



ASTREDHOR
44 rue d'Alésia
75 682 Paris cedex 14

Programme National 2008
Etude épidémiologique de la rouille blanche (*Puccinia horiana*) du chrysanthème*



Station d'Expérimentation des Plantes en Pots
52, rue de St Ilan
22 360 Langueux



GIE
Fleurs & Plantes
du Sud-Ouest

GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest
71, avenue Edouard Bourlaux / BP81
33 883 Villenave d'Ornon cedex



BBV, Laboratoire phytopathologie
Penn-ar-Prat
29 250 Saint Pol de Léon

*** L'application des méthodes, résultats et conclusions aux conditions de chaque exploitation horticole se fait sous l'entière responsabilité des entreprises**

SOMMAIRE

	Page
1 DESCRIPTION ACTIVITES GIE FLEURS ET PLANTES DU SUD-OUEST	
1.1 Enquête	3
1.2 Suivi des cultures et échantillonnage sur les sites pilotes	3
1.3 Observations de terrain	4
2 DESCRIPTION ACTIVITES STEPP BRETAGNE	
2.1 Enquête et observations de terrain	6
2.2 Suivi des cultures et échantillonnage sur les sites pilotes	7
3 ANALYSE DE DONNEES DES ENQUETES	9
4 JOURNEE ROUILLE BLANCHE DU CHRYSANTHEME (29 JANVIER 2009) ...	9
5 PERSPECTIVES DU PROGRAMME EN 2009	10
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

1 DESCRIPTION ACTIVITES GIE FLEURS ET PLANTES DU SUD-OUEST

1.1 Enquête

Le questionnaire pour l'enquête, validé en 2007 et reconduit sur le même modèle en 2008. L'ensemble des adhérents du GIE FPSO produisant du chrysanthème sont sollicités pour le remplir soit 40 entreprises dans les régions du Sud Ouest (Aquitaine, Poitou-Charentes et Midi-Pyrénées). Malgré les relances téléphoniques, lors des visites par les conseillers techniques sur les exploitations et une distribution plus précoce du questionnaire pour le remplir au fur et à mesure, seuls 8 producteurs ont renvoyés l'enquête complétée. Le traitement des données de l'enquête sera rendu dans les mois qui suivent.

La culture du chrysanthème en 2008 a été beaucoup moins atteinte par la rouille blanche et les producteurs n'estiment pas le besoin de mettre à plat leurs pratiques. Après une production en 2007 fortement touchée par la maladie, ils ont pris le parti de traiter systématiquement tous les 15 jours avec les produits à leur disposition, soit l'alternance entre un fongicide de la famille des triazoles (BAYCOR et SYSTHANE) et un fongicide de la famille des strobilurines (ALLIAGE et ORTIVA).

1.2 Suivi des cultures et échantillonnage sur les sites pilotes

Le prélèvement des échantillons et le suivi cultural se fait plus particulièrement sur 4 sites pilotes : 3 exploitations horticoles et la station d'expérimentation du GIE FPSO. Les sites sont les mêmes que l'an passé. Leurs caractéristiques principales sont données dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Caractéristiques des sites pilotes échantillonnés

Site	Support de culture	Irrigation	Symptômes de rouille
Ets Frimont (la Réole-33)	Aire hors sol extérieure sur film plastique	Ruissèlement	Oui, 2007 et 2008
Ets Labat (Portets-33)	Aire extérieure et tunnel plastique	Ruissèlement	Non, jamais
Ets Hortiland (Bastennes-40)	Serre plastique DPG sur bâche étanche	Ruissèlement	Oui, 2007 et 2008
GIE FPSO (Villeneuve-33)	Serre découvrable sur plate forme Hortigreen	Marée haute marée basse puis goutte à goutte	Non, jamais

Les données climatiques de températures et d'hygrométries sont mesurées toutes les 20 minutes pendant toute la durée de la culture par un enregistreur Tiny Tag (données en annexes). Les variations d'hygrométrie sont très importantes durant toute la culture et des températures descendent régulièrement sous les 15°C après le 15 septembre. Comme en 2007, les facteurs favorables à la propagation de la maladie sont présents.

L'échantillonnage est réalisé en semaine 25 soit moins d'une semaine après réception des boutures sur l'ensemble des exploitations. La diversité des obtenteurs-multiplicateurs présent dans le Sud-Ouest (Bernard, Guittet, Serres de Oisème, Challet-Hérault) est respectée lors des prélèvements, ainsi que la représentation de la diversité des variétés sur une même exploitation (tableau suivant). Au total 260 boîtes de Pétri comprenant chacune 4 feuilles d'une même variété sont envoyés à BBV. Aucun des échantillons prélevés ne présentaient de tâches suspectes. Aucune des analyses qui s'en sont suivies n'ont détectées la présence de rouille blanche du chrysanthème sur les échantillons prélevés.

Tableau 2 : Caractéristiques des échantillons prélevés

Site	Nombre de variétés échantillonnées	Nombre d'échantillons	Détection de rouille suite aux prélèvements
Ets Frimont (la Réole-33)	20 variétés petites (PF) et grosses fleurs (GF)	100 boîtes	Non
Ets Labat (Portets-33)	8 variétés PF et GF	30 boîtes	Non
Ets Hortiland (Bastennes-40)	60 variétés PF et GF	100 boîtes	Non
GIE FPSO (Villenave-33)	6 variétés pF	30 boîtes	Non

Plus tardivement dans l'itinéraire de culture, certaines des variétés sur ces entreprises ont présentées des symptômes de rouille : cela concerne en grosses fleurs Movida jaune, Polojo jaune, Sonora rouge et or, Corola doré et en petites fleurs Yahou, Obao, Baloon rouge, Kaleido blanc, Pantin jaune, Cigale rose.

1.3 Observations de terrain

Si un constat doit être fait sur cette campagne 2008, il concerne la qualité du matériel végétal reçu chez les horticulteurs. Les boutures racinées reçues étaient bien plus homogènes que l'an passé. Les producteurs ont également été plus vigilants à réception du matériel et ont misé sur un traitement régulier. Ils sont suivis au plus près leur culture étant donné l'ampleur de l'attaque du pathogène qui avait fortement surpris en 2007 surtout sur des entreprises qui n'en avaient plus eu depuis 10 ans.

En terme de climatologie, malgré un mois d'août assez pluvieux, l'automne a été clément à Bordeaux (voir annexe 1). Cependant, les conditions climatiques varient beaucoup d'une exploitation à une autre en fonction de leur exposition. Ces conditions ont parfois été favorables à la sporulation du champignon à mi-culture, quand les conditions d'humidité sont devenues plus favorables. Ainsi en 2008, seuls 3 entreprises ont déclaré avoir eu des foyers de rouille blanche. Les symptômes sont apparus tardivement dans l'itinéraire cultural, vers la fin

septembre. Ces foyers ont été localisés sur des entreprises dont les aires de cultures sont dans des zones humides : cuvette sujette au brouillard, parcelle sensible au flaquage,...

Ces entreprises ont des environnements favorables à l'expression des symptômes mais ont également eu de fortes attaques en 2007. Or, en 2008 aucune des variétés testées ne s'est révélée positive au test de détection en laboratoire. Se pose alors la question de la conservation du champignon hors de la période de production du chrysanthème. En effet, le pathogène de la rouille blanche du chrysanthème :

- a un nombre limité de plante hôte,
- a besoin de tissu vert pour se propager
- la dispersion des spores se fait difficilement.

Prenons l'exemple d'un horticulteur qui a été fortement touchés sur l'ensemble de ses variétés grosses fleurs en 2007 et sur certaines sensibles de petites fleurs. Suite à la Toussaint de 2007, ce producteur a pris soin de balayer, racler puis désinfecter son aire de culture avec du Cryptonet (BHS-solution aqueuse d'ammonium quaternaire 50 %). Son aire de culture est constituée d'une toile hors sol sous une serre DPG, avec un arrosage par subirrigation. Suite au chrysanthème, se sont succédé sur cette aire de culture des cultures de bisannuelles (pensées et primevères) puis une gamme de diversification et de vivaces au printemps avant d'accueillir de nouveau des chrysanthèmes. Et pourtant, les foyers de rouille sont retrouvés sur les variétés sensibles (Yahoo, Corola doré, Sonora rouge et or, Movida jaune) mais plus particulièrement aux endroits où l'an passé des foyers importants ont été détectés. Ainsi, une même variété présente à 2 endroits peut montrer dans un cas des symptômes sur plusieurs pots au niveau de cette zone « sensible » alors que rien n'est observé dans l'autre zone. Pourtant, la bibliographie sur le pathogène ne suggère pas de conservation possible dans le sol.

2 DESCRIPTION ACTIVITES STEPP BRETAGNE

2.1 Enquête et observations de terrain.

Le questionnaire pour l'enquête, validé en 2007 et reconduit sur le même modèle en 2008. En 2007, 25 enquêtes ont été effectuées en régions Bretagne et Pays de la Loire. Suite à la demande du Conseil Scientifique début 2008, l'équipe de la STEPP a poursuivi les enquêtes en 2008 en régions Normandie et Nord Pas de Calais, 2 bassins importants de production des chrysanthèmes. Au total 23 producteurs ont été visités mi-octobre 2008 afin d'obtenir un maximum d'information sur les interventions et les observations dans la culture. La répartition des visites par région : 6 visites en Basse Normandie, 5 visites dans la région autour de Lille, 8 visites dans la région autour de Dunkerque, 3 visites en région Bretagne et 1 visite en région Pays de la Loire. La durée de chaque visite a été environ 2 heures. Pendant ce temps, le questionnaire a été rempli par les enquêteurs et une visite d'entreprise nous a permis d'avoir une vision globale vis-à-vis de l'état des chrysanthèmes. Lors des visites aux entreprises, les producteurs ont constaté des problèmes de rouille sur les variétés suivantes :

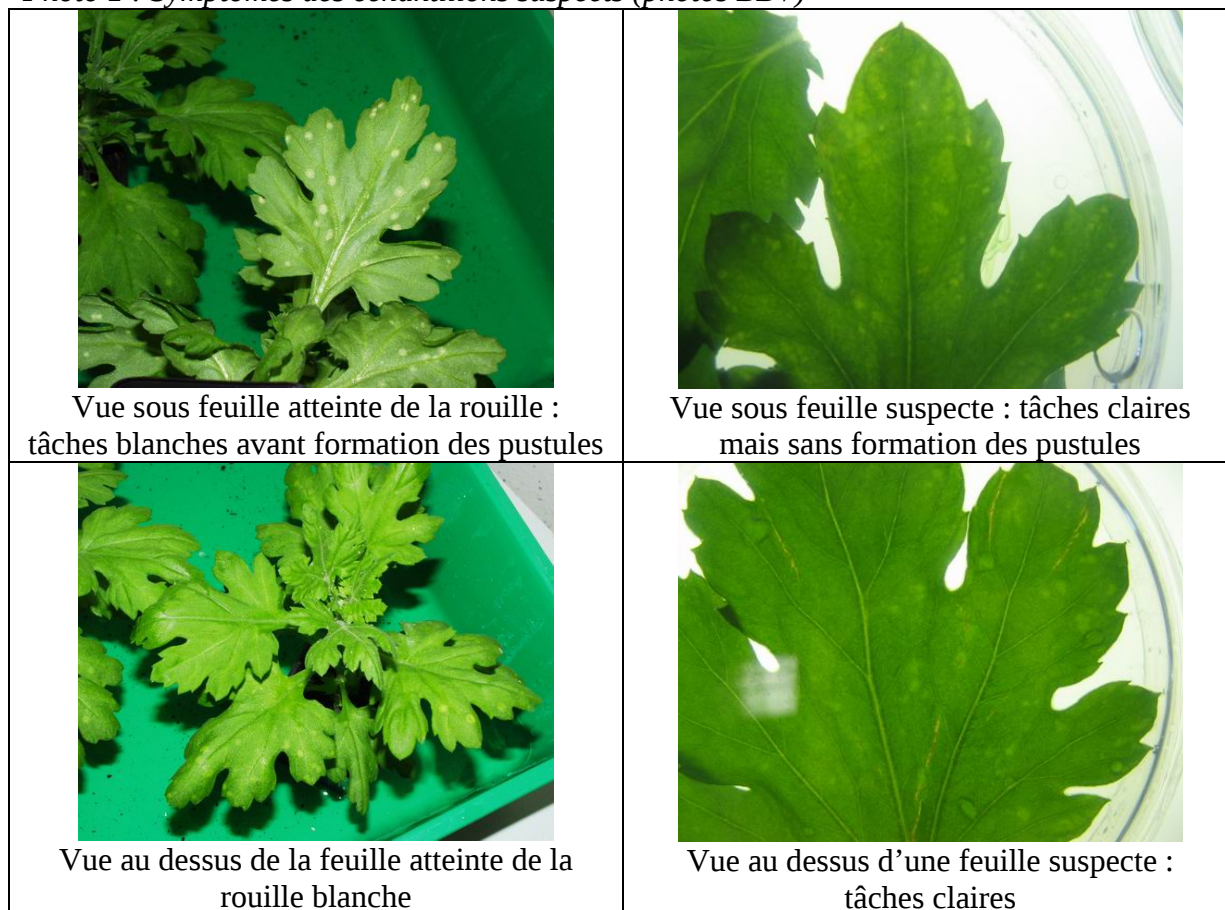
Tableau 3 : L'incidence de la rouille en 2008 par variété indiquée par le producteur

Variété	Région et nombre d'entreprises concernés	Remarques
Xena rouge	Dunkerque, 3 entreprises	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur, pots enterrés. Plantes touchées surtout au bord des parcelles. Premiers symptômes fin août / début septembre
Chirella	Dunkerque, 1 entreprise	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur. Premiers symptômes fin août / début septembre
Louissette jaune	Dunkerque, 1 entreprise	Chrysanthème dirigé cultivé en serre verre. Plantes touchées surtout à l'intérieur de la parcelle. Premiers symptômes fin août / début septembre
Torpedo	Dunkerque, 1 entreprise	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur. Premiers symptômes fin août / début septembre
Tabata jaune	Dunkerque, 1 entreprise	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur. Premiers symptômes fin août / début septembre
Urba rouge	Dunkerque, 2 entreprises	Chrysanthème en extérieur. Premiers symptômes fin août / début septembre
Taragona rouge	Dunkerque, 1 entreprise	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur. Premiers symptômes fin août / début septembre
Saga violet	Dunkerque, 1 entreprise	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur. Premiers symptômes fin août / début septembre
Cigale	Lille, 1 entreprise	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur. Premiers symptômes fin août / début septembre
Vaumoise	Basse Normandie, 1 entreprise	Chrysanthème multifleur cultivé en extérieur. Premiers symptômes début septembre sur le bas des feuilles

2.2 Suivi des cultures et échantillonnage sur les sites pilotes

Trois producteurs pilotes ont été suivis en 2008 (les mêmes qu'en 2007) ainsi que les cultures à la STEPP. Chez les 4 sites pilotes nous avons prélevé des échantillons de feuilles dès réception des jeunes plants. Pour la description du protocole de prélèvement voir le compte rendu 2007. Au total 339 boîtes de Pétri ont été remplies avec 4 feuilles par boîte. Voir annexe 2 pour la répartition du nombre de prélèvements par variété et par entreprise. La répartition du nombre de feuilles à prélever a été définie en fonction de l'importance de la commande de chaque variété par entreprise. Les échantillons de feuilles ont ensuite été envoyés rapidement par Chronopost (service 13 heures) au laboratoire BBV pour faire un diagnostic précoce sur l'état phytosanitaire des plantes concernant la rouille. Au moment des prélèvements, nous n'avons pas constaté de plants avec des symptômes de la rouille blanche. A BBV, un échantillon suspect a été identifié venant des boutures livrées chez Ets. Merrer (29) avec des symptômes suivants : tâches claires et régulières sans évolution vers une phase de sporulation (pustules). Nous avons averti ce producteur qui avait pris des précautions au sein de la variété visée (observations et traitements). Une enquête effectuée 2 mois plus tard n'a pas révélé de problèmes de rouille dans cette entreprise.

Photo 1 : Symptômes des échantillons suspects (photos BBV)



Par site pilote, nous avons installé un enregistreur climatique pour mesurer toutes les heures l'humidité relative (HR) et la température (temp) pendant toute la durée de la culture. Six paramètres ont été mesurés : RH et temp actuelle et, pendant la période d'une heure, temp et HR minimale et temp et HR maximale (voir annexes 3). Les producteurs pilotes ont été à nouveau enquêtés pour connaître les interventions et les pratiques effectuées en 2008.

Ets. Coz a été à nouveau enquêté en 2008 car ce producteur nous a communiqué de ses problèmes de rouille au bord de la parcelle sur la variété ‘Louissette jaune’ en coupe13, cultivé en multi chapelle, et la variété ‘Yahoo jaune’ en extérieur. Chez Ets Brichet les variétés ‘Succes mauve’ et ‘Angali violet’ en coupe 23 et sous tunnel ont développées de symptômes de rouille apparus fin août / début septembre. Cependant, les prélèvements sur les jeunes plants de ces variétés ont donné des résultats négatifs à BBV. La source d’infestation reste inconnue. Il est possible que le nombre de prélèvements de feuilles sur jeunes plants de ces variétés n’a pas été assez ou que les sources d’infestation se trouvaient dans d’autres lots de livraisons.

Tableau 4 : Caractéristiques des sites pilotes échantillonnés

Site	Support de culture	Irrigation	Symptômes de rouille
Ets Brichet (Lannion-22)	Culture de chrysanthème dirigé en coupe 23cm, 7 têtes, hors sol sous tunnel plastique.	Aspersion manuelle à la pomme	Oui, 2007 et oui, 2008
Ets Merrer (St Pol de Léon-29)	Culture hors sol, multi chapelle, chrysanthème dirigé, plusieurs contenants, de 5 à 15 têtes	Goutte à goutte	Oui, 2007 et non 2008
Ets Delhommeau (La Planche-44)	Serre plastique double paroi gonflable, coupe 23-32, 5 à 15 têtes.	Goutte à goutte	Oui, 2007 non, 2008
STEPP (Langueux-22)	Culture de chrysanthème dirigé, hors sol sous tunnel plastique	Goutte à goutte	Non, jamais

3 ANALYSE DE DONNEES DES ENQUETES

La saisie des réponses des enquêtes utilisant le logiciel Sphinx s'avère plus laborieuse que prévu. Cinquante réponses ont été saisies et une trentaine restent à rentrer. Nous estimons que l'analyse des réponses sur les 137 questions dans le questionnaire sera achevée courant mai 2009.

4 JOURNEE ROUILLE BLANCHE DU CHRYSANTHEME (29 JANVIER 2009) ORGANISEE DANS LE CADRE DE DU PROGRAMME « ROUILLE BLANCHE » ET DU PROGRAMME « PHYTOSTIMULANTS CONTRE LA ROUILLE » (VOIR DOCUMENT « JOURNEE ROUILLE BLANCHE 290109.PDF »)

Le 29 janvier 2009, le GIEFPSO et STEPP ont organisé une journée d'information sur la rouille blanche du chrysanthème au sein des locaux de BBV (St Pol de Léon, 29) pour les expérimentateurs et les conseillers techniques du réseau ASTREDHOR. La journée avait pour objectif d'informer les participants des résultats obtenus dans le cadre des 2 programmes nationaux Epidémiologie rouille et Phytostimulants contre rouille et de prendre connaissance des travaux de notre partenaire du programme « Rouille » Dr Kurt Heungens, responsable du programme « détection moléculaire des pathogènes *Puccinia horiana* et *Phytophthora* » au sein de l'ILVO à Gent-Belgique.

Le programme de la journée était le suivant

Matin présentations

- Recherche sur rouille blanche de chrysanthème en Flandres (Kurt Heungens, ILVO – PLANT)
- Évaluation de l'efficacité de produits phytosanitaires « alternatifs » sur le couple chrysanthème/rouille blanche et l'épidémiologie de la rouille blanche (Jérôme Guerrand – BBV Laboratoire Phytopathologie)
- Efficacité des phytostimulants en horticulture ornementale contre la rouille blanche (Oscar Stapel - STEPP)
- Programme National épidémiologie de la rouille blanche (Oscar Stapel – STEPP)
- Programme National sur l'étude épidémiologique de la rouille blanche du chrysanthème (Emilie Maugin – GIEFPSO)

Après midi :

- Visite à BBV, le nouveau laboratoire classé S3 permettant de manipuler les pathogènes réglementés comme *P. horiana*.

L'intervention de Kurt HEUNGENS nous a permis de mieux appréhender :

- la génétique du champignon *Puccinia horiana*, les pathovars existants et leurs virulences
- une méthode pour déterminer le niveau de résistance des nouvelles variétés de chrysanthèmes
- une nouvelle méthode de détection précoce par PCR quantitative avec une très haute sensibilité de détection.

Des tests moléculaires mettent en évidence au moins 3 pathovars existant en Europe, avec des niveaux de virulence différents selon les variétés testées. Un pathovar venant des Pays Bas est

particulièrement virulent avec des symptômes plus intenses. D'autres pathovars dans sa collection proviennent de la Belgique, du Japon et d'autres pays. Dr Heungens a développé une méthode de vérification du niveau de résistance des variétés de chrysanthèmes en fonction de leurs résistances à différents pathovars. Le protocole consiste à confronter différentes variétés à divers pathovars de *P. Horianana*. Un obtenteur de chrysanthème peut ainsi rapidement savoir (délai environ 15 jours) le niveau de résistance d'une variété contre certains pathovars. Avec cette connaissance l'obteneur peut prendre une décision stratégique vis-à-vis du positionnement géographique d'une nouvelle variété et de la commercialiser dans une région définie où un certain pathovar n'est pas présent.

Il serait donc intéressant de vérifier pour le pathogène présent en France à quel(s) pathovar(s) il(s) appartient et d'essayer de caractériser son agressivité face aux variétés courantes sur le territoire.

Les 2 axes de travail du laboratoire BBV sur la rouille blanche ont été présentés par Jérôme Guerrand, chercheur au laboratoire phytopathologie. Il s'agit les 2 programmes nationaux sur la rouille blanche : le programme « phytostimulants » et le programme « épidémiologie ». Dans la présentation du programme « phytostimulants » les méthodes d'inoculation, de criblage des phytostimulants et de détermination de la rémanence des produits ont été présentées. Dans le cadre du programme « épidémiologie de la rouille blanche » BBV a présenté une méthode en vivo de détection des symptômes de la rouille blanche sur échantillons de feuilles envoyées par les 2 stations GIEFESO et STEPP. La détection au laboratoire permet d'identifier les sources d'infection, d'aider les stations à identifier les paramètres environnementaux favorables à l'installation de la maladie et d'améliorer la prophylaxie pour prévenir les contaminations. Le compte rendu du travail de BBV se présente sous forme de mémoire de stage de M. Al Jabal (AgroParisTech), disponible dans le compte rendu du programme sur les phytostimulants.

5 PERSPECTIVES DU PROGRAMME EN 2009

Lors du Salon du Végétal en février 2009 les porteurs du projet ont contacté 3 des 4 obtenteurs français de chrysanthèmes (Ets Challet Hérault, Ets. Sauvé-Guittet, Ets. Bernard) pour les convier à participer à une réunion de travail prévu en mai 2009. Les 3 obtenteurs ont répondu favorablement. Cette réunion aura comme objectifs :

- Présenter les travaux effectués dans le cadre des programmes nationaux Rouille et Phytostimulants.
- Proposer de mettre en place en France pour les obtenteurs intéressés un système de détection précoce de la rouille blanche en cultures de pieds mères par analyse PCR quantitative (protocole décrit par Dr K. Heungens dans le Journal of Molecular Methods : « Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. »). La méthode de détection est apparemment très sensible et une feuille infestée parmi 20 000 feuilles prélevées peut être détectée (com. Dr. K. Heungens). Dans cette proposition on pourra imaginer effectuer des prélèvements de feuilles sur pieds mères réalisés par les obtenteurs selon un protocole établi. Les analyses seront effectuées par un laboratoire capable de maîtriser la technique de détection moléculaire décrit par Dr. Heungens. Les résultats des analyses seront confidentiels et directement communiqués aux obtenteurs concernés. En fonction des résultats des analyses les obtenteurs pourront ensuite prendre des mesures appropriées. Un schéma de certification phytosanitaire concernant la

rouille blanche pourrait aussi être envisagé avec les obtenteurs. Une telle certification par entreprise est probablement très motivant pour l'obteneur.

- Proposer aux obtenteurs la possibilité de sélectionner et de générer des variétés résistantes à la rouille blanche. Des tests en série peuvent être envisagés pour déterminer le niveau de résistance de chaque nouvelle création génétique vis-à-vis de différents pathovars de *P. horiana*. Un laboratoire compétent pourra de ce fait réaliser ces tests dans pour lesquels, les variétés seront inoculées avec différents pathovars. Une nouvelle création résistante à la rouille blanche aurait un potentiel commercial important pour l'obteneur.

Les propositions décrites ci-dessus ont été accueillies avec grand d'intérêt par les obtenteurs. Ainsi, une telle initiative commune pourrait conduire à une solution durable pour lutter contre la rouille blanche du chrysanthème.

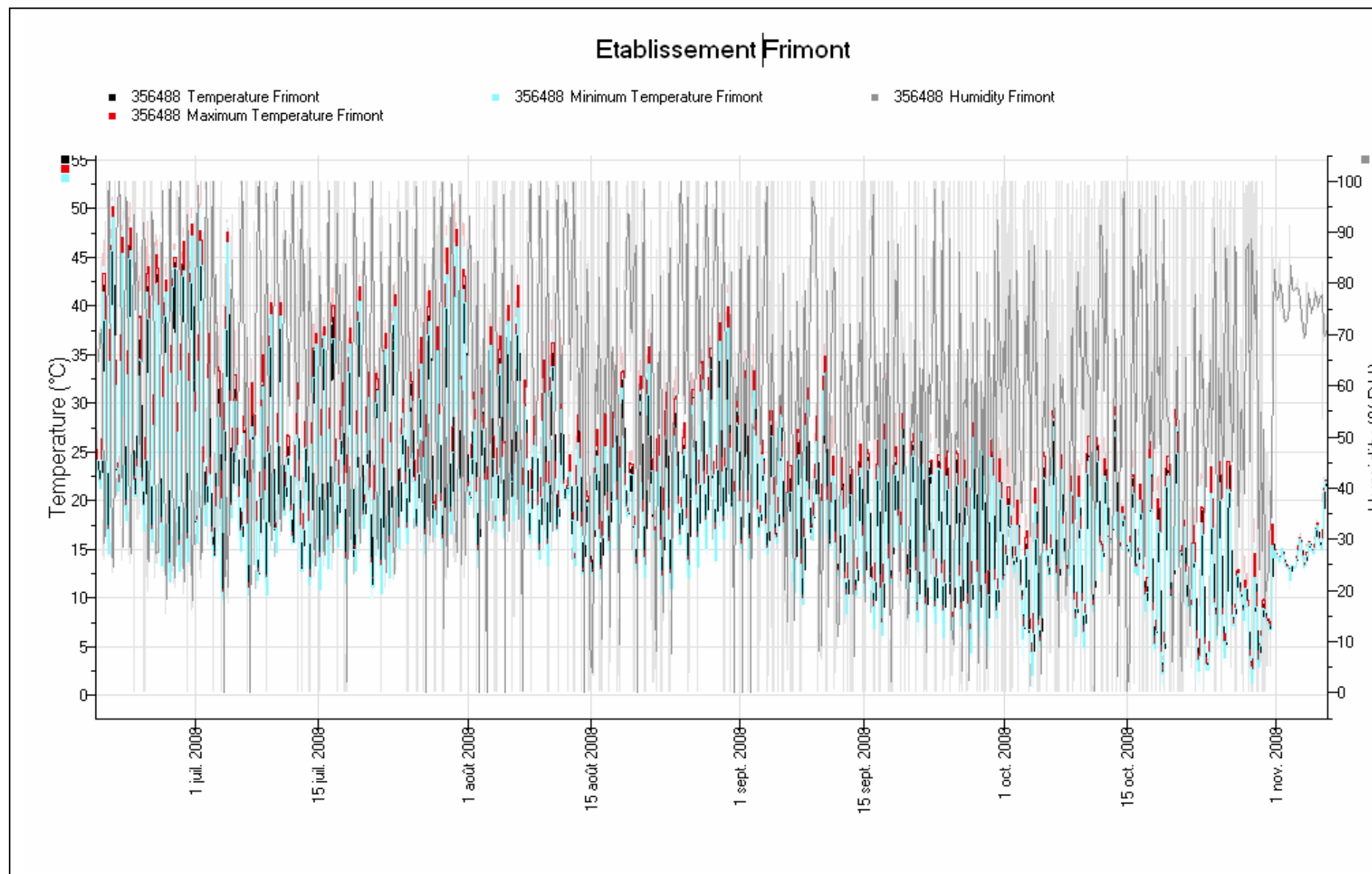
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

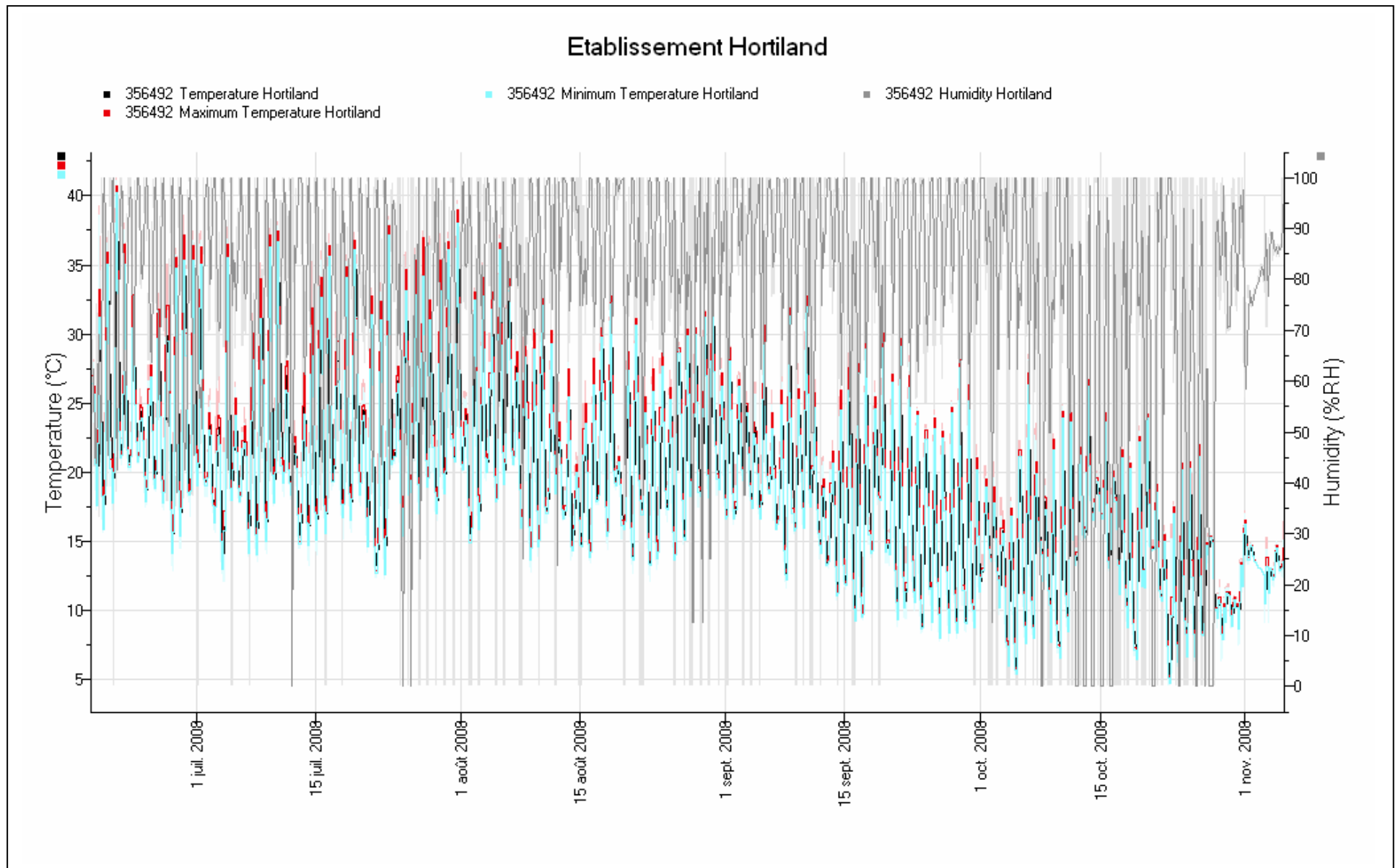
- Bonde, M.R., Peterson, G.L., Rizvi, S.A., and Smilanick, J.L. 1995. Myclobutanil as a curative agent for chrysanthemum white rust. *Plant Disease* 79 : 500-505.
- Catley, A. (1987) Outbreak of chrysanthemum white rust in Australie. *FAO Plant Protection Bulletin* 35 : 99.
- Cook, R.T.A. 2001. First report in England of changes in the susceptibility of *Puccinia horiana*, the cause of chrysanthemum white rust, to triazole and strobilurin fungicides. *Plant Pathology* ? 50 : 792.
- Dickens, J.S.W. 1970. Infection of chrysanthemum flowers by white rust (*Puccinia horiana*). *Plant Pathology* 19, 122-124.
- Dickens, J.S.W. 1990. Studies on the chemical control of chrysanthemum white rust caused by *Puccinia horiana*. *Plant Pathology* 39, 434-442.
- Firmaman, I.D., Martin, P.H. 1968. White rust of chrysanthemum. *Ann. Appl. Biol.* 62:429-442.
- Grouet, D. 1984. Mise au point sur les possibilités actuelles de lutte contre la rouille blanche du chrysanthème. *Revue Horticole* 251, 33-36.
- Grouet, D.; Allaire, L. 1973. La rouille blanche du chrysanthème. *Evolution et méthodes de lutte. Horticulture Française* 30, 1-8.
- Guerrand, J. (2004) Les rouilles fongiques. Rapport bibliographique, BBV. 22p.
- Harada Y., Iwama T. et Fukuda T. 1996. Life cycle of *Puccinia chrysanthemii* Roze, the rust fungus on *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 62:199-201.
- Hossein A. S, Baeyen, M. Maes, M. Höfte et K. Heungens, 2008. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. *Journal of Biological Methods*.
- MacDonald, L. 2001. Floriculture Factsheet on Chrysanthemum White Rust. British Columbia Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, Abbotsford, B.C., Canada. pp.3.
- Ohishi K., Okumura Y. et Moroika K. 2000. Incubation of *Puccinia horiana* P. H. using chrysanthemum plants cultured in vitro. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 69 (6): 767-769.
- OEPP/EPPO. 2006. Data sheets on quarantine organisms, 1982, 80p.
- ONIFLHOR. 2001. Le marché du chrysanthème de Toussaint. Publication CE-8/10/2001.
- Punithalingam, E. 1968. C.M.I. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 176 (*Puccinia horiana*). CAB International, Wallingford, UK.
- Rademaker, W.; Jong, J. de. 1987. Types of resistance to *Puccinia horiana* in chrysanthemum. *Acta Horticulturae* 197, 85-88.
- Rattink, H.; Zamorski, C.; Dil, M.C.. 1985. Spread and control of white rust (*Puccinia horiana*) on chrysanthemums on artificial substrate. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 50, 1243-1249.
- Takatsu Y., Ohishi K., Tomita Y., Hayashi M., Nakajima M., Akutsu K.. 2000. Use of chrysanthemum plantlets grown in vitro to test cultivar susceptibility to white rust, *Puccinia horiana* P. Hennings. *Plant Breeding* 119, 528-530.
- Srivastava, A.K.; Defago, G.; Kern, H. 1985. Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. *Phytopathologische Zeitschrift.* 114, 73-78.
- Water, J.K.. 1981. Chrysanthemum white rust. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 11, 239-242.
- Wojdyla, A.T. 2002. Azoles in the control of *Puccinia horiana* on chrysanthemum. *J. Plant Protection Res.* 42 (3) : 263-270.

- Wojdyla, A.T. 2004. *Development of Puccinia horiana on chrysanthemum leaves in relation to chemical compounds and time of their application. J. Plant Protection Res.* 44 (2) : 91-102.
- Yamada S. 1956. *Experiments on the epidemiology and control of chrysanthemum white rust, caused by Puccinia horiana. Annals of the Phytopathological Society of Japan* 20, 148-154.
- Yoder Bros. 1998. *Chrysanthemum white rust - a Bulletin. Yoder Brothers, Inc., Florida, USA.*
- Zamorski, C. 1982. *Efficacité des fongicides pour la lutte contre la rouille blanche Puccinia horiana. Acta Agrobotanica* 35, 251-256.

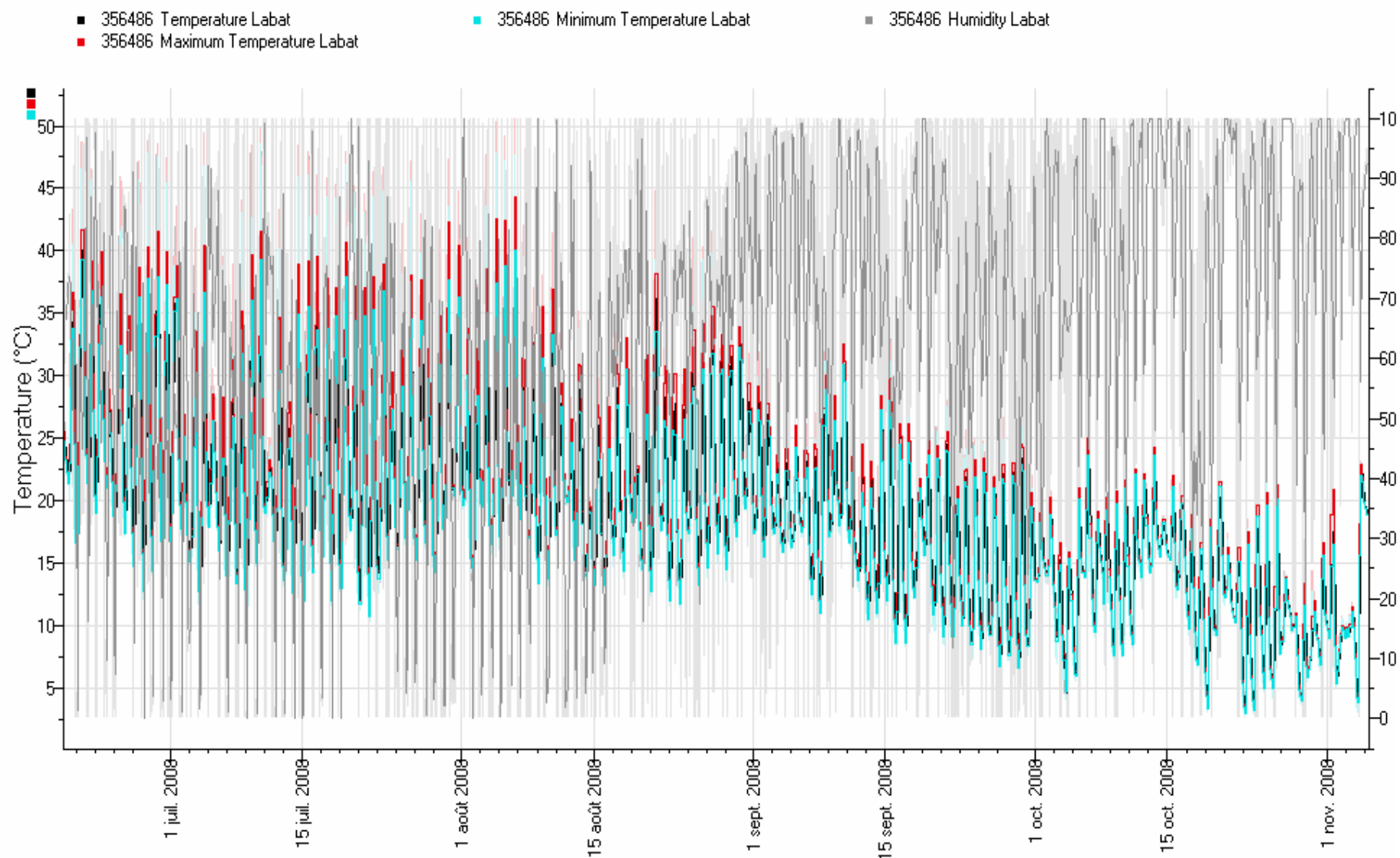
ANNEXE 1

Relevés climatiques des sites pilotes GIE FPSO par les sondes Tiny tag



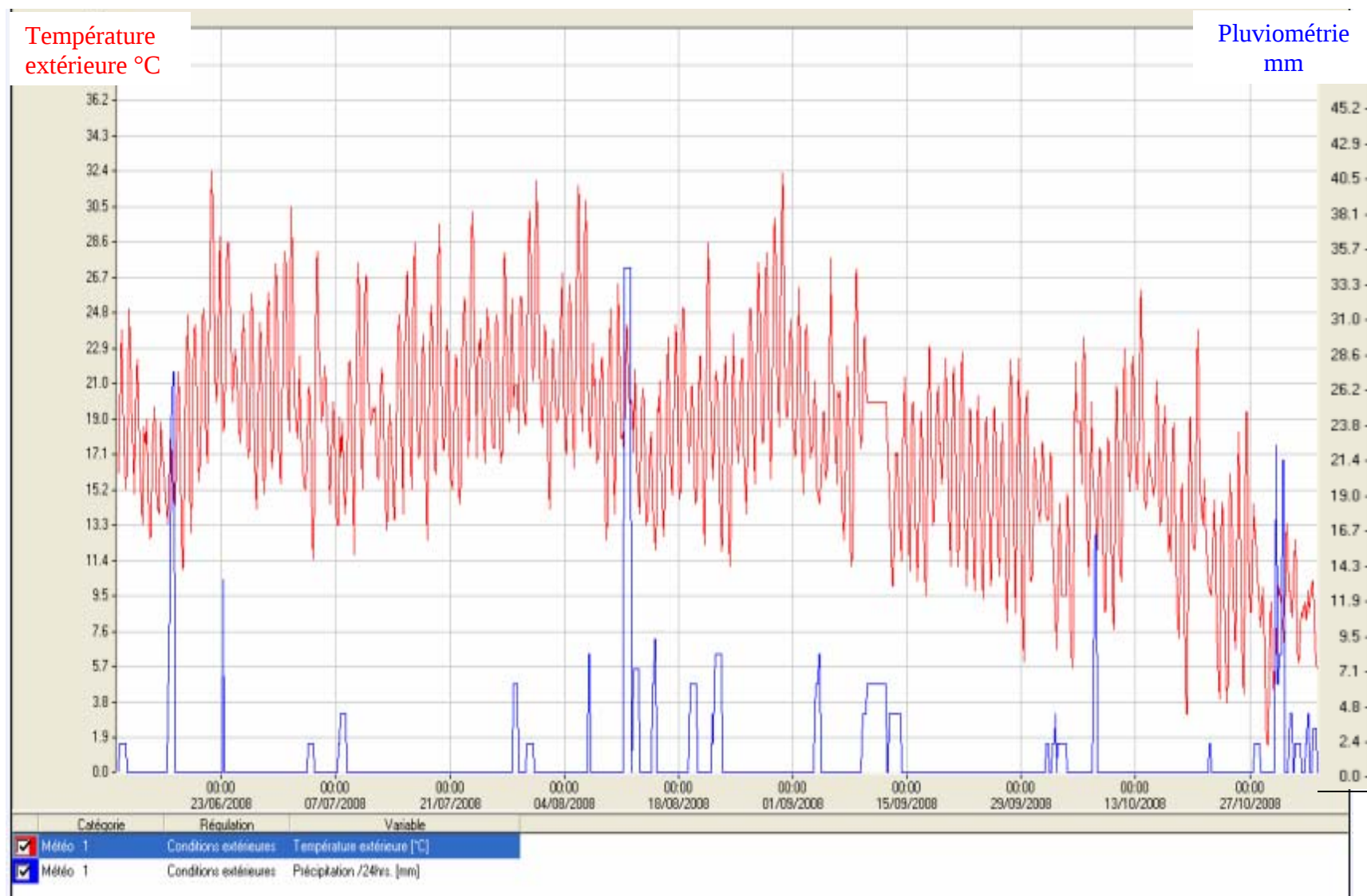


Etablissement Labat



ANNEXE 1

Relevés climatiques du GIE FPSO par l'ordinateur climatique



Annexe 2

ETS Delhommeau

Semaine d'échantillonnage	Fournisseur		Variété	Code	Nombre théoriqu	Nombre de boîtes	Nombre de feuilles à prelever
S28	Challet Herault		One Step rouge	D1	7	0	8
			Fontana jaune	D2	11	0	12
	Bernard		Malabar	D3	14	3	12
			Malibu	D4	57	14	56
			Salambo	D5	47	12	48
			Komodo	D6	5	1	4
			Bouldor	D7	19	5	20
			Nagano	D8	14	3	12
	Guittet		Azadi	D9	2	1	4
			Passion rouge	D10	50	12	48
			Passion jaune	D11	114	28	112
			Sunberry	D12	2	1	4
			Angali	D13	35	9	36
			Olebo violet	D14	2	1	4
			Santosh	D15	2	1	4
			Jacana	D16	19	5	20
Total				400	95	400	

ETS Merrer

Semaine	Fournisseur		Variété	Code	Nombre théoriqu	Nombre de boîtes	Nombre de feuilles à prelever
S27	Challet Herault		Allegro framboise	M1	25	6	24
			Belcanto rouge et d	M2	27	7	28
			Carillon cuivre	M3	25	6	24
			Cymbale doré	M4	11	3	12
			Cymbale jaune	M5	18	5	20
			Cymbale rose	M6	15	4	16
			Cymbale violet	M7	17	4	16
			Lyre blanc	M8	15	4	16
			Triumf red	M9	44	11	44
			Triumf violet	M10	48	12	48
			Triumf yellow	M11	52	13	52
			Rosalba rose	M12	21	5	20
	Bernard		Malabar	M13	25	6	24
			Malibu	M14	22	6	24
			Komodo blanc	M15	13	3	12
			Kalisto	M16	10	2	8
			Bouldor	M17	10	2	8
Total				400	100	400	

ETS Brichet

EVS Brevet							
Semaine	Fournisseur		Variété	Code	Nombre théoriqu	Nombre de boîtes	Nombre de feuilles à prelever
S27	Bernard		Malibu	B1	9	2	8
	Oroflor		Albugo	B2	17	0	16
			Passion cuivré	B3	52	13	52
			Darina	B4	4	0	4
			Passion jaune	B5	94	24	96
			Soleil voilé	B6	21	5	20
			Succes mauve	B7	19	5	20
			Angeli	B8	52	13	52
			Passion rouge et o	B9	42	10	40
			Tourbillon	B10	11	0	12
	Challet Hérault		Alto	B11	17	4	16
			Carillon	B12	10	3	12
			Clavecin	B13	9	2	8
			Alegro	B14	21	5	20
			Fifre rose	B15	10	3	12
			Belcanto	B16	12	3	12
Total				400	92	400	

STEPP

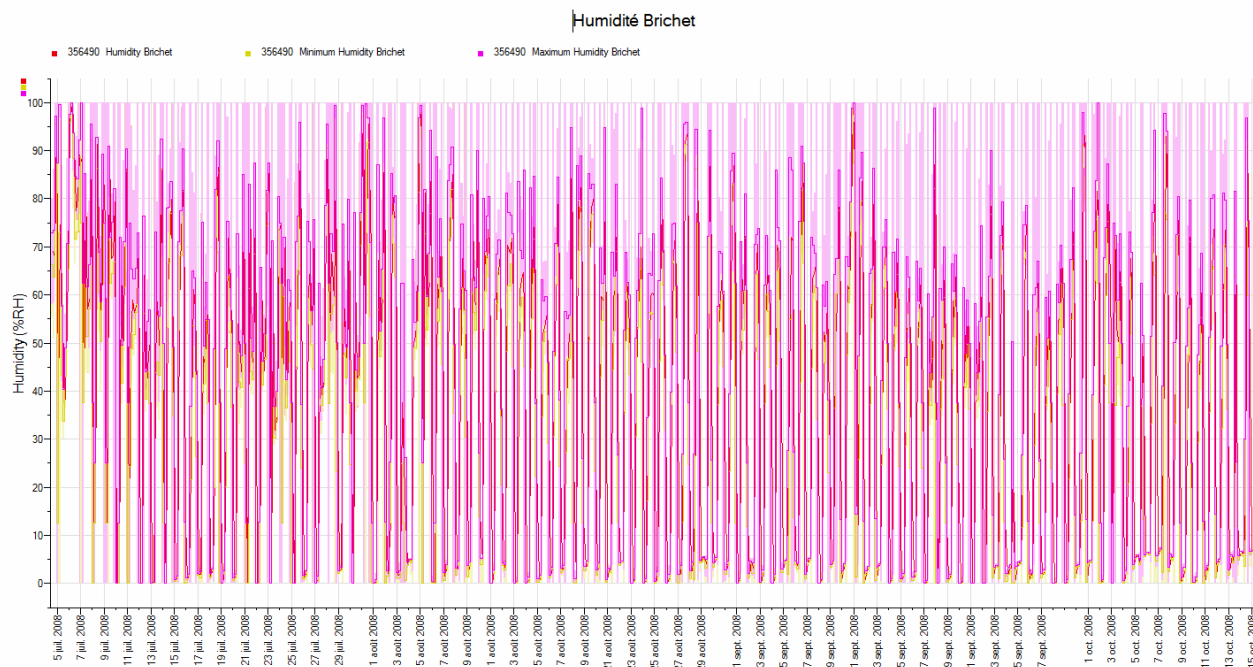
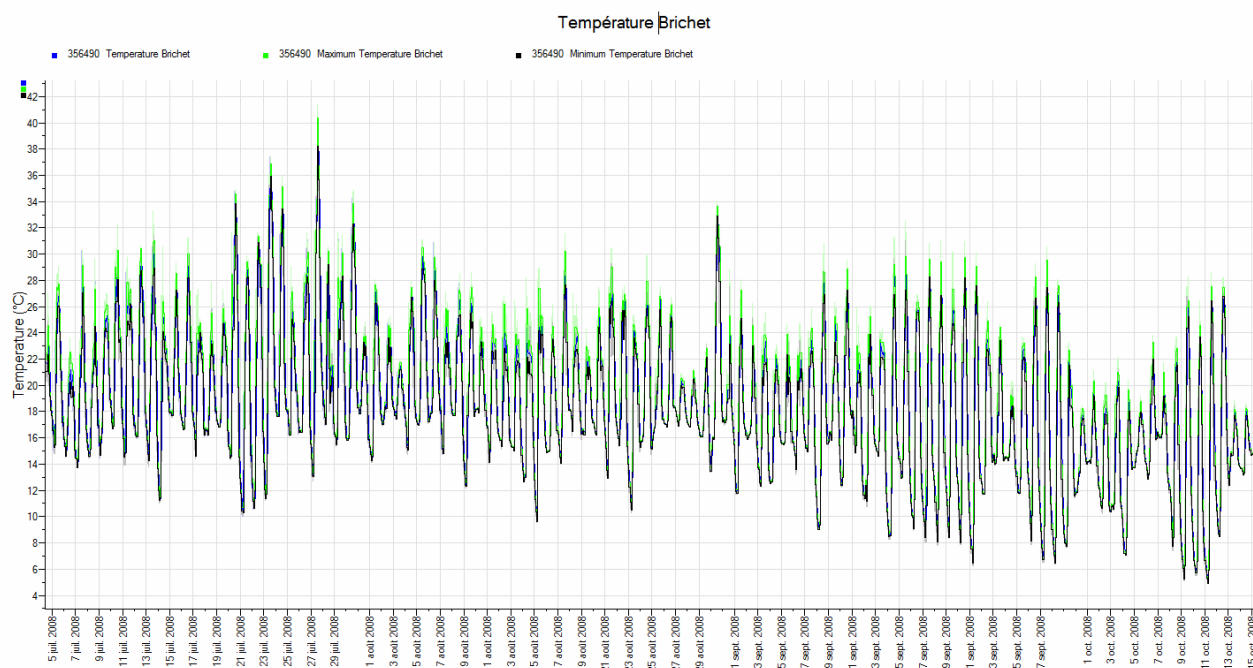
Semaine	Fournisseur	Variété	Code	Nombre de boîtes	Nombre de feuilles à prelever
S29	Challet Hérault	Louissette jaune	S4	13	52
		Chorus	S2	13	52
		Kena	S3	13	52
S35		Spiro	S1	13	52

52

208

Annexe 3

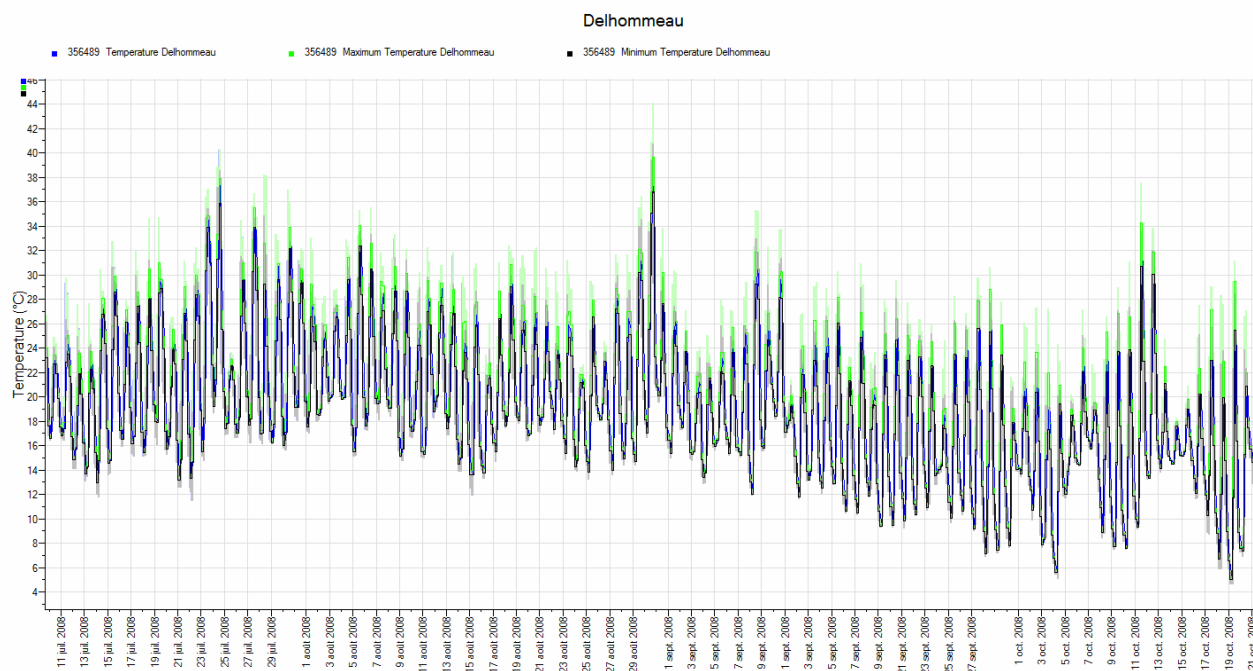
Relevés Climatiques Ets Brichet



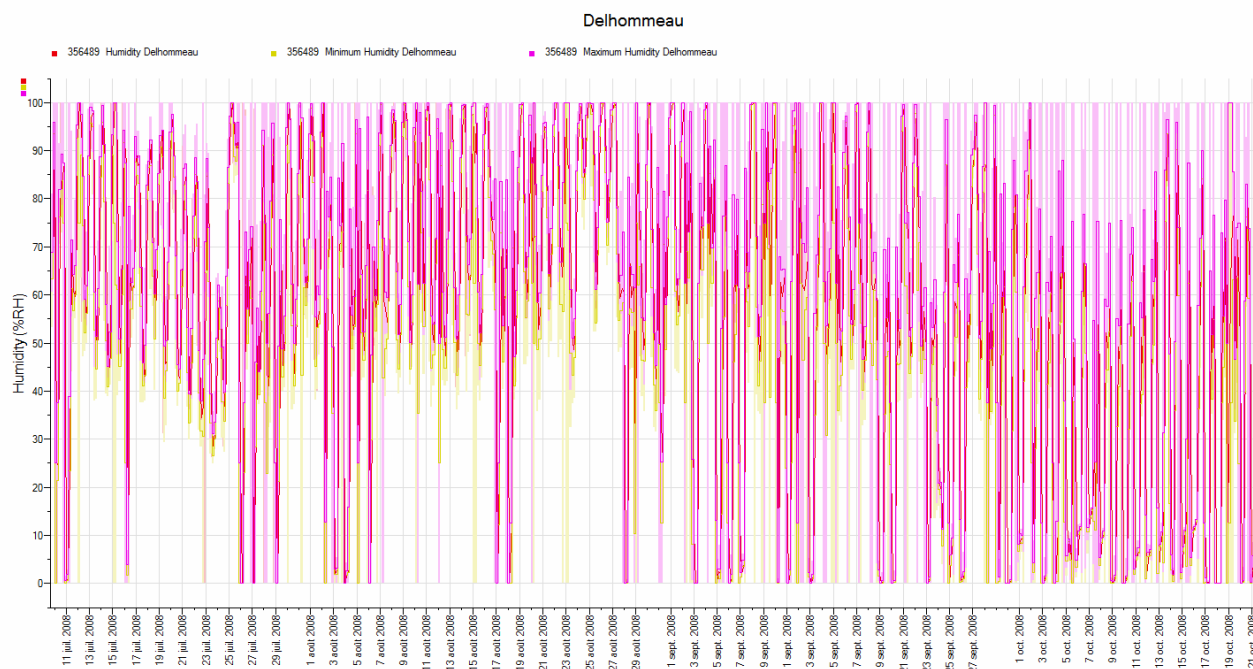
Annexe 3

Relevés Climatiques Ets Delhommeau

Température



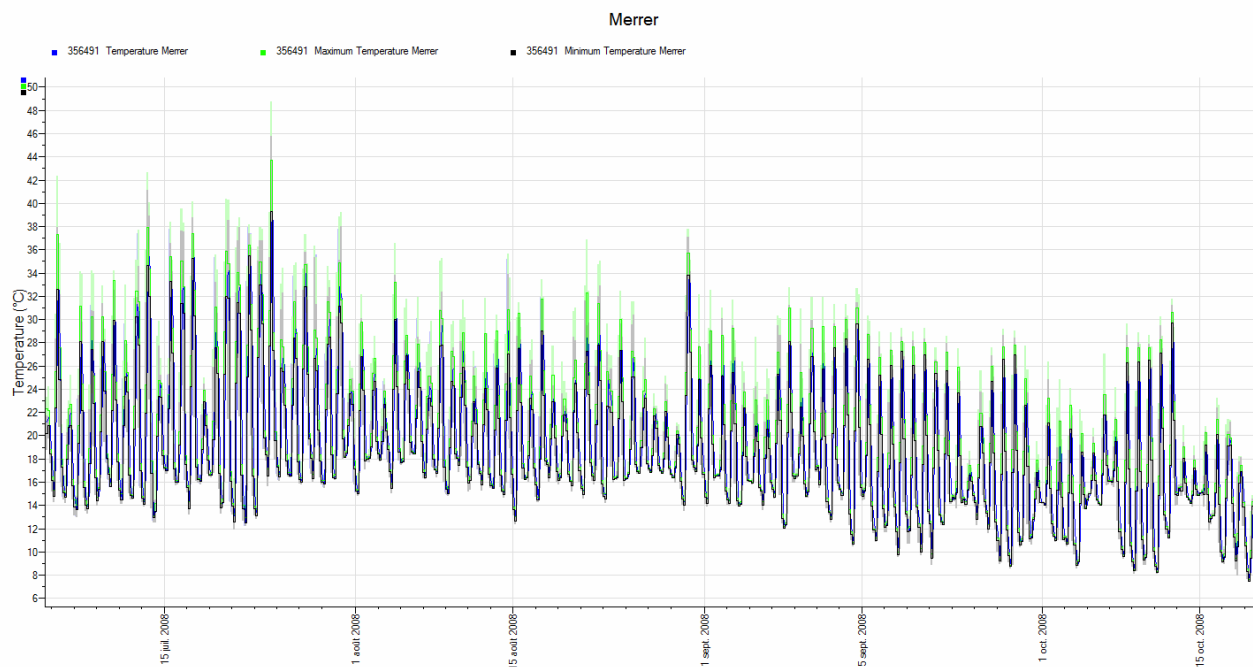
Humidité relative



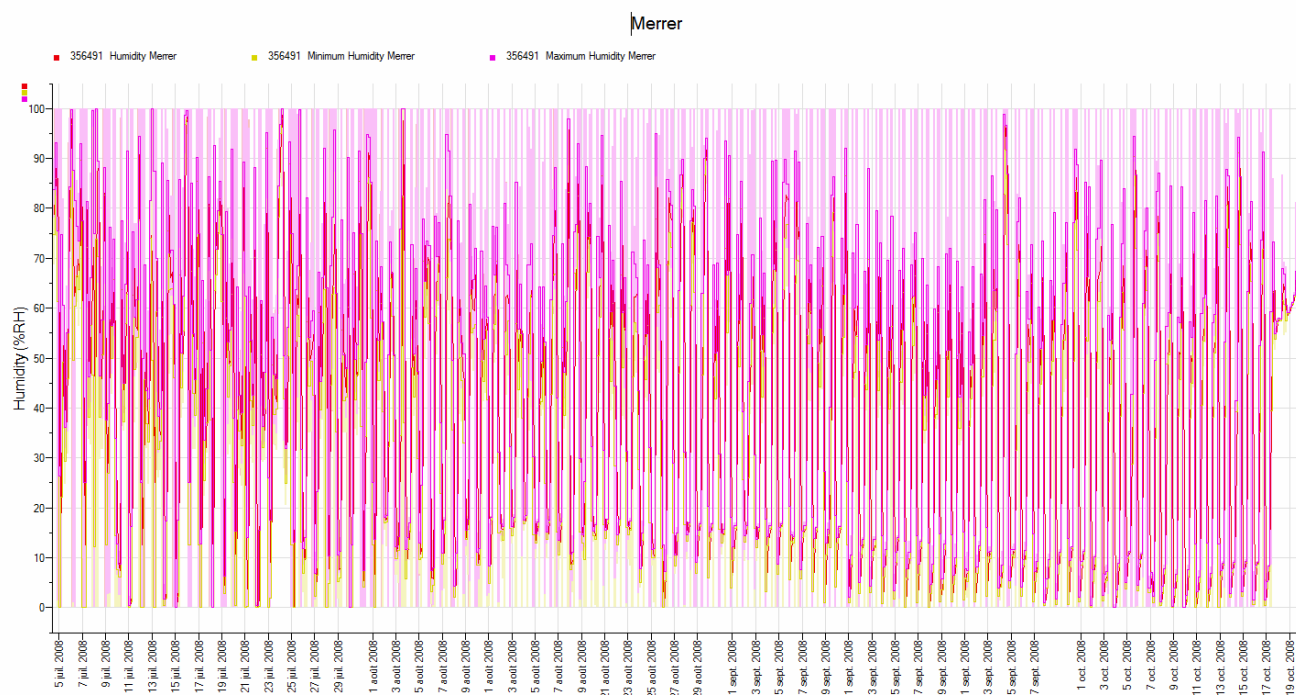
Annexe 3

Relevés Climatiques Ets Merrer

Température

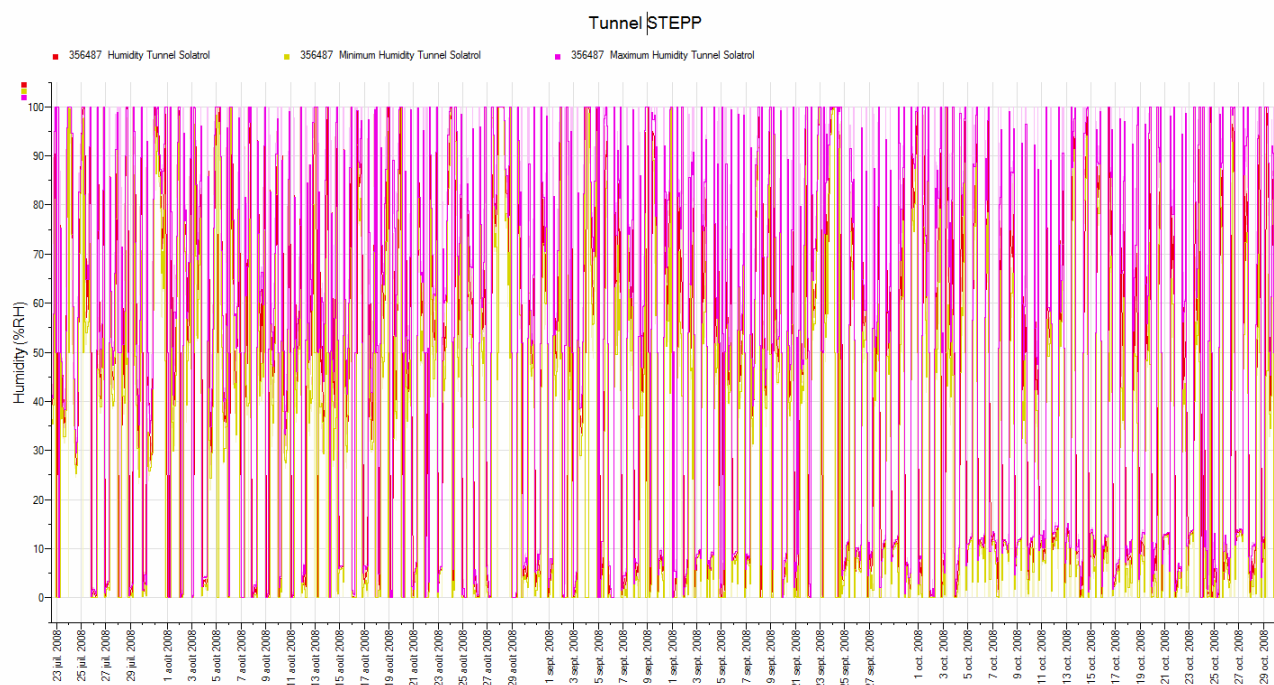
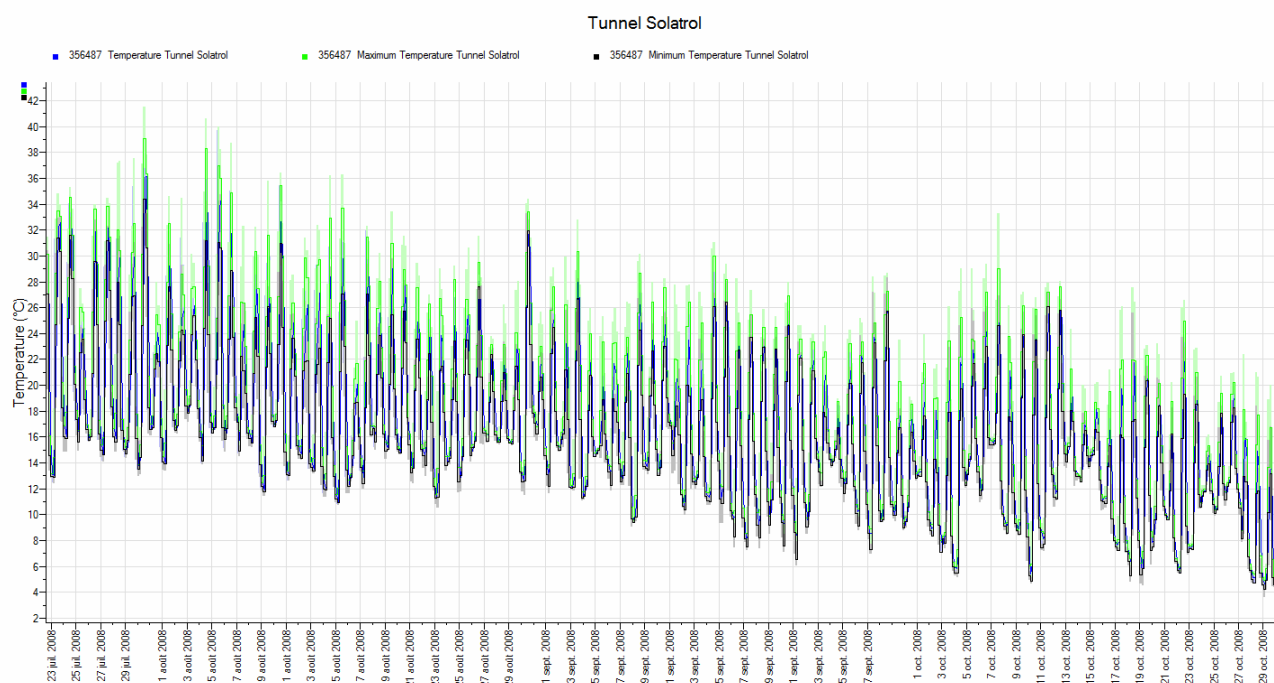


Humidité relative



Annexe 3 Relevés Climatiques STEPP

Température



Présentations Journée Rouille Blanche du Chrysanthème 29/01/09
Liens vers présentations



Recherche sur rouille blanche de chrysanthème en Flandres
Kurt Heungens ILVO – PLANT

Évaluation de l'efficacité de produits phytosanitaires « alternatifs » sur le couple chrysanthème/rouille blanche et Epidémiologie de la rouille blanche
Jérôme Guerrand – BBV Laboratoire Phytopathologie

Programme National Phytostimulants en horticulture ornementale
Programme National Epidémiologie de la Rouille Blanche
Oscar Stapel – STEPP Bretagne

Programme National sur l'étude épidémiologique de la rouille blanche du chrysanthème
Emilie Maugin – GIEFPSO

Article scientifique de Kurt Heungens
Molecular detection of Puccinia horiana in Chrysanthemum x morifolium through conventional and real-time PCR.
Journal of Microbiological Methods



Recherche sur rouille blanche de chrysanthème en Flandres

Kurt Heungens

visite à STEPP et BBV
Bretagne
28&29/01/2009



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



sujets

- ILVO: quoi, où et structure d'organisation
- Sujets de recherche dans la groupe mycologie
- *Puccinia horiana* / rouille blanche de chrysanthème
 - introduction: cycle, contrôle, objectifs de recherche
 - détection moléculaire
 - développement latente dans la plante
 - essai d'évaluation de résistance
 - pathotypes
 - autres sujets: hérédité de la résistance, épidémiologie, résistance au fongicides

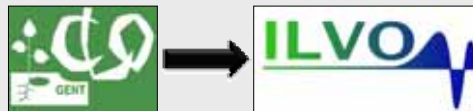


ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



ILVO: quoi, où, et structure d'organisation

- ILVO = Instituut voor Landbouwkundig – en VisserijOnderzoek
(Institut de recherche pour l'agriculture et la pêche)
- parti de la ministère d'agriculture
- 2002: Ministère d'agriculture: fédéral vers régional
- 2006: réorganisation

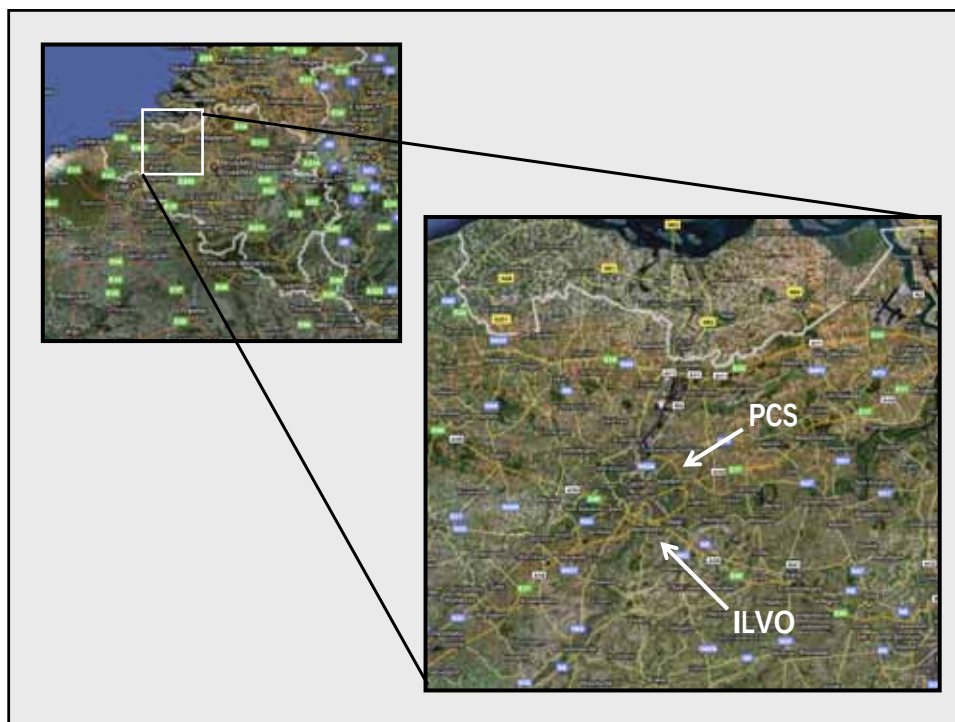


ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij

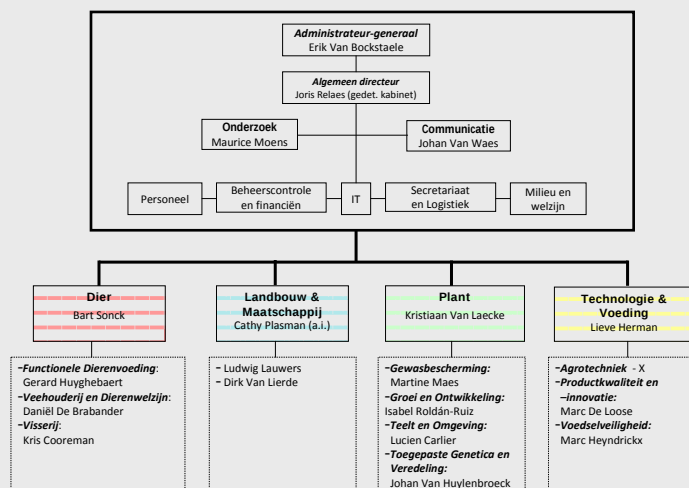


ILVO: quoi, où, et structure d'organisation

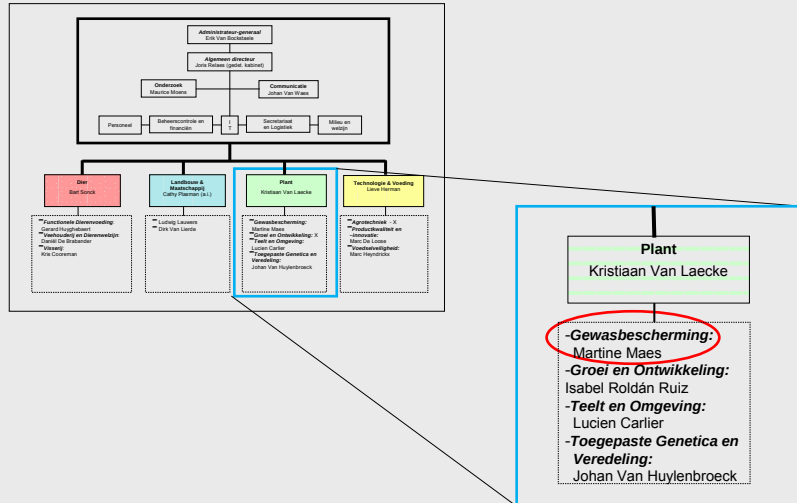




ILVO: quoi, où, et structure d'organisation



ILVO: quoi, où, et structure d'organisation



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



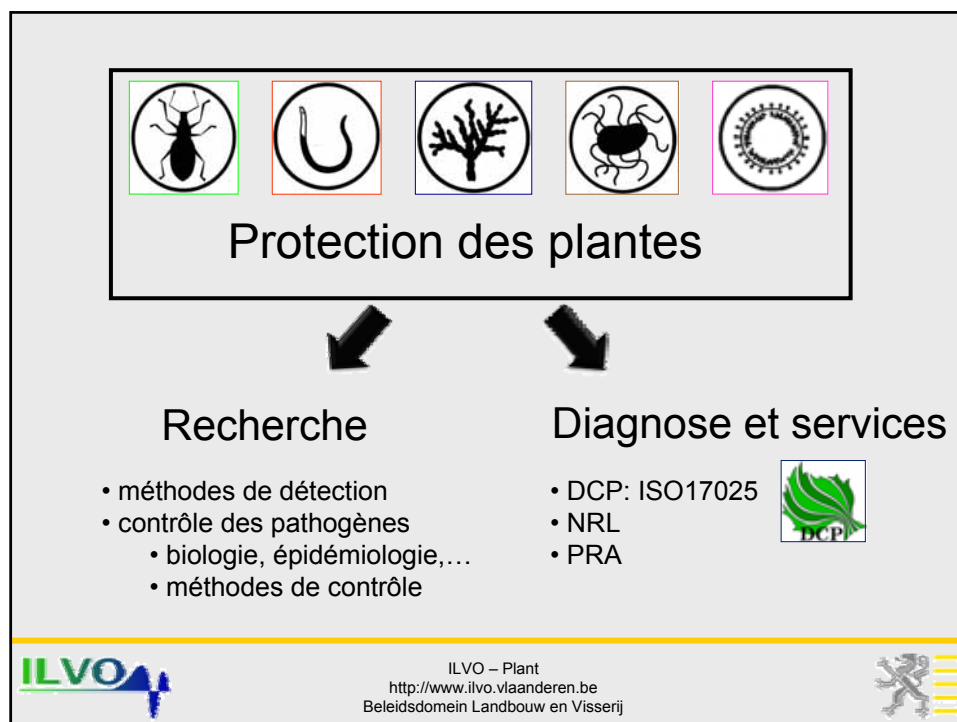
Disciplines et responsables

Insectes	Nématodes	Champignons	Bactéries	Virus
Hans Casteels	Nicole Viaene	Kurt Heungens	Johan Van Vaerenbergh	Kris De Jonghe



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij





Recherche dans l'unité mycologie

Projects:

- *Phytophthora ramorum* sur rhododendron
- *Puccinia horiana* sur chrysanthème
- *Colletotrichum acutatum* sur fraise
- *Fusarium foetens* sur Begonia
- *Fusarium* sp. sur paprika
- *Phytophthora citricola* sur azalée
- *Cylindrocladium scoparium* sur azalée
- *Cylindrocladium buxicola* sur buis
- *Phytophthora cactorum* x *P. hedraiandra* hybrides

Aspects:

- dissémination
- diversité génétique (pathotypes et marqueurs moléculaires)
- types de croissance
- évaluation de résistance
- fongicides: efficacité et développement de résistance
- détection moléculaire
- méthodes d'inoculation



Puccinia horiana rouille blanche de chrysanthème

- **introduction: symptômes, cycle, contrôle, questions de recherche**
- phylogénie et détection moléculaire
- développement latente dans la plante
- essai d'évaluation de résistance
- pathotypes
- autres sujets:
 - hérédité de la résistance
 - épidémiologie
 - résistance au fongicides

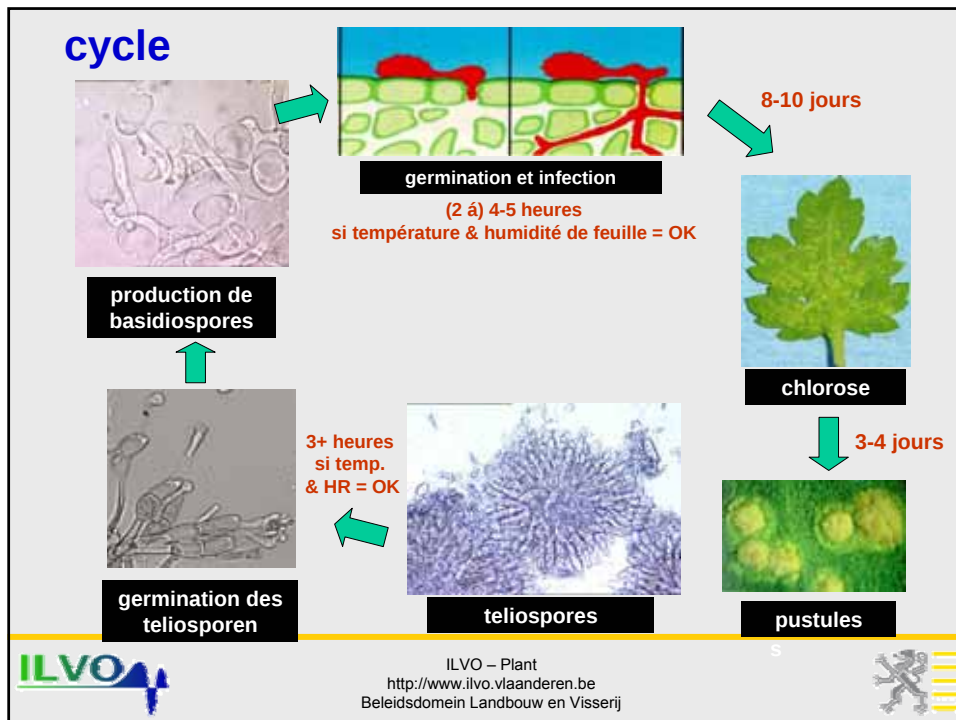


introduction



- **symptômes**
- cycle
- contrôle
- questions de recherche





≠ rouille brune = *P. chrysanthemi* ≠ *P. tanacetii*



symptômes, cycle, **contrôle**, questions de recherche

- Éviter les conditions nécessaires pour l'infection
 - éviter l'humidité des feuilles (irrigation, condensation)
 - éviter l'humidité de l'air élevée
- Éviter l'introduction du pathogène
- Fongicides (surtout préventif)
- Employer des cultivars qui sont résistants



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



symptômes, cycle, **contrôle**, questions de recherche

- Éviter les conditions nécessaires pour l'infection
 - éviter l'humidité des feuilles (irrigation)
 - éviter l'humidité de l'air élevée
- Éviter l'introduction du pathogène
- Fongicides (surtout préventif)
- Employer des cultivars qui sont résistants



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



symptômes, cycle, contrôle, questions de recherche

- Éviter l'introduction de l'agent pathogène
 - Comment est-ce qu'il survit?
 - Comment est-ce qu'il entre aux pépinières?
 - Est-ce qu'on peut installer un système d'avertissement?
- Fongicides
 - Est-ce qu'il y a de la résistance au fongicides?
 - Comment est-ce qu'on peut la détecter (et intégrer dans un système d'avertissement)?
- Cultivars résistants
 - Quels cultivars sont résistants?
 - Est-ce qu'il y a des pathotypes?



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Rouille blanche: objectifs de recherche à l'ILVO (2003-2011)

Survie / introduction:

- test moléculaire de détection (real-time PCR) (2003-2007)
- développement latente, en fonction de la température (2007)
- introduction aux pépinières / système d'avertissement (2009-2011)

Résistance aux fongicides

- présence? (2007, 2009)
- détection moléculaire de résistance ? (2009-2011)

Cultivars résistants

- développement d'un essai de résistance (2004-2005)
- évaluation de résistance (2004-2011)
- présence et diversité génétique des pathotypes (2007-2009)
- hérédité de la résistance (2008-2010)



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



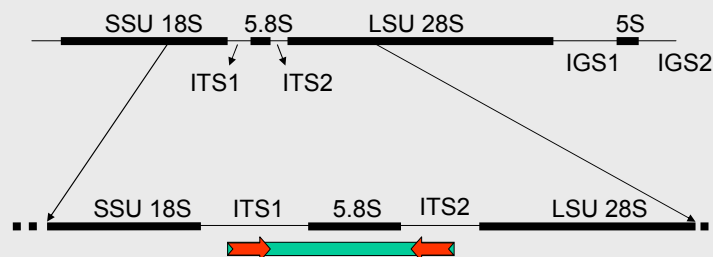
Puccinia horiana rouille blanche de chrysanthème

- introduction: symptômes, cycle, contrôle, questions de recherche
- **phylogénie et détection moléculaire**
- développement latente dans la plante
- essai d'évaluation de résistance
- pathotypes
- autres sujets:
 - hérédité de la résistance
 - épidémiologie
 - résistance au fongicides



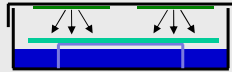
phylogénie et détection moléculaire

gènes rRNA
régions ITS



phylogénie et détection moléculaire

- collection de spores: vérification microscopique
- extraction de ADN
- amplification du région d'intérêt
- cloner et détermination de la séquence ADN



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



phylogénie et détection moléculaire

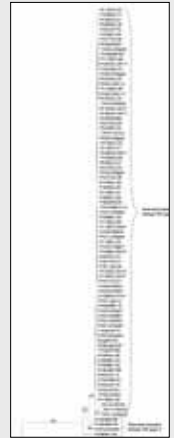
isolats de P. horiana dont la séquence ITS a été déterminée

Isolate code and (number of clones sequenced)	Host plant	Country of collection and (collection year)	Nature and origin of sample
HA101-Ph301 (19)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph304 (5)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph308 (8)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph313 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph316 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph316HF (4)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph319 (5)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph325 (4)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA101-Ph325HF (5)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (2003)	Fresh sample, collected by H. Alaei
HA102-Ph01RE (5)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	UK (2005)	Fresh sample, via Dr. S. McDonough, CSL, York, UK
HA102-Ph02SG (4)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	UK (2005)	Fresh sample, via Dr. S. McDonough, CSL, York, UK
HA102-Ph03SP (5)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	UK (2005)	Fresh sample, via Dr. S. McDonough, CSL, York, UK
HA104-Ph01N (3)	<i>Chrysanthemum hortorum</i>	Norway (1996)	Herbarium specimen, via Dr. H.B. Gjerum, NPPI, As, Norway
HA104-Ph02N (3)	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Norway (1999)	Herbarium specimen, via Dr. H.B. Gjerum, NPPI, As, Norway
HA103-Ph03B (3)	<i>Chrysanthemum "Cool"</i>	Brazil (2002)	Herbarium specimen, via Dr. H.B. Gjerum, NPPI, As, Norway
HA105-Ph01P (3)	<i>Chrysanthemum "Melba"</i>	Poland (2006)	Fresh sample, via Dr. A. Wojdyla, INSAD, Skierniewice, Poland
HA106-Ph01H (3)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Netherlands (2006)	Fresh sample, via Dr. W. Janssen, PD, Wageningen, The Netherlands
HA107-Ph01U (1)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	USA (2006)	Dried sample, via Dr. M. Palm, APHIS-PPQ, Beltsville
HA310-CH54 (4)	<i>Chrysanthemum sinensis</i>	Japan (1903)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
HA309-CH56 (3)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Japan (1912)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij

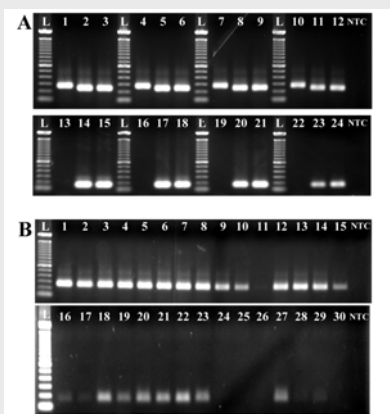




- 3 régions de répétition
- 3 types de ITS



phylogénie et détection moléculaire



- amorces spécifiques pour les types II et III
- montré que les types exceptionnelles sont présents dans tous les isolats



phylogénie et détection moléculaire

isolats d'autres rouilles sur chrysanthème

Rust species	Isolate code and (number of clones sequenced)	Host plant (and family if not Asteraceae)	Country of collection and (collection year)	Nature and origin of sample
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA301-CH83 (4)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1900)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA302-CH84 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1902)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA303-CH86 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1904)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA304-CH88 (5)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1901)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA305-CH89 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1902)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA306-CH81 (2)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Germany (1900)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA307-CH57 (2)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	USA (1921)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA308-CH79 (5)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Finland (1937)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>P. chrysanthemi</i>	HA306-CH81 (2)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Germany (1900)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>P. chrysanthemi</i>	HA307-CH57 (1)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	USA (1921)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>P. chrysanthemi</i>	HA308-CH79 (3)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Finland (1937)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium



Phylogénie



P. horiana dans le clade avec les rouilles des grains

Puccinia chrysanthemi

Puccinia sp. 1
 dans le clade avec plusieurs autres rouilles d'Asteraceae



détection moléculaire: rouilles non visées

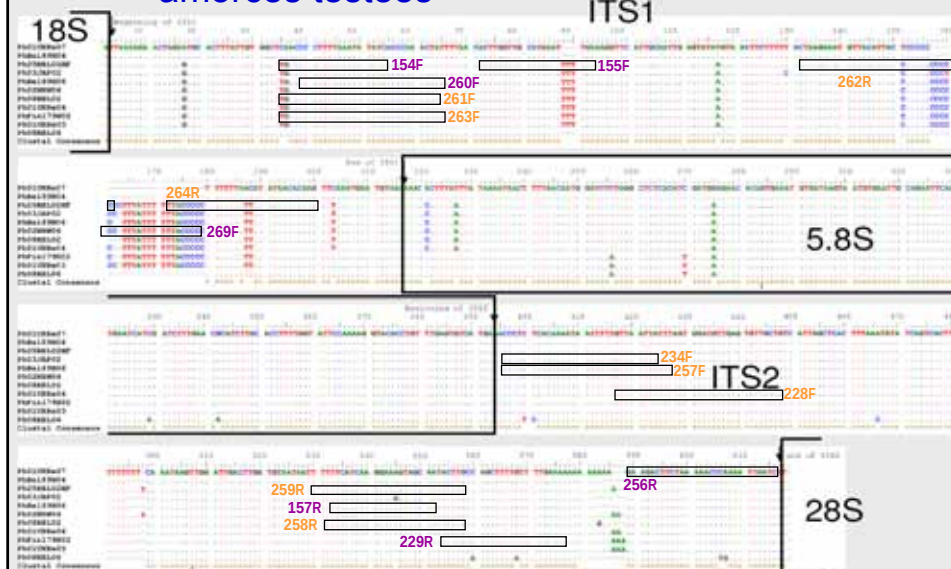
Rust species	Isolate code and (number of clones sequenced)	Host plant (and family if not Asteraceae)	Country of collection and (collection year)	Nature and origin of sample
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA301-CH83 (4)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1900)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA302-CH84 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1902)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA303-CH86 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1904)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA304-CH88 (5)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1901)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA305-CH89 (2)	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium (1902)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA306-CH81 (2)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Germany (1900)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA307-CH57 (2)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	USA (1921)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia</i> sp. 1	HA308-CH79 (5)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Finland (1937)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>P. chrysanthemi</i>	HA306-CH81 (2)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Germany (1900)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>P. chrysanthemi</i>	HA307-CH57 (1)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	USA (1921)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>P. chrysanthemi</i>	HA308-CH79 (3)	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Finland (1937)	Herbarium specimen, NBG, Meise, Belgium
<i>P. coronata</i> f.sp. <i>avenae</i>	HA201 (2)	<i>Lolium perenne</i> (Poaceae)	Belgium (2004)	Stored urediospores, via Dr. L. Leus, ILVO, Ghent, Belgium
<i>P. recondita</i>	HA202 (1)	<i>Hordeum vulgare</i> (Poaceae)	Belgium (2004)	Fresh sample, collected by Dr. K. Heugens
<i>P. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	HA203 (1)	<i>Hordeum vulgare</i> (Poaceae)	Belgium (2004)	Fresh sample, collected by Dr. K. Heugens
<i>P. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	HA206 (1)	<i>Triticum aestivum</i> (Poaceae)	Iran (1995)	Dried sample, via H. Alaei, Univ. of Rafsanjan, Iran
<i>P. striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i>	HA204 (2)	<i>Triticum aestivum</i> (Poaceae)	Iran (1995)	Dried sample, via H. Alaei, Univ. of Rafsanjan, Iran
<i>P. tritici</i>	HA205 (1)	<i>Triticum aestivum</i> (Poaceae)	Iran (1995)	Dried sample, via H. Alaei, Univ. of Rafsanjan, Iran
<i>Puccinia</i> sp. 2	HA207 (1)	Unspecified weed (Poaceae)	Iran (1995)	Dried sample, via H. Alaei, Univ. of Rafsanjan, Iran
<i>P. thlaspeos</i>	HA208 (2)	<i>Draba arabisans</i> (Brassicaceae)	USA (2005)	Dried sample, via Dr. B. Kropp, Utah State Univ., Logan, USA
<i>P. drabae</i>	HA209-Pd16 (2)	<i>Draba incana</i> (Brassicaceae)	Norway (1975)	Genomic DNA, via Dr. B. Kropp, Utah State Univ., Logan, USA
<i>P. drabae</i>	HA210-Pd17 (2)	<i>Draba glabella</i> (Brassicaceae)	Greenland (1982)	Genomic DNA, via Dr. B. Kropp, Utah State Univ., Logan, USA
<i>P. tanacetii</i>	HA214 (4)	<i>Tanacetum vulgare</i> (Asteraceae)	USA (2003)	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Puccinia</i> sp. 3	HA215 (4)	<i>Artemisia tridactyla</i> (Asteraceae)	USA (2004)	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Puccinia</i> sp. 3	HA216 (4)	<i>Helianthus annuus</i> (Asteraceae)	USA (2004)	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Puccinia</i> sp. 3	HA217 (4)	<i>Cirsium vulgare</i> (Asteraceae)	USA (2004)	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Melampsora laricis-populina</i>	HA218 (5)	<i>Populus</i> sp. (Salicaceae)	Belgium (2004)	Fresh sample, collected by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Kuehneola uredinis</i>	HA219 (4)	<i>Rubus fruticosus</i> (Rosaceae)	Belgium (2004)	Fresh sample, collected by K. Van Poucke, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Uromyces trifolii-repentis</i>	HA220 (1)	<i>Trifolium resupinatum</i> (Fabaceae)	Iran (1995)	Dried sample, via H. Alaei, Univ. of Rafsanjan, Iran
<i>Tranzschelia discolor</i>	HA221 (2)	<i>Prunus dulcis</i> (Rosaceae)	Iran (2002)	Diseased plant, via Dr. M.A. Samih, Univ. of Rafsanjan, Iran
<i>Pileolaria terebinthi</i>	HA222 (2)	<i>Pistacia mulica</i> (Anacardiaceae)	Iran (unknown)	Diseased plant, via Dr. M. Okhovat, Univ. of Tehran, Iran
<i>P. allii</i> (pon)	HA213-HSZ0428 (2)	<i>Allium</i> sp. (Alliaceae)	Slovakia (unknown)	Plasmid clone, via Dr. L.Szabo, CDL, St. Paul, USA



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



amorces testées

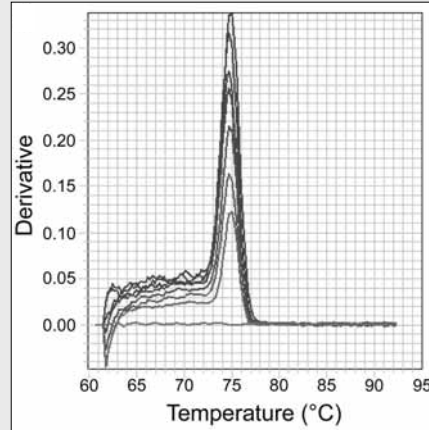
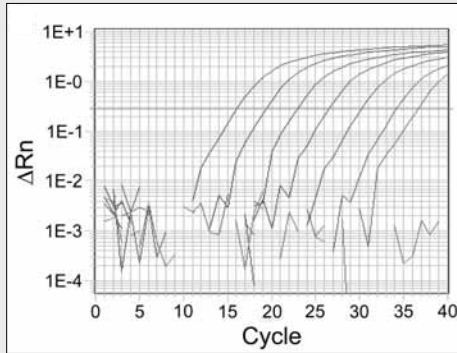


ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



détection moléculaire

Courbes d'amplification et dissociation



plasmid copies	Ct	genomic DNA	Ct
5000000	16,0	500 pg	18,3
500000	19,3	50 pg	21,6
50000	22,9	5 pg	25,1
5000	26,5	500 fg	28,6
500	30,1	50 fg	33,6
50	34,1	5 fg	36,9
5	36,5	500 ag	>40
0	>40		

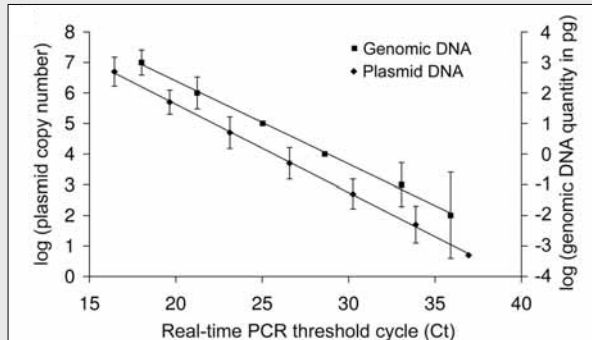
Slope: -3.51
R²: 0.998

sensitivité

limit de détection = 5 fg

selectivité:

pas de signal avec
10⁵ copies de ITS des
rouilles non visées

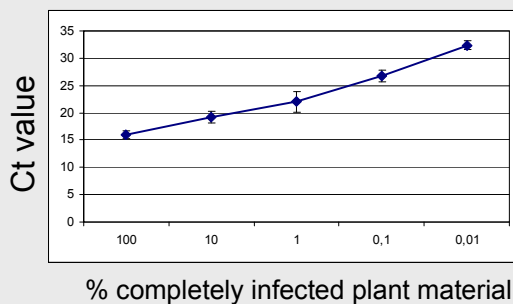


Optimalisation de l'extraction ADN

- Comparé plusieurs méthodes. Les meilleurs étaient:
CTAB
kit Invitek
kit Sigma
détails ► voir article
- Pas d'inhibition avec 10 ng ADN total (plante + *P. horiana*)
- Limite de détection en pratique?
100 mg matériel infectée ► diluer sériellement avec 900 mg non-infectée

limite de détection pratique ?

100 mg plant material



Bioreba Homex-6

Puccinia horiana rouille blanche de chrysanthème

- introduction: symptômes, cycle, contrôle, questions de recherche
- phylogénie et détection moléculaire
- **développement latente dans la plante**
- essai d'évaluation de résistance
- pathotypes
- autres sujets:
 - hérédité de la résistance
 - épidémiologie
 - résistance au fongicides



Puccinia horiana rouille blanche de chrysanthème

- introduction: symptômes, cycle, contrôle, questions de recherche
- phylogénie et détection moléculaire
- développement latente dans la plante
- **essai d'évaluation de résistance**
- pathotypes
- autres sujets:
 - hérédité de la résistance
 - épidémiologie
 - résistance au fongicides



essai d'évaluation de résistance

Préparation des boutures

Préparation d'inoculum
(18 - 21 jours)

Inoculation

Incubation (21 - 28 jours)

Evaluation



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Préparation des boutures



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij





Préparation d'inoculum

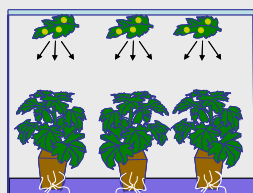
combiner des isolats



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Inoculation



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Incubation



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Évaluation



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Évaluation



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



système d'évaluation: index de maladie



résistant

intermédiaire

sensitif

n_x = nombre de feuilles avec score x

$$\text{Index de maladie} = \left(\frac{(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) + (5 \times n_5) + (6 \times n_6)}{6 \times (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5 + n_6)} \right) \times 100$$



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



exemple de résultat de teste

Block 1	0	1	2	3	4	5	6	index
1	0							72
2	1	4	1					17
3	0			4	1	1		64
4	1	5						14
5	0	2	4					28
6	0		2	4				44
7	1	2		3				31
8	1			5				42
9	0			2	2	2		78
10	6							0
11	5	1						3
12	4	2						6
13	2		4					22
14	0	2	4					28
15	0	5	1					36
16	4	2						6
17	0		5	1				36
18	4	2						6
19	0	1	5					31
20	0				1	5		94
Taliedo	0				1	3	2	86

Block 2	0	1	2	3	4	5	6	index
1	0	1						81
2	2	4			1			11
3	0			4	1	1		64
4	2	4						11
5	3	3						8
6	0	3		3				33
7	0	2		4				39
8	2			4				33
9	0			1	2	3		81
10	6							0
11	6							0
12	3	3						8
13	2	4						11
14	0	6						17
15	2	4						11
16	3	3						8
17	4	2						6
18	3	3						8
19	2		4					22
20	0			2	1	3		81
Taliedo	0			3		3		75

Block 3	0	1	2	3	4	5	6	index
1	0							75
2	1	5						14
3	0			3	1	2		72
4	2	4						11
5	2	4						11
6	6							0
7	3		3					25
8	1		3	1	1			50
9	0			1	1	2		81
10	6							0
11	6							0
12	2		4					22
13	0	5	1					19
14	0							33
15	2	4						11
16	3	3						6
17	2		4					22
18	4	2						6
19	2							22
20	0			3		3		75
Taliedo	0			2	2	2		78

Block 4	0	1	2	3	4	5	6	index
1	1			3	1			53
2	1	3	2					19
3	0			2	1			78
4	4	2						6
5	0	3	3					25
6	3			3				25
7	3			3				25
8	1			4	1			47
9	0			1		5		92
10	6							0
11	6							0
12	3	1	2					14
13	3		3					17
14	2	3	1					14
15	1	1	4					25
16	3	3						8
17	1		5					28
18	4	2						6
19	3		3					17
20	0				2	1		86
Taliedo	0			3	1	2		72

Block 5	0	1	2	3	4	5	6	index
1	0			3	1			69
2	0			3	1			72
3	0	1		4				53
4	2	4						11
5	3	3						8
6	0	3		3				33
7	3							8
8	0			6				50
9	0			3	1	1		67
10	6							0
11	6							0
12	3							8
13	0	1	5					31
14	0	3	3					25
15	3	3						8
16	3							8
17	0	2		4				39
18	3			3				25
19	2			4				33
20	0					1	5	97
Taliedo	3		2		1			33



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Exemple de résultat de teste (continué)

cv.	cv #	Block 1	Block 2	Block 3	Block 4	Block 5	mean	St.dev.
05_5002	1	72	81	75	53	69	70	12,0
05_5003	2	17	11	14	19	72	27	28,9
05_5004	3	64	64	72	78	53	66	10,8
05_5005	4	14	11	11	6	11	11	2,5
05_5006	5	28	8	11	25	8	16	8,1
05_5007	6	44	33	0	25	33	27	15,6
05_5008	7	31	39	25	25	8	26	12,7
05_5009	8	42	33	50	47	50	44	8,1
05_5010	9	78	81	81	92	67	80	10,2
05_5011	10	0	0	0	0	0	0	0,0
05_5012	11	3	0	0	0	0	0	0,0
05_5013	12	6	8	22	14	8	12	6,6
05_5014	13	22	11	19	17	31	20	8,4
05_5015	14	28	17	33	14	25	23	8,5
05_5016	15	36	11	15	25	8	19	7,4
05_5017	16	6	8	16	8	8	9	4,0
05_5018	17	36	6	17	28	39	25	14,2
05_5019	18	6	8	6	6	25	10	9,2
05_5020	19	31	22	22	17	33	25	6,8
Medonia	20	94	81	75	86	97	87	9,3
Taliedo	21	86	75	78	72	33	69	21,1
Mean		35,4	29,0	30,6	31,3	32,3		
St.dev.		28,4	29,2	28,5	28,6	27,1		

CV	cv #	Mean index	St.dev. index
05_5011	10	0	0
05_5012	11	1	0
05_5017	16	9	4
05_5019	18	10	9,2
05_5005	4	11	2,5
05_5013	12	12	6,6
05_5006	5	16	8,1
05_5015	14	23	8,5
05_5016	15	19	7,4
05_5014	13	20	8,4
05_5018	17	25	14,2
05_5020	19	25	6,8
05_5008	7	26	12,7
05_5007	6	27	15,6
05_5003	2	27	28,9
05_5009	8	44	8,1
05_5004	3	66	10,8
Taliedo	21	69	21,1
05_5002	1	70	12
05_5010	9	80	10,2
Medonia	20	87	9,3



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Puccinia horiana rouille blanche de chrysanthème

- introduction: symptômes, cycle, contrôle, questions de recherche
- phylogénie et détection moléculaire
- développement latente dans la plante
- essai d'évaluation de résistance
- **pathotypes**
- autres sujets:
 - hérédité de la résistance
 - épidémiologie
 - résistance au fongicides



C'est quoi un pathotype?

pathotype: réaction différentielle sur des cultivars différents

	pathotype1	pathotype2	pathotype3	pathotype4
Cultivar 1	sensitif	sensitif	sensitif	sensitif
Cultivar 2	résistant	résistant	résistant	résistant
Cultivar 3	résistant	sensitif	sensitif	résistant
Cultivar 4	résistant	résistant	résistant	sensitif
Cultivar 5	résistant	résistant	sensitif	résistant
Cultivar 6	résistant	résistant	résistant	sensitif

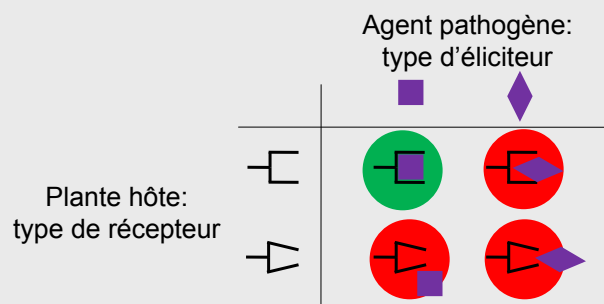
↓
cultivars différentiels

Explication moléculaire des pathotypes ?

Certaines formes de résistance sont basées sur la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène par l'hôte:

éléments spécifiques dans l'agent pathogène (éliciteurs)
reconnus par des éléments spécifiques dans l'hôte (récepteurs)
commence une cascade de défense

► « gene-for-gene resistance » / résistance de type gène-à-gène



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Combinaison de plusieurs éliciteurs avec plusieurs récepteurs donne une série d'interactions complexe

		pathotype 1 ■ ■ ■	pathotype 2 ■ ■ ■	pathotype 3 ■
cultivar 1	┌┐	●	●	●
	└┐	●	●	●
	└┐	●	●	●
cultivar 2	┌┐	●	●	●
	└┐	●	●	●
	└┐	●	●	●
cultivar 3	┌┐	●	●	●
	└┐	●	●	●
	└┐	●	●	●

Pathotypes

Est-ce qu'il y a des pathotypes de la rouille blanche?

- littérature scientifique: oui, probablement, mais pas de résultats récents.
- résultats d'essais de résistance à ILVO ◀▶ PD (Pays Bas):
 - pas de différence en 2004
 - différences en 2005



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Pathotypes

essai de résistance: un cultivar avec plusieurs pathotypes

essai de pathotype: un isolat avec plusieurs cultivars

Plantes hôte

- sélection de 36 cultivars potentiellement différentielles

Inoculum

- isolats individuels (16-18), commençant d'une pustule individuelle
- sélection basée sur la diversité connue (limité!):
 - géographique: BE(6); NL (1-3); UK(3); PO(1); JP(2); MY(2); CO(1)
 - isolats de cultivars qui étaient évalués comme résistants
 - différentes années (BE): 2003, 2005, 2007, 2008



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij








- 3 répétitions par isolat
- 36 ou 18 cultivars par récipient
- « randomized complete block design »
- incubation dans chambre de biosécurité (2Q)



53

ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Évaluation

- après 21 and 28 jours
- macroscopique + vérification microscopique
- système d'évaluation
 - 0 = pas de pustules
 - 1 = infection limitée
 - 2 = infection claire

Exemples de 1 (= infection limitée):

- quelques pustules par plante
- infection seulement sur les stipules
- infection seulement sur le bord du feuille







54

ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
 Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Évaluation

pustules seulement sur
les stipules

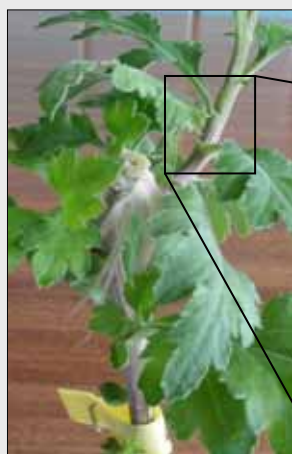


pustules seulement sur
le bord de la feuille



Évaluation

pustules sur tissus abîmés:



Évaluation

- 3 répétitions
- XYZ score avec:
X = nombre de plantes avec score 2
Y = nombre de plantes avec score 1
Z = nombre de plantes avec score 0

- XYZ score vers code plus général:

300	210	120	030	021	012	003
sensitif		intermédiaire			résistant	

pathotypes: conclusions

- répétition de testes nécessaire
- au moins 3 pathotypes en Europe
 - as de garantie que les cultivars qui ont été vérifiés avec un pathotype sont résistants à tous les EU pathotypes
 - nouveaux cultivars: vérifier la résistance avec plusieurs pathotypes
 - solats qui peuvent être des nouveaux pathotypes: fournissez les aux stations de recherche!

Puccinia horiana rouille blanche de chrysanthème

- introduction: symptômes, cycle, contrôle, questions de recherche
- phylogénie et détection moléculaire
- développement latente dans la plante
- essai d'évaluation de résistance
- pathotypes
- **autres sujets:**
 - hérédité de la résistance
 - épidémiologie
 - résistance au fongicides



hérédité de la résistance

susceptible: rr rr rr ●
 résistance simplex: Rr rr rr ●
 résistance duplex: Rr Rr rr ●

		R:S
simplex x susceptible: Rr rr rr x rr rr rr	► 50% Rr rr rr ● +50% rr rr rr ●	1:1
duplex x susceptible: Rr Rr rr x rr rr rr	► 25% Rr Rr rr ● 25% Rr rr rr ● 25% rr Rr rr ● 25% rr rr rr ●	3:1

hérédité de la résistance

simplex x susceptible: $Rr\ rr\ rr \times rr\ rr\ rr \rightarrow 50\% Rr\ rr\ rr$ ●
+ $50\% rr\ rr\ rr$ ●

Développement de marqueurs via BSA et AFLP:

OK, mais,

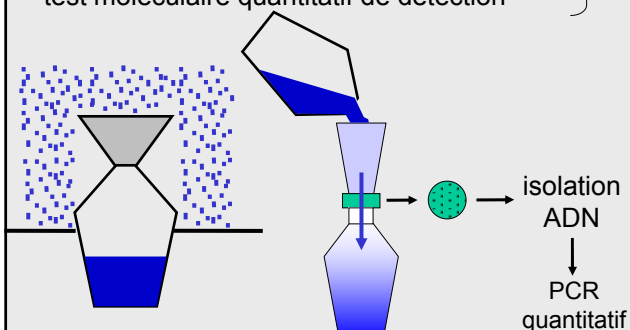
- plusieurs gènes jouent un rôle: résultat dépend des deux parents
- pathotypes: est-ce que les gènes sont liés ?

épidémiologie

analyse des jeunes plantes: Bretagne!

analyse de l'air et de l'eau avec les méthodes moléculaires

- collection de spores de l'air et de la pluie
 - concentration des spores (pluie) par filtration
 - extraction de l'ADN
 - test moléculaire quantitatif de détection
- } initier un système d'avertissement?



fongicides

En Belgique, permet spécifique contre rouille blanche pour:

- myclobutanil (Systhane)
- kresoxim-methyl (Candit / Discus) ► sous protection

+ permet contre des rouilles dans l'horticulture:

- azoxystrobin (Amistar)
- bitertanol (Baycor)
- triadimenol (Bayfidan, Exact, Shavit)
- difenaconazole (Difcor, Geyser)
- propiconazole [+ bifenthrin] (KB polycare)
- metiram (Polyram)
- mancozeb (10+ produits)
- maneb (Trimangol)



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



fongicides

Testes initiés avec deux strobilurines et deux triazoles:

- Candit (kresoxim-methyl)
- Flint (trifloxystrobine)
- Tilt (propiconazole) ——— Résistance
- Systhane (myclobutanil)



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij



ILVO personnel – *Puccinia horiana*

Hossein Alaei
étudiant doctoral
2003-2007



- détection moléculaire
- phylogénie
- développement latente
- essai de résistance
- évaluation de cultivars

Mathias De Backer
étudiant doctoral
2007-2011



- évaluation de cultivars
- diversité génétique de *P.horiana* (pathotypes, AFLP,...)
- épidémiologie
- marqueurs de résistance

Dirk Ravier
technicien
2003-



- entretien des isolats



ILVO – Plant
<http://www.ilvo.vlaanderen.be>
Beleidsdomein Landbouw en Visserij





Évaluation de l'efficacité de produits phytosanitaires « alternatifs » sur le couple chrysanthème/rouille blanche

Epidémiologie de la rouille blanche



Plan

I. Introduction

- Présentation de BBV
- Contexte du travail « Rouille Blanche »
- Rappel du cycle végétatif de *Puccinia horiana*

II. Méthode d'inoculation

III. Evaluation de produits en conditions contrôlées

IV. Epidémiologie de la rouille blanche

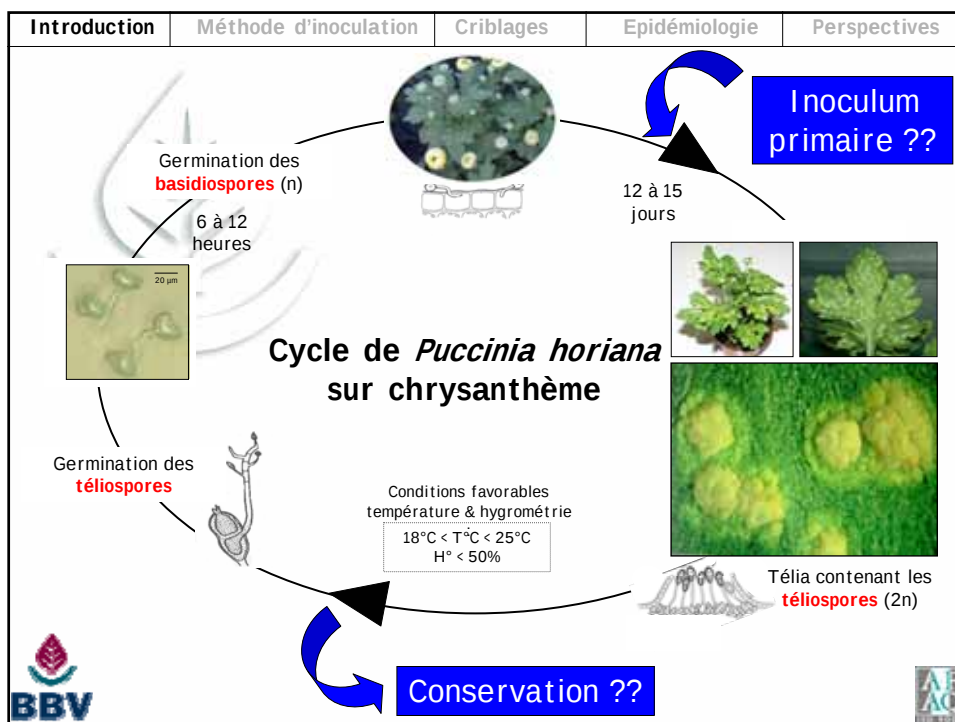
V. Perspectives

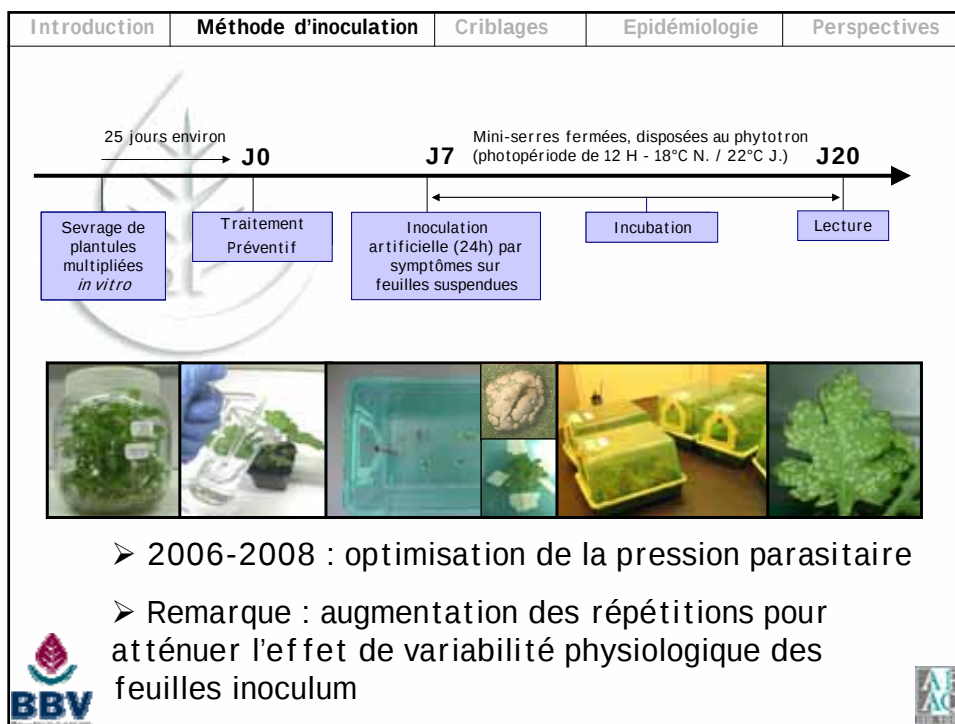


Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
Fonction de BBV : recherche et développement à l'échelle du laboratoire, transfert de technologie - Amélioration des variétés végétales - Traçabilité génétique - Protection des plantes - Qualité sensorielle et nutritionnelle				
				

Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
Positionnement de BBV Offre de service focalisée sur 5 « technologies clés » - Empreintes génétiques des végétaux et de leurs pathogènes - Haplométhodes et autres techniques de culture <i>in vitro</i> - Evaluation de produits « alternatifs » de lutte contre les maladies - Désinfection des serres et outils de production - Evaluation sensorielle <i>Aujourd'hui déclinées sur 50 espèces végétales</i>				
				

Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
Contexte du travail « Rouille Blanche » ➤ 2001 : Dossier « laboratoire confiné (NS3) » ➤ 2003 : A la demande des producteurs, mise en place d'un Programme National par l'ASTREDHOR (PNA) - Cyclamen/ fusariose - Chrysanthème/rouilles brune & blanche ➤ 2005 : Demande de dérogation pour la détention et manipulation de <i>Puccinia horiana</i> (<i>Service de la Protection des Végétaux</i>) - AUDIT PV (21 juillet 2005) - Rapport d'audit avec avis favorable ➤ 2006 : Début des expérimentations en conditions contrôlées (cofinancement PRC/PNA) ➤ 2008 : Livraison du laboratoire confiné				



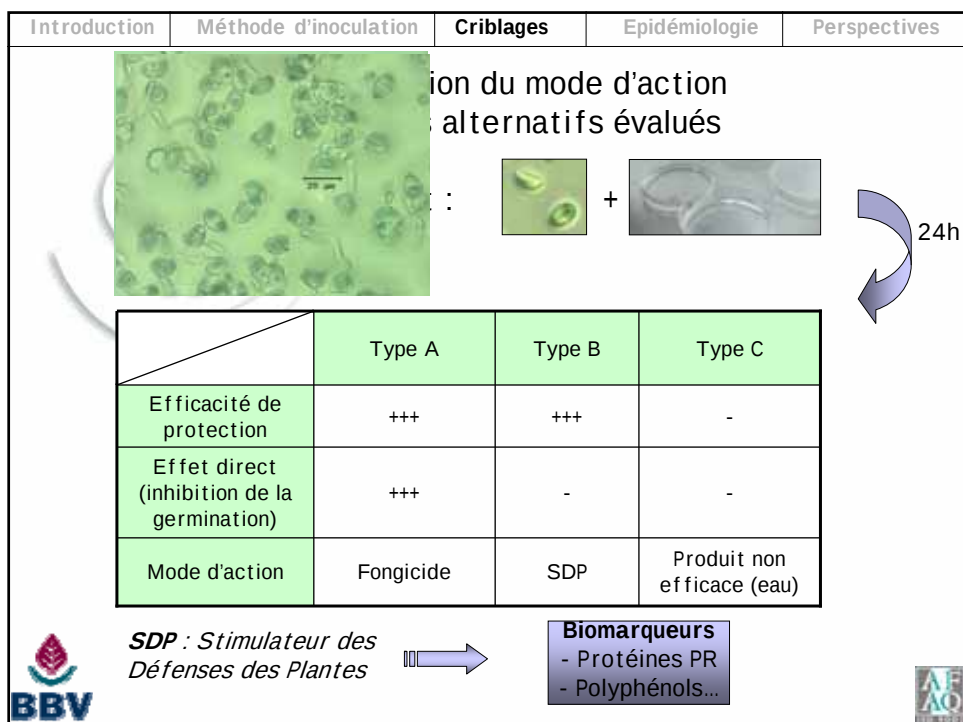
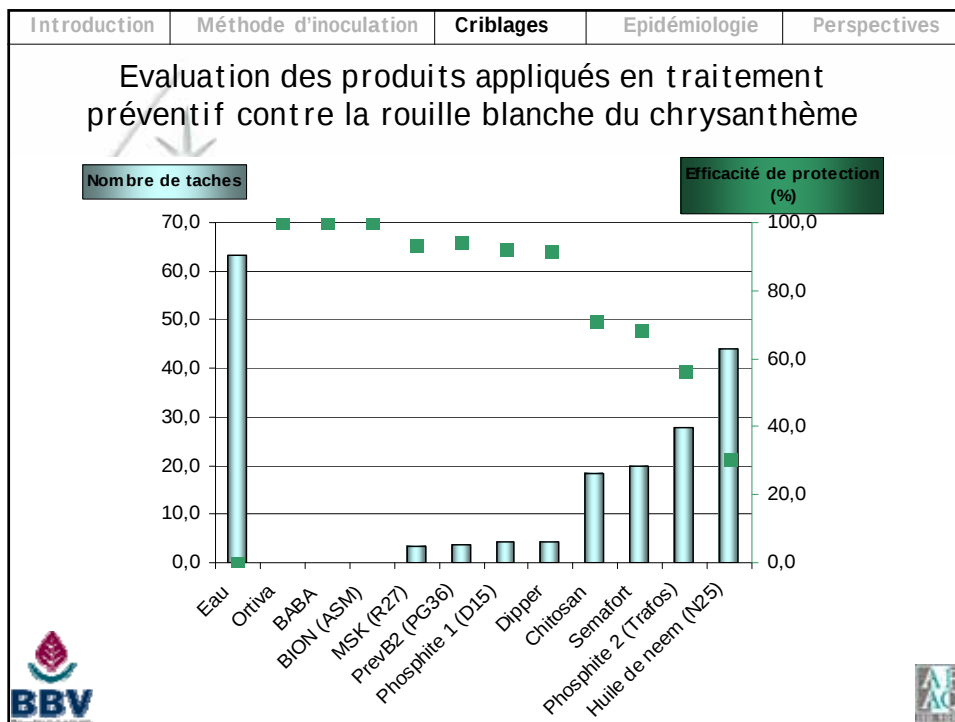


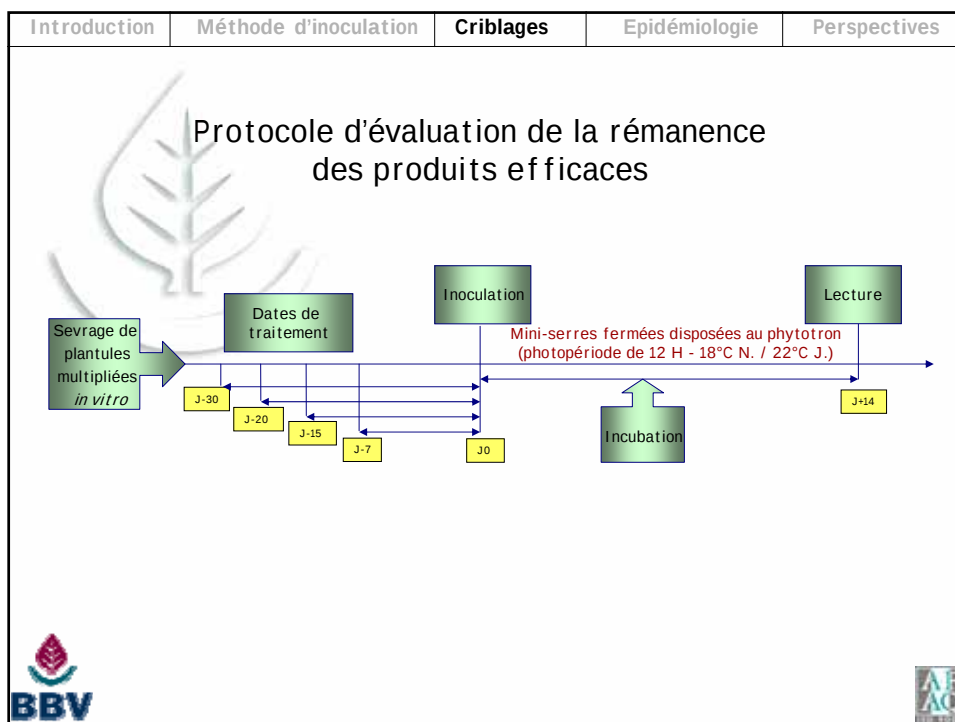
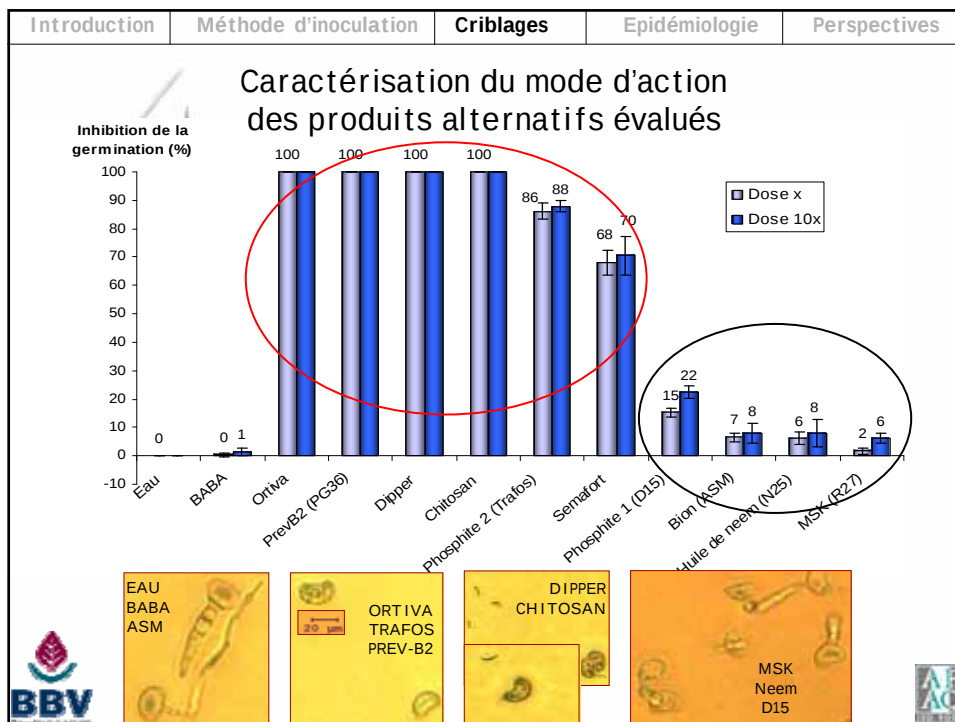
Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
--------------	-----------------------	-----------	---------------	--------------

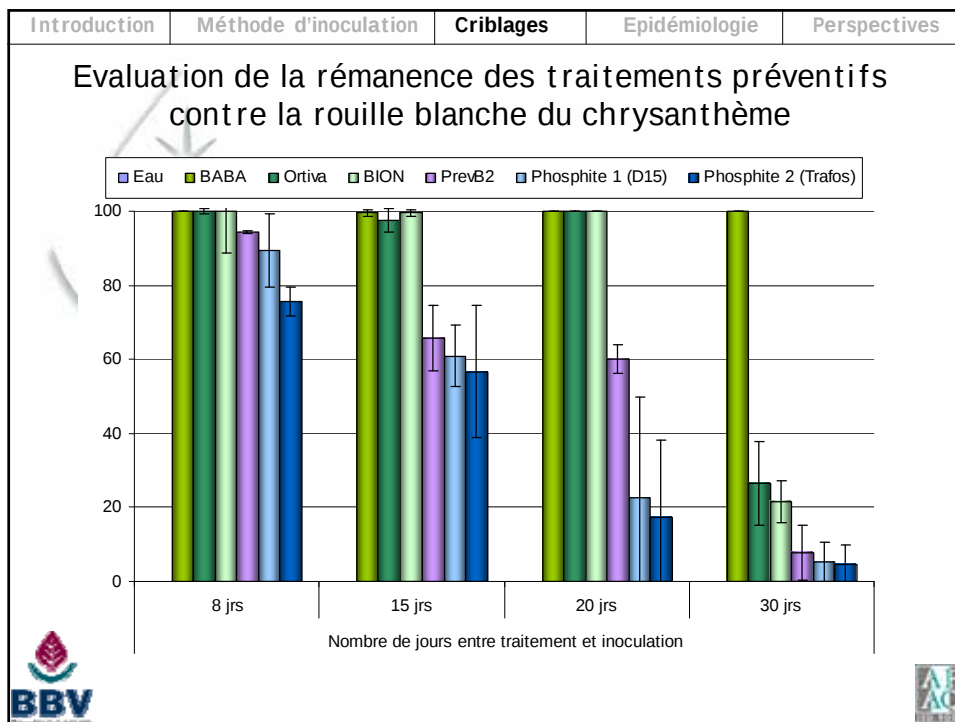
Produits alternatifs évalués en conditions contrôlées

Produits	Matières actives	Doses testées (non phytotoxiques)
Ortiva	Azoxystrobine 25%	0,66% v/v
BABA	Acide b-amino-butérique	0,41% p/v
D15	Phosphite (base Mono PK)	1% v/v
Dipper	Extrait de citrus	0,3% v/v
R27	Mono-silicate de potassium	2,5% v/v
Bion	Acidenzolar-S-méthyl	0,01% p/v
Chitosan	N-acétyl-glucosamine	2% v/v
Sémafort	Phosphite + aa + extrait d'algue + base engrais NFU 42.001	0,75% v/v
Trafos	Phosphite (base Mono PK)	0,6% v/v
PrevB2 (PG36)	Extrait d'orange	1% v/v
N25	Huile de neem	0,5% v/v

BBV **AF AO**

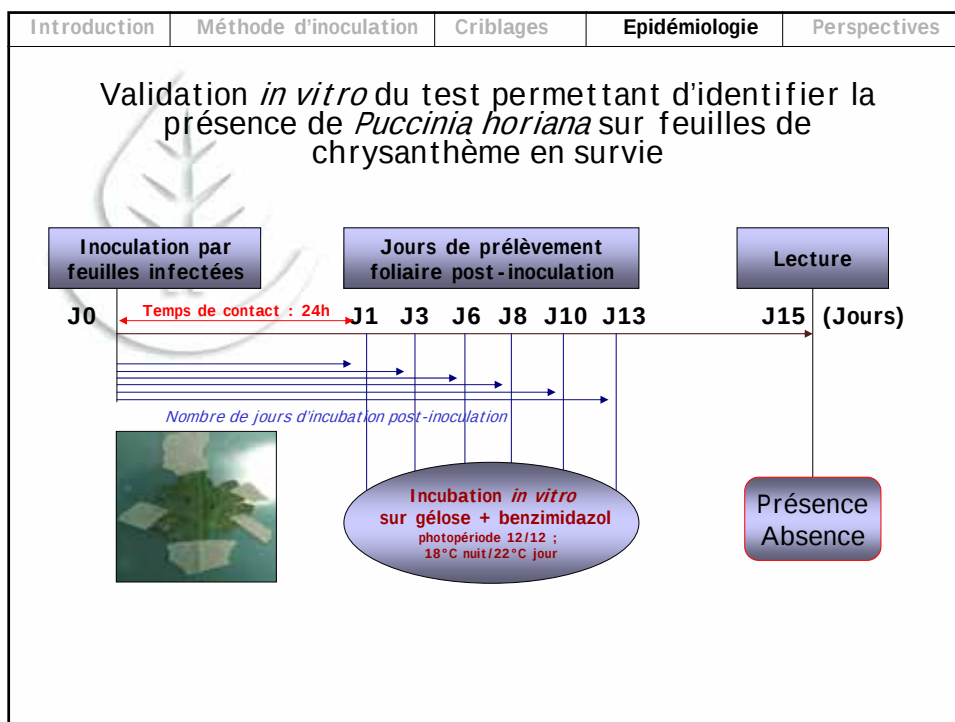


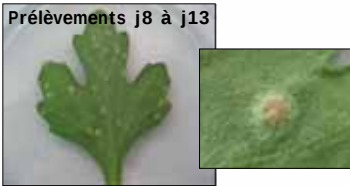




Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
<u>Conclusions criblages :</u> ➤ Validation en conditions de production (STEPP-Bretagne) des traitements préventifs efficaces à BBV ➤ Evaluation en curatif des différents produits ? ➤ Définir des itinéraires techniques de traitements (combinaison et/ou alternance de produits efficaces) ➤ Recherche de produits alternatifs disponibles				

Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
Programme National Astredhor « Epidémiologie de la Rouille Blanche » Objectifs : ➤ Analyser les données issues d'enquêtes sur sites de production pour : - identifier les sources d'infections (multiplicateurs-obtenteurs, horticulteurs-producteur) - identifier les paramètres environnementaux favorables à l'installation de la maladie ➤ Améliorer la prophylaxie pour prévenir les contaminations				



Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
Validation <i>in vitro</i> du test permettant d'identifier la présence de <i>Puccinia horiana</i> sur feuilles de chrysanthème en survie ➤ Observation à J15 Prélèvement j1  Prélèvement j3  Prélèvement j6  Prélèvements j8 à j13  ➤ Diagnostic possible dès le 1^{er} jour de prélèvement, post-inoculation ➤ Limite du test : fructification du <i>Puccinia</i> dépendante de la durée de son cycle <i>in vivo</i>				

Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
Campagne de prélèvement 2007-2008 Réception des échantillons (STEPP/GIEFPSO) Lecture (Présence/Absence) Conditionnement et incubation <i>in vitro</i> (feuilles en survie) 2007 2008 ➤ un site (Ets. Brichet) a montré une forte contamination (distribution homogène) ➤ une variété (Angali) a été contaminée sur 2 sites différents (et 2 fournisseurs différents) ➤ Détection <i>in vitro</i> de symptômes (taches claires) mais pas de fructification ➤ Analyse d'enquêtes en cours				

Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
<u>Conclusions épidémiologie :</u> ➤ La détection <i>in vitro</i> fonctionne en routine mais présente des limites dans le diagnostic ➤ La corrélation entre les données « Présence de symptômes », « Variétés », « Provenances » et « Périodes de prélèvement » permettra de mieux connaître les paramètres favorables à l'installation de la rouille blanche				

Introduction	Méthode d'inoculation	Criblages	Epidémiologie	Perspectives
<u>En 2009 :</u> ➤ Amélioration de la méthode d'inoculation (CDHR-Centre) ➤ Développement d'une souchothèque sur vitroplants ➤ Poursuite des criblages phytosanitaires dans le cadre du PNA + transfert terrain (STEPP-Bretagne, CDHR-Centre...) ➤ Campagne épidémiologie : détection <i>in vitro</i> ➤ Soutien d'un nouveau programme expérimental ? ➤ Collaboration européenne multipartenaires ?  				



Merci de votre attention

Contact : Jérôme GUERRAND guerrand@bbv.fr






Programme National Phytostimulants en horticulture ornementale





Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Modèles étudiés

- Cyclamen / fusariose (*Fusarium oxysporum cf cyclaminis*) (2003–2006)
- Chrysanthème / rouille brune (*Puccinia chrysanthemii*) (2003–2006)
- Chrysanthème / rouille blanche (*Puccinia horiana*) (2006-2009)
- Rosier / Oïdium (*Sphaerotheca pannosa*, 2008-2009),
Cyclamen / Botrytis (*Botrytis cinerea*, 2008-2009),
Pélargonium / Botrytis (*Botrytis cinerea*) GIEPFSO 2009

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Caractérisation des produits testés

- Phytostimulants
 - Engrais organiques à base d'extraits des végétaux
 - Stimulants racinaires
 - Stimulants foliaires et de ramification
- Stimulateurs de défenses naturelles (Iodus, Stifinia, Bion)
- Criblage de produits efficaces à BBV, essais d'efficacité en conditions de production

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Présentation

- Efficacité des phytotimulants dans la lutte contre la rouille blanche du chrysanthème en situation de production.
- Essais Rouille Blanche du chrysanthème
 - Résultats PN SDN2007 et PN SDN2008
 - Résultats essai régional CDHR Centre 2008

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



STEPP : matériels & méthodes (1/2)

- 1 variété : Louissette jaune
- Essai à 4 répétitions avec 1 facteur (produit) à 8 modalités randomisées
- 12 potées par répétition (parcelle élémentaire).
- Parmi ces potées :
 - 2 plantes indicatrices de l'infestation (plantes non traitées),
 - 1 godet de chrysanthème infesté introduit dans chaque parcelle élémentaire 4 jours après les premiers traitements.

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



STEPP: matériels & méthodes (2/2)



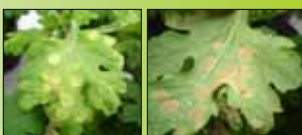
Les parcelles sur géotextile pour garder une humidité importante. Aspersions de 15 secondes toutes les 3 heures.



Plante inoculatrice atteinte de rouille blanche introduite dans les parcelles en S38



2 plantes indicatrices non traitées se trouvent au centre ainsi que la plante d'inoculation.



Vu de dessus et de dessous d'une feuille atteinte. Tâches et pustules bien visibles

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



STEPP : matériels & méthodes 2007 (1/2)

Les modalités de traitement à la station

<i>Produit (code interne, nom commercial)</i>	<i>Dose</i>	<i>ml de bouillie utilisée sur 10 potées de chrysanthème (une parcelle élémentaire)</i>		
		12/9	26/9	6/10
BABA (produit de laboratoire)	0,4% p/v	150	150	185
ASM (C, Bion)	0,01% p/v	150	150	185
Extrait de chitine (06A10, Chitosan)	2% v/v	150	150	185
Monosilicate de Kalium MSK (06R11)	2,5% v/v	150	150	185
Krésoxim methyl (Alliage)	0,015% p/v	150	150	185
myclobutanil + mancozébe (Gana)	0,265% p/v	150	150	185
Extrait de citrus (Dipper)	0,3% v/v	150	150	185
eau		150	150	185

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



STEPP : matériels & méthodes 2007 (2/2)

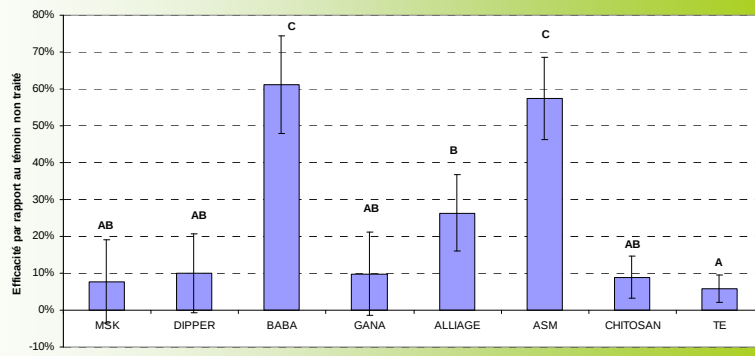
Evaluation et quantification des symptômes : échelle de notation à 11 niveaux

0 = pas de symptômes,
 1 = < 10 impacts visibles sur 50% des feuilles de la potée, pas de pustules
 2 = 10 - 50 impacts visibles sur 50% des feuilles de la potée, pas de pustules
 3 = > 50 impacts visibles sur 50% des feuilles de la potée, pas de pustules
 4 = > 50 impacts visibles sur 50% des feuilles de la potée, 1-10 tâches par potée
 5 = > 50 impacts visibles sur toutes les feuilles de la potée, 11-50 tâches par potée
 6 = > 50 tâches et 1-10 pustules par potée
 7 = 10-50 pustules par potée
 8 = 51-100 pustules par potée
 9 = 101 et 200 pustules par potée
 10 = > 200 pustules par potée

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009

Résultats 2007 (1/2)

Efficacité des produits contre la rouille blanche du chrysanthème par rapport au témoin non-traité, 23 jours après inoculation. A noter : pression parasitaire très importante.



Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009

Résultats 2007 (2/2)

Petites lésions (impacts) provoquées par la pénétration des spores de la rouille blanche dans la feuille. Dans le cas du traitement témoin on voit 5 jours plus tard des tâches rondes qui se transforment en pustules sur la face inférieure de la feuille. Photos prises 11/10/07



Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



STEPP : matériels & méthodes 2008 (1/3)

- 1 variété : Louissette jaune
- Essai à 4 répétitions avec 1 facteur (produit) à 8 modalités randomisées
- Modalités :
 - Eau
 - STS2008 : 10 GR / 100 L (0.01%p/v, 0,1g/l)
 - ORTIVA (AZ) : 100 ML /100 L (0.1%v/v, 1 ml/l)
 - STS2008+ORTIVA (tank mix) : 10 GR / 100 L (0.01%) + 100 ML /100 L (0.1%)
 - Iodus 40 (0,3%, 3ml/l)
 - Dipper (0,3%, 3ml/l)
 - PG36 (1%, 10 ml/l)
 - D15 Nutri-phyte NPK 4-30-8 (1%, 10ml/l)
- 12 potées par répétition (parcelle élémentaire).
- Parmi ces potées,
 - 2 plantes indicatrices de l'infestation (plantes non traitées)
 - 1 godet de chrysanthème infesté introduit dans chaque parcelle élémentaire le 23/09, 4 jours après les premiers traitements.

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



STEPP : matériels & méthodes 2008 (2/3)

Evaluation et quantification des symptômes

- A 3 périodes après infestation :
 - progression des symptômes sur plantes indicatrices
 - à l'aide d'une échelle de notation à 10 niveaux
- Dénombrement de tâches claires et de pustules sur 20 feuilles suspectes, prélevées de chaque parcelle élémentaire.
5 dates de prélèvement : 17/10, 24/10, 31/10, 6/11 et 14/11.
- Observations qualitatives concernant la phytotoxicité des produits
- Observations qualitatives concernant la croissance et la floraison de la plante
- Climat

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009

STEPP : matériels & méthodes 2008 (3/3)

Produit	Date d'application			
	19/09	3/10	17/10	31/10
Eau	400	500	700	625
STS2008	500	700	800	625
Ortiva	550	750	750	625
Ortiva/ STS2008	700	700	750	600
Iodus40	500	550	750	775
Dipper	500	600	650	625
PG36	400	600	650	625
D15 nutriphyte NPK	500	550	650	625

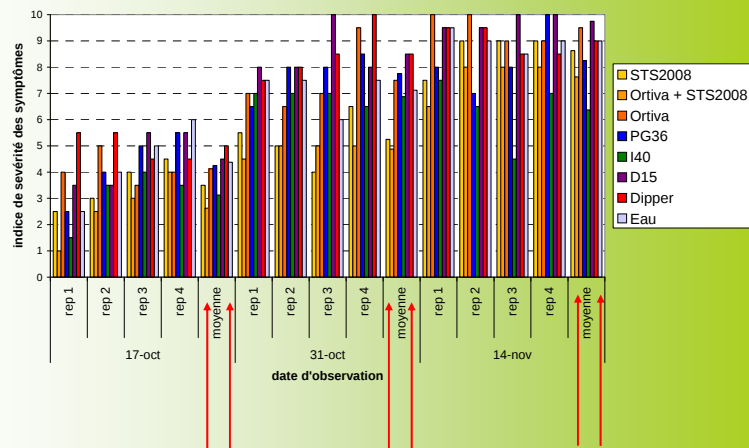
Inoculation (plantes infestées) : 23/09/08

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009

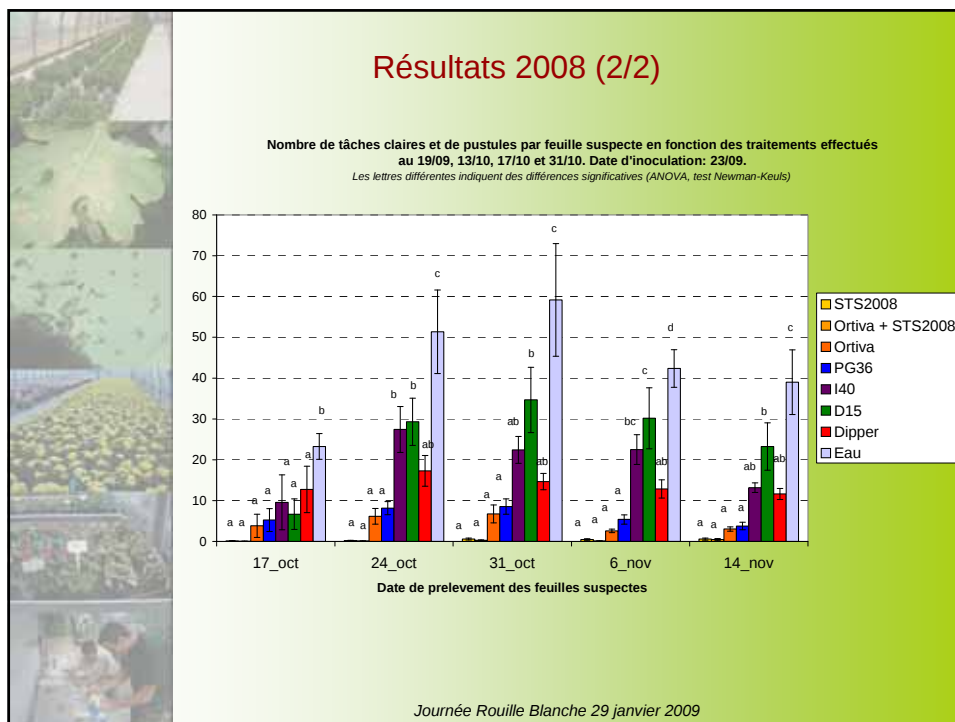
Résultats 2008 (1/2)

Sevérité des symptômes de la rouille blanche sur les 2 plantes indicatrices (plantes non traitées)
dans chaque parcelle élémentaire.

Echelle de notation de 0 à 10 (10 = densité de taches claires et de pustules la plus élevée sur la plante).



Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Essai 2008 CDHR Centre

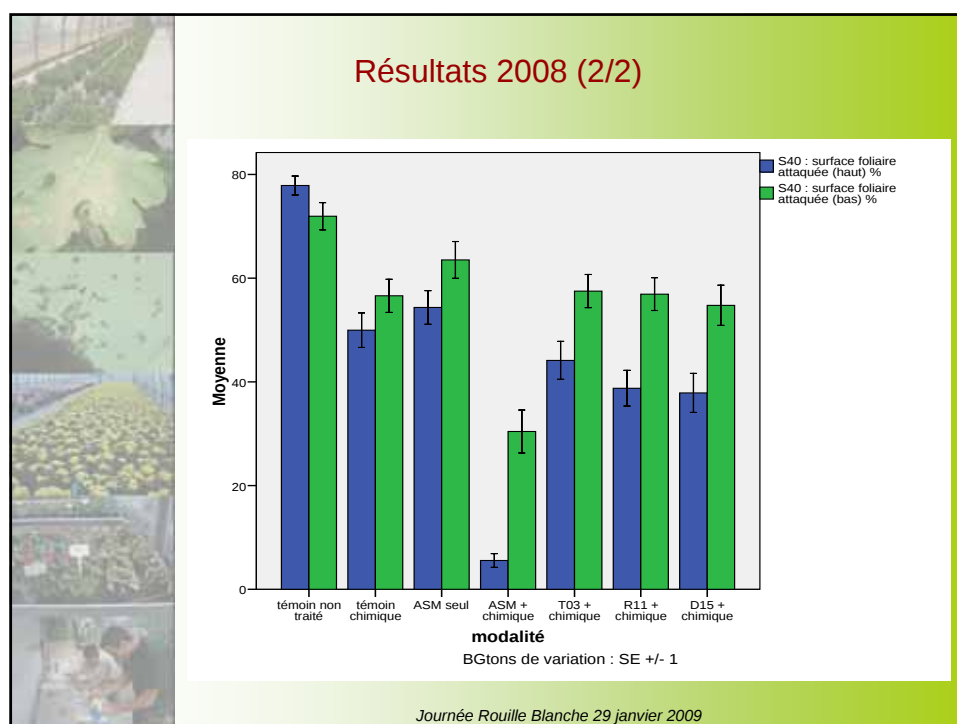
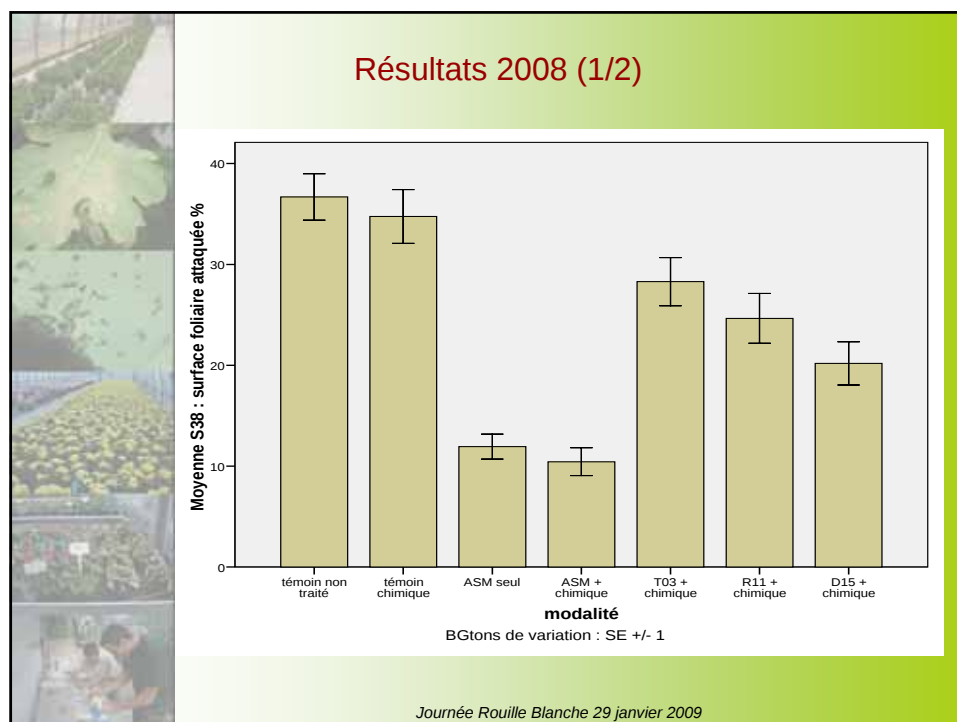
M 00	Témoin non traité
M 01	Témoin programme de traitements chimiques
M 02	ASM seul (0,01%)
M 03	ASM (0.01 %) + traitements chimiques
M 04	D15 (1 %) + traitements chimiques
M 05	T03 (1 %) + traitements chimiques
M 06	R11 (2,5 %) + traitements chimiques

- Traitements tous les 15 jours

- Traitements chimiques : alternance tous les 15 jours
Systhane New (myclobutanil) 170 ml/hl
Alliage (kresoxim-methyl) à la dose 30 ml/hl

- Inoculation (solution de spores) : Après premier traitement?

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009





Conclusions

- Efficacité des phytostimulants en station souvent moins importante que celle obtenue au labo.
- BABA, efficacité intéressante. Pas d'effet direct contre le pathogène. **SDN?** Produit sans espoir d'homologation.
- STS2008, efficacité intéressante. **Faible effet direct contre le pathogène. Chrysanthème plus résistant après traitement ASM (SDN, augmentation activité enzymes glucanase et peroxydase)**
- Ortiva (azoxystrobine) seul, efficacité importante. Mélange Ortiva/STS2008 très efficace. **Stratégie de lutte intéressante : effet SDN et effet direct.**
- Efficacité en fonction de la méthode d'inoculation?

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009




Programme National

Contribution à la lutte contre la Rouille Blanche du chrysanthème

(Puccinia horiana)





Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Rappel des objectifs

- **Recherche bibliographique** (biologie, facteurs favorables, infestation, lutte, méthodes de détection)
- Recherche des instituts compétents (INRA, ILVO, Universités...) pour collaboration.
- **Enquête épidémiologique** chez les producteurs.
- Développement d'une **technique de détection précoce, rapide et peu coûteuse**, utilisant des échantillons prélevés chez les producteurs pilotes

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Recherche bibliographique

- Origine, symptômes et reconnaissance
- Conditions favorables
- Prévention et lutte
- Biologie
- Réglementation. Annexe II, Directive 2000/29/CE

« organisme nuisible dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les Etats membres s'ils se trouvent sur certains végétaux ou produits végétaux ». La réglementation concerne uniquement « les végétaux de Dendranthema (DC.) Des Moul., destinés à la plantation, à l'exception des semences »

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Enquête chez les producteurs

Population 2007 :

- 25 producteurs du Grand Ouest (adhérents STEPP)
- 19 producteurs du Sud Ouest (adhérents GIEFPSO)

Population 2008 :

- 24 producteurs Normandie et Nord Pas de Calais
- 10 producteurs du Sud Ouest et ? producteurs Centre

Enquête :

- Caractéristiques liées à la culture, la structure de production, l'arrosage, la fertilisation, les traitements phytosanitaires, la gestion du climat / de la lumière, l'environnement autour des systèmes de production, Impressions du producteur vis-à-vis de la rouille blanche, observations de l'enquêteur (*)
- Logiciel Sphinx : saisie et traitement de données en cours

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009

Détection précoce de la rouille blanche



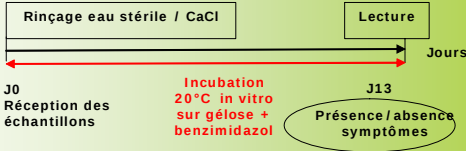
6 producteurs pilotes (GIE / STEPP) :

- 3 producteurs Grand Ouest (22, 29, 44)
- 3 producteurs du Sud Ouest (33, 33, 40)

Prélèvement des feuilles (GIE / STEPP) :

- dès réception des plants en entreprise
- après période d'occultation

Analyse des échantillons (BBV) :



Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009

Conclusions globales



- Certains **fournisseurs de jeunes plants** sont à l'origine des **problèmes** de la rouille blanche chez les producteurs de plantes finies.
- Les **productions plus sèches** sur sol bétonné ou bitumé semblent **moins touchées** par la rouille blanche.
- Les producteurs qui ont commencé à **traiter préventivement** dès réception des boutures sont **moins ou pas touchés**.
- Les producteurs qui ont **commandé** des variétés **chez plusieurs multiplicateurs** sont les **plus touchés** par la rouille blanche.

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Perspectives 2009

- Analyse des données de l'enquête 2007 et 2008 avant avril 2009.
- Visite et enquête adaptée des multiplicateurs.
- Poursuite de la suivi des cultures et des prélèvements des échantillons chez les producteurs pilotes.

Journée Rouille Blanche 29 janvier 2009



Présentation BBV



Programme National sur l'étude épidémiologique de la rouille blanche du chrysanthème



GIE FPSO Bilan Rouille Blanche du chrysanthème 2007 et 2008



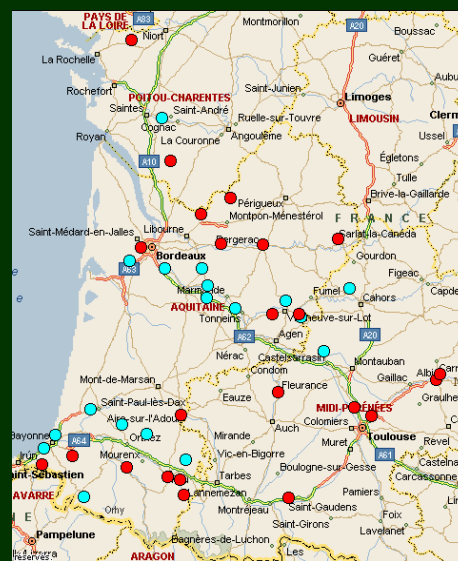
L'enquête dans le Sud Ouest

2007 : Retour en force de la maladie alors qu'elle était absente de certaine entreprise depuis 10 ans

45 enquêtes, sur 3 régions
19 réponses : 50 % des entreprises avaient de la rouille
= 11 entreprises réparties aléatoirement sur le SO

2008 : Peu de symptômes, en fin de culture lorsque peu de traitement

41 enquêtes - 9 retours et seulement Moindre intérêt
3 entreprises avec de la rouille



Bilan de campagne en 2007

➤ Matériel végétal

- ✓ boutures tachées à réception : attaque dès juin
- ✓ Producteurs de jeunes plants ne respectent pas la réglementation

➤ Climat : printemps et été pluvieux et frais

- ✓ 1^{eres} attaques précoces début juin
- ✓ Plusieurs cycles de contamination : à réception des boutures, pendant la culture,...

➤ Environnement : les entreprises les moins touchées

- ✓ Cultural : béton >goudron>toile
- ✓ Géographique : zone sèche
- ✓ Sanitaires : traitements précoces et réguliers

Bilan de campagne en 2008

➤ Matériel végétal

- ✓ boutures de meilleure qualité
- ✓ Plus de vigilance au rempotage

➤ Climat : été pluvieux et automne clément

- ✓ Attaques tardives en fin de cultures sur quelques entreprises
- ✓ Conservation du champignon d'une année sur l'autre

➤ Environnement : les entreprises les plus touchées

- ✓ Celles qui ont eu de fortes attaques l'an passé
- ✓ Géographique : zone très humide (cuvette, brouillard,...)
- ✓ Sanitaires : si impasse de traitements phytosanitaires

Présentation des sites pilotes



Site	Support de culture	Irrigation	Symptômes de rouille
Ets Frimont (la Réole-33)	Aire hors sol extérieure sur film plastique	Ruissèlement	Oui, 2007 et 2008
Ets Labat (Portets-33)	Aire extérieure et tunnel plastique	Ruissèlement	Non, jamais
Ets Hortiland (Bastennes-40)	Serre plastique DPG sur bâche étanche	Ruissèlement	Oui, 2007 et 2008
GIE FPSO (Villenave-33)	Serre découvrable sur plate forme Hortigreen	Marée haute marée basse puis goutte à goutte	Non, jamais

Echantillonnage



✓ Différents fournisseurs (Bernard, Guittet, Serres de Oisèmes, Challet-Hérault) et multitude de variétés chez un même producteur

✓ Prélèvements

- Quand ? A réception des boutures sur plaques alvéolées semaines 26 et 28
- Comment ? 100 BP par site, 4 feuilles / BP
- Combien ? Nombre de BP / variété est représentatif de la diversité sur l'entreprise



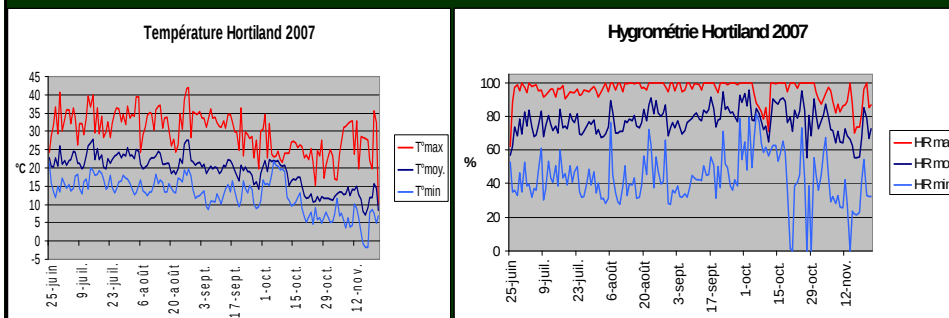
✓ Résultats de détection

- 2007 : problème de désinfection, pas de résultats
- 2008 : aucun échantillon positif

Données climatiques



- ✓ Une sonde Tiny Tag par site pilote
- ✓ Relevé des températures et hygrométries toutes les 20 min
- ✓ Exemple de données recueillies sur une entreprise avec des symptômes de rouille blanche sur chrysanthème



Variations importantes qui a accentuer et favoriser l'apparition et le développement de la maladie

Les variétés touchées

- Variétés à grosses fleurs sont plus touchées que les multifleurs en intensité : plus ancienne donc moins de sélection que les petites fleurs qui ont moins de 5 ans de création
- Variétés jaunes semblent être plus sensibles : génétique ?

Année	Grosses fleurs	Petites fleurs
2007	India, Corola doré, Torpedo rouge, Mistral jaune, Movida jaune, Polojo jaune, Bouldor, Gusli jaune, Mistral jaune, Malabar, Movida rose, Kalisto rose, Komodo, Polochon, Sonora, Cocori, Salambo rose, Louisette jaune et doré	Yahou, Tonka, Fada rouge, Balsa rouge, Ciné jaune, Kaleido blanc et rouge, Soda, Oslo, Cigale rouge, Krousti orange, Balsa, Skippi, Clero, Zephyr, Smilla, Ivrea, Lazca, Pampa, Simlar jaune, Divaljo, Swan jaune, Angali, Clero blanc, Senso violet, Gugus rouge, Lora jaune, Padoc rose, Balsa rouge, Teva rose, Pantin blanc et jaune et rose, Simlar jaune, Divaljo, Swan jaune, Angali, Lauriane jaune, Belcanto, Alegro, Laura jaune, Clero blanc, Tulsa, Taiga, Blanca, Pony
2008	Movida jaune, Polojo jaune, Sonora rouge et or, Corola doré	Yahou, Obao, Baloon rouge, Kaleido blanc, Pantin jaune, Cigale rose



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmethMolecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCRHossein Alaei^{a,b,1}, Steve Baeyen^a, Martine Maes^a, Monica Höfte^b, Kurt Heungens^{a,*}^a Institute for Agricultural and Fisheries Research, Unit Plant – Crop Protection, Burg. Van Gansberghelaan 96 bus 2, 9820 Merelbeke, Belgium^b Ghent University Lab Phytopathology, Department of Crop Protection, Coupure Links 653, 9000 Gent, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2008

Received in revised form 1 October 2008

Accepted 1 October 2008

Available online xxxx

Keywords:

Chrysanthemum white rust

Specificity

Sensitivity

DNA extraction

PCR inhibitors

Detection limit

ABSTRACT

Puccinia horiana Henn. is a quarantine organism and one of the most important fungal pathogens of *Chrysanthemum x morifolium* cultivars grown for cut flower or potted plant production (florist's chrysanthemum) in several regions of the world. Highly specific primer pairs were identified for conventional, nested, and real-time PCR detection of *P. horiana* based on the specific and sensitive PCR amplification of selected regions in the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the nuclear ribosomal DNA (rDNA). Using these different PCR versions, 10 pg, 10 fg, and 5 fg genomic DNA could be detected, respectively. When using cloned target DNA as template, the detection limits were 5000, 50, and 5 target copies, respectively. These detection limits were not affected by a background of chrysanthemum plant DNA. The DNA extraction method was optimized to maximize the recoverability of the pathogen from infected plant tissue. A CTAB extraction protocol or a selection of commercial DNA extraction methods allowed the use of 10 ng total (plant+pathogen) DNA without interference of PCR inhibitors. Due to the specificity of the primers, SYBR Green I technology enabled reliable real time PCR signal detection. However, an efficient TaqMan probe is available. The lowest proportion of infected plant material that could still be detected when mixed with healthy plant material was 0.001%. The real-time PCR assay could detect as few as eight pure *P. horiana* basidiospores, demonstrating the potential of the technique for aerial detection of the pathogen. The amount of *P. horiana* DNA in plant tissue was determined at various time points after basidiospore inoculation. Using the real-time PCR protocol, it was possible to detect the pathogen immediately after the inoculation period, even though the accumulation of pathogen DNA was most pronounced near the end of the latent period. The detection system proved to be accurate and sensitive and could help not only in pathogen diagnosis but also in pathogen monitoring and disease forecasting systems.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chrysanthemum white rust or Japanese rust is caused by *Puccinia horiana* Henn. (Hennings, 1901). This pathogen is one of the most important fungal pathogens of *Chrysanthemum x morifolium* cultivars grown for cut flower or potted plant production (florist's chrysanthemum). *P. horiana* is a microcyclic rust fungus and has been reported in most regions where florist's chrysanthemum is grown (Anon, 1989; Punithalingam, 1968b). In several of these regions it has obtained a quarantine status (Anon, 2004). Therefore, shipments in which the pathogen is detected or infected batches at nurseries are usually destroyed. Teliospores of *P. horiana*, produced on the lower surface of infected leaves, germinate and produce basidiospores in conditions of high humidity and cool temperatures. The basidiospores are dispersed

by air and cause new infections (Zandvoort, 1968). The period from infection to initial symptoms is 8 to 10 days under optimal conditions (Firman and Martin, 1968; Zandvoort et al., 1968).

When disease symptoms occur, they often do so suddenly and on a large scale, leaving little or no time for the growers to take control measures. This leads to ecologically and economically suboptimal calendar-based preventive application of fungicides. Reports of fungicide-resistant strains (Cook, 2001) show that this practice is not sustainable with some fungicides. Another problem is the lack of information on the origin of the initial infections and the possibility of latent survival. The pathogen can overwinter in infected plant material but production nurseries and consumers usually do not keep any plant material during winter time, thus treating the host as an annual plant. Each year nurseries tend to purchase new planting material from specialized companies that perform stringent inspections of their mother plants and cuttings. Unless this material is latently infected, an external inoculum source and/or survival in a yet unknown host or location must be involved.

Given the strictly biotrophic nature of *P. horiana*, chrysanthemum white rust is traditionally detected in plant material through visual examination for disease symptoms. However, symptom-based

* Corresponding author. Tel.: +32 9 272 2487; fax: +32 9 272 2429.

E-mail addresses: hossein.alaei@ilvo.vlaanderen.be (H. Alaei), steve.baeyen@ilvo.vlaanderen.be (S. Baeyen), martine.maes@ilvo.vlaanderen.be (M. Maes), monica.hofte@ugent.be (M. Höfte), kurt.heungens@ilvo.vlaanderen.be (K. Heungens).¹ Present address: Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Valiasr Rafsanjan University, 518, Rafsanjan, Iran.

identification may require long waiting periods as the incubation period of the disease is strongly dependent on the environmental temperature (Firman and Martin, 1968; Whipps, 1993). This may translate in quarantine periods that are unpractical. Also, fungicides may keep the pathogen in a latent phase, making symptom-based detection unreliable. A rapid, sensitive and specific detection method for this pathogen would be useful during quarantine inspections and would serve as a tool to increase the knowledge of the biology and epidemiology of *P. horiana*. Such a detection technique could be used to monitor the latent presence of the pathogen in plant tissue at various stages of the growing process, especially in propagating material and during international shipments.

Different methods are available for rapid, sensitive and specific detection of plant pathogens. Immunological and DNA-based detection methods are most commonly used. Molecular techniques based on PCR-mediated DNA detection are becoming quite popular due to the now commonly available PCR equipment. When primer selection is optimal, the sensitivity (pg DNA range), specificity and reproducibility of this technique is excellent (Henson and French, 1993; Martin et al., 2000; White et al., 1990). Nested PCR assays may be required to detect low levels of infection (10 fg DNA range) (Flowers et al., 2003; Ma et al., 2003). More recently, real-time PCR has become available, which has the added benefits of a wider dynamic range and a quantitative aspect (Kubista et al., 2006; Schena et al., 2004). These PCR-based approaches have been used to detect some rust fungi, including stem rust (*Puccinia graminis*), stripe rust (*Puccinia striiformis*), crown rust (*Puccinia coronata*), and leaf rust (*Puccinia recondita* and *Puccinia triticina*) (Barnes and Szabo, 2007; Fraaije et al., 2001; Jackson et al., 2006; Wang et al., 2007). Most of these protocols used primer sequences that were derived from the internal transcribed spacer regions of the ribosomal RNA genes (rDNA-ITS). These regions are popular because it has little intraspecific DNA sequence variability but usually sufficient interspecific variability to design species-specific primers (Lee and Taylor, 1992; White et al., 1990). This was confirmed for *P. horiana* in a previous study (Alaei et al., 2009). The rDNA-ITS sequences are present in multiple copies (Bornerman and Hartin, 2000; Boyle et al., 2005; White et al., 1990), which increases the sensitivity of detection. Furthermore, the rDNA-ITS sequences are the most widely available sequences among different organisms in public databases such as GenBank, allowing design of specific primers without the need to determine the nucleotide sequence of the DNA area of interest in a large collection of non-target organisms.

Hardly any work has been described on the PCR detection of *P. horiana*. Sugimura (2001) obtained a part of the *P. horiana* rDNA-ITS sequences but PCR amplification based on two sets of primers appeared to lack specificity. Other attempts were hampered by difficulties in obtaining the rDNA-ITS sequences from *P. horiana* (Grasso et al., 2006; Hughes, personal communication). To our knowledge, this is the first study focusing on the molecular detection of *P. horiana* directly from chrysanthemum tissue. Specifically, our first objective was to develop PCR primers for conventional, nested and real-time PCR that allow sensitive and specific detection of *P. horiana* DNA. Our second objective was to optimize the DNA extraction and total DNA concentration in the PCR reaction for application of this technique to plant tissue. The last objective was to determine the quantity of *P. horiana* DNA in plant tissue during the course of the latent infection stage and verify experimentally that the theoretical detection limit in plant tissue could be reached. A preliminary report involving the first objective was presented previously (Alaei et al., 2007).

2. Materials and methods

2.1. Organisms and plasmids

The name, host and origin of microorganisms used in this study are listed in Table 1. They were selected based on their ITS sequence similarity to *P. horiana* or their potential presence in the same ecological

niche. Preparation of plasmid clones containing the ITS regions of the ribosomal DNA of *P. horiana* or other rusts was as described in a previous study (Alaei et al., 2009). We made extensive use of such plasmid clones because obtaining sufficient amounts of genomic DNA from obligate parasites such as rust fungi is extremely hard without co-extracting contaminating plant DNA.

Chrysanthemum x morifolium cultivars Medonia, Taliedo and Minera were used as hosts and maintained year-round in a greenhouse. When needed, cuttings were prepared for inoculation and detection experiments and for maintenance of the *P. horiana* isolates. Plant inoculations with *P. horiana* were conducted as described previously (Alaei et al., 2009). Briefly, cuttings were inoculated in closed transparent recipients in which leaves bearing telia were stuck to the lid using diluted water agar. After misting the inside of the recipient and the leaves with water, the recipients were placed at 17 °C to allow spore discharge and infection. After 9 h the inoculation was stopped by removing the teliospore-bearing leaves.

2.2. DNA extraction and quantification

Mycelium and spores of the non-obligate fungi were harvested from liquid cultures in potato dextrose broth (Difco), grown for up to two weeks on an orbital shaker at 27 °C. Their genomic DNA (gDNA) was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Genomic DNA of *P. horiana* and other rust species was isolated as described previously (Alaei et al., 2009). Unless noted otherwise, DNA of infected and non-infected chrysanthemum leaves was extracted with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) using 100 mg of leaf tissue that was previously ground in liquid nitrogen. Genomic DNA from bacteria was extracted using the Puregene® DNA purification kit (Gentra). DNA concentrations were determined using a VersaFluor Fluorometer (BioRad) and the PicoGreen® dsDNA (Molecular Probes) or Hoechst Dye 33258 (Biorad) DNA quantification kits. Considering the complete sequence of each of the plasmid clones was known, the copy number of plasmids and thus the number of templates in a specific PCR reaction was calculated based on the molecular weight of the plasmids and the DNA concentration in the plasmid solution. Plasmid DNA is hereafter referred to as pDNA.

2.3. Primer and probe development

To develop candidate specific primers for *P. horiana* we aligned the rDNA ITS sequences of different *P. horiana* isolates (Alaei et al., 2009) with the ITS sequence data from other closely related rusts (Table 1) and from *Chrysanthemum x morifolium* (AF314599) using ClustalX 1.81 (Thompson et al., 1997). Regions that were conserved within the *P. horiana* isolates but differed from non-target organisms were used to develop candidate specific primers for *P. horiana*. For conventional PCR, seven different candidate specific primers were designed manually, based on visual inspection of the multiple alignments. Candidate primer pairs were checked for G/C content, annealing temperature, primer-dimer and hairpin formation using Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). For real-time PCR, five forward and five reverse primers were designed using the Primer Express Software version 2 (Applied Biosystems) and through manual inspection of the multiple alignment. Primers were synthesized by Eurogentec. Conventional and real-time PCR primers were subjected to preliminary selectivity and specificity tests using a selection of the organisms listed in Table 1 (results not shown). All primers that passed these preliminary tests are listed in Table 2, together with the TaqMan® probe (synthesized by Applied Biosystems).

2.4. PCR amplifications methods

Primer combinations Ph260F–Ph256R; Ph154F–Ph157R; Ph155F–Ph157R and Ph269F–Ph157R were used for conventional PCR. The

Table 1
Isolates and plasmid clones of *Puccinia horiana* and other (rust) fungi and bacteria used

Organism	Isolate code(s) or accession number(s)	Host	Country of collection	Collection year	Nature and source of sample
<i>Puccinia horiana</i>	Phx ^a	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Belgium	2003	Fresh samples, collected by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Puccinia horiana</i>	Phy ^b	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	UK	2005	Fresh samples, via S. McDonough, CSL, York, UK
<i>Puccinia horiana</i>	Ph01N; Ph02N	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Norway	1996, 1999	Herbarium specimen, via Dr. H.B. Gjørsum, NPPI, Ås, Norway
<i>Puccinia horiana</i>	Ph03B	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Brazil	2002	Herbarium specimen, via Dr. H.B. Gjørsum, NPPI, Ås, Norway
<i>Puccinia horiana</i>	Ph01P	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Poland	2006	Fresh sample, via Dr. A. Wojdyla, INSAD, Skierniewice, Poland
<i>Puccinia horiana</i>	Ph01H	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Netherlands	2006	Fresh sample, via W. Janssen, PD, Wageningen, The Netherlands
<i>Puccinia horiana</i>	Ph01U	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	USA	2006	Dried sample, via Dr. M. Palm, APHIS-PPQ, Beltsville, USA
<i>Puccinia horiana</i>	R56j; R54j	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Japan	1903, 1912	Herbarium specimen 71737–54, 56, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia allii</i>	pHSZ0428-5	<i>Allium</i> sp.	Slovakia	Unknown	Plasmid clone (HSZ0428), via Dr. L. Szabo, CDL, St. Paul, USA
<i>Puccinia asparagi</i>	EU014051	Unspecified weed (Poaceae)	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Puccinia asparagi</i>	HSZ0318	<i>Asparagus</i> sp.	USA	Unknown	Genomic DNA (HSZ0318), via Dr. L. Szabo, CDL, St. Paul, USA
<i>Puccinia chrysanthemi</i>	EU014035	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Finland	1937	Herbarium specimen 111047–79, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia cirsii</i>	EU014065	<i>Cirsium vulgare</i>	USA	2004	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i>	EU014044	<i>Lolium perenne</i>	Belgium	2004	Stored urediospores, via Dr. L. Leus, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Puccinia drabae</i>	EU014054	<i>Draba arabisans</i>	Norway	1975	gDNA(16555), via Dr. B. Kropp, Utah State Univ., Logan, USA
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	EU014046	<i>Hordeum vulgare</i>	Belgium	2004	Fresh sample, collected by Dr. K. Heungens, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	EU014047	<i>Triticum aestivum</i>	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Puccinia helianthi</i>	EU014063	<i>Helianthus annuus</i>	USA	2004	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Puccinia malvacearum</i>	HA216	<i>Alcea rosea</i>	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Puccinia miscanthi</i>	HA215	<i>Plantago</i> sp.	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Puccinia monoica</i>	HSZ0545	<i>Arabis</i>	USA	Unknown	Genomic DNA (HSZ0545), via Dr. L. Szabo, CDL, St. Paul, USA
<i>Puccinia persistens</i>	pHSZ0685-0	<i>Elytrigia intermedia</i>	Slovakia	2002	Plasmid clone (HSZ0685-0), via Dr. L. Szabo, CDL, St. Paul, USA
<i>Puccinia recondita</i>	EU014045	<i>Hordeum vulgare</i>	Belgium	2004	Fresh sample, collected by Dr. K. Heungens, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Puccinia recondita</i>	pHSZ0712-1	<i>Secale cereale</i>	USA	2003	Plasmid clone (HSZ0712-1), via Dr. L. Szabo, CDL, St. Paul, USA
<i>Puccinia</i> sp. 1	EU014043	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Belgium	1900	Herbarium specimen 111051–83, NBG, Meise, Belgium
<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	EU014048	<i>Triticum aestivum</i>	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Puccinia tanacetii</i>	EU014058	<i>Tanacetum vulgare</i>	USA	2004	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Puccinia tanacetii</i>	EU014059	<i>Tanacetum vulgare</i>	USA	2004	Dried sample, via Dr. G. Newcombe, Univ. of Idaho, Moscow, USA
<i>Puccinia thlaspeos</i>	EU014052	<i>Draba arabisans</i>	Canada	1954	Dried sample, via Dr. B. Kropp, Utah State Univ., Logan, USA
<i>Puccinia trebouxii</i>	EU770611	<i>Melica jacquemontii</i>	Iran	2002	Herbarium specimen 11638, via M. Abbasi, PPDRI, Tehran, Iran
<i>Puccinia triticina</i>	EU014050	<i>Triticum aestivum</i>	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Kuehneola uredinis</i>	EU014068	<i>Rubus fruticosus</i>	Belgium	2004	Fresh sample, collected by K. Van Poucke, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Melampsora laricis-populina</i>	EU014067	<i>Populus</i> sp.	Belgium	2004	Fresh sample, collected by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Phragmidium rosa</i>	HA217	<i>Rosa</i> sp.	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Pileolaria terebinthi</i>	EU014072	<i>Pistacia mutica</i>	Iran	Unknown	Diseased plant, via Dr. S. M. Okhovat, Univ. of Tehran, Iran
<i>Tranzschelia discolor</i>	EU014071	<i>Prunus dulcis</i>	Iran	2002	Diseased plant, via Dr. M.A. Samia, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Uromyces trifolii-repentis</i>	EU014070	<i>Trifolium resupinatum</i>	Iran	1995	Dried sample, via H. Alaei, Valiasr Rafsanjan Univ., Iran
<i>Alternaria infectoria</i>	HA406	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Belgium	2004	Sample isolated from plant, by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Aspergillus</i> sp.	HA404	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Belgium	2004	Sample isolated from plant, by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Botrytis cinerea</i>	HA402	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Belgium	2004	Sample isolated from plant, by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Cladosporium</i> sp.	HA403	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Belgium	2004	Sample isolated from plant, by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Fusarium solani</i>	HA410	<i>Solanum tuberosum</i>	Belgium	2004	Sample via S. Inghelbrecht, ILVO culture collection, isolate 48, Ghent, Belgium
<i>Oidium chrysanthemi</i>	HA401	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Belgium	2004	Mycelia and Conidia, via H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Penicillium</i> sp.	HA405	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Belgium	2004	Sample isolated from plant, by H. Alaei, ILVO, Ghent, Belgium
<i>Rhizoctonia solani</i>	HA407	<i>Solanum tuberosum</i>	Belgium	2004	Sample via S. Inghelbrecht, ILVO culture collection, isolate 97, Ghent, Belgium
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	HA411	<i>Cucumis sativus</i>	Belgium	2004	Sample via S. Inghelbrecht, ILVO culture collection, isolate 106, Ghent, Belgium
<i>Septoria</i> sp.	HA408	<i>Rhododendron</i> sp.	Belgium	2004	Sample via S. Inghelbrecht, ILVO culture collection, isolate 142, Ghent, Belgium
<i>Trichoderma harzianum</i>	HA409	Soil	Belgium	2004	Sample via S. Inghelbrecht, ILVO culture collection, isolate 117, Ghent, Belgium
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	HA412	<i>Saintpaulia ionantha</i>	Belgium	1982	Sample via B. Asselbergh, Univ. Ghent culture collection, strain 3937, Belgium
<i>Pseudomonas chichorii</i>	HA413	<i>Lactuca sativa</i> cv. <i>capitata</i>	Belgium	2004	Sample via B. Cottyn, ILVO culture collection, DGBBC-1307, Ghent, Belgium

^a (x=301, 304, 308, 313, 316, 319, and 325).

^b (y=01RE, 02SG, and 03SP).

Table 2
Nucleotide sequence of PCR primers and probe used

Primer code	Orientation	Location	Sequence (5' to 3')
Conventional and nested PCR			
Ph154F	Forward	ITS1	TGACCCCTTTTAAATATATC
Ph155F	Forward	ITS1	CTTGGTTGCATGAATTTTGT
Ph157R	Reverse	ITS2	TTGCTACTTTCCTTGATGAA
Ph229R	Reverse	ITS2	TTTCAAAAACAAAAGCTGGCAAGT
Ph256R	Reverse	ITS2	GATTAATTTTGGGTTTITAGAACTCTT
Ph260F	Forward	ITS1	CCCTTTTAAATATATACCCCAACTAT
Ph269F	Forward	ITS1	CCCCTTTATTTTATCCCC
Quantitative real-time PCR			
Ph229R	Reverse	ITS2	TTTCAAAAACAAAAGCTGGCAAGT
Ph234F	Forward	ITS2	CCCTCTCACAAAATAATTTTGTAAATTA
Ph258R	Reverse	ITS2	CAAGTATTGCTACTTTCCTTGATGAAA
Ph259R	Reverse	ITS2	CAAGTATTGCTACTTTCCTTGATGAAAAA
Ph261F	Forward	ITS1	ACCCCTTTTAAATATATACCCCAACTA
Ph263F	Forward	ITS1	ACCCCTTTTAAATATATACCCCAACTAT
Ph264R	Reverse	ITS1	CTTGTTATATAATAAAAAGGGGGTAA
TaqMan probe			
Ph706		ITS1	6-FAM-ACTTGGTTGCATGAATT-MGB

reaction mix (50 µl) consisted of GeneAmp PCR Gold Buffer II (10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl pH 9.0), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP (Roche), 0.2 µM of each primer, 1.25 units AmpliTaq Gold DNA polymerase, and DNA template (in 5 µl) from target or non-target organisms, tested at different concentrations. Reagents were from Applied Biosystems unless listed otherwise. MilliQ water was used instead of DNA template in the negative control. Thermal cycles were conducted in a GeneAmp PCR System 9700 PE (Applied Biosystems). Annealing temperature (47 to 65 °C), annealing time (30 to 60 s), and extension time (45 to 60 s) were optimized for the different primers during preliminary experiments. Finally, the PCR cycles consisted of an initial preheat at 94 °C (5 min) and 35 cycles, each consisting of 30 s denaturation at 94 °C, annealing for 30 s at 49 °C (except Ph260F–Ph256R, for which 60 °C was used), and 45 s extension at 72 °C. The reaction was ended with a final extension at 72 °C for 10 min.

For nested PCR, primer combinations Ph260F–Ph256R and Ph154F–Ph157R were used as external primers, using 30 s at 60 °C and 49 °C as annealing conditions, respectively. When using pDNA as template, the first round PCR reaction product was diluted 500-fold and 5 µl used as template in the second round PCR. When using gDNA as template, 1 µl of non-diluted product from the first round was used as template in the second round of amplification. The following primer pairs were withheld for the second round of amplification (annealing for 30 s at temperatures listed between brackets): Ph155F–Ph157R (49 °C); Ph269F–Ph157R (49 °C); Ph269F–Ph229R (55 °C). Ten µl of each PCR product was analysed by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

For real-time PCR, the primer combinations that were withheld after the preliminary tests were Ph261F–Ph264R; Ph263F–Ph264R; Ph234F–Ph258R; Ph234F–Ph229R; Ph234F–Ph259R. For each DNA sample, real-time PCR was performed in 25 µl reactions containing variable copy numbers of cloned pDNA as template (in 5 µl), 0.3 µM of each primer and SYBR Green I PCR Master Mix (Applied Biosystems). When Taqman technology was used, the PCR mix contained the same ingredients, except for the addition of probe Ph706 (0.2 µM) and the use of Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) instead of the SYBR Green Master Mix. Amplification and detection of fluorescence were performed in white 96-well optical reaction plates (ABgene) using an ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). The thermocycling profile for all PCR reactions was 2 min preheating at 50 °C, 10 min at 95 °C and 40 cycles consisting of 15 s denaturation at 95 °C and 60 s annealing and extension at 60 °C. For quantification purposes, standard curves were constructed by including reactions containing cloned pDNA in a 10-fold dilution series from 10⁹ to 10⁰ copies per reaction. Each analysis also

included a no-template control, in which the DNA was substituted by MilliQ water. The manufacturer's Sequence Detection Software (SDS, Applied Biosystems) was used to generate the amplification curves for each reaction. The threshold cycle number (Ct) was calculated with SDS using the default settings. Dissociation curves were constructed and analysed to check for specificity of the amplicons. To further confirm that no other amplicons were generated during the testing stage of the real-time PCR, the 25 µl PCR product of each sample was analysed by electrophoresis on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

2.5. Sensitivity, specificity, and repeatability tests

To assess the sensitivity of the detection of *P. horiana* using the preselected primers, DNA dilution series resulting in 1 ng to 100 ag gDNA from Ph325 per PCR reaction or 5 × 10⁶ to 5 × 10⁰ copies pDNA per reaction were subjected to conventional, nested, and real-time PCR analyses. Plasmid DNA was circular, as preliminary tests showed no significant difference between the standard curves of real-time PCR assays when circular versus HindIII-linearized plasmid was used. To test the capacity of the primers to detect *P. horiana* isolates from different origins, the most useful primers were tested on 18 isolates of *P. horiana* (5 µl of a 10-fold diluted DNA extract), collected in 8 different countries spanning 3 different continents (Table 1), and on 1 and 10 ng of total DNA from infected and non-infected chrysanthemum leaves.

The specificity of the primers was tested using 1 ng gDNA and/or 5 × 10⁵ and 5 × 10⁶ copies (pDNA) from the non-target organisms listed in Table 1.

To assess the accuracy and repeatability of the real-time PCR setup and the comparability of standard curves using gDNA versus pDNA as template, three independent real-time PCR reaction series were performed using primer set Ph263F–Ph264R and a new template dilution series of genomic and plasmid DNA within each series.

To compare the SYBR Green I detection system with the TaqMan® detection system, simultaneous reactions were performed on the same pDNA dilution series using the two detection systems.

To evaluate the effect of background host DNA on the detection efficiency of target DNA, dilution series of target gDNA and pDNA were established in MilliQ water as well as in a 0.2 ng µl⁻¹ and 2 ng µl⁻¹ DNA solution from healthy chrysanthemum leaves. The dilution series were used as templates in real-time PCR using primers Ph263F–Ph264R and the effect of the plant DNA was evaluated based on the comparison of the standard curves.

2.6. Optimization of DNA extraction and DNA extract amount for real-time PCR detection of *P. horiana* in infected plant material

A good DNA extraction method for *P. horiana*-infected plant material has a high target DNA yield, successfully removes PCR inhibiting compounds, and is affordable in terms of materials and labour. Using these criteria, two non-commercial CTAB DNA extraction methods and the following commercially available DNA extraction kits were compared: Genelute plant genomic DNA kit (Sigma), Easy-DNA™ kit (Invitrogen), Puregene® DNA purification kit (Gentra systems), Invisorb® spin plant mini kit (Invitek), the E.Z.N.A.® Fungal DNA mini kit (PEQLab Biotechnologie), Dynabeads® DNA Direct™ universal (Dynal Biotech), DNeasy Plant mini kit (Qiagen), and the UltraClean™ Plant DNA Isolation kit (MoBio laboratories). Symptomatic plant material (18 days post inoculation) was collected and homogenized by grinding in liquid nitrogen. For each method, three replicate DNA extractions were performed using 100 mg of the ground material per extraction. The ground material was transferred into a microcentrifuge tube containing 100 mg zirconium beads (0.1 mm diameter) and the amount of lysis buffer recommended by the manufacturers. The extraction mixture was vortexed for 1 min and

further homogenized by two cycles of 30 s bead-beating at the high frequency setting in a Mixer Mill MM301 (Qiagen). Samples were spun down and incubated for 30 min at 65 °C after which the DNA extraction was continued according to the manufacturer's instructions. The CTAB methods were modified from Gardes and Bruns (1993). The lysis buffer consisted of 1.4 M NaCl (Sigma), 100 mM Tris–HCl (pH 8.0) (UCB), 0.02 M Na-EDTA (Invitrogen), 1% (vol/vol) β -mercaptoethanol (Sigma), and 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Sigma). Samples were processed as described for the commercial kits after which an equal volume of chloroform:isoamylalcohol (24:1 vol:vol) (= CTAB method I) or phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1 vol:vol) (= CTAB method II) was added. The mixture was vortexed and then centrifuged at 16,000 $\times$ g for 5 min. The upper phase was transferred to a new tube and after 15 min treatment with 40 μ g RNase (Qiagen), the DNA was precipitated by adding 0.7 volumes isopropanol, pelleted, washed in 70% ethanol, resuspended in 50 μ l of TE buffer and stored at –20 °C until further use. Total DNA was quantified as described above. To determine the most optimal DNA extraction method, a two-step process was conducted. First, we determined the methods that allowed detection of the largest amounts of quantifiable *P. horiana* DNA (using real-time PCR with primers Ph263F–Ph264R) in a small amount of DNA extract (containing 1 ng total DNA). This was a level at which no PCR inhibition was expected. In a second step, we determined which of these preselected methods contained the fewest co-extracted inhibitors by increasing the amount of DNA extract in the real-time PCR reactions from 1 ng to 10, 50, and 100 ng total DNA, and verifying at what level inhibition started to occur. This was done by comparing the theoretical Ct values with the observed Ct values. The data was analysed using ANOVA and Fisher's pairwise comparison ($P=0.05$) using SPSS version 11.5 (SPSS Inc).

2.7. Detection limit in plant tissue and detection of pure basidiospores

The proportion of infected material detectable can be estimated based on the amount of target DNA present in uniformly inoculated plant material (x days after the infection started), the size of the sample, and the DNA detection limit using the optimized DNA extraction and (real-time) PCR techniques. An experiment was designed to verify this detection limit empirically for a sample of 100 mg plant tissue. Symptomatic plant material was excised from leaves with a scalpel 10 days after the inoculation. It was immediately frozen and homogenized in liquid nitrogen. By serially diluting 100 mg of infected leaf material with 900 mg healthy plant material that was similarly processed, plant samples were created containing 100% to 0.001% of this infected leaf material. Three replicate dilution series were prepared. DNA was extracted from 100 mg of each sample using the Invisorb® spin plant mini kit (Invitex). Total DNA was quantified and 10 ng was subjected to the conventional (Ph260F–Ph256R), nested (Ph155F–Ph157R), and real-time PCR formats (Ph263F–Ph264R).

To assess the possibility to detect *P. horiana* spores directly, basidiospores were collected from infected leaves using a spore-harvesting method (Alaei et al., 2009). The spores were quantified using a haemocytometer and serially diluted in MilliQ water with 0.01% Tween 20. Suspensions containing either 8, 80, or 800 basidiospores were used directly as template in real time PCR reactions using primer pair Ph263F–Ph264R and the conditions described above.

2.8. Detection in infected plant material at various stages of the infection process

To determine the target DNA concentration at various stages of the infection process, the real-time PCR method (see Section 2.7) was used with DNA extracted from plant material (cv. Medonia) inoculated with *P. horiana* and harvested 0, 2, 4, 8, and 14 days post inoculation (dpi). For each time point, 4 leaves were taken from each of 3 randomly selected and separately inoculated plants. Leaves were washed with

deionized water (to remove inoculated spores that were only adhering to the outer leaf surface), blotted dry, and frozen at –70 °C until all samples were collected. The leaves were bulked per plant, ground to a fine powder with liquid nitrogen, and extracted as described in Section 2.7. To determine the time point at which the pathogen could be detected with conventional PCR, the samples were also analysed with primers Ph260F–Ph256R.

3. Results

3.1. Sensitivity, specificity, and repeatability tests

The four candidate primer pairs designed for conventional PCR detection of *P. horiana* all produced a clear amplicon of the expected size using DNA from all 18 *P. horiana* isolates (Table 3). As low as 5000 copies pDNA (except for primer pair Ph260F–Ph256R (5×10^4)) or 10 pg gDNA could reliably be detected (Table 3). Primer pairs were considered specific if no signal was obtained when using 1 ng of genomic DNA or 5×10^6 copies of pDNA from all the separate non-target organisms. In conventional PCR assays this was obtained with primer pairs Ph260F–Ph256R and Ph154F–Ph157R only (Table 3). When PCR product from the non-target reactions with either one of these primer pairs was used as template for nested PCR with primer pairs Ph155F–Ph157R, Ph269F–Ph229R, or Ph269F–Ph157R, a faint band was observed with up to 3 non-target rust species (Table 3). However, when using 5×10^5 copies instead of 5×10^6 copies non-target pDNA in the first round PCR, no band was observed after the second round of PCR (data not shown). The detection limit for target DNA was 100 to 1000 times more sensitive for nested PCR than for conventional PCR when using primer set Ph260F–Ph256R or Ph154–Ph157R for the first round and Ph155F–Ph157R, Ph269F–Ph157R or Ph269F–Ph229R for the second round: a single band was produced with as low as 50 copies of cloned pDNA and as low as 10 fg of genomic DNA (Table 3 and Fig. 1). The results with the real-time PCR primers are also shown in Table 3. When using 1 ng of genomic DNA from the non-target organisms and primers Ph263F–Ph264R, no signal ($C_t > 40$) was observed with any of the templates. When using 5×10^6 copies of pDNA, a signal (C_t usually > 30) was occasionally obtained with some of the non-target templates, especially with *Puccinia drabae* and *Puccinia trebouxii* (Table 3). With primer pairs Ph234F–Ph258R, Ph234F–Ph229R, and Ph234F–Ph259R this was most problematic. However, when using 5×10^5 copies of non-target pDNA, there was no signal ($C_t > 40$) when using primer pairs Ph261F–Ph264R or Ph263F–Ph264R. When using target DNA from *P. horiana* isolate Ph325 with these primers, as low as 5 copies of cloned pDNA and 5 fg of genomic DNA could be detected (Table 3 and Fig. 2). Melting curve analysis revealed that the melting temperatures of the PCR products using primer pair Ph263F–Ph264R and pDNA or gDNA of *P. horiana* as template were uniform for all template concentrations, demonstrating the specificity of the amplification process (Fig. 2). The standard curves from simultaneous real-time PCR reactions with the different detection technologies were $y = -0.2882 \times x + 11.49$ ($R^2 = 0.996$) for SYBR Green and $y = -0.2589 \times x + 11.71$ ($R^2 = 0.996$) for TaqMan®, in which “ y ” represents the log of the target copy number and “ x ” represents the C_t value. Based on an average difference of 0.95 C_t values, the SYBR Green based assay is approximately twice as sensitive as the TaqMan assay.

The standard curves obtained from the separate real-time PCR assays using primer pair Ph263F–Ph264R and three different dilution series of genomic and plasmid DNA were highly similar: the coefficient of variation between the C_t values was smaller than 5% at all template levels. Highly linear relationships ($R^2 > 0.99$) were observed between the C_t value and the log of the DNA concentration in each replicate. The slope of the standard curves was not significantly different ($P > 0.05$) for pDNA template (-3.3 ± 0.139 ;

Table 3Signal presence^a and corresponding minimum DNA template amounts in the specificity and sensitivity tests with different PCR primer pairs, PCR versions, and template types^b

Samples or isolate code(s)	Conventional PCR primer pair			Nested ^c PCR primer pair		Real-time PCR primer pair				
	Ph260F–Ph256R or Ph154F–Ph157R	Ph155F–Ph157R	Ph269F–Ph157R	Ph155F–Ph157R	Ph269F–Ph229R or Ph269F–Ph157R	Ph261F–Ph264R	Ph263F–Ph264R	Ph234F–Ph258R	Ph234F–Ph229R	Ph234F–Ph259R
<i>Puccinia horiana</i> (Ph325)	10 pg 5 × 10 ³ copies ^d	10 pg 5 × 10 ³ copies ^e	10 pg 5 × 10 ³ copies	10 fg 5 × 10 ¹ copies	10 fg 5 × 10 ¹ copies	5 × 10 ¹ copies (Ct = 35)	5 × 10 ⁰ copies (Ct = 33) 5 fg (Ct = 34)	5 × 10 ¹ copies (Ct = 35)	5 × 10 ¹ copies (Ct = 36)	5 × 10 ¹ copies (Ct = 33)
<i>Puccinia horiana</i> ^f	g+ (±575, ±521 bp)	g+ (±483 bp)	g+ (±392 bp)	g+ (±483 bp)	g+ (±216, ±392 bp)	g+	g+	g+	g+	g+
Infected plant ^g	g+	g+	g+	g+	g+	g+	g+	g+	g+	g+
Healthy plant	g–	g–	g–	g–	g–	g–	g–	g–	g–	g–
<i>Puccinia allii</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Puccinia asparagi</i>	p–	p–	p–	p–	p+ weak band	p–	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Puccinia chrysanthemi</i>	p–	p+(±200bp)	p–	p–	p–	p–	p–	ND	p–	p–
<i>Puccinia cirsii</i>	p–	p–	p–	p+ weak band	p+ weak band	p–	p–/g–	ND	p+(Ct = 34)	p–
<i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Puccinia drabae</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p+ (Ct = 36)/g–	p+(Ct = 25)	p+(Ct = 21)	p+(Ct = 28)
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>triticii</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Puccinia helianthi</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p–/g–	ND	p–	p–
<i>Puccinia malvacearum</i>	g–	g–	g–	g–	g–	g–	g–	ND	g–	g–
<i>Puccinia miscanthi</i>	g–	g–	g–	ND	ND	g–	g–	ND	g–	g–
<i>Puccinia monoica</i>	ND ^h	ND	ND	ND	ND	g–	g–	ND	g–	g–
<i>Puccinia persistens</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p–/g–	p+(Ct = 37)	p–	p–
<i>Puccinia recondita</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p+(Ct = 36)	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Puccinia</i> sp.1	p–	p+(±200bp)	p+ weak band	p–	p–	p+(Ct = 33)	p–	ND	p–	p–
<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>triticii</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p+(Ct = 37)	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Puccinia tanacetii</i> EU014058	p–	p–	p+ weak band	p–	p+ weak band	p–	p–/g–	ND	p–	p–
<i>Puccinia tanacetii</i> EU014059	p–	p+(±200bp)	p–	p–	p–	p–	p–/g–	ND	p–	p–
<i>Puccinia thlaspeos</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p+ (Ct = 35)/g–	p–	p–	p–
<i>Puccinia trebouxii</i>	p–/g–	p–/g–	p–/g–	p–/g	p–/g	p–	p+(Ct = 35)/g–	p–	p+(Ct = 37)/g–	p–
<i>Puccinia triticina</i>	p–	p–	p–	p+ weak band	p–	p–	p–/g–	p+(Ct = 36)	p–	p–
<i>Kuehneola uredinis</i>	p–	p–	p+(±520bp) ⁱ	p–	p–	p–	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Melampsora laris-populina</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p–/g–	p–	p–	p–
<i>Phragmidium rosa</i>	g–	g–	g–	g–	g–	g–	g–	ND	g–	g–
<i>Pileolaria terebinthi</i>	p–	p–	p–	p–	p–	p–	p–/g–	ND	p–	p–
<i>Tranzschelia discolor</i>	p–	p–	p–	p+ weak band	p–	p–	p–/g–	ND	p–	p–
<i>Uromyces trifolii-repentis</i>	p–	p+(±435bp) ⁱ	p–	p–	p–	p–	p–/g–	p–	p–	p–
HA401–HA413	g–	g–	g–	g–	g–	g–	g–	ND	g–	g–

^a +/- = signal present versus absent.^b Specificity tests conducted at 1 ng genomic DNA (represented by “g”) and/or 5 × 10⁶ copies cloned plasmid DNA (represented by “p”).^c Nested PCR performed on product from first round PCR with primers Ph260F–Ph256R or Ph154F–Ph157R.^d For primer Ph260F–Ph256R the detection limit was 5 × 10⁴ copies.^e Plasmid DNA containing ITS sequence.^f Ph(301,304,308,313,316,319,01RE,02SG,03SP,01N,02N,03B,01P,01H,01U) and showing the predicted fragment sizes for conventional and nested PCR.^g 1 ng total DNA(plant+fungus).^h ND = not determined.ⁱ Starting at 5 × 10⁵ copies of plasmid DNA.

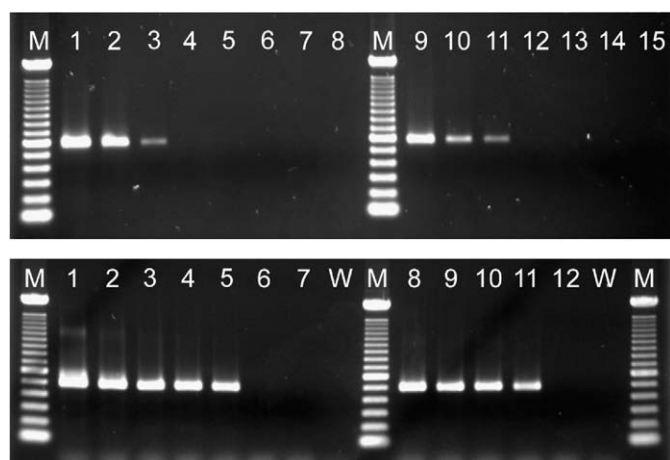


Fig. 1. Typical amplification products of conventional PCR with primer set Ph260F–Ph256R (top part) or nested PCR with the additional primer set Ph155F–Ph157R (bottom part). Lanes 1 through 8 in the top part result from PCR reactions with a 10-fold dilution series of genomic *P. horiana* DNA as template, starting with 1 ng per reaction. Lanes 9 through 15 consist of PCR product from reactions using a 10-fold dilution series of cloned plasmid DNA as template, starting with 5×10^6 copies per reaction. Similarly, lanes 1 through 7 in the bottom part were created using 100 pg through 100 ag genomic DNA template. Lanes 8 through 12 were created using 5×10^4 through 5×10^0 copies plasmid DNA. M = 100-bp DNA ladder (Invitrogen). W = Water (no template control). Results from nested PCR with primer set Ph269F–Ph229R were almost identical to the one shown in the bottom part.

average $\pm$ standard deviation) versus gDNA template (-3.6 ± 0.40), which implies that pDNA can be used reliably for the assembly of standard curves and thus the quantification of *P. horiana* in unknown DNA samples (Fig. 2). Based on the standard curves from both DNA

sources (Fig. 2), an estimated 1223 target copies are present per pg of *P. horiana* gDNA. When real-time PCR was conducted on *P. horiana* pDNA and gDNA that was diluted with a solution of *Chrysanthemum* gDNA versus with water, no significant difference was observed between the resulting standard curves ($P > 0.05$) or the correlation coefficients (all $R^2 > 0.99$), indicating no interactive effect of the plant DNA with the PCR reactions.

3.2. Optimization of DNA extraction and DNA extract amount for real-time PCR detection of *P. horiana* in infected plant material

Ten different DNA extraction methods were applied to 100 mg plant material infected with *P. horiana*. The amount of total DNA (plant + fungus), the amount of amplifiable *P. horiana* DNA (based on real-time PCR quantification) in DNA extract containing 1 ng total DNA, and the total amount of *P. horiana* DNA in 100 mg infected plant tissue are listed in Table 4. Methods that resulted in a large proportion and a reasonably large amount of *P. horiana* DNA were the UltraClean™ Plant DNA Isolation kit (MoBio), the Genelute plant genomic DNA kit (Sigma), the Invisorb® spin plant mini kit (Invitex), and the CTAB methods. These methods were withheld for further testing on the presence of PCR inhibitors, except for the phenol-containing CTAB method (CTAB II), which was not significantly better than the less toxic phenol-free version (CTAB I). During these further tests, the reduction in Ct value remained closest to the theoretical reduction when using DNA extracted with the Genelute plant genomic DNA kit (Sigma) (Table 5). However, to avoid PCR inhibition, template amount should probably not be raised above 10 ng, a level at which also the Invisorb® spin plant mini kit (Invitex) and the CTAB method still performed well. The method that extracted the highest proportion of *P. horiana* DNA when using 1 ng of total DNA template

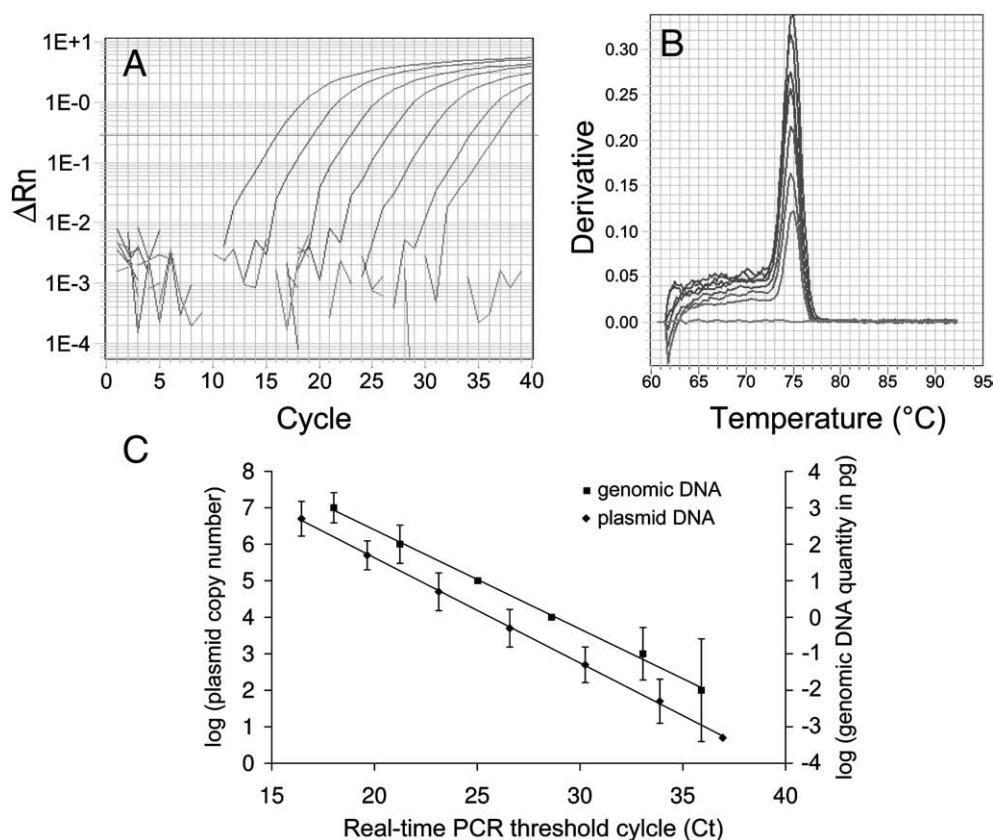


Fig. 2. Real-time PCR output using primers Ph263F–Ph264R. (A) Typical amplification plot using a 10-fold dilution series of cloned plasmid DNA as template (5×10^6 to 5×10^0 copies). (B) Typical melting curve from the PCR products shown in A. (C) Reverse standard plots showing the average of three reaction series with plasmid DNA (5×10^6 to 5×10^0) and genomic DNA (1 ng to 10 fg) as template. Error bars represent the standard deviation. For genomic DNA, the regression equation is $y = -0.2718 \times x + 7.8321$ ($R^2 = 0.9977$) with y being the DNA quantity and x the threshold cycle. For plasmid DNA, the regression equation is $y = -0.2883 \times x + 11.395$ ($R^2 = 0.9995$).

Table 4

Amount of total DNA, amount of amplifiable *P. horiana* DNA in extract containing 1 ng total DNA (based on quantitative real-time PCR), and total amount of *P. horiana* genomic DNA detected in 100 mg *P. horiana*-infected chrysanthemum leaves using 10 different DNA extraction methods

#	DNA extracting method	Total DNA in 100 mg plant tissue (ng)	<i>P. horiana</i> DNA in 1 ng total DNA (pg)	Total <i>P. horiana</i> DNA in 100 mg plant tissue (ng)
1.	Ultraclean plant DNA isolation kit	12,443±3698 c	99.6±20.0 a	1284±574 a
2.	Genelute plant genomic DNA kit	7915±1241 cde	73.8±23.5 ab	594±232 bc
3.	Invisorb spin plant mini kit	10,676±2114 cd	58.9±11.5 bc	622±152 bc
4.	CTAB-II	22,069±9199 ab	57.5±27.8 bcd	1267±823 a
5.	CTAB-I	26,229±12,472 a	40.2±14.0 cde	1010±461 ab
6.	Dynabeads plant mini kit	1280±1275 e	24.7±29.0 de	50±69 c
7.	E.Z.N.A. fungal DNA mini kit	13,831±2622 bc	15.2±6.2 e	221±117 c
8.	Dneasy plant mini kit	4209±495 de	13.6±22.3 e	53±86 c
9.	Easy-DNA kit	2775±499 de	0 (Ct>40)	0 (Ct>40)
10.	Puregene DNA purification kit	8808±3700 cde	0 (Ct>40)	0 (Ct>40)

Data represents average±standard deviation of three separate extraction events. DNA extraction methods are sorted based on the average amount of *P. horiana* DNA in 1 ng total DNA extract. Within each data column, methods labelled with the same letter are not statistically different according to Fisher's pairwise comparison ($P>0.05$). No real-time PCR signal (Ct>40) was obtained with any method when extracting DNA from healthy leaves.

(UltraClean™ Plant DNA Isolation kit) did not perform well when using 10 ng of template DNA.

3.3. Detection of infected plant material and *P. horiana* basidiospores

Using conventional and optimized real-time PCR protocols, *P. horiana* was detected in artificially infected chrysanthemum cuttings at various time points after inoculation. When using conventional PCR, the pathogen could be detected as early as 4 days post inoculation (dpi) (data not shown). When using real-time PCR, the amounts of *P. horiana* DNA in 100 mg leaf tissue were 0±0 ng, 1.3±1.2 ng, 1.1±0.6 ng, 4.6±3.6 ng, 29.5±17.3 ng, and 538.5±360.9 ng after 0, 0.375, 2, 4, 8 and 14 dpi respectively. Visual symptoms appeared at 8 to 10 dpi and showed a homogenous infection of the leaves.

When using infected plant material in a dilution series with healthy plant material, the pathogen could be detected with conventional PCR, when at least 0.1% of the plant material was infected. With nested PCR and with real-time PCR, the detection limit was the highest dilution tested (0.001% infected plant material).

Real time PCR detection using a dilution series of pure *P. horiana* basidiospores as template resulted in Ct values (and amount of *P. horiana* DNA) of 23.6 (23.8 pg), 26.9 (4 pg), and 33.5 (0.1 pg) for 800, 80 and 8 basidiospores, respectively.

4. Discussion

This paper describes the successful identification of conventional, nested, and real-time PCR primers for the DNA-mediated detection of *P. horiana*, a pathogen of quarantine importance on *Chrysanthemum x morifolium*. Candidate primers were designed based on sufficiently conserved parts of the rDNA ITS regions, as determined in a previous study (Alaei et al., 2009). After a very stringent selection process for specificity and sensitivity, which the majority of the candidate primers did not pass, we recommend primer pair Ph260F–Ph256R for conventional PCR and for the first round of nested PCR. For the second round of nested PCR, we propose primer pair Ph155F–Ph157R. For real-time PCR, we advise primer pair Ph263F–Ph264R and if desired, TaqMan probe Ph706. In case of PCR-mediated detection of

P. horiana in a shipment under quarantine regulation, confirmation via a second set of primers is sometimes requested. Such options are presented here. For example, real-time PCR primers Ph234F–Ph259R also meet the criteria and amplify a part of the ITS2 instead of the ITS1 region.

The main focus of this paper is on real-time PCR, as this method has the advantages of a wider dynamic range, the quantitative determination of the template DNA amount, detection after a single PCR-run, and the absence of gel-based detection. However, because real-time PCR equipment is not yet as widespread as that of traditional PCR equipment, we also chose to develop PCR primers for conventional and nested PCR. Various types of detection chemistries can be used for monitoring real-time PCR products. The double stranded DNA-binding dye SYBR Green I was selected in this study. It is a simple, reliable, and relatively low-cost method based on the monitoring of the fluorescence intensity after each PCR cycle. This dye does not discriminate between the different dsDNA molecules in a PCR reaction but different PCR amplification products can be accurately distinguished by including the melting curve temperature analysis (T_m) of the final amplicons (Ririe et al., 1997; Schena et al., 2004). Using primers Ph263F–Ph264R and this T_m analysis, we did not observe peaks that would suggest the production of non-target amplicons, even at low target concentration. Other detection chemistries, such as those with TaqMan technology, can deliver additional specificity. A TaqMan probe was developed and tested, but its use is not considered essential due to the specificity of the primers. However, this probe may become valuable in settings where multiplexing is desirable. Depending on the conditions listed above, other studies have used real-time PCR detection of plant pathogens through SYBR Green I (Boyle et al., 2005; Fraaije et al., 2001; Lievens et al., 2006; Barnes and Szabo, 2007; Frederick et al., 2002) versus TaqMan technology (Barnes and Szabo, 2007; Frederick et al., 2002). In some cases, both are conducted (Bilodeau et al., 2007).

We chose to impose very stringent specificity criteria during the evaluation of the primers, including tests with the rust species that have the highest sequence similarity to *P. horiana*, even if they are not pathogens of *Chrysanthemum x morifolium*. Our first motivation was that in cases of quarantine organisms, errors due to cross-reaction with non-target organisms cannot be tolerated, even if the chance of finding such target organisms in the sample is limited. Secondly, one of the future applications of these primers is in epidemiological studies, during which air and water samples will be processed for the presence of *P. horiana* basidiospores. Many non-target organisms may be present in such samples, such as the urediniospores of cereal rusts, creating the requirement for a highly specific detection method. The only cross-reactions observed with the best primers occurred when at least 5×10^6 copies of the most similar non-target DNA were present per PCR reaction. Based on our quantitative assays with *P. horiana*, this is a level that is not reached in the 10 ng total DNA (template amount

Table 5

Optimization of DNA template concentration for real-time PCR using primers Ph263F–Ph264R: theoretical and experimental Ct values (average±standard deviation; $n=3$) at different template concentrations for DNA extracted with different extracting methods

Template amount (ng)	Theoretical Ct value ^a	DNA extracting method ^b (experimental Ct value)			
		1	2	3	5
1	18.9	18.2±0.1	19.5±0.4	18.6±0.2	19.1±0.3
10	15.6	20.8±1.9	15.4±0.4	15.6±0.3	15.9±0.6
50	13.3	Ct>40	15.5±0.4	17.0±0.1	35.5±16.5
100	12.3	Ct>40	22.3±13.7	26.2±11.2	25.2±17.4

No real-time PCR signal (Ct>40) was obtained with any method when extracting DNA from healthy leaves.

^a The average experimental Ct value of the four methods was chosen as the theoretical Ct value for 1 ng. The theoretical Ct values for the other levels were calculated based on a decrease of 3.3 Ct values per log level.

^b See Table 4 for method name corresponding to method number.

for a single PCR reaction) from even fully symptomatic plant material. It also represents more spores (an estimated 2.3×10^5 in case of *P. horiana*) than will be present in the DNA extracted from environmental samples. Most of the cross-reactions were observed with *P. drabae* and *P. trebouxii*. Although these rusts have a large amount of sequence similarity to *P. horiana*, they do not occur in the same niche. *P. drabae* occurs on long stalked draba (Kropp et al., 1997). *P. trebouxii* is a rarely reported rust on melic grass (*Melica jacquemontii*) only. In contrast, *Puccinia chrysanthemi* and *Puccinia* sp. 1 are two rusts which do infect *Chrysanthemum x morifolium* (Alaei et al., 2009; Gibson, 1904; Punithalingam, 1968a). Few cross-reactions were observed with these species. This was not unexpected, as phylogenetically they do not cluster together with *P. horiana* in the Pucciniaceae (Alaei et al., 2009). Similarly, little to no cross reactions were observed with other rusts from Asteraceae, such as *Puccinia tanacetii* from *Tanacetum vulgare*, nor with any of the other fungi or bacteria tested.

The selected primers also passed stringent sensitivity tests. The sensitivity of conventional PCR was more than sufficient to confirm the pathogen's identity in symptomatic tissue. However, to detect early infection stages at low disease incidence, nested PCR or real-time PCR is required. We obtained a detection limit of approximately 10 fg per PCR reaction, which is at least as good as reported for other rust fungi (Barnes and Szabo, 2007; Frederick et al., 2002). The size of the leaf samples (100 mg) is standard in comparable studies, but may prove insufficient in practical settings. However, samples consisting of several cuttings can easily be macerated simultaneously with a Homex 6 plant tissue homogenizer (Bioreba). Given the detection limit of 0.001%, it should be no problem to detect the pathogen in a subsample of this macerate.

Real-time PCR using separate reactions with cloned target DNA and genomic DNA in the same run allows determination of the number of target copies per mass unit of genomic DNA. Based on this number, and an estimated genome size based on 67 Mbases in *P. graminis* (Backlund and Szabo, 1993), approximately 80 target copies are expected per haploid genome of *P. horiana*. Considering we can detect less than 10 target copies using real-time PCR, theoretically it is possible to detect individual basidiospores of *P. horiana*. Preliminary detection tests using small numbers of basidiospores as template confirmed this. Similar levels of sensitivity are reported for other rusts such as *P. graminis* (Barnes and Szabo, 2007) and *Phakopsora pachyrhizi* (Steinlage et al., 2006).

One limiting factor in PCR-based detection assays is the presence of PCR-inhibitors in the DNA extract (Malvick and Grunden, 2005; Wilson, 1997). Reducing the effect of inhibitors is often done by using a 10-fold diluted DNA extract as template (Atkins and Clark, 2004; Baric and la-Via, 2004; Bustin, 2000). However, diluting the DNA extract limits the sensitivity of the assay. For that purpose, we determined which DNA extraction methods gave a high yield of *P. horiana* DNA from infected plant tissue without co-extracting large amounts of PCR-inhibiting compounds. Ultimately, a CTAB method and two commercially available methods allowed the use of at least 10 ng total DNA extract from chrysanthemum leaves without any inhibitory effects on the real-time PCR reaction. Although several commercial kits did not perform well in this system, their performance may be adequate in other systems. The importance of assessing the purity of the DNA extract and determining the optimum template concentration was confirmed by Cankar et al. (2006) and Kubista et al. (2006). Using 10 ng DNA extract, it was possible to detect *P. horiana* in plant tissue if 0.001% of the sample consisted of fully infected plant material. This proportion corresponds to the theoretical amount, calculated based on the amount of pathogen DNA present in 100% infected plant material (>500 pg in extract containing 10 ng total DNA) and the detection limit of pure pathogen DNA (5 fg range).

Although the focus of this paper was on the development of the detection method, we demonstrated that it can be used to quantitatively monitor the pathogen inside the plant during its entire life cycle.

A 490-fold increase of *P. horiana* DNA was observed between 2 and 14 dpi. The most significant part of this increase took place near the end of the colonization, when visual symptoms appeared. This would suggest that the activity of the pathogen is not pronounced during the early stages of the infection process. With the sensitive real-time PCR detection technique it is possible to detect and quantify the pathogen during these early stages, allowing the measurement of its growth (or lack thereof) as a function of environmental or host factors such as temperature, cultivar, and fungicide application. The technique therefore has more applications than just the diagnosis of samples from quarantine inspections. As mentioned above, monitoring of basidiospore inoculum in water and air samples should also be possible and may find applications in disease warning systems and in studies on the epidemiology of the pathogen. This may ultimately lead to fewer but more targeted fungicide treatments, which is not only cost-saving and perceived as less taxing to the environment, but also reduces the risk of development of fungicide resistance.

Acknowledgements

We express our appreciation for the scholarship of the first author from the Ministry of Science, Research and Technology, Iran. Partial funding was provided via FAVV, Nationaal Referentielaboratorium-Plantenziekten. We thank L. Szabo, S. M. Okhovat, B. Kropp, G. Newcombe, M. Abbasi, H. B. Gjaerum, A. Wojdyla, M. Daughtrey, M. Palm, M. A. Samia, L. Leus, B. Cottyn, S. McDonough, W. Janssen, B. Asselbergh, and S. Inghelbrecht for providing rust-affected, bacterial and fungal samples. We greatly appreciate the loan services of the Mycological Herbarium of the National Botanic Garden of Belgium, and in particular the help of Ms. Ann Bogaerts. We thank D. Ravier for his help in the maintenance of the *P. horiana* isolates.

References

- Anon, 1989. Distribution maps of plant diseases. *Puccinia horiana* Henning, No. 403 (edition 4) CAB International, Wallingford, UK.
- Anon, 2004. *Puccinia horiana*. Bull. OEPP/EPPO 34, 209–211.
- Alaei, H., Höfte, M., Maes, M., Heungens, K., 2007. Molecular detection of *Puccinia horiana* Henn. the causal agent of *Chrysanthemum* white rust. Proceedings of the 59th International Symposium on Crop Protection. Gent, May 22, 2007. Comm. Agric. Appl. Biol. Sci. 72, 739–743.
- Alaei, H., De Backer, M., Nuytinck, J., Maes, M., Höfte, M., Heungens, K., 2009. Phylogeny of rust pathogens of *Chrysanthemum x morifolium* based on rDNA ITS sequence analysis. Mycol. Res. Accepted after revisions.
- Atkins, S.D., Clark, I.M., 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. J. Appl. Genet. 45, 3–15.
- Backlund, J.E., Szabo, L.J., 1993. Physical characteristics of the genome of the phytopathogenic fungus *Puccinia graminis*. Curr. Genet. 24, 89–93.
- Baric, S., la-Via, J., 2004. A new approach to apply proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. J. Microbiol. Methods 57, 135–145.
- Barnes, C.W., Szabo, L.J., 2007. Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction. Phytopathology 97, 717–727.
- Bilodeau, G.J., Levesque, C.A., De Cock, A.W.A.M., Duchaine, C., Briere, S., Uribe, P., et al., 2007. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. Phytopathology 97, 632–642.
- Borneman, J., Hartin, R.J., 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4356–4360.
- Boyle, B., Hamelin, R.C., Seguin, A., 2005. *In vivo* monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1546–1552.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25, 169–193.
- Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., Gruden, K., 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. BMC Biotechnol. 6, 37.
- Cook, R.T.A., 2001. First report in England of changes in the susceptibility of *Puccinia horiana*, the cause of chrysanthemum white rust, to triazole and strobilurin fungicides. Plant Pathol. 50, 792.
- Firman, I.D., Martin, P.H., 1968. White rust of chrysanthemums. Ann. Appl. Biol. 62, 429–442.
- Flowers, J., Hartman, J., Vaillancourt, L., 2003. Detection of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in Austrian pine tissues using nested-polymerase chain reaction. Phytopathology 93, 1471–1477.
- Fraaije, B.A., Lovell, D.J., Coelho, J.M., Baldwin, S., Hollomon, D.W., 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora*

- nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. Eur. J. Plant Pathol. 107, 905–917.
- Frederick, R.D., Snyder, C.L., Peterson, G.L., Bonde, M.R., 2002. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. Phytopathology 92, 217–227.
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2, 113–118.
- Gibson, C.M., 1904. Notes on infection experiments with various Uredineae. New Phytol. 3, 184–191.
- Grasso, V., Sierotzki, H., Garibaldi, A., Gisi, U., 2006. Relatedness among agronomically important rusts based on mitochondrial cytochrome *b* gene and ribosomal ITS sequences. J. Phytopathol. 154, 110–118.
- Hennings, P., 1901. Einige neue japanische Uredineen [Some new Japanese rusts]. Hedwigia 40, 25–26.
- Henson, J.M., French, R., 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31, 81–109.
- Jackson, E.W., Avant, J.B., Overturf, K.E., Bonman, J.M., 2006. A quantitative assay of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* DNA in *Avena sativa*. Plant Dis. 90, 629–636.
- Kropp, B.R., Hansen, D.R., Wolf, P.G., Flint, K.M., Thomson, S.V., 1997. A study on the phylogeny of the dyer's woad rust fungus and other species of *Puccinia* from crucifers. Phytopathology 87, 565–571.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., et al., 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol. Aspects Med. 27, 95–125.
- Lee, S.B., Taylor, J.W., 1992. Phylogeny of five fungus-like protistans *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Mol. Biol. Evol. 9, 636–653.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A.C.R.C., Cammue, B.P.A., Thomma, B.P.H.J., 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. Plant Sci. 171, 155–165.
- Ma, Z., Luo, Y., Michailides, T.J., 2003. Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. J. Phytopathol. 151, 312–322.
- Malvick, D.K., Grunden, E., 2005. Isolation of fungal DNA from plant tissues and removal of DNA amplification inhibitors. Mol. Ecol. Notes 5, 958–960.
- Martin, R.R., James, D., Levesque, C.A., 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. Annu. Rev. Phytopathol. 38, 207–239.
- Punithalingam, E., 1968a. *Puccinia chrysanthemi*. CMI Descr. Pathog. Fungi Bact. 175, 1–2.
- Punithalingam, E., 1968b. *Puccinia horiana*. CMI Descr. Pathog. Fungi Bact. 176, 1–2.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 245, 154–160.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D., 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. Eur. J. Plant Pathol. 110, 893–908.
- Steinlage, T.A., M.R.M., S.A.I., J.M., Hartman, G.L., 2006. Detection of low numbers of *Phakopsora pachyrhizi* spores by quantitative real-time PCR. Proceedings of the National Soybean Rust Symposium, November 29–December 1, 2006. The American Phytopathological Society, St. Louis, Missouri.
- Sugimura, T., 2001. Nucleotide sequence of nuclear rDNA-ITS regions and design of genus specific primers for the regions of several plant pathogens of strawberry and chrysanthemum. Bull. Nara Prefectural Agric. Exp. Stn. 32, 9–17.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25, 4876–4882.
- Wang, X., Zheng, W., Buchenauer, H., Zhao, J., Han, Q., Huang, L., et al., 2007. The development of a PCR-based method for detecting *Puccinia striiformis* latent infections in wheat leaves. Eur. J. Plant Pathol. 120, 241–247.
- Whipps, J.M., 1993. A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn) disease on chrysanthemum and the potential for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas. Ann. Appl. Biol. 122, 173–187.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.A., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3741–3751.
- Zandvoort, R., 1968. Wind dispersal of *Puccinia horiana*. Eur. J. Plant Pathol. 74, 124–127.
- Zandvoort, R., Groenewegen, C., Zadoks, J., 1968. On the incubation period of *Puccinia horiana*. Eur. J. Plant Pathol. 74, 128–130.