

KNPV werkgroep *Phytophthora* en *Pythium*

Bijeenkomst van 20 september 2007 te Bleiswijk

Monitoring en vroegtijdige bestrijding van wortelpathogenen

Adriaan Vermunt

Groen Agro Control, Distributieweg 1, 2645 EG Delfgauw
E-mail: a.vermunt@agrocontrol.nl;
website: www.agrocontrol.nl

In het Life-project CEPE, dat door de Europese Commissie is gesubsidieerd, is een methode gedemonstreerd om ziekten in de glastuinbouw te voorkomen en te beheersen. Het doel van het project is om een gezond gewas te telen met gebruik van minder bestrijdingsmiddelen. Het project loopt van november 2005 tot november 2007. Partners in het project zijn: Wageningen UR Glastuinbouw, LUCEL, Blgg en Groen Agro Control. CEPE staat voor 'Constant monitoring, Early diagnosis, Prevention and Early treatment'.

Het project bestaat uit twee gedeelten: een demonstratiekasproef in het kassencomplex van WUR Glastuinbouw te Bleiswijk en daarnaast monitoring bij praktijkbedrijven. Voor beide onderdelen zijn watermonsters verzameld uit de wortelzone van de substraatmat. De monsters zijn wekelijks of tweewekelijks genomen, afhankelijk van de gewas-pathogeencombinatie en teeltomstandigheden. De monsters zijn geanalyseerd op de aanwezigheid en concentratie van wortelpathogenen en bestrijdingsmiddelen. Tevens zijn klimaat- en teeltdata verzameld. Alle data gingen vervolgens in een, door het projectteam ontwikkelde, advies-*tool* met schadedrempels. De adviezen die hieruit rolden werden meegewogen door telers in de te nemen teeltmaatregelen.

Voor de analyses van pathogenen hebben de twee labs, Groen Agro Control en Blgg, hun eigen DNA-methodes gebruikt. Voor de analyse van bestrijdingsmiddelen heeft Groen Agro Control gebruik gemaakt van GC-MS en LC-MS. Voor zowel de kasproef als de praktijkbedrijven zijn vier

gewassen gevolgd, nl. tomaat, paprika, komkommer en roos.

In de kasproef zijn er opzettelijk pathogenen toegediend aan het recirculatiewater om het monitoringsprincipe te demonstreren en om het CEPE-adviestool te optimaliseren. Er kwam aantasting bij *Pythium aphanidermatum* in komkommer en *Phytophthora capsici* in paprika. Geen of weinig aantasting was er bij *P. aphanidermatum* in zowel paprika als tomaat, bij *Phytophthora nicotianae* in tomaat, *P. nicotianae* in roos en *Cylindrocladium scoparium* in roos.

Bij *P. capsici* in paprika waren er drie wekelijkse bestrijdingen met AA-terra (etridiazool) nodig om de opgelopen infectiedruk te onderdrukken. Twee maanden na een *P. nicotianae*-besmetting bij roos, liep de infectiedruk rond de wortels van deze *Phytophthora* snel op. Twee bestrijdingen met Fenomenal met een tussenperiode van negen dagen waren voldoende om de infectiedruk volledig te onderdrukken. Hier was dan ook geen zichtbare aantasting waarneembaar. Bestrijding van *P. aphanidermatum* in komkommer was effectiever met AA-terra dan met Previcur (propamocarb-HCl), omdat de infectiedruk met AA-terra sterker afnam. Zodra de infectiedruk van *P. aphanidermatum* in komkommer toeneemt dient zo snel mogelijk bestreden te worden.

Zowel door Blgg als Groen Agro Control zijn twintig telers gevolgd. *Pythium* heeft bij een aantal tomatentelers voor problemen gezorgd. Bij deze bedrijven is dan ook een bestrijding uitgevoerd tegen *Pythium*. Bij rozentelers was het typisch dat na elke oogstperiode (snee) de infectiedruk van *Pythium* toenam. Veel rozentelers voeren bestrijdingen uit tegen *Pythium*, *Cylindrocladium scoparium* en *Cylindrocarpon destructans*. In enkele gevallen was bij roos ook *Phytophthora* geconstateerd in de wortelzone. In de meeste gevallen was hiertegen een bestrijding uitgevoerd. Veel komkommertelers telen twee of drie keer op dezelfde substraatmatten. Vaak is dan in de tweede of derde teelt een hoge infectiedruk van *Pythium* waarneembaar. Als in dergelijke gevallen tevens blijkt dat er *P. aphanidermatum* aanwezig is, wordt er vaak een bestrijding tegen *Pythium*

WERKGROEP

uitgevoerd. Bij één paprikateler was er een zware besmetting van *P. capsici* aanwezig. Dit was gemeenten in het voedingswater en visueel waarneembaar in het gewas. De teler heeft dit alleen tijdelijk kunnen onderdrukken.

In het algemeen blijkt uit de ervaringen in de praktijk dat de CEPE-adviezen door de telers meegewogen worden in de afweging over de te nemen teeltmaatregelen. Dit kunnen bestrijdingen of klimaatmaatregelen zijn. Aan de ene kant worden bestrijdingen uitgesteld aan de hand van CEPE-adviezen. Aan de andere kant worden bestrijdingen vroegtijdig toegepast als de concentratie pathogenen toeneemt en visueel nog geen schade waarneembaar is. In het laatste geval zijn de bestrijdingen effectief om de infectiedruk en aantasting voldoende te onderdrukken.

Pythium in de mobiele chrysantenteelt

Piet Jansen

MobyFlowers, Vogelaer 7, 2675 SH Honselersdijk
E-mail: Peter@mobyflowers.nl

Al meer dan twintig jaar wordt gezocht naar mogelijkheden voor het telen van chrysanten 'los van de ondergrond'. In alle experimenten en proeven die in de loop van vele jaren werden genomen kwam de complexiteit van *Pythium* in de chrysantenteelt sterk naar voren. De meerproducties die veelal inherent zijn aan nieuwe systemen werden ook bij de teelt in de grond gerealiseerd terwijl wortelproblemen bleven! Door de noodzaak tot minder gebruik van energie en lagere milieubelasting bleef de drang naar telen 'uit de grond'.

In 2004 leidde dit tot de opzet van Mobysant: een samenwerkingsproject tussen chrysantentelers, -veredelaars en tuinbouwtoeleveranciers. Het project had een vierledige doelstelling, namelijk:

- betere ruimtebenutting
- milieuverbetering
- arbeidsefficiëntie/besparing
- energiebesparing per eenheid product

Op basis van teeltconceptkeuze is een teeltsysteem ontwikkeld, uitgebouwd en getest op technische en bedrijfseconomische haalbaarheid. Meerdere substraten, veen, veenmengsels en kokos, zijn evenals waterteelt in het project getest. Het resultaat was een teeltsysteem van goten van

6 cm breed en hoog met daarin een geperforeerde V-goot en kokos als substraat.

Na 2,5 jaar leidde het project tot de volgende conclusies en aanbevelingen:

- het project heeft veel inzichten opgeleverd over de gevoeligheid van chrysantenrassen voor o.a. *Pythium*
- *Pythium* is een terugkerend en hardnekkig probleem
- de beheersbaarheid van gewasuitval is teruggebracht tot een 'aanvaardbaar' niveau, maar de maximale productie is nooit gehaald
- meer kennis en ervaring zijn nodig om *Pythium* te tackelen
- ontsmetten van goten na iedere teelt lijkt noodzakelijk
- *Pythium* is in de grondteelt door juiste maatregelen redelijk te beheersen maar lijkt zich in het Mobysantsysteem versterkt te manifesteren.
- beheersing van *Pythium* is de kritische succesfactor van het systeem.
- nieuwe sensorsystemen moeten het mogelijk maken inzicht in de kritische stressfactoren van de plant te krijgen.
- *Pythium*-resistente en snelwortelende rassen dienen ontwikkeld te worden.

Het ontwikkelde teeltsysteem en het medium (kokos) was zo perspectiefvol dat het al snel door de praktijk werd opgepakt. De wortelvorming in kokos en de groeiversnelling ten opzichte van de gangbare teelt hebben, in combinatie met automatisch steksteken, automatisch transport van stek tot bloei en oogsten in een geconditioneerde ruimte, geresulteerd in de bouw van een productiebedrijf van 22.000 m²: MobyFlowers. Dit bedrijf is in productie vanaf januari 2007.

MobyFlowers was erop voorbereid dat het niet vanzelf zou gaan. Tijdens de tweede teelt ontstonden bijna gelijktijdig over het gehele bedrijf groeistoornissen. Veel waarnemingen en monsteranalyses van het teeltmedium en de verschillende waterstromen hebben uiteindelijk geleid naar besmetting met *Pythium* en *Phytophthora* in de eerste teeltfase (beworteling).

Diverse gangbare *Pythium*-bestrijders zijn proefondervindelijk toegepast. Een (tijdelijke) oplossing is gevonden in een behandeling met Ridomil Gold. Twee dagen na de behandeling werd al herstel van de wortels waargenomen en drie weken na de behandeling was het gewas al ver hersteld. Momenteel wordt gewerkt aan verbeterde reiniging van de teeltgoten zodat geen gebruik meer

gemaakt hoeft te worden van bestrijdingsmiddelen.

Om *Pythium* én *Phytophthora* beter te kunnen beheersen in waterige systemen:

- is meer kennis en inzicht nodig in de omstandigheden waaronder *Pythium* en *Phytophthora* kunnen toeslaan
- moeten biosensoren worden ontwikkeld voor een snelle diagnose van schadelijke schimmels
- is in de praktijk behoefte aan een uniforme wijze van schimmeldiagnose en een eenduidige waardebeoordeling

De ontwikkelingen in de chrysantenteelt gaan voort. Het probleem dat is weergegeven is uit de praktijk. Wie helpt dit oplossen?

Phytophthora Database

Peter Bonants¹, Henk Brouwer², Collin Gerritsen², Els Verstappen¹, Lute-Harm Zwiers² en Arthur de Cock²

¹Plant Research International (PRI), Wageningen

²Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht

In 2006 is het FES (Fonds Economische Structuurversterking) -programma "Versterking infrastructuur plantgezondheid" van start gegaan. Dit FES-programma is door het Ministerie van LNV voorgesteld. Het doel van dit programma is het op peil brengen van collecties en gegevensbestanden, het genereren van genetische basisgegevens en het ontwikkelen van nieuwe technieken welke identificatie en detectie van in het bijzonder Q-organismen moeten vergemakkelijken.

Bij de keuze van de organismen voor bewerking in het FES-programma is gekeken naar het economische belang, de aanwezigheid van Q (quarantaine) -organismen, het wetenschappelijke en ecologische belang en de startpositie. Uit deze inventarisatie kwam binnen het uitvoeringsconsortium schimmels *Phytophthora* met de hoogste score uit de bus. Het belang van *Phytophthora* is zowel economisch als ecologisch evident:

- *Phytophthora* richt wereldwijd een miljardenschade aan in land- en tuinbouwgewassen en in bomen in parken, tuinen en gehele ecosystemen
- *Phytophthora* omvat een aantal belangrijke Q-organismen (im- en export)
- bestrijding van *Phytophthora* vergt een hoog fungicide gebruik

De problemen met *Phytophthora* nemen toe door de introductie van nieuwe pathogenen (*P.*

ramorum), maar ook door opduiken van nieuwe vormen (paringstypen) en het ontstaan van hybriden (*hedraiandra-cactorum*). Daarnaast zijn de gewenste beperking van het fungicide gebruik en de verplichte waterrecirculatie in de kasteelt oorzaken van toenemende problemen.

Het uitvoeringsconsortium schimmels heeft voor het werk aan *Phytophthora* de volgende werkdelen gedefinieerd.

- up-to-date maken van collecties van prioritaire groepen
- het opzetten van een database-systeem met taxonomische/morfologische en moleculaire
- opzetten van een DNA-bank
- ontwikkeling van een identificatie- en detectiesystemen
- taxonomische expertise herwinnen en verdiepen

In werkpakketten laat dat zich als volgt vertalen: WP1) Database / collecties

- database schimmels op basis wensen gebruikers
- up-to-date collecties van prioritaire groepen (Q en mogelijke Q)
- DNA-bank van prioritaire groepen (Q en mogelijke Q)

WP2) Sequenties / taxonomie

- taxonomische data incl. symptomen en foto's
- sequenties van sleutelgenen

WP3) Methoden

- nieuwe identificatie- en detectiesystemen

In de eerste fase van WP1 is een database-structuur opgezet voor *Phytophthora*. Voor het opzetten van de database is gekozen voor BioloMICS, de software welke ook ten grondslag ligt aan MycoBank (<http://www.mycobank.org>). MycoBank is momenteel de enige databank in de wereld die alle namen bevat van bekende schimmels. De BioloMics software biedt een oplossing voor de opslag, analyse en publicatie van biologische data. Alle mogelijke typen van data kunnen hierin worden gearchiveerd, uiteenlopend van morfologische, fysiologische, biochemische, chemische, chromatografische, electroforetische, DNA-, RNA- of eiwitsequenties tot bibliografische, taxonomische, geografische of administratieve data (en nog vele andere). Plaatjes, URLs en files in elk format kunnen worden gelinked aan de velden en gemakkelijk worden bekeken. Al deze eigenschappen maken het mogelijk dit systeem te gebruiken voor polyfasische identificatie. Als eerste opzet werd een selectie gemaakt van

Phytophthora-isolaten, waarbij van elke soort één representatieve stam (meest ex-type) werd gekozen, te beginnen met de twintig tot dertig voor Nederland meest relevante soorten. Aan het einde van de eerste fase moet de functionaliteit van het systeem gedemonstreerd worden. In vervolgfases worden meerdere isolaten per soort en meer soorten meegenomen. Momenteel is de opzet van de stamendatabase gebaseerd op o.a. Stamps *et al.* (1990) en is na inventarisatie van wensen van gebruikers uitgebreid. Een selectie is gemaakt van representatieve stammen van de zeventig soorten (waaronder ca. vijftig ex-type stammen), en nieuwe (nog te beschrijven) soorten worden verworven. Een begin is gemaakt met het verkrijgen van morfologische data (kolonievormen, temperatuur / groeirelaties, symptomen, meetgegevens en foto's). Ook is een start gemaakt om van al deze isolaten moleculaire data te verkrijgen. Sequenties zullen worden bepaald van ITS, β -tubuline, Translatie elongatiefactor (EF) 1-alpha en *CoxI*-genen. Daartoe zijn PCR-primers ontworpen om deze genen te amplificeren.

Uiteindelijk zal een database met morfologische en moleculaire data van *Phytophthora*:

- een belangrijke bijdrage leveren aan de taxonomische kennis van het genus
- een belangrijke bron van informatie zijn voor identificatie
- een basis vormen voor het ontwikkelen van detectiemethoden
- een basis vormen voor ontdekken/onderkennen toekomstige nieuwe pathogenen

Onlangs is ook in de VS een *Phytophthora*-databaseproject opgestart (www.phytophthoradb.org). In deze database ligt de nadruk op moleculaire data. De DNA-sequenties van negen genen worden hierin ondergebracht: β -tubuline, Cytochrome oxidase, EF 1 alpha, Large Subunit rRNA, TIG1 gene fusion, Enolase, Heat Shock Protein 90 en 60S Ribosomal Protein L10. Morfologische data worden voornamelijk overgenomen uit bestaande literatuur. Verder bevat deze database de gegevens van 172 waardplanten en 3601 referenties en tevens biedt deze database de mogelijkheid om programma's als BLAST Search, ClustalW-Analyse en Virtual RFLP uit te voeren. Afspraken over vormen van samenwerking tussen de twee *Phytophthora* databases (NL en USA) zullen worden gemaakt.

Referentie

Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. & Hall, G. S., 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Papers 162: 1-28.

De Belgische A2-isolaten van *Phytophthora ramorum*: genotypering, virulentie en nakomelingen

Annelies Vercauteren¹, Isabelle De Dobbelaere¹, Xavier Boutet², Anne Chandelier², Martine Maes¹ en Kurt Heungens¹

¹Instituut voor Landbouw- en VisserijOnderzoek (ILVO), Plant, Gewasbescherming, Burg. Van Gansberghelaan 96, 9820 Merelbeke

²Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W), Rue de Lirou 4, 5030 Gembloux

Phytophthora ramorum werd voor het eerst gerapporteerd in Duitsland en Nederland in 1993 en 1995, waar het bladlesies en twijgkanker op *Rhododendron* and *Viburnum* spp. veroorzaakte. Rond dezelfde periode trad er in Californië door dit pathogeen massale sterfte op van bepaalde loofbomen, voornamelijk *Lithocarpus densiflorus* ("tanoak") en *Quercus agrifolia*. Wegens het relatief snel optreden van de symptomen, de snelle verspreiding van de ziekte en de opvallende aantasting bij eiken, werd de ziekte in de VS. "Sudden Oak Death" genoemd. In Europa werd de ziekte tot nog toe voornamelijk gevonden in kwekerijen op *Rhododendron* en *Viburnum*. In Nederland en in het Verenigd Koninkrijk werden in openbaar groen en in bossen sporadische stamaantastingen vastgesteld op bepaalde loofbomen. *P. ramorum*-isolaten uit Europa en de VS zijn genetisch verschillend, wat onder meer aangetoond werd met AFLP en microsatteliet-merkers. *P. ramorum* is heterothallisch en beide kruisingstypes zijn op enkele uitzonderingen na ook geografisch gescheiden. Met uitzondering van enkele introducties, zijn alle Amerikaanse isolaten (US) van het A2-kruisingstype. In Europa (EU) was oorspronkelijk enkel het A1-kruisingstype aanwezig, maar in 2002 vonden Werres & De Merlier (2003) één A2-isolaat van het EU-type. Dit isolaat was afkomstig van een *Viburnum*-plant uit België die het seizoen ervoor geïmporteerd werd uit Nederland.

In deze studie werd het kruisingstype bepaald van alle Vlaamse isolaten die in collecties aanwezig waren. Een *in vitro* kruisingstechniek op wortelmedium werd geoptimaliseerd om het kruisingstype te bepalen door middel van testerisolaten. Met deze techniek werden meer dan 250 Vlaamse isolaten, die verzameld werden tussen 2002 en 2006, gescreend. Dit resulteerde in de identificatie van twee extra isolaten van het A2-kruisingstype.

WERKGROEP

Er werd onderzocht of deze isolaten genetisch en pathologisch te onderscheiden waren. Genotypering met polymorfe merkers (microsatellieten, AFLP en COX-gen polymorfisme) kon de Europese A2-isolaten niet onderscheiden van de grootste Europese genotypegroep. Inoculatietesten op verschillende waardplanten toonde ook geen verschil aan in pathogeniciteit tussen de Europese A1- en A2-isolaten.

In het CRA-W (Centre Wallon de Recherches Agonomiques) werden nakomelingen gegenereerd uit een kruising tussen EU-A1 en EU-A2 isolaten. Deze werden genotypisch gekarakteriseerd. De nakomelingen bleken een herschikking van heterozygote merkers te vertonen, wat bevestigt dat ze ontstaan waren uit gekiemde oösporen. Microsatelliet-analyse van een kruising tussen een EU-A1 en een US-A2 isolaat, waarvoor wel discriminerende moleculaire merkers beschikbaar zijn, zal in de nabije toekomst duidelijkheid geven of de nakomelingen een resultaat zijn van zelfbevruchting, dan wel van een genetische uitwisseling tussen een A1- en een A2-isolaat.

Referentie

Werres, S. & De Merlier, D., 2003. First detection of *Phytophthora ramorum* mating standard A2 in Europe. *Plant Disease* 87: 1266.

Phytophthora in het veld: recente ontwikkelingen

Henk Brouwer

Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen
Thans: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht

Deze presentatie gaf een kort overzicht van recente ontwikkelingen omtrent *Phytophthora*; dit is een korte samenvatting.

De waardplantenlijst van *Phytophthora ramorum* blijft groeien (momenteel 109 soorten). In Nederland is *P. ramorum* het afgelopen jaar voor het eerst gevonden op beuk en *Pieris* spp. De belangrijke rol van irrigatiewater bij de verspreiding van *Phytophthora*-soorten waaronder *P. ramorum* is nogmaals bevestigd in een recent onderzoek van Werres *et al.* (2007). Bij inspecties van de PD konden vaak meerdere *Phytophthora*-soorten uit het irrigatiewater van besmette kwekerijen geïsoleerd worden.

Een recent beschreven Q-waardige *Phytophthora*-

hora-soort, *P. kernoviae* (Brasier *et al.*, 2005) die in Europa tot nu toe uitsluitend in Engeland gevonden is, is nu ook aangetoond in Nieuw Zeeland. Het is nog onduidelijk of de soort daar oorspronkelijk vandaan komt of dat deze daar ook geïntroduceerd is. *P. kernoviae* heeft net als *P. ramorum* een brede waardplantenreeks en komt voornamelijk voor op *Rhododendron*. De meeste vondsten zijn nabij Cornwall, in Groot-Brittannië. Er wordt veel aan gedaan om verdere verspreiding te voorkomen.

Daarnaast is er de afgelopen jaren een aantal *Phytophthora*-isolaten gevonden die hybriden zijn tussen verschillende *Phytophthora*-soorten. *Phytophthora cactorum* x *hedraiondra*-hybriden (Man in 't Veld *et al.*, 2007) worden zeer veel gevonden. Deze hybride lijkt de oudersoorten vrijwel verdrongen te hebben op de waardplant *Rhododendron. Palni* subsp. *alni* is een hybride die grote schade veroorzaakt aan *Alnus* spp.

Verder zijn het afgelopen jaar verschillende nieuwe soorten beschreven:

<i>Phytophthora captiosa</i>	<i>Eucalyptus</i>
Nieuw Zeeland	Dick <i>et al.</i> , 2006
<i>Phytophthora fallax</i>	<i>Eucalyptus</i>
Nieuw Zeeland	Dick <i>et al.</i> , 2006
<i>Phytophthora foliorum</i>	<i>Azalea</i>
USA	Donahoo <i>et al.</i> , 2006
<i>Phytophthora polonica</i>	<i>Alnus</i> (grond)
Polen	Belbahri <i>et al.</i> , 2006
<i>Phytophthora austrocedrae</i>	<i>Austrocedrus</i>
Chili	Greslebin <i>et al.</i> , 2007
<i>Phytophthora rubi</i>	<i>Rubus idaeus</i>
Europa	Man in 't Veld, 2007

Phytophthora foliorum is verwant aan *Phytophthora ramorum*, en geeft kruisreacties in sommige diagnostische tests voor *P. ramorum*.

Referenties

- Belbahri, L., Moralejo, E., Calmin, G., Oszako, T., García, J.A., Descals, E. & Lefort, F., 2006. *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland. *FEMS Microbiology Letters* 261: 165-174.
- Brasier, C.M., Beales, P.A., Kirk, S.A., Denman, S & Rose, J., 2005. *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. *Mycological Research*, 109: 853-859.
- Dick, M.A., Dobbie, K., Cooke, D.E.L & Brasier, C.M., 2006. *Phytophthora captiosa* sp. nov. and *P. fallax* sp. nov. causing crown dieback of *Eucalyptus* in New Zealand. *Mycological Research*, 110: 393-404.
- Donahoo, R., Blomquist, C.L., Thomas, S.L., Moulton, J.K., Cooke, D.E.L & Lamour, K.H., 2006. *Phytophthora foliorum* sp. nov., a new species causing leaf blight of *Azalea*. *Mycological Research*, 110: 1309-1322.
- Greslebin, A.G., Hansen, E.M. & Sutton, W., 2007. *Phytophthora austrocedrae* sp. nov., a new species associated with *Austrocedrus chilensis* mortality in Patagonia (Argentina). *Mycological Research*, 111: 308-316.

- Man in 't Veld, W.A., 2007. Gene flow analysis demonstrates that *Phytophthora fragariae* var. *rubi* constitutes a distinct species, *Phytophthora rubi* comb. nov. *Mycologia* 99: 222-226.
- Man in 't Veld, W.A., de Cock, A.W.A.M. & Summerbell, R.C., 2007. Natural Hybrids of Resident and Introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new hosts. *European Journal of Plant Pathology* 117: 25-33.
- Werres, S., Wagner, S., Brand, T., Kaminski, K. & Seipp, D., 2007. Survival of *Phytophthora ramorum* in recirculating irrigation water and subsequent infection of *Rhododendron* and *Viburnum*. *Plant Disease* 91:1034-1044.

Natuurlijke *Phytophthora nicotianae* x *cactorum*-hybriden; nieuwe ontwikkelingen

Johan Meffert & Willem Man in 't Veld

Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen

Hybridisatie in *Phytophthora* werd voor het eerst beschreven in 1998 met de ontdekking van hybriden tussen *Phytophthora nicotianae* en *Phytophthora cactorum*. Deze hybriden werden geïsoleerd van een vijftal sierplanten in kassen in Nederland. In 2001 werden deze hybriden ontdekt op Loquat in Taiwan. In 2006 werden uit Peru dezelfde hybriden gerapporteerd die, intrigerend genoeg, eveneens gevonden werden op Loquat. In beide landen waren de hybriden de oorzaak van de sterfte van volwassen bomen. De vraag was of Peru deze hybriden wellicht geïmporteerd had uit Taiwan. Besloten werd te onderzoeken met AFLP analyse of er misschien een clonale lijn viel te ontdekken om deze hypothese te testen. De AFLP analyse toonde duidelijk aan dat de AFLP-bandenpatronen van de onderzochte isolaten niet identiek waren en dat de hybriden in Taiwan en in Peru onafhankelijk van elkaar ontstaan moeten zijn.

Moleculaire analyse van *Phytophthora hedraiaandra* x *P. cactorum*-hybriden

Kris Van Poucke, Isabelle De Dobbelaere, Kurt Heungens & Martine Maes

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Merelbeke (B)

In 2005 werden in het Diagnosecentrum voor Planten van het ILVO (Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, België) in totaal 156 *Phytophthora*-isolaten verkregen uit diverse planten- en watermonsters (*P. ramorum*-isolaten niet

meegerekend). Van elk van deze isolaten werd de volledige ITS (internal transcribed spacer) -regio van het ribosomaal DNA geamplificeerd via PCR en geanalyseerd via RFLP met de restrictie-enzymen AluI, MspI en Taq I. Het verkregen bandenpatroon werd vergeleken met referenties opgegeven in Cooke en Duncan (1997) (www.phytid.org). Vijf stammen, die voornamelijk uit rododendron werden geïsoleerd, werden met deze methode geïdentificeerd als *P. idaei* of *P. pseudotsugae*. Beide soorten zijn echter beschreven als strikt waardplantenspecifiek op respectievelijk framboos en Douglasspar en worden niet op rododendron gemeld.

Bij monsternamen op één enkel rododendronbedrijf in het kader van een *P. ramorum* onderzoeksproject werden 38 *Phytophthora*-stammen geïsoleerd die een analoog restrictieprofiel vertoonden. Van enkele isolaten van dit bedrijf werd na kloneren de ITS1-regio gesequeneerd. De sequentie bleek in enkele gevallen identiek te zijn aan die van *P. hedraiaandra*. Van één kloon was de ITS1-regio echter identiek aan die van *P. cactorum*. Dit deed vermoeden dat het hier mogelijk om *P. hedraiaandra* x *P. cactorum*-hybriden ging. Van de vijf isolaten van het Diagnosecentrum, van negen isolaten van het rododendronbedrijf en van twee referentie-isolaten van respectievelijk *P. cactorum* en *P. hedraiaandra* werden monosporeculturen bereid. Via verschillende methoden werd nagegaan of deze zestien isolaten al dan niet hybriden zijn van *Phytophthora hedraiaandra* en *P. cactorum*.

Een eerste methode bestaat erin de ITS-regio te amplificeren en het PCR-product rechtstreeks te sequencen. Hybride isolaten zullen dan op de plaatsen waar de sequenties polymorf zijn, dubbele pieken vertonen in het elektroferogram (Man in 't Veld *et al.*, 2007). Uit toepassing van deze methode bleek dat twee van de vijf isolaten van het Diagnosecentrum zuivere culturen waren; de ene geïdentificeerd als *P. cactorum*, de andere als *P. hedraiaandra*. Eén isolaat bleek een hybride te zijn van *P. nicotianae* en *P. cactorum*. De twee andere isolaten van het Diagnosecentrum en alle isolaten van het rododendronbedrijf waren *P. hedraiaandra* x *P. cactorum*-hybriden.

Na amplificatie van de ITS1-regio van de zestien isolaten werd het PCR-product geknipt met het enzym HphI. Dit enzym heeft een knipplaats in de ITS1-sequentie van *P. cactorum*, maar niet in die van *P. hedraiaandra*. Na scheiding op gel vertonen hybride-soorten dus zowel een ongeknipt bandje van *P. hedraiaandra* als twee bandjes van

WERKGROEP

P. cactorum. Deze methode leverde dezelfde resultaten op als de sequenering. Ook bleek dat de intensiteit van de bandjes verschilde, waardoor vermoed werd dat de ITS-kopieën van *P. hedraiaandra* en *P. cactorum* bij de verschillende isolaten in verschillende proporties voorkomen. Zo kon er onder andere geconcludeerd worden dat bij drie van de negen isolaten van het rododendronbedrijf er meer *P. cactorum*-type ITS-kopieën aanwezig waren dan bij de zes andere isolaten. Dit werd bevestigd door de verschillende hoogte van de dubbele pieken in de electroferogrammen.

Op basis van de polymorfismen in de ITS1-sequentie van *P. hedraiaandra* en *P. cactorum* werden voor beide soorten selectieve PCR-primers ontwikkeld. Door gebruik te maken van deze primers werd met behulp van *real-time* PCR vastgesteld dat het isolaat dat via sequenering en PCR-RFLP als *P. hedraiaandra* werd gedetermineerd, toch een hybride bleek te zijn waarin echter heel wat minder *P. cactorum*-type ITS-kopieën aanwezig waren. Bij de negen isolaten afkomstig van het rododendronbedrijf was het aantal *P. cactorum*-type ITS-kopieën overal nagenoeg gelijk. Bij drie van deze isolaten, waarvan op basis van sequenering en PCR-RFLP werd gesteld dat er meer *P. cactorum*-type ITS-kopieën aanwezig waren, bleek dat er in feite minder *P. hedraiaandra*-type ITS-kopieën aanwezig waren dan bij de resterende zes isolaten.

Samengevat kan worden gesteld dat de *real-time* PCR-methode meer resolutie biedt dan de PCR-RFLP-methode en het analyseren van de electroferogrammen voor het onderscheiden van specifieke hybriden. Eén hybride werd immers alleen met de *real-time* PCR-methode geïdentificeerd. Omdat deze methode kwantitatief is, geeft ze tevens het aantal ITS-kopieën weer van de oudersoorten die in de hybriden aanwezig zijn. Zo werd vastgesteld dat er minstens drie types *P. cactorum* x *P. hedraiaandra*-hybriden lijken te bestaan. Verdere analyse dient aan te geven of deze afkomstig zijn uit aparte hybridisatie-*events* of na eenzelfde hybridisatie verschillende genetische herschikkingen ondergingen.

Referenties

- Cooke, D.E.L. & Duncan, J. M., 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* 101: 667-677.
 Man in 't Veld, W.A., De Cock, A.W.A.M. & Summerbell, R.C., 2007. Natural hybrids of resident *Phytophthora* species proliferating on multiple hosts. *European Journal of Plant Pathology* 117: 25-33.



Deelnemers worden rondgeleid door het nieuwe kassencomplex van WUR-Glastuinbouw in Bleiswijk.

Inventarisatie en beheersing van valse meeldauw (*Plasmopara halstedii*) in zonnebloemen

Suzanne Breeuwsma, Marjan de Boer, Rik de Werd en Frank van der Helm

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving – Bloembollen, Postbus 85, 2160 AB Lisse

Valse meeldauw, veroorzaakt door de oömyceet *Plasmopara halstedii* is het grootste ziekteprobleem in de zonnebloemteelt van dit moment. Deze bodemgebonden ziekteverwekker kan onder natte omstandigheden de kiemplant via jonge wortels infecteren. Vooral wortels tot 2,5 centimeter lang zijn invalspoorten voor het pathogeen.

Bij infectie vanuit de bodem, de zogenaamde systemische infectie, blijven de planten achter in groei en sterven voortijdig af. Daarnaast kunnen de sporen via de lucht en opspattend water op de bladeren terechtkomen. Hierdoor ontstaan kleine gele bladplekken met wit schimmelpluis aan de onderkant van het blad. Deze bladplekken zijn niet fataal voor de plant maar leveren wel kwaliteitsverlies op aangezien zonnebloemen in Nederland worden geteeld voor de bloemen en niet voor het zaad.

Bij PPO in Lisse is de afgelopen twee jaar onderzoek gedaan naar de beheersing van deze ziekte. In eerste instantie is onderzoek gedaan naar niet-chemische maatregelen omdat valse meeldauw met name in de biologische teelt een probleem is. Er is gekeken naar de mogelijkheden van het

planten van 1 week oude zaailingen in pluggen, omdat 1 week oude zaailingen veel minder gevoelig zijn. Uit een proef op drie praktijkpercelen waarin het effect van planten in pluggen vergeleken is met direct zaaien bleek dat het planten in pluggen de aantasting sterk kan verminderen. Dit positieve effect is wel afhankelijk van de grondsoort (klei of zand) en van de grondstructuur (vochtig of droge grond).

Daarnaast zijn in kleinschalige veldproeven diverse biologische plantversterkers en GNO's getest. Geen van deze behandelingen had een positief effect op de beheersing van valse meeldauw.

Tevens is een zaailingbiotoets ontwikkeld om op

kleine schaal en onder gecontroleerde omstandigheden maatregelen te kunnen toetsen. Maar gezien de relatieve korte tijd waarmee infectiedruk kan worden vastgesteld, wordt onderzocht of deze biotoets gebruikt kan worden om de infectiedruk in praktijkpercelen te meten. Met behulp van deze biotoets is ook vastgesteld dat biologische grondontsmetting de valse meeldauw infectiedruk sterk kan verminderen. Andere behandelingen zoals biofumigatie en compost hebben geen effect op de infectiedruk. In 2008 zal verder onderzocht worden of biologische grondontsmetting een reële mogelijkheid kan bieden aan biologische en gangbare telers om de infectiedruk in de grond te verminderen.

KNPV-werkgroep Meloidogyne

Bijeenkomst van 6 november 2007

Samenvatting Monitoring Nulsituatie - Rapport Resultaten meetronde 2005-2006

Harm Keidel¹, Thea van Beers², Jitse Doornbos³ en Leendert Molendijk²

¹ Blgg BV Oosterbeek

² Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

³ NAK AGRO BV

Achtergrond

Eind 2004 is door het Hoofdproductschap Akkerbouw (HPA), het Productschap Tuinbouw (PT) en LTO Nederland het initiatief genomen

om de aaltjesproblemen gezamenlijk aan te pakken. Hiervoor is het actieplan aaltjesbeheersing gelanceerd. Eén van de projecten binnen dit actieplan was het monitoren van de nulsituatie. Dit project is uitgevoerd door een consortium van Blgg BV, NAK AGRO BV en PPO-AGV. Binnen het project zijn tussen november 2005 en april 2006 op 425 akkerbouwbedrijven grondmonsters genomen. Deze zijn geanalyseerd op de meest bekende plantenparasitaire aaltjes. Daarnaast is aan de deelnemers gevraagd om mee te werken aan een enquête over hun bedrijfsvoering en hun ervaringen met aaltjes.

De bedrijven zijn verdeeld over zes regio's. Als aanvulling is het TBM (Teelt Beschermende Maatregelen)-gebied opgenomen; hiervoor zijn de resultaten van de TBM-monitoring van 2005 gebruikt:

Tabel 1. Overzicht van de regio's en het aantal deelnemende bedrijven.

Regio	Afkorting	Regio-omschrijving	aantal bedrijven
1	W&WF	Wieringermeer en West Friesland	39
2	Zee	Zeeland	74
3	NKlei	Noordelijk Kleigebied (Friesland en Groningen)	73
4	CKklei	Centraal Kleigebied (Flevoland)	106
5	OZA	Oostelijk zandgebied (Gelderland)	57
6	ZON	Zuidoostelijk zandgebied (ZON)	76
		TOTAAL	425
7	TBM	TBM-gebied (Noordoostelijk zand- en dalgrondgebied)	163 ¹

¹ Het betreft hier het aantal bemonsterde percelen van circa vijf hectare. Per perceel zijn meerdere monsters genomen. In totaal zijn 776 monsters onderzocht op cysten en 438 monsters op overige aaltjes (mondelijke mededeling J. Doornbos, NAK AGRO BV).

WERKGROEP