

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.

WERK GROEP