KNPV werkgroep *Phytophthora* & *Pythium*

Bijeenkomst van 23 september 2004 te Merelbeke (B)

Phytophthora ramorum: *waardplantgevoeligheid en beheersing*

Isabelle De Dobbelaere, Kurt Heungens en Martine Maes

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek (CLO-DGB), Merelbeke)

In Europa is één van de belangrijkste waardplanten van het species *Phytophthora ramorum Rhododendron ssp* (inclusief species en hybriden). Er werden 63 cultivars en species getest en vergeleken op ziektegevoeligheid. In beperkte mate werd er ook gekeken naar de gevoeligheid van azalea. In preliminaire testen werden een aantal infectiemethoden vergeleken. De inoculatietechnieken werden opgesplitst in methoden met en zonder verwonding van blad- en stengelmateriaal. Bij de kunstmatige besmettingen met verwonding werd de doorgroei van het inoculum in het plantenmateriaal opgemeten, daar waar de methoden zonder verwonding een beeld gaven van de potentie van de pathogeen om het plantenweefsel binnen te dringen. Vier locale *P. ramorum* stammen werden met elkaar vergeleken in infectiegraad en vertoonden geen pathologische variatie. Uiteindelijk werden er 4 infectiemethoden en 1 *P. ramorum* stam gebruikt voor de evaluatie van resistentie tussen 63 *Rhododendron spp*. De eerste resultaten duiden op belangrijke verschillen in ziektegevoeligheid binnen zowel species als hybriden en bij bepaalde plantengenotypes bleek de ziektegevoeligheid gerelateerd te zijn met een resistentie tegenover het binnendringen van de pathogeen.

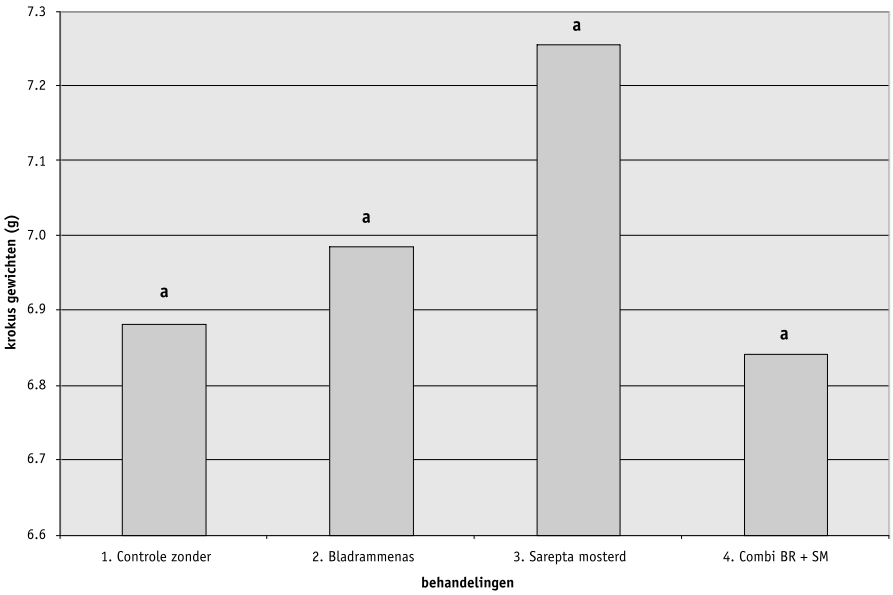
Effect van tussengewassen, Ridomil Gold en Pseudomonaden op Pythium beheersing in crocus en hyacint

Vincent Bijman, Suzanne Breeuwsma, Marjan de Boer, Aad Koster en Jan van der Bent

PPO Bloembollen Postbus 85, 2160 AB Lisse. E-mail: vincent.bijman@WUR.nl

In het kader van het Gewasbeschermingsprogramma van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV), onderdeel Geïntegreerde Beheerstrategieën, wordt er onderzoek verricht naar het ontwikkelen van een geïntegreerde beheersstrategie ter voorkoming van *Pythium* wortelrot in crocus en hyacint. *Pythium* is een groot probleem in beide gewassen omdat de hierdoor veroorzaakte wortelrot resulteert in opbrengstderving. In de praktijk zijn er nauwelijks maatregelen beschikbaar tegen deze ziekte. Er wordt momenteel 1 fungicide in de praktijk gebruikt maar dit middel heeft na langdurig gebruik een verminderde werking.
Door PPO Bloembollen wordt momenteel gewerkt aan het combineren van nieuwe en bestaande maatregelen zodanig dat de combinatie in een goede *Pythium* beheersing resulteert.

De maatregelen die momenteel worden onderzocht binnen de ontwikkeling van een beheersstrategie zijn de toepassing van tussengewassen (o.a. met biofumigatie capaciteiten), de toepassing van *Pythium* onderdrukkende *Pseudomonas* bacteriën en de toepassing van een fungicide. Al deze maatregelen resulteren wanneer ze sec worden toegepast al in *Pythium* bestrijding. Verwacht wordt echter dat door mogelijke synergie in de toekomst een stabiel en efficiënte beheersing van *Pythium* te bereiken is. Daarnaast kan het combineren van verschillende mechanismen tegen *Pythium* adaptatie van *Pythium* en/of de grond tegen fungiciden worden voorkomen. Op deze manier kan de toepassing van deze schaarse middelen voor de toekomst worden behouden.

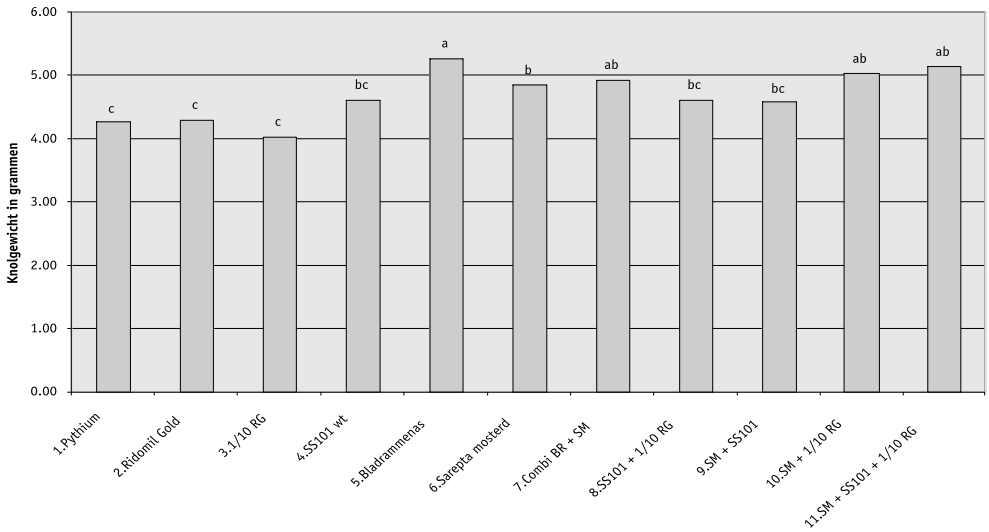


Tussengewassen

Uit vooronderzoek is gebleken dat *Brassica juncea* cv. ISCI 20 (Sarepta mosterd), geselecteerd op zijn biofumigatie vermogen geschikt is voor *Pythium* beheersing. Biofumigatie berust op het vrijkomen van glucosinolaten bij het kapot maken van plantencellen (b.v. door het klepelen en inwerken van het gewas) die door een enzymatische reactie (met enzymen uit de plantencel) worden omgezet ondergronds in gasvormige isothiocyanaten. Een tweede tussengewas is *Raphanus sativus* cv. Adagio (bladrammenas). Deze bevat geen glucosinolaten en is opgenomen als een standaardcontrole in de proef. Bladrammenas wordt door telers veel toegepast als tussengewas in verband met onkruidbeheersing, stuifbestrijding op de zandgronden in de zomer, bemesting, etc.
Daarnaast is er gekozen voor een combinatie van Sarepta mosterd en Bladrammenas om na te gaan of zo het biofumigatie effect gecombineerd met b.v. het bemestingseffect zal resulteren in een verhoogde bolopbrengst.

Pseudomonas bacteriën

Een andere maatregel waar al een aantal jaren onderzoek wordt gedaan is de toepassing van *Pythium* onderdrukkende *Pseudomonas* bacteriën die in samenwerking met Jos Raaijmakers (Laboratorium van Fytopathologie, Wageningen Universiteit) zijn ontwikkeld.
Deze bacteriën liggen al 5 jaar in biotoetsen en veld proeven in Lisse, en dit jaar wordt deze optie toegepast op grotere schaal bij enkele telers. Over het algemeen resulteert de toepassing in de veldexperimenten in een betere opbrengst, maar helaas niet altijd in alle jaren.



Fungicide

Als fungicide is gekozen voor Ridomil Gold omdat deze van de beschikbare fungiciden het meest wordt toegepast. Na langdurig gebruik kan er sprake van verminderde werking zijn.
Het concept van de gecombineerde strategie berust op een trapsgewijze aanpak ter beheersing van *Pythium*. Tevens gaat de *Pythium* (pathogeen druk) omlaag door isothiocyanaten (biofumigatie) en microbiële activiteit. Toediening van Ridomil Gold bij het planten zorgt voor tijdelijke bescherming van de wortels en /of vermindering van de infectie druk. De werking is van korte duur. Echter, de wortels zijn gedurende de duur van de teelt gevoelig voor infectie door *Pythium*. Het fungicide beschermt de wortels gedurende de tijd die de *Pseudomonas* bacteriën nodig hebben om de jonge kwetsbare wortels te koloniseren. De tot nu toe geteste pseudomonaden hebben diverse ziekte onderdrukkende mechanismen die in staat zijn om pathogene schimmels op afstand te houden of te doden, zoals de productie van antibiotica of van biosurfactants. Momenteel wordt het onderzoek gericht op een isolaat dat o.a. biosurfactants aanmaakt die zoosporen doet barsten. Wanneer de wortel preventief bezet is door de *Pseudomonas*, is deze mogelijk voor de duur van de teelt beschermd tegen *Pythium*.

Resultaten geïntegreerde beheersing

Uit de crocus proef van dit jaar (fig. 1 en fig. 2) blijkt dat bladrammenas resulteert in de hoogste ziekteonderdrukking. Dit effect is geen bemestings effect (zie figuur 1). Behandelingen als, Sarepta mosterd met bladrammenas, Sarepta mosterd + *Pseudomonas* A +1/10 Ridomil Gold en Sarepta Mosterd + 1/10 Ridomil Gold waren niet significant verschillend van bladrammenas.
Biofumigatie door toepassing van Sarepta Mosterd had weinig effect. De behandeling met *Pseudomonas* stam A resulteerde ook in een goede ziekteonderdrukking.
De lage doseringen van 1/10 Ridomil Gold was niet effectief in de veldproef terwijl deze dosering wel in ziekteonderdrukking resulteerde in biotoetsen onder geconditioneerde omstandigheden. Dus combinaties van maatregelen gaven een aanzienlijk beter resultaat dan de besmette controle en de toepassing van Ridomil Gold (volle dosering en 1/10 dosering).
In de hyacintenproef bleek de enorme variatie tussen de veldjes van één behandeling te leiden tot niet significante verschillen van alle behandelingen t.o.v. de controle. De tendens lijkt aanwezig dat de combinatie van maatregelen of alleen het toepassen van tussengewassen voor hyacint ook positief uitpakt voor *Pythium* beheersing.
De strategie van combinatie van maatregelen wordt momenteel ook op praktijkpercelen uitgetest. Op twee praktijkpercelen wordt de combinatie van bladrammenas en Ridomil Gold uitgetest. Bij een aantal telers wordt de *Pseudomonas* bacterie uitgetest in een enkele toepassing en gecombineerd met Ridomil Gold.
Bij één teler (uit Telen met Toekomst) wordt momenteel het effect van de combinatie van alle maatregelen op een praktijkperceel onderzocht.

Activiteit van cyclische lipopeptide surfactants tegen pathogene Oomyceten

J.M. Raaijmakers[1], H. Tran Thi Thu[1], M. de Boer[2], C.F. Geerds[1], P. de Waard3, T.A. van Beek[4], J.T. de Souza[1] and A. Ficke[1]

[1] Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, P.O. Box 8025, 6709 PG Wageningen; [2] Applied Plant Research, section Flowerbulbs, Lisse; [3] NMR Centre, Wageningen University; [4] Natural Products Chemistry group, Laboratory of Organic Chemistry, Wageningen University, the Netherlands.

Oomyceten vormen een diverse groep van schimmelachtige microorganismen en herbergen een reeks economisch belangrijke pathogenen van planten, insecten, vissen en dieren. Het voorkomen van agressieve en fungicide-ongevoelige stammen van Oomyceten alsmede het wereldwijde beleid om de duurzaamheid van de land- en tuinbouw te stimuleren hebben geleid tot een toenemende vraag naar nieuwe methoden om deze pathogenen te beheersen. Ten aanzien van biologische bestrijding van Oomyceten hebben recente studies in ons laboratorium geleid tot de isolatie en identificatie van verschillende isolaten van *Pseudomonas fluorescens* die oppervlakte-actieve stoffen produceren, zgn. surfactants, met een destructief effect op zoösporen van Oomyceten. Een van deze isolaten, *Pseudomonas fluorescens* R1SS101, produceert tenminste 5 extracellulaire surfactants, waarvan één geïdentificeerd is als een cyclisch lipopeptide bestaande uit negen aminozuren en een 10-C vetzuur. Dit cyclisch lipopeptide heeft niet alleen een destructief effect op zoösporen maar tevens een remmende werking op myceliumgroei van verscheidene Oomyceten en plantenpathogene schimmels, waaronder *Pythium aphanidermatum* en *Phytophthora* soorten. Toediening van *Pseudomonas fluorescens* R1SS101 aan grond of bloembollen resulteerde in een effectieve bestrijding van *Pythium* wortelrot van hyacint en krokus in zowel kleinschalige bi-

otoetsen als veldexperimenten. In substraatteelt-assays was toediening van isolaat R1SS101 of van de surfactants zelf erg effectief en consistent in onderdrukking van *Pythium aphanidermatum* in komkommer. De cyclische lipopeptide surfactants geproduceerd door *Pseudomonas fluorescens* R1SS101 geven een sterke reductie in oppervlaktespanning en dragen tevens bij aan de beweeglijkheid en verspreiding van isolaat R1SS101. Genetische analyse heeft geleid tot de identificatie van meerdere genen die betrokken zijn bij de biosynthese en regulatie van surfactants in *P. fluorescens* R1SS101. Huidig onderzoek richt zich op genetische analyse en op de effectiviteit van cyclische lipopeptiden in de beheersing van diverse Oomyceten.

Pythium, fylogenie en soortsafgrenzingen

Arthur de Cock[1], André Lévesque[2], Andrew Schurko[3], James Bedard[3] en Glen Klassen[3]

[1]Centraalbureau voor Schimmelcultures, Postbus 85167, 3508 AD Utrecht
[2] Environmental Health Program - Biodiversity, Agriculture and Agri-Food Canada, 960 Carling Avenue, Ottawa, ON K1A 0C6, Canada
[3]Department of Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, R3T 2N2 Canada

Van alle thans beschikbare soorten en varieteiten van *Pythium* werd de ITS van het nucleaire ribosomale DNA gesequentiëerd en geanalyseerd met parsimonie zowel als phenetische methodes. Van de helft van de soorten werd ook het D1, D2 en D3 gebied van het aangrenzende 28S rRNA gen gesequentiëerd. De fylogenie op basis van het 28S was congruent met die op basis van de ITS. Bij het onderzoek waren alle nog bestaande ex-type stammen betrokken, evenals 20 sequenties van recentelijk beschreven soorten van GenBank. Soorten waarvan geen ex-type beschikbaar was werden vertegenwoordigd door een authentieke stam (6), stammen die door Van der Plaats-Niterink gebruikt zijn in haar Monograph of the Genus *Pythium* (33) of stammen die geselecteerd waren op morfologische kenmerken (17). Parsimonie analyse genereerde twee hoofdclusters die de *Pythium* soorten vertegenwoordigen met resp. filamenteuze en bolvormige sporangia. Een kleine cluster met “contiguous” sporangia werd gevonden tussen deze twee clades. Dit type is morfologisch een tussenvorm tussen filamenteus en bolvormig.
In totaal werden 11 kleinere clusters onderscheiden die vaak correleerden met waardplant-type of substraat en in verschillende gevallen met een subset van morfologische kenmerken (b.v. oogonium ornamentatie). Echter, veel kenmerken die in de taxonomie van *Pythium* gebruikt worden, zoals antheridium positie, afmetingen van oogonia, etc., correleerden niet of nauwelijks met de fylogenie.
Een vergelijking van de ex-type en representatieve stammen met alle ITS sequenties van *Pythium* in Genbank toonde beperkte infraspecifieke variatie behalve bij *P. rostratum*, *P. irregulare*, *P. heterothallicum* en *P. ultimum*. Het totale aantal soorten dat onderzocht werd bedroeg 116 (inclusief 60 type strains). Zesentwintig soorten hadden ITS sequenties die identiek of bijna identiek waren met eerder beschreven soorten, hetgeen op conspecificiteit duidt.
Een groot aantal isolaten (ruim 500) werd behalve met sequencing ook met andere moleculaire methoden onderzocht (RADP, restrictieanalyse van ITS en IGS). Dit toonde aan dat 26 soorten in meerdere of mindere mate heterogeen zijn. Extreme heterogeniteit werd gevonden in b.v. *P. violae* en *P. rostratum* die beide uit drie verschillende soorten blijken te bestaan. Soorten met identieke ITS sequenties bleken meestal ook met andere methodes identiek en kunnen als conspecifiek beschouwd worden.

De wortelpathogeen Pythium myriotylum *bij cocoyam: een nieuw species?*

Maaike Perneel en Monica Höfte

Universiteit Gent, Faculteit Biowetenschappen, Laboratorium voor Fytopathologie, Coupure Links 653, B-9000 Gent, België

Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*), een knolgewas uit de *Araceae* familie, voorziet miljoenen mensen in de tropen en subtropen in hun dagelijkse behoeften aan koolhydraten, proteïnen, vetten en essentiële vitaminen. Ook in Kameroen is cocoyam na maniok het belangrijkste voedselgewas. De productie van cocoyam is verre van optimaal te wijten aan wortelrot, een ziekte die enorme oogstverliezen veroorzaakt. De bodempathogeen verantwoordelijk voor wortelrot werd morfologisch geïdentificeerd als *Pythium myriotylum*. Hoewel *P. myriotylum* beschreven staat als een pathogeen met een breed waardplantenspectrum, toonde onderzoek aan dat *P. myriotylum* isolaten van cocoyam een zeer nauw gastheerspectrum hebben. Bovendien bleken cocoyamisolaten een lager optimum groeitemperatuur te vertonen en konden ze op basis van esterasepatronen onderscheiden worden van *P. myriotylum* isolaten van andere waardplanten. In deze studie werden 40 *P. myriotylum* isolaten af-

komstig van geïnfecteerde cocoyamknollen uit Kameroen en Costa Rica vergeleken met 11 *P. myriotylum* isolaten van andere waardplanten voor intraspecifieke variabiliteit. Alle cocoyamisolaten vertoonden een optimum groeitemperatuur van 28°C, terwijl *P. myriotylum* isolaten van andere waardplanten best groeiden bij 37°C. Esterase en AFLP analyse lieten toe de cocoyamisolaten ondubbelzinnig te onderscheiden van de overige *P. myriotylum* isolaten. Bovendien bleek uit het AFLP patroon dat de cocoyamisolaten, ongeacht hun verschillende eco-geografische oorsprong zeer gelijkaardig te zijn. Sequenering van de ITS-regio toonde aan dat de ITS-regio van de cocoyamisolaten 99.2% homoloog is met de ITS-regio van *P. myriotylum*. Alle cocoyamisolaten hebben een basepaarsubstitutie van adenine naar guanine ter hoogte van het 5' einde van het 28S rDNA. Van de 11 sequenties van *P. myriotylum* die in de GenBank opgenomen zijn, vertoonde slechts 1 sequentie deze identieke substitutie. Het ging om een isolaat afkomstig van *Amorphophallus konjac*, een Japanse plant behorend tot dezelfde plantenfamilie als cocoyam, namelijk de *Araceae*. Pathogeniciteitstesten toonden tenslotte aan dat alleen isolaten afkomstig van geïnfecteerde cocoyamwortels opnieuw cocoyam konden infecteren. *P. myriotylum* isolaten van andere waardplanten bleken avirulent te zijn voor cocoyam. De significante verschillen op biochemisch en genetisch niveau, alsook het specifieke waardplantenspectrum van de cocoyamisolaten suggeren dat de wortelpathogeen op cocoyam misschien moet ondergebracht worden in een nieuw species.

Bestrijding van Phytophthora nicotianae *bij tomaat met behulp van surfactantproducerende bacteriën en rhamnolipiden*

K. De Jonghe & M. Höfte

Laboratorium voor Fytopathologie, Departement Gewasbescherming, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent

Phytophthora nicotianae is een bodempathogeen met een waardplantenreeks van meer dan 72 genera. Deze oomyceet veroorzaakt stengel- en wortelrot bij tomaat, tabak, avocado, katoen en een reeks sierplanten en bomen. De pathogeen wordt via deeltjes grond en opspattend water verspreid en infecteert voornamelijk door middel van zijn beweeglijke zoosporen.
In dit werk werd de mogelijkheid onderzocht om *P. nicotianae* in de tomatenteelt te bestrijden met behulp van biosurfactants. Hiertoe werden de biosurfactant formulering PRO1, op basis van rhamnolipiden (orig. *Pseudomonas aeruginosa*), en de surfactant- producerende *Pseudomonas* spp. CMR12a en CMR5c aangewend. CMR12a en CMR5c werden geïsoleerd uit de rhizosfeer van cocoyamplanten in Kameroen. De metaboliet met surfactant eigenschappen die beide bacteriesoorten produceren werd totnogtoe niet gekarakteriseerd.
We weten reeds uit de literatuur dat surfactants een afdodend effect hebben op zoosporen. Uit *in vitro* proeven met *P. nicotianae* is gebleken dat toediening van 10 µg/ml PRO1 voldoende is om de zoosporen van deze pathogeen onmiddellijk hun mobiliteit te laten verliezen. Bovendien trad voor de meeste zoosporen binnen de minuut na toediening van het biosurfactant lyse op.
In de *in vivo* proeven met PRO1 werd zowel in grond als in substraatteelt een goede bestrijding bekomen van *P. nicotianae*. In de verschillende herhalingen van de behandelingen met PRO1 werden, in vergelijking met de geïnfecteerde controle, telkens ongeveer 90% minder aangetaste planten opgetekend. De infectie gebeurde zowel met myceliumsuspensie als met zoösporenoplossingen (102 zoosporen/ml). Behandelingen met 10^8 bacteriën CMR12a en CMR5c, aangegoten met de voedingsoplossing, resulteerden in een goede bestrijding van een zoosporeninfectie (102 zoosporen/ml) van *P. nicotianae* in de substraatteelt, maar niet in de grondteelt. De resultaten van deze testen waren reproduceerbaar en telkens werd een beter bestrijdingseffect bekomen met CMR12a, in vergelijking met CMR5c. Bovendien werd voor beide bacteriën een schijnbaar stimulerend effect vastgesteld op de ontwikkeling van de tomatenplanten. Hierover kunnen echter nog geen besluiten worden getrokken en dit zal verder onderzocht worden. Zowel voor PRO1 als voor de bacteriebehandelingen werd geen fytotoxiciteit vastgesteld.
Als voornaamste conclusie kunnen we stellen dat biosurfactants en biosurfactant producerende bacteriën een uitstekend potentieel hebben in de bestrijding van *P. nicotianae* in de tomatenteelt.

Microsatelieten Phytophthora ramorum

Peter Bonants[1], Ineke de Vries[1], Els Verstappen[1], Matteo Garbelotto[2] en Kelly Ivors[3]

[1]Plant Research International, Wageningen, The Netherlands, [2]Dept. of ESPM-ES, University of California, Berkeley, CA, USA,[3] Dept. of Plant Pathology, North Carolina State University, Fletcher, NC, USA.

Zoals bekend zijn er diverse isolaten van *Phytophthora ramorum* gevonden op diverse gewassen in Europa en de VS. In Nederland en diverse landen van Europa voornamelijk in kwekerijen op *Rhododendron* en *Viburnum*. Recent is voor het eerst ook in Nederland een aantasting in *Taxus* aangetoond. Belangrijker is de recente vondst van de PD in een amerikaanse eik (*Quercus rubra*) in openbaar groen in de omgeving van Nijmegen. Het gaat hier om een eerste vondst van *P. ramorum* in een boom in Europa. Ongeveer tegelijkertijd werd in Engeland eveneens *P. ramorum* aangetroffen in een andere uitheemse eikensoort (*Quercus falcata*). In dergelijke gevallen is het van belang om vast te stellen of het een nieuw of oud genotype betreft en waar de besmetting vandaan komt. Voor tracering van het betrokken isolaat is het noodzakelijk om te beschikken over een geschikte genotyperingsmethode (een methode om m.b.v. streepjescodes van het DNA een isolaat te karakteriseren). De momenteel beschikbare methodes gaan allen uit van reincultures, gevolgd door opkweek en DNA isolatie. Echter, in vele gevallen kan geen reincultuur worden verkregen maar dient toch bepaald te worden of er een ander genotype in het spel is. De PD heeft derhalve een fytosanitair belang om een goede genotyperingsmethode in handen te hebben. Dit project beoogt derhalve een dergelijke methode te ontwikkelen die in planta gebruikt kan worden door de PD. Een bijkomend voordeel van deze methode is dat de methode ook ingezet kan worden om sexuele kruisingen te bestuderen. Tot voor kort werd alleen het A1 mating type gevonden in de EU en A2 in de VS. Echter, een enkel isolaat van het A2 mating type is nu gevonden in België en het A1 mating type in een kwekerijen in de VS. Sexuele sporen zijn nog niet gevonden. Het voorkomen van beide mating types in dezelfde regio kan potentieel leiden tot een sexueel reproducerende populatie en kan een nieuwe bron van inoculum genereren.

Methode:

Hierin wordt gebruik gemaakt van microsatelieten. Microsatelieten zijn korte repeterende sequenties van 2 of 3 basen, zgn repeats. Variatie zit meestal in het aantal repeats dat in een isolaat aanwezig is. Microsateliet variatie kan gebruikt worden om isolaten zo een unieke streepjescode te geven. Deze methode is dan uitermate geschikt om isolaten te traceren, hybridisatie te bestuderen, verschillen tussen populaties aan te tonen en om de mate van gene flow te bepalen tussen en binnen populaties en wordt bv. ook gebruikt om mensen te genotyperen in o.a. forensische studies. De genoomsequentie van *P. ramorum* is recentelijk bepaald door het Joint Genome Institute in de VS en onlangs is binnen Plant Research International een software-tool ontwikkeld die efficiënte identificatie van microsatellieten en design van primers voor de PCR amplificatie van deze microsatellieten mogelijk maakt. Het computerprogramma wordt nu gebruikt om in de genoomsequentiedata van *P. ramorum* microsatelieten op te sporen en een genotyperingsmethode te ontwikkelen. Momenteel zijn 1334 microsatelieten met primercombinaties geselecteerd. Hiervan zijn er 102 uitgetest. Eerste resultaten laten zien dat er 14 bruikbaar zijn voor een grootschalige screening om te onderzoeken of en hoe groot de variatie is tussen honderden isolaten vanuit de EU en de VS. Van meer dan 200 isolaten is momenteel DNA en/of gevriesdroogd mycelium voor dit project beschikbaar, afkomstig van diverse landen binnen de EU als ook uit de VS, maar ook van diverse waardplanten.