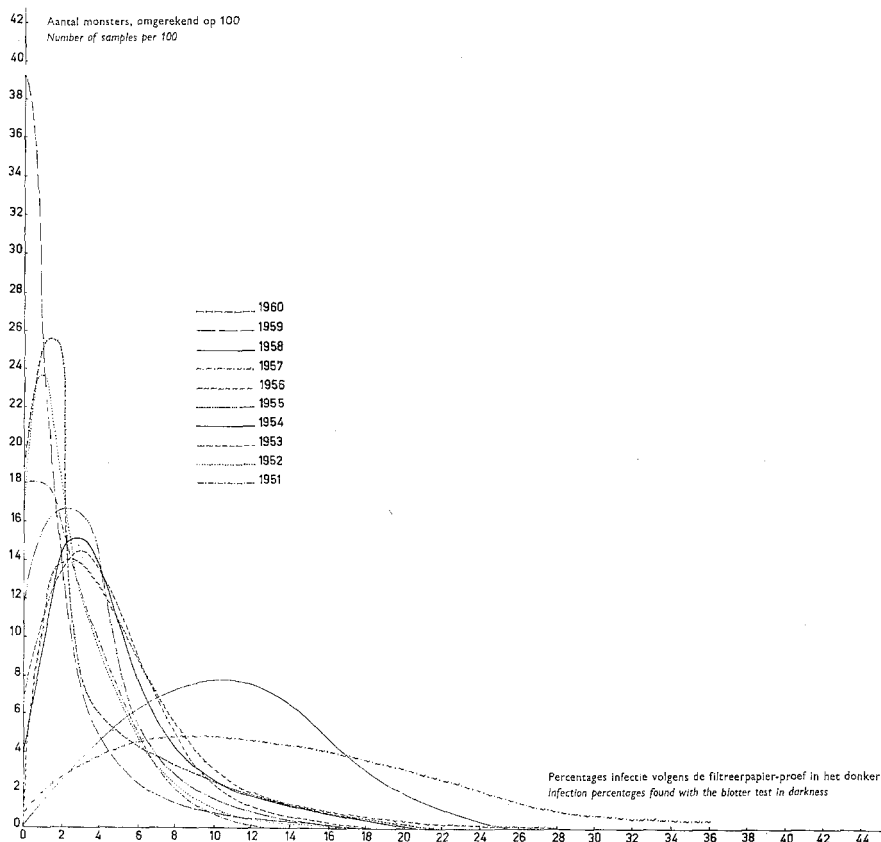


FIG. 2. Frequentiekrommen voor de *Botrytis*-infectie van Nederlands lijnzaad van de oogst-jaren 1951 tot en met 1960.

Frequency curves for the Botrytis infection in Dutch flax seed for the harvest years 1951 to 1960 inclusive.

verkregen resultaten nogal uiteenlopen. Aangezien men in het buitenland begonnen is met ten aanzien van de *Botrytis*-infectie van importpartijen lijnzaad concrete eisen te stellen, bestond er aanleiding tot een nadere vergelijking van de verschillende bepalmogelijkheden.

MATERIAAL EN METHODIEK

In het onderzoek werden 61 kleine lijnzaadmonsters betrokken, waarvan de infectie in veel sterkere mate uiteen bleek te lopen dan voor grote handelspartijen en de daarvan afkomstige monsters het geval pleegt te zijn, namelijk van 0 tot 36% (kiemkast-methode). Dit proefmateriaal mag dus beslist niet representatief worden geacht voor de Nederlandse lijnzaadoogst.

Drie methoden van onderzoek kwamen in aanmerking, te weten de filtreerpapier-methode in het donker, de filtreerpapier-methode in het licht en de agar-methode. Voor de eerste worden 4×100 zaden uitgelegd op vochtig filtreerpapier in zinken bakjes van ongeveer 10×25 cm. De beoordeling vindt plaats met het blote oog na 6 dagen bewaring in het donker bij een temperatuur van 20° (kiemkast-methode). Langer kan men de proef niet aanhouden, omdat onder de genoemde omstandigheden de schimmel zich sterk verspreidt, wat een nauwkeurige bepaling van het infectiepercentage na langere proefduur onmogelijk maakt. *Botrytis* veroorzaakt in deze proef verschillende ziektesymptomen en sporuleert meestal niet. Daardoor is het soms moeilijk de *Botrytis*-infectie te onderscheiden van andere infecties van lijnzaad, maar meestal spelen de laatste een zeer ondergeschikte rol of ontbreken geheel.

Neeft men een filtreerpapier-proef in het licht (normale dag/nacht-wisseling met aanvullend TL-licht overdag), dan ontwikkelen de pathogene schimmels zich typischer en de infecties zijn dus gemakkelijker herkenbaar en van elkaar te onderscheiden. *Botrytis* ontwikkelt zich dan langzamer, zodat de proef bij 20° 9 dagen vergt, maar de schimmel gaat niet zo gemakkelijk over op oorspronkelijk gezonde kiemplanten en sporuleert overvloedig (kiemtafel-methode).

Voor de agar-methode wordt moutagar in petri-schalen gebruikt en de beoordeling der gevormde schimmelkolonies vindt met het blote oog plaats nadat de schalen 4 dagen bij 20° in het donker hebben gestaan.

De resultaten van het laboratorium-onderzoek dienen, strikt genomen, vergeleken te worden met die van veldproeven. Deze hebben echter verschillende nadelen: ze kunnen slechts in één jaargetijde genomen worden, de proefomstandigheden zijn slecht te beheersen en de uitkomsten zijn onnauwkeurig. Daarom is het beter ze te vervangen door binnenshuis uitgevoerde grondproeven. Daarvoor werden plastic bakken gebruikt met een mengsel van lemige zandgrond, wat scherp zand en wat turfmoel, dat op goede vochtigheid gebracht was en waarin zeer oppervlakkig werd gezaaid. De bakken werden afgedekt met plastic en gedurende een bepaald aantal dagen bij een bepaalde temperatuur in verlichte ruimten bewaard, te weten 11 dagen bij 12° of 8 dagen bij 20° .

Grondproeven zijn weinig geschikt ter vaststelling van het percentage infectie met *Botrytis*. Enerzijds zullen zwaar aangetaste zaden zelfs onder de gunstigste omstandigheden geen opkomende kiemplant vormen en dus aan de waarneming ontsnappen, anderzijds heeft de schimmel in de grond een sterke neiging tot verspreiding, zodat de proef niet lang kan worden aangehouden. Aan de in grondproeven waargenomen besmetting van afzonderlijke zaadmon-

sters kan men dus weinig waarde hechten, wel echter aan verschillen en verhoudingen. Van grotere waarde zijn de opkomstpercentages, die kunnen worden gecorrigeerd met het in de filtreerpapier-proef waargenomen percentage abnormale en dode zaden door andere oorzaken dan *Botrytis*.

Voor elke bepaling werden 400 zaden gebruikt, te weten 40×10 bij de agar-methode en 4×100 bij de andere methoden. Omdat bewaring de *Botrytis*-infectie in lijnzaad doet achteruitgaan, wat in verschillende mate tot uitdrukking komt bij verschillende beoordelingsmethoden (VAN DER SPEK, 1960), werd het gehele onderzoek tweemaal verricht, eerst in het najaar (november–december) en nog eens ongeveer vier maanden later (maart–april).

PROEFRESULTATEN

De betrouwbaarheid van verschillende laboratorium-methoden kan men niet vaststellen door directe onderlinge vergelijking, maar wel door ze op de grondproeven te betrekken, ook al zijn de laatste op zich zelf weinig betrouwbaar. In tabel 1 ziet men de correlatie-coëfficiënten tussen de in laboratoriumproeven bepaalde *Botrytis*-percentages en de in grondproeven waargenomen opkomstpercentages.

TABEL 1. Nauwkeurigheid van laboratorium-methoden voor onderzoek van lijnzaad op *Botrytis*. De getallen in de beide laatste kolommen geven de correlaties-coëfficiënten weer tussen de met de drie laboratorium-methoden voor de 61 monsters bepaalde *Botrytis*-percentages en de voor die monsters in de beide grondproeven waargenomen opkomst-percentages.
Correlation between laboratory methods for determining Botrytis infection in flax seed and soil test emergences.

		Grondproef 12°C <i>Soil test 12°C</i>	Grondproef 20°C <i>Soil test 20°C</i>
Najaar 1960 <i>Fall 1960</i>	Moutagar / <i>Malt agar</i>	0,84	0,57
	Kiemkast / <i>Blotter, darkness</i>	0,83	0,57
	Kiemtafel / <i>Blotter, light</i>	0,86	0,67
Voorjaar 1961 <i>Spring 1961</i>	Moutagar / <i>Malt agar</i>	0,58	0,29
	Kiemkast / <i>Blotter, darkness</i>	0,55	0,31
	Kiemtafel / <i>Blotter, light</i>	0,58	0,41

De nauwkeurigheid van de laboratorium-methoden met betrekking tot de grondproeven blijkt inderdaad niet groot te zijn, maar is in elk geval voor de grondproef bij 12° veel groter dan voor de grondproef bij 20°. Ook vanwege de wenselijkheid de laboratoriumresultaten te vergelijken met die bij zo normaal mogelijke omstandigheden bij het uitzaaien, kunnen wij ons beter verder beperken tot vergelijking met de resultaten der grondproef bij 12°.

Zowel in het eerste als in het tweede onderzoek vertonen de drie laboratorium-methoden een vrijwel gelijke nauwkeurigheid. Deze tabel brengt ons dus niet verder wat betreft een keuze uit de laboratorium-methoden. Voor het in het voorjaar herhaalde onderzoek liggen de correlaties echter veel lager, wat vermoedelijk komt doordat de langzaam afstervende schimmel bijzonder gevoelig wordt voor geringe variaties in omstandigheden tijdens de proeven.

In tabel 2 ziet men de uitkomsten die voor de 61 monsters met de verschillende methoden verkregen zijn in de herfst en in het voorjaar.

Vergeleken met de routine-methodiek van het Proefstation (kiemkastproef) lagen dus in het najaar de uitkomsten der agar-methode gemiddeld een tiende hoger en die der kiemtafel-methode een vijfde lager. Gedurende 4 maanden bewaring in een onverwarmde ruimte (zachte winter) liep het gemiddelde

TABEL 2. Uitkomsten, verkregen voor 61 met *Botrytis* besmette lijnzaadmonsters.
Average percentages of infection found with different methods for 61 samples of Botrytis-infected flax seed.

	<i>Botrytis</i> in de laboratoriumproeven <i>Botrytis in laboratory tests</i>			<i>Opkomst en Botrytis</i> in de grondproeven <i>Emergence and Botrytis in soil tests</i>	
	Agar <i>Agar</i>	Kiemkast <i>Blotter, dark</i>	Kiemtafel <i>Blotter, light</i>	Grondproef 12°C <i>Soil test 12°C</i>	Grondproef 20°C <i>Soil test 20°C</i>
Najaar 1960 <i>Fall 1960</i>	8,5 ⁵ %	7,8 %	6,3 %	87,4 % / 4,8 %	92,3 % / 3,4 %
Voorjaar 1961 <i>Spring 1961</i>	6,8 %	3,7 %	3,4 %	89,4 % / 2,7 ⁵ %	93,0 ⁵ % / 2,2 ⁵ %

Botrytis-percentage bij de agar-methode met een vijfde terug, dat bij de kiemkast-methode met ruim de helft en dat bij de kiemtafel-methode met bijna de helft. In andere jaren zal de achteruitgang misschien groter of kleiner zijn, afhankelijk van de toestand van het zaad, van de infectie en van de uitwendige omstandigheden. Na deze bewaartijd lag het gemiddelde volgens de agar-methode bijna tweemaal zo hoog als dat volgens de kiemkast-methode, en dat volgens de kiemtafel-methode een tiende lager dan dat der kiemkast-methode.

In de grondproef bij 12° liep de waarneembare infectie gedurende de bewaartijd gemiddeld met bijna de helft terug, in de grondproef bij 20° (die veel onbetrouwbaarder is) met een derde.

BESPREKING

Bij de vergelijkende beoordeling van verschillende laboratorium-mogelijkheden voor gezondheidsonderzoek op hun praktische bruikbaarheid vormt het absolute peil der uitkomsten geen zwaarwegend argument. Van veel groter belang is de correlatie der met verschillende laboratorium-methoden verkregen uitkomsten met praktijkwaarnemingen. In het onderhavige geval, dus bij de *Botrytis*-infectie van lijnzaad, werden praktijkwaarnemingen – d.w.z. veldproeven – vervangen door grondproeven bij bepaalde temperaturen, omdat deze veel nauwkeuriger zijn en omdat de tamelijk snelle achteruitgang van de besmetting tijdens bewaring van het zaad gelijktijdige uitvoering van het onderzoek in het laboratorium en in grond wenselijk maakt.

Het bleek nu, dat de drie in het onderzoek opgenomen laboratorium-methoden vrijwel gelijkwaardig zijn wat betreft hun nauwkeurigheid ten opzichte van de resultaten van de grondproeven. De methode die de laagste *Botrytis*-percentages te zien geeft, namelijk de filtreerpapier-proef in het licht (kiemtafel-methode), weerspiegelt de achteruitgang van de infectie tijdens de bewaring van het zaad het beste. De filtreerpapier-proef in het donker (kiemkastproef,

routine-methode van het Proefstation) voldoet in dit opzicht iets minder goed en de agar-methode beslist slecht. Reeds VAN DER SPEK (1960) heeft in proeven met steriele grond aangetoond, dat de achteruitgang van de infectie tijdens bewaring van de zaadmonsters beter tot uitdrukking komt in de filtreerpapier-proef in het donker dan in de agar-proef.

Men houde hierbij in het oog, dat bij de laatste methode pathogene schimmels worden beoordeeld op hun saprofytische ontwikkeling op agar en bij de filtreerpapier-proeven op hun parasitaire ontwikkeling op de kiemplant. Het is dus te verwachten, dat voor bepaalde infecties de filtreerpapier-methoden juistere aanwijzingen zullen geven. Verder kan worden overwogen, dat de agar-methode een steriel milieu vereist, wat niet altijd en overal gemakkelijk te bereiken is. In het Proefstation geeft dit nogal eens moeilijkheden door het optreden van snelgroeïende saprofytische schimmels (o.a. *Rhizopus*), welke dikwijls van de zaden zelf afkomstig zijn. Tenslotte is de agar-methode bewerkelijk en duur omdat men per monster 40 glasdozen moet hanteren. Daartegenover staat het voordeel van de korte proefduur der agar-methode. Bovendien kan men overwegen, dat bij onderzoek van een groot aantal lijnzaadmonsters in de loop van de winter – terwijl de bijbehorende partijen ongeveer gelijktijdig in de lente zullen worden gezaaid – een methode waarbij de langzame achteruitgang van de infecties in sterke mate wordt genegeerd juist aantrekkelijk is. Anderzijds zijn de ermee verkregen infectie-percentages ten opzichte van het uitzaaien in het voorjaar beslist te hoog.

De keuze is moeilijk en moet wel afhangen van plaatselijke omstandigheden en persoonlijke voorkeur. De oude routine-methode van het Proefstation heeft belangrijke nadelen, welke vooral gelegen zijn in een weinig typische ontwikkeling van pathogenen en ziekte-symptomen, waardoor het moeilijk is de zaad-infecties in voldoende mate te onderkennen en scherp van elkander te scheiden. Ook de agar-methode heeft grote bezwaren. Het ligt in de bedoeling in de toekomst over te stappen op de kiemtafel-methode (filtreerpapier, licht) voor het gezondheidsonderzoek van lijnzaad, ondanks het feit dat deze voor *Botrytis* 9 dagen vergt en voor verschillende andere schimmels van lijnzaad zelfs 10 dagen en ondanks het bezwaar van elke verandering in methode, namelijk dat de resultaten verkregen voor en na die verandering niet meer als gelijkwaardig kunnen worden vergeleken. Het doorslaggevende argument bij de keuze is, dat bij deze methode de pathogenen zich meer normaal, dus kenmerkend, kunnen ontwikkelen. Er zijn nu in het Proefstation kiemkasten met TL-verlichting in aanbouw, waardoor in een beperkte laboratorium-ruimte toch te zijner tijd grote aantallen monsters tegelijk kunnen worden onderzocht.

Uit het voorgaande blijkt voldoende, hoe subjectief de keuze van een routine-methodiek voor gezondheidsonderzoek van een bepaalde zaadsoort eigenlijk is. Dit neemt niet weg, dat bepaalde methoden onder bepaalde omstandigheden doorslaggevende bezwaren kunnen ontmoeten. Dit maakt het onwenselijk ter zake dwingende internationale voorschriften uit te vaardigen. Het nadeel van een onvolkomen standaardisering in dit opzicht is te ondervangen door bestudering van het resultaat dat met verschillende methoden voor eenzelfde infectie wordt gevonden.

SAMENVATTING

Gedurende de laatste jaren wordt internationaal veel aandacht geschonken aan de *Botrytis*-aantasting van lijnzaad. Voor routine-onderzoek van lijnzaad-monsters wordt in verscheidene landen de voorkeur gegeven aan de agar-methode, terwijl in Nederland van ouds de filtreerpapier-proef in het donker wordt gebruikt.

In het onderhavige onderzoek werden de filtreerpapier-proef in het licht, de filtreerpapier-proef in het donker en de agar-methode ter bepaling van deze infectie vergeleken met betrekking tot de resultaten van grondproeven. Daarbij bleek, dat deze drie methoden ten opzichte van de grondproeven vrijwel even nauwkeurig zijn, maar dat de achteruitgang van de infectie tijdens de bewaring van geïnfecteerd zaad beter tot uitdrukking komt in de filtreerpapier-methoden dan in de agar-methode.

De oude werkwijze van het Proefstation heeft belangrijke nadelen, o.a. dat hij onbevredigend is voor de meeste andere lijnzaadschimmels. De agar-methode blijkt ook belangrijke nadelen te hebben. In de toekomst zal worden overgegaan op de filtreerpapier-methode in het licht.

SUMMARY

In the examination of flax seed for infection with *Botrytis cinerea*, different methods are used in different countries. Since there is, as yet, no internationally accepted standard method, it was thought desirable to compare the results obtained with various routine methods now in use.

In this investigation 61 samples of flax seed were tested for the fungus by three methods, viz. the malt agar method, the blotter method in darkness and the blotter method in light. The results obtained using these laboratory methods were compared with the figures for emergence and *Botrytis* percentage in soil tests at constant temperatures of 12° and 20°C. All methods were used simultaneously in early winter and again in spring after four months' storage in an unheated room.

Figs. 1 and 2 show the importance of *Botrytis* under field conditions in the Netherlands and the prevalence of infection in the seed harvest over a period of years.

Table 1 shows the correlation-coefficient found between the figures for *Botrytis* infection determined with the laboratory methods and the emergence figures determined in soil tests. It would appear that the three laboratory methods are equally accurate, but that the soil test at 12°C, which is the more common temperature for flax sowings, is more reliable. The correlations are far higher for the fall determinations, which suggests that by spring the aged and declining infections become very sensitive to small variations in testing conditions.

Table 2 gives the average infection figures found for the 61 samples by the different methods. It will be seen that they are highest for the agar method and lowest for the blotter method in light. The decline of the seed-borne inoculum during storage is best revealed by the blotter test in light, somewhat less by the blotter test in darkness, and very badly by the agar test.

Especially when a weak or weakened pathogen is concerned it is scientifically preferable to use a method in which the infection is estimated from parasitic

development on the growing seedling. In seed testing practice, however, the first samples are usually examined several months before, and the last ones during or even after normal sowing time. This makes a method desirable which does not reflect the aging very strongly, such as the agar-method. The results of the agar test are quickly available, but the method has practical disadvantages. For example, it is cumbersome to handle 40 glass dishes of 10 seeds per sample, and it requires absolute sterility, which is difficult to fulfil where *Rhizopus* and similar fungi are prevalent air- and seed-borne contaminants.

For *Botrytis* the old blotter method in darkness is fairly satisfactory, but for other seed-borne flax fungi – which in Holland are far less common – it is unsatisfactory. In past years, therefore, the blotter method in light has frequently been used beside it.

The agar method does not seem attractive. For that reason the Dutch Seed Testing Station intends to adopt the blotter method in light for flax health investigation. For the purpose glass germinators with fluorescent light will be constructed.

It will be understood from the preceding that any choice of a routine method of health investigation for flax seed will to some extent be arbitrary, and markedly dependent on local circumstances, such as equipment, experience, and requirements. Such a choice cannot but be subjective. Though international standardization of certain testing methods is a modern aim and should be welcomed, it does not seem desirable to push it so far that certain methods are made internationally obligatory for certain infections. In stead it might be studied what is the level of the results obtained with different methods for the same disease.

LITERATUUR

- SPEK, J. VAN DER, – 1960. Het gezondheidsonderzoek van lijnzaad op *Botrytis*. T. Pl.-ziekten 66: 123.
TEMPE, J. DE, – 1958. Infectie van lijnzaad met *Botrytis* – Waardering en bestrijding. T.Pl.-ziekten 64: 281–296.