

KNPV-werkgroep 'Phytophthora en Pythium'

Samenvattingen van de bijdragen, gehouden op de bijeenkomst van 18 september 1998

Phytophthora spp. in de hydrocultuur van witloof

N. Demeulenaere¹, R. Sarrazyn² en M. Höfte¹

¹ Lab. Fytopathologie, Universiteit Gent, Coupure Links 653, B-9000 Gent

² POVLT, Ieperseweg 87, B-8800 Rumbeke, België

In België wordt ongeveer 75% van de witloof geforceerd in hydrocultuur, terwijl in West-Vlaanderen zelfs 90% van de telers witloof forceren in een voedingsoplossing. Deze voedingsoplossing is een ideale omgeving voor Oomycota zoals *Phytophthora* en *Pythium* spp. Deze zogenaamde 'pseudoschimmels' kunnen zich via hun zoösporen actief verspreiden in het systeem en veroorzaken wortelrot of tasten de vezelwortels aan. Er wordt algemeen aanvaard dat vooral *Phytophthora cryptogea* de oorzaak is van wortelrot bij witloof, alhoewel in vroegere rapporten ook *Phytophthora erythroseptica* werd aangezien als een wortelrotverwekker bij witloof. Verbruining van de vezelwortels wordt voornamelijk veroorzaakt door *Pythium mastophorum*. In dit werk hebben we vooral de *Phytophthora* spp. die witloof aantasten nader willen onderzoeken. Via artificiële infecties met mycelium en zoösporen werd aangetoond dat veertig zoösporen/ml of 1 ng mycelium droge stof/ml afkomstig van *Phytophthora cryptogea* voldoende is om wortelrot te veroorzaken. Zes dagen na infectie kon de schimmel via uitplantingen worden aangetoond, terwijl visuele symptomen zichtbaar waren na ongeveer negen dagen. Bovendien bleek een tomatenisolaat van *Phytophthora erythroseptica* eveneens in staat wortelrot te veroorzaken bij witloof. Verschillende detectiemethodes voor *Phytophthora* werden geëvalueerd. *Phytophthora* kon worden aangetoond in zieke wortels door uitplanting op het selectieve CPARPH medium. Een bait methode met witloofwortelstukjes kon worden aangewend voor de detectie van *Phytophthora* in de grond. Voor de detectie van *Phytophthora* in water werd een *Phytophthora* E ELISA kit van Agri-Diagnostic Associates uitgetest, doch deze kit bleek weinig gevoelig voor *Phytophthora cryptogea* daar 1000 zoösporen/ml niet meer konden gedetecteerd worden. Een

nested PCR techniek ontwikkeld door Bonants et al. (1) op basis van ITS gebieden van het rRNA bleek echter zeer interessant. Hierbij worden in eerste PCR ronde de primers ITS4 en DC6 gebruikt, gevolgd door een tweede PCR ronde met de specifieke CryF2 en CryR2 primers. Via deze methode konden minder dan veertig zoösporen/ml afkomstig van *Phytophthora cryptogea* worden gedetecteerd in de voedingsoplossing. Ook kon de schimmel worden aangetoond in DNA geïsoleerd van zieke witloofwortels. Met behulp van de specifieke CryF2 en CryR2 primers kon echter geen onderscheid gemaakt worden tussen *P. cryptogea* en *P. erythroseptica*.

Ook werden reeds enkele initiële experimenten gedaan in verband met de bestrijding van *Phytophthora* in de witloofteelt. Eerder toevallig werd ontdekt dat witloofwortels die een veldbehandeling met Topsin M en Alto hadden ondergaan, niet meer konden geïnfecteerd worden door *Phytophthora cryptogea*. Deze waarneming dient zeker verder onderzocht te worden. *Pseudomonas aeruginosa* PNA1, afkomstig van chickpea wortels in India, vertoonde een sterk antagonisme tegen *Phytophthora cryptogea* in vitro. Deze stam produceert twee fenazine antibiotica, namelijk fenazine-1-carboxylzuur en oxychlororaphine, die wellicht een rol spelen in het antagonisme. Een fenazine en tryptofaan-auxotrofe mutant van *P. aeruginosa* PNA1, die anthranilaat overproduceert, was eveneens sterk antagonistisch ten opzichte van *P. cryptogea*. Daar ook zuiver anthranilaat een inhiberende werking op *Phytophthora cryptogea* had, is het antagonisme van deze mutant waarschijnlijk te verklaren door anthranilaat productie. Vroeger werd reeds aangetoond dat anthranilaat ook *Pythium* spp. kan onderdrukken (2). Verder onderzoek moet uitwijzen of *P. aeruginosa* PNA1 en/of anthranilaat *Phytophthora* kan onderdrukken in de hydrocultuur van witloof.

Referenties:

- (1) Bonants, P., Hagenaar-De Weerd, M., Van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D. & Duncan, J. (1997) Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology **103**: 345-355.
- (2) Anjaiah, V., Koedam, N., Nowak-Thompson, B., Loper, J.E., Höfte, M., Tambong, J.T. & Cornelis, P. (1998) Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. Molecular Plant-Microbe Interactions **11**: 847-854.

Moleculaire manipulatie van oömyceten

F. Govers

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit en onderzoekschool Experimentele Plantenwetenschappen, Binnenhaven 9, 6709 PD Wageningen.

Phytophthora en *Pythium* soorten behoren tot de klasse der oömyceten, afdeling oömycota, en staan evolutionair gezien ver verwijderd van de hogere schimmels uit de afdelingen ascomycota en de basidiomycota. Begin jaren negentig is een begin gemaakt met het ontwikkelen van methoden ten behoeve van moleculair-genetisch onderzoek aan oömyceten, in het bijzonder aan *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte.

Ons onderzoek richt zich op het ontrafelen van de interactie tussen plant en pathogeen op moleculair en cellulair niveau. Om te kunnen onderzoeken waarom *P. infestans* pathogeen is op aardappel en tomaat, en hoe *P. infestans* in sommige aardappelcultivars en in niet-waardplanten afweerreacties induceert, isoleren en karakteriseren wij genen uit *P. infestans* die direct of indirect verantwoordelijk zijn voor de synthese van pathogeniteitsfactoren en elicatoren. Met behulp van gerichte mutagenese kan onderzocht worden in hoeverre deze genen cruciaal zijn voor pathogenese of voor het induceren van afweerreacties.

Dat gerichte mutagenese mogelijk is in *P. infestans* is aangetoond met het *inf1* gen. *Inf1* codeert voor een 10 kDa extracellulair eiwit, het elicotine INF1. Elicitines zijn elicitors die in soorten uit het geslacht *Nicotiana* een overgevoeligheidsreactie induceren. Er wordt verondersteld dat elicitines de waardplantenreeks van *Phytophthora* beperken. Om te onderzoeken of INF1 fungeert als een avirulentiefactor die in *Nicotiana* resistentie induceert tegen *P. infestans*, hebben wij gerichte mutagenese uitgevoerd door *P. infestans* te transformeren met *inf1* constructen in 'sense' en anti-sense' oriëntatie. Op die manier werden verschillende INF1 deficiënte stammen verkregen. Deze stammen zijn nog steeds pathogeen op aardappel maar kunnen, in tegenstelling tot wildtype *P. infestans* stammen, ook sporulerende lesies vormen op *Nicotiana benthamiana*. Hiermee is het bewijs geleverd dat herkenning van het elicitoreiwit INF1 een cruciale rol speelt in de resistentie van *N. benthamiana* tegen *P. infestans* (Kamoun *et al.* 1998 Plant Cell **10**, 1413-1425).

Bij onderzoek naar het *in planta* geïnduceerde gen *ipiO*, werd de activiteit van de *ipiO*-promoter onderzocht door *P. infestans* te transformeren met een construct waarin de *ipiO*-promoter gefuseerd is aan het GUS reporter gen. Hieruit bleek dat *ipiO* tijdens infectie specifiek tot expressie komt in de tip van hyfen die

de plantencellen binnendringen hetgeen wijst op een rol voor IPI-O in de pathogenese (van West *et al.* 1998 Fungal Genetics and Biology **23**, 126-138). Tot dusver is GUS het enige reporter gen waarvan aangetoond is dat het werkzaam is in oömyceten.

Om fysio-specifieke elicatoren van *P. infestans* te karakteriseren willen we de betreffende genen, *avr* genen, isoleren met behulp van positionele clonering. Op basis van AFLP merkers werd een moleculair-genetische koppelingskaart van *P. infestans* geconstrueerd (van der Lee *et al.* 1998 Fungal Genetics and Biology **21**, 278-291). Momenteel wordt gericht zocht naar AFLP merkers die sterk gekoppeld zijn aan *avr* genen en deze zullen gebruikt worden om *avr* genen te isoleren.

Detection of *Phytophthora* species with the *Rhododendron* leaf test

K. Themann¹ and S. Werres²

¹ Institut für Mikrobiologie der Universität Braunschweig, Konstantin-Uhde-Str. 5, D - 38106 Braunschweig

² Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Messeweg 11/12, D - 38104 Braunschweig

Fungus-like microorganisms of the genus *Phytophthora* are important soil-borne pathogens in horticulture and on trees and shrubs. *Phytophthora* species can cause for example root rot, collar rot, twig blight and fruit rot. Disease development can be slow especially in woody plants and very often symptoms develop long after infection has taken place. Up to now diagnosis for infection with *Phytophthora* species has mainly been done by visual assessment of disease symptoms and by microbiological examination. Both methods are not very successful for detecting latent infections especially in voluminous and woody root systems. To lower the risk that *Phytophthora* species are spread by latently infected plants, easy to handle methods for routine screening of plant material, of soil before planting and for the examination of recycling water in nurseries and hydroponic systems are necessary.

Diagnostic techniques which are very easy to handle are bait tests. In experiments *Rhododendron* leaves of the cultivar *R. catawbiense* 'Cunningham's White' have been proved to be a very attractive bait for *Phytophthora* species. For baiting 200 ml of root pieces of about 2 cm in length or 200 ml soil or 400 ml water were filled into a plastic container (size: 11.5 x 18.5 x 5 cm). To the root and the soil samples 400 ml deionised water was added. Then 5 freshly picked *Rhododendron* leaves we-

re placed on the water surface of each plastic container. Incubated at room temperature (about 20°C) in the in-vitro experiments these leaves trapped a wide range of *Phytophthora* species even those which are not known to attack *Rhododendron* under natural conditions. Within 2 to 8 days most of the *Phytophthora* species under investigation caused characteristic spots on the *Rhododendron* leaves from which *Phytophthora* structures grew when placed on carrot agar. But there was no successful baiting of *P. fragariae* var. *fragariae* (Red Core on strawberry) and var. *rubi* (root rot on Red Raspberry) and there was only a very low trapping rate with the *P. erythroseptica* isolate under investigation. Incubation of the samples at 15°/10°C favours the trapping of *Phytophthora* species which prefer low temperatures for development, like *P. syringae*.

Pythium species, which are taxonomically very closely related to the genus *Phytophthora*, and which are present in nearly every root sample, soil and water sample, could invade the tissue of the *Rhododendron* leaves too. However using *Rhododendron* leaves with a well developed cuticula most of the *Pythium* species under investigation needed much more time than the *Phytophthora* species to infect the healthy leaf tissue. Furthermore *Pythium* species usually cause leaf symptoms which look different from those caused by *Phytophthora* species. And *Pythium* species preferred to enter those leaf parts which were under water during the incubation period: the leaf tip and the base. That means, isolation of *Pythium* spp. from the tissue samples can be very easily prevented by starting with the isolation procedure as soon as the characteristic leaf spots appear and by taking no tissue from the leaf tip and base.

Furthermore the *Rhododendron* leaves with a well developed cuticula facilitate the minimizing of bacterial contamination during the isolation procedure without using selective media. This is a great advantage because some *Phytophthora* species are suppressed by supplements like antibiotica. Bacteria are unable to enter the healthy tissue of the *Rhododendron* leaves. Also the bacterial flora on the leaf surface can be killed or reduced to a minimum by careful washing of the leaves with a brush under running tap water, followed by surface disinfection and by perfect drying of the leaf surface before tissue pieces are cut out to place on an agar medium.

During the last years the *Rhododendron* leaf test has been applied to a wide range of root, soil and water samples from nurseries, public green spaces and from forest areas. Different *Phytophthora* species, known and unknown ones, have been detected with this bait test. So the *Rhododendron* leaf test has been proven to be a sensitive and very easy to handle diagnostic tool for the routine screening of the *Phytophthora* species.

Literature

- Werres, S., Hahn, R. and K. Themann, 1997. Application of different techniques to detect *Phytophthora* spp. in roots of commercially produced *Chamaecyparis lawsoniana*. Journal of Plant Diseases and Protection 104(5), 474-482.
- Themann, K. and Werres, S., 1998. Verwendung von *Rhododendron*blättern zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Wurzel- und Bodenproben (Use of *Rhododendron* leaves to detect *Phytophthora* species in root and soil samples). Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 50(2), 37-45.

Verwijdering van *Phytophthora cinnamomi* uit recirculatiewater met langzame zandfiltratie

E. van Os

IMAG-DLO, Postbus 43, 6700 AA Wageningen

De Nederlandse glastuinbouw is de afgelopen vijftien jaar vrij massaal overgeschakeld op grondloze teeltsystemen. Wetgeving verplichtte de tuinders om gesloten teeltsystemen toe te passen, waarbij water en nutriënten worden hergebruikt. Hergebruik houdt het risico in van verspreiding van ziekten over het gehele bedrijf. Dit was de belangrijkste reden voor onderzoek naar mogelijkheden om pathogenen uit het recirculatiewater te verwijderen. De huidige ontsmettingssystemen (verhitting, ozon, UV) zijn high-tech en duur en daarom alleen op grotere bedrijven toepasbaar. In vergelijking hiermee is langzame zandfiltratie een niet-chemische, goedkope en robuuste methode die dus ook op kleinere bedrijven goed toepasbaar is.

Het onderzoek naar langzame zandfiltratie is uitgevoerd op het IMAG-DLO, in samenwerking met de Proefstations in Naaldwijk en Boskoop en het LU departement AMST. Het onderzoek richtte zich op de randvoorwaarden (korrelgrootteverdeling van het zand, filtratiesnelheid) waaronder het principe op glastuinbouwbedrijven kan werken en het werkingsmechanisme om pathogenen te verwijderen (fysisch, biologisch, mechanisch). Hiervoor was een kas ingericht met 12 onafhankelijke gesloten teeltsystemen met elk een eigen langzaam zandfilter. Aan het influent werden pathogenen toegevoegd in een bekende concentratie, terwijl het effluent gedurende korte of langere tijd werd bemonsterd op de uitstromende pathogenen.

Uit de proeven bleek dat *Phytophthora cinnamomi* voor 100% te verwijderen was bij een lage stroomsnelheid (0,1 m.h-1) en een fijne of een middel korrelgrootte verdeling (zandfractie 0,15-0,35 mm en 0,2-0,8 mm). Tevens bleek dat *P. cinnamomi* in zand met een lage biologische lading net zo goed te verwijderen was als in zand met een hoge biologische lading. Dit duidt op een belangrijk aandeel van een fysisch verwijderingsmechanisme en een kleiner aandeel van een biologisch mechanisme.

Phytophthora multivesiculata

R. Pieters¹ en P.J.M. Bonants²

¹ Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102,
6700 HC Wageningen

² IPO-DLO, Postbus 9060,
6700 GW Wageningen

In 1991 ontving de Plantenziektenkundige Dienst voor het eerst zieke *Cymbidium* planten van verschillende telers. De bladeren vertoonden een karakteristiek dwarsgestreept bandenpatroon. Er werd een *Phytophthora* soort uit geïsoleerd waarvan de morfologie niet overeen kwam met reeds eerder beschreven soorten. Van *P. cactorum*, *P. nicotianae*, *P. palmivora* en *P. erythroseptica* var. *erythroseptica* is bekend dat zij ook orchideeën kunnen aantasten. De nieuwe *Phytophthora* vertoonde echter slechts enige gelijkenis met *P. porri* en *P. megasperma*.

De onbekende *Phytophthora* heeft semi-papillate tot non-papillate sporangia en overwegend amphigyne antheridia, op grond van deze eigenschappen behoort deze soort in group IV van Waterhouse. Hij onderscheidt zich van de andere soorten in deze klasse door een maximum groeitemperatuur van 35°C, grote aantallen catenulate hyfezwellingen en interne proliferatie van sporangia. Met behulp van isozym analyse kon worden aangetoond dat het hier een uniek electrophoretisch type betrof, duidelijk te onderscheiden van *P. porri* en *P. megasperma*.

De ITS (internal transcribed spacer) regions van het ribosomale DNA varieëren tussen soorten. De sequentie van deze gebieden werd van de onbekende *Phytophthora* bepaald en vergeleken met die van meer dan 40 *Phytophthora* soorten. De ITS sequenties waren uniek. Een betrekkelijk nieuwe DNA fingerprinting techniek, AFLP (amplified fragment length polymorphism), werd gebruikt om DNA fingerprints te genereren van deze nieuwe soort. Na vergelijking met DNA fingerprints van meer dan 40 *Phytophthora* soorten bleek dat ook deze een uniek patroon te zien gaven.

Op grond van morfologische, biochemische en moleculair biologische kenmerken werd geconcludeerd dat de *Phytophthora* uit *Cymbidium* een nieuwe nog niet beschreven soort is. De hyfezwellingen die in karakteristieke ketens gevormd worden, hebben geïnspireerd tot de naam *Phytophthora multivesiculata*. De beschrijving van deze nieuwe soort is inmiddels verschenen in European Journal of Plant Pathology **104** (7): 677-684.

Een nieuwe Phytophthora soort gevonden?

W. Man in 't Veld

Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102,
6700 HC Wageningen

In 1993 werd de Plantenziektenkundige Dienst geconfronteerd met *Rhododendron*struiken, waarvan de bloemen en bovenste bladeren verwelkt waren. Hieruit werd een *Phytophthora* geïsoleerd die niet éénduidig op naam te brengen was. Dit jaar, een typisch 'Phytophthora-jaar', kwamen een zevental inzendingen binnen van *Rhododendron*-planten met dezelfde symptomen. De aangetaste planten zijn meestal tientallen jaren oud en afkomstig uit verschillende delen van het land.

In alle gevallen werd een *Phytophthora* soort geïsoleerd, die vergelijkbare eigenschappen had met het iso-laar uit 1993. Kenmerkend was de massale aanwezigheid van sporangiën direct na isolatie. Deze sporangiën zijn papillaat, afvallend en veelal in trosvormige structuren. In dit opzicht doet deze *Phytophthora* aan de bekende soort *Phytophthora palmivora* denken. *Phytophthora palmivora* is echter een tropische soort, die in ons klimaat niet zou overleven. Bovendien is de optimale groeitemperatuur van de *Phytophthora ex Rhododendron* ~18°C, terwijl die van *P. palmivora* ~28°C is.

Uit de literatuur is bekend dat *P. palmivora* isozymatisch heel consistent is op het Mdh-2 locus. De *Rhododendron* isolaten verschilden op dit locus van *P. palmivora*. Ook de ITS sequentie verschilde met die van *P. palmivora*. Conclusie: Het is waarschijnlijk dat we hier te maken hebben met een nieuwe *Phytophthora*-soort.

Moleculair taxonomisch onderzoek aan Pythium

A.W.A.M. de Cock¹, G.R. Klassen² en
C.A. Lévesque³

¹Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS),
Julianalaan 67, 2628 BC Delft

²Department of Microbiology, University of
Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

³Agriculture and Agri-Food Canada, Pacific Agri-
Food Research Centre, Summerland, B.C.,
Canada

De taxonomie bij schimmels van het geslacht *Pythium* is gebaseerd op morfologie. Omdat morfologische kenmerken bij dit geslacht grote variatie en overlappingsen vertonen is de taxonomische indeling en de identifica-

tie op soortsniveau vaak zeer problematisch. Om hierin verbetering te brengen werden vertegenwoordigers van alle beschikbare soorten (ruim 100) onderzocht met een aantal verschillende moleculaire methoden. Om de intraspecifieke variatie vast te stellen werden, indien beschikbaar, meerdere isolaten per soort onderzocht (totaal ruim 400).

Restrictie patronen van PCR geamplificeerde inter-genic spacers (IGS) van het ribosomale DNA bleken bij de meeste soorten te corresponderen met de indeling op grond van morfologie. Echter, binnen een vijftiental soorten werden 2 of meer sterk verschillende RFLP groepen gevonden; deze soorten zullen gesplitst moeten worden in 2 (of meer) soorten. Een even groot aantal bleek echter synoniem met andere beschreven soorten (identieke RFLP-patronen). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) patronen van de stammen bevestigden deze resultaten. Deze technieken maken het mogelijk om populaties en soorten af te bakenen. Bepalen van verwantschappen is niet mogelijk omdat

RFLP en RAPD patronen tussen soorten sterk verschillen; ook als ze nauw verwant zijn is de overeenkomst beperkt.

Verwantschap van soorten werd bepaald door sequencing van de internal transcribed spacer (ITS) van het ribosomale DNA. Groeperingen in een phylogenetische boom, gebaseerd op deze sequenties, bleken te corresponderen met sporangiumtypes; correlatie van kenmerken van de geslachtelijk structuren met groeperingen in de boom was meestal minder duidelijk. Door vergelijking van sequenties werden voor een groot aantal soorten unieke oligo-nucleotidensequenties geselecteerd. De soortspecificiteit daarvan werd bepaald met behulp van 'reverse dot blot' hybridisatie. Het uiteindelijke doel is deze oligonucleotiden in een DNA chip toe te gaan passen voor snelle en betrouwbare identificatie van *Pythium*, ook bij monsters waarin meerdere soorten tegelijk aanwezig zijn, zoals grondmonsters.

Samenvattingen van de bijdragen, gehouden op de bijeenkomst van 17 september 1999

Involvement of Phytophthora species in Central en Western European oak decline and the influence of site factors and nitrogen input on the disease

*T. Jung, H. Blaschke and W. Oßwald
Institute of Forest Botany, Forest
Phytopathology, Am Hochanger 13,
D-85354 Freising, Germany*

From 1994 to 1999 a survey was made in c. 100 oak stands in Central and Western Europe on the occurrence of *Phytophthora* species in the rhizosphere. The most widespread species were *Phytophthora quercina* sp. nov., *P. citricola* and *P. cambivora*. Eight other *Phytophthora* species were isolated infrequently. Soil infestation tests proved *P. quercina* and *P. cambivora* being the most aggressive species to fine roots of *Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. ilex*. The results of an intense study concerning the health condition of the crowns and fine root systems of 217 oaks in 35 stands on a range of different sites in Bavaria indicate that there are at least two different complex diseases being referred to under the name 'oak decline'. In stands with a soil pH (CaCl₂) > 3.5 *Phytophthora* spp. were commonly isolated from rhizosphere soil and a highly significant correlation existed between the health condition of the

crown and different root parameters, whereas no such correlation was found on acid soils (pH < 3.5) without *Phytophthora*. Considering their high aggressivity to oak *Phytophthora* species are most likely to be heavily involved in oak decline on neutral to moderately acid sites. Anthropogenic nitrogen input as well as climatic changes are discussed as triggering factors.

Hybridisatie tussen *Phytophthora* soorten in de natuur

*W. Man in 't Veld¹, P. Bonants², A. de Cock³,
M. Hagenaar - de Weerd² en
R. Baayen¹*

¹ *Plantenziektenkundige Dienst (PD)
Wageningen*

² *Instituut voor Plantenziektenkundig
Onderzoek (IPO) Wageningen*

³ *Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS)
Delft*

In de loop van een vijftal jaren werden uit vijf waardplanten elf morfologisch vergelijkbare *Phytophthora* stammen geïsoleerd die niet eenduidig op naam gebracht konden worden. Deze stammen waren papillaat, homothallisch, ze hadden overwegend amphigyne

antheridia en een maximum groeitemperatuur van 36.5°C. Isozym analyse toonde aan dat deze stammen het resultaat waren van kruisingen, waarbij hoogstwaarschijnlijk *P. nicotianae* en *P. cactorum* betrokken waren. Met behulp van Southern blot analyse van Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprint patronen kon worden aangetoond dat species-specifieke banden van zowel *P. nicotianae* als *P. cactorum* inderdaad aanwezig waren in deze stammen. Er werd geconcludeerd dat deze stammen het resultaat waren van hybridevorming tussen *P. nicotianae* en *P. cactorum*.

Uit restrictie enzym analyse van mitochondriaal DNA (mtDNA) uit drie hybride stammen bleek dat deze eenduidig *P. nicotianae* mtDNA bevatten. Dit bevestigde het ouderschap van *P. nicotianae*. RFLP analyse van de ITS gebieden (internal transcribed spacer) van het ribosomaal DNA (rDNA) toonde aan dat de ITS sequenties van beide ouders aanwezig waren in de hybriden. Een ontwikkelde multiplex PCR met primers voor beide soorten bevestigde dit beeld. Computeranalyse van Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) DNA fingerprintpatronen van de hybriden en beide ouders liet zien dat de elf hybride stammen clusterden precies tussen *P. nicotianae* en *P. cactorum* in. AFLP analyse liet bovendien zien dat hoogstwaarschijnlijk meerdere hybridisatie gebeurtenissen hadden plaatsgevonden.

Het Masterplan Phytophthora: een breed offensief tegen de aardappelziekte

H.T.A.M. Schepers (in samenwerking met taskforce Masterplan)
PAV, Postbus 430, 8200 AK Lelystad

De problemen met *Phytophthora infestans* in aardappelen zijn de laatste jaren behoorlijk toegenomen. De schimmel is agressiever dan voorheen, en kan zich sinds enkele jaren ook geslachtelijk voortplanten. De combinatie van deze factoren maakt de schimmel veel moeilijker te bestrijden. Zeker als de weersomstandigheden voor *Phytophthora* gunstig zijn.

Op zich is *Phytophthora* met fungiciden in de hand te houden. Het probleem is echter dat het vrij veel bespuitingen vraagt en milieubelasting veroorzaakt. De oplossing om *Phytophthora* met minder milieubelasting beheersbaar te houden, is een brede en preventieve aanpak. Immers, als alle mogelijke bronnen van de schimmelziekte aangepakt worden en alle beschikbare kennis ingezet wordt, zal de schimmel zich niet zo vroeg openbaren en zich minder snel verspreiden.

Op initiatief van LTO-Nederland hebben aardappelonderzoekers, voorlichters, overheid, milieuorganisaties,

industrie en het landbouwbedrijfsleven gezamenlijk een plan van aanpak opgesteld hoe de ziekte vooral ook op bedrijfsniveau te beheersen. Dat moet leiden tot een vermindering van de milieubelasting met 35% in 2001 en met 50% in 2005 ten opzichte van de periode 1996 t/m 1998. Het Masterplan *Phytophthora* stelt ook nadrukkelijk als doel dat de continuïteit van de aardappelteelt niet in gevaar mag komen.

Het Masterplan startte voorjaar 1999 en gaat drie jaar lopen. De aardappeltelers dragen voor het uitvoeren van het plan tien gulden per hectare per jaar bij. Een aantal activiteiten die dit seizoen zijn uitgevoerd: het verbeteren van waarschuwingssystemen, het organiseren van een Open Meteo Netwerk, invloed nagaan van aardappels onder plastic als ziektebron en het opzetten van een meldsysteem voor afvalhopen. Daarnaast zijn diverse voorlichtings- en bewustwordingsactiviteiten georganiseerd en zijn ook onderzoeksactiviteiten opgestart die resultaten op lange termijn moeten gaan opleveren.

'MIOPRODIS'

J. Postma
IPO, Postbus 9060, 6700 GW Wageningen

MIOPRODIS is het acroniem van het EU-FAIR project 'Prevention of root diseases in closed soilless growing systems by microbial optimisation, a replacement for methyl bromide' dat in maart 1999 van start ging. Het doel van dit project is om een duurzaam teeltsysteem te ontwikkelen om wortelziekten te voorkomen door de aanwezige microflora te optimaliseren. Meer algemene informatie over het project is te vinden in de samenvatting van Erik van Os (elders in dit nummer) of op internet (www.imag.dlo.nl). De taak van het IPO is enerzijds het ontwikkelen van een methode om lage concentraties zoosporen van *Pythium aphanidermatum* in de voedingsoplossing te detecteren (zie Peter Bonants, elders in dit nummer). Anderzijds wordt de algemene microflora geanalyseerd m.b.v. verschillende technieken, met als doel inzicht te verkrijgen in de populatiedynamiek en de mogelijkheden om een microbiologisch bufferend systeem te ontwikkelen. Verschillende groepen micro-organismen (aërobe bacteriën, fluorescerende pseudomonaden, actinomyceten, schimmels) worden gekwantificeerd met plaattellingen op semi-selectieve media. De moleculaire fingerprint techniek PCR-DGGE (polymerase chain reaction - denaturing gradient gel electrophoresis) wordt toegepast om de samenstelling en diversiteit van de bacteriepopulatie te bepalen. Met beide technieken zijn verschuivingen in de microflora aangetoond: tijdens de gewasgroei en a.g.v. langzame zandfiltratie. In toekomstige experimenten zal onderzocht worden of bepaalde behandelingen verschillen in ziekteontwikkeling veroorzaken en of dit correleert met een veranderde samenstelling van de microflora.

De vorming van *Phytophthora infestans* x *P.mirabilis* hybriden

L.P.N.M. Kroon

IPO, Postbus 9060, 6700 GW Wageningen

Het effect van hybride soortsvorming op waardplant-specificiteit wordt onderzocht aan de hand van *Pinfestans* x *Pmirabilis* hybriden. Isolaten uit het centre of origin (Toluca Valley, Mexico) van beide heterothallische *Phytophthora* soorten zijn gekruist op rogge-agar platen. Gevormde oösporen zijn geïsoleerd en tot kieming gebracht. Kruisingsproducten zijn geanalyseerd met AFLP en getoetst op waardplant-specificiteit. Uit de verkregen AFLP fingerprints bleken alle geïsoleerde nakomelingen hybriden te zijn. Deze hybriden gaven een heftige hypersensitieve response bij inoculatie van bladeren van het vatbare aardappelras Bintje. Het *Pinfestans* ouder-isolaat gaf zware aantasting en het *Pmirabilis* ouder-isolaat gaf een milde hypersensitieve response op bladeren van Bintje. Bladeren van *Mirabilis jalapa*, de enige bekende waard van *Pmirabilis*, reageerden niet op inoculatie met zowel de hybriden als het *Pinfestans* ouder-isolaat. Het *Pmirabilis* ouder-isolaat gaf zware aantasting.

De hybriden zullen onderling gekruist worden, en dan zal bekeken worden hoe waardplant-specificiteit en AFLP-merkers uitsplitsen in de F2 populatie.

Real time detectie van *Pythium aphanidermatum* tijdens PCR met een 'molecular beacon'

P. Bonants en J. Postma

IPO, Postbus 9060, 6700 GW Wageningen

In het EU project MIOPRODIS (coördinator ir. E. van Os, IMAG Wageningen) wordt op het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO, Wageningen) gewerkt aan het ontwikkelen van een gevoelige detectiemethode voor de schimmel *Pythium aphanidermatum*.

Een nested PCR methode is ontwikkeld waarin erg gevoelig de schimmel kan worden aangetoond.

Een DNA verdunningsreeks van *P. aphanidermatum* toonde aan dat detectie mogelijk is tot 10 fg (enkele PCR en tot 1 fg (nested PCR). Ook een zoospore verdunningsreeks van de schimmel werd uitgetest. Detectie m.b.v. nested PCR is mogelijk tot 0.6 zoospore/ml. Verder werd een Molecular Beacon (MB) ontwikkeld om in een ABI PRISM 7700 spectrofluorometrische thermocycler real time de PCR amplificatie te volgen. Een MB is een fluorescentie probe welke aan de PCR mix wordt toegevoegd. Deze probe bindt tijdens de PCR reactie aan het amplicon. Gebonden MB fluoresceert terwijl ongebonden MB niet fluorescent is. Door nu tijdens de PCR reactie de fluorescentie te meten kan bepaald worden tijdens welke cyclus van de PCR de fluorescentie boven de achtergrond waarde uitstijgt, de zgn threshold value Tc. Deze waarde is een maat voor de hoeveelheid template aanwezig in het monster. Dit werd ook gedaan voor de DNA verdunningsreeks. Op deze manier kon een ijklijn worden gemaakt en is het mogelijk om de hoeveelheid template in het monster te quantificeren.