

KNPV werkgroep *Phytophthora* & *Pythium*

Samenvattingen van de 20e bijeenkomst, gehouden op donderdag 28 april 2011 te Gent.

Lien Bertier¹,
Henk Brouwer³,
Arthur de Cock³,
Liesbet D'hondt,
Leen Leus² &
Monica Höfte¹

¹ Universiteit Gent, Vakgroep Gewasbescherming, Labo Fytopathologie, Coupure links 653, BE-9000 Gent, België

² Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO), Eenheid Plant, Toegepaste Genetica en Veredeling, Caritasstraat 21, BE-9090 Melle, België

³ CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, Nederland

Theo van der Lee¹,
Ying Li^{1,2}, Trudy van den Bosch¹, Marga van Gent-Pelzer¹, Bert Evenhuis¹, Evert Jacobsen³, Sanweng Huang², Wilbert Flier^{1,4} & Geert Kessel¹

¹ Plant Research International (Wageningen UR) Wageningen, The Netherlands

² Institute of Vegetables and Flowers, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

³ Wageningen University (Wageningen UR) Wageningen, The Netherlands

⁴ Huidig adres: DuPont de Nemours Nederland BV

Evolutie van het *Phytophthora porri*-complex door waardplantadaptatie, hybridisatie en polyploidisatie

Sinds de beschrijving van *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van de Ierse hongersnood anderhalve eeuw geleden, is het aantal *Phytophthora*-soorten exponentieel gegroeid. Vandaag de dag zijn meer dan honderd verschillende soorten bekend en zij zijn bijna allemaal plantenpathogenen. Fylogenetisch wordt het geslacht opgedeeld in tien betrouwbare clades en in dit onderzoek werd het vóórkomen, de genetische diversiteit en waardplantadaptatie van *Phytophthora porri* en andere *Phytophthora*-clade 8b-soorten (uitgezonderd *Phytophthora syringae*) nader onderzocht. Clade 8b bevat een groep van traaggroeiende, homothallische en koudetolerante soorten die voornamelijk ziekte kunnen veroorzaken op volgegrondsgroenten in winterteelten in België en in regio's met gelijkaardige klimatologische condities. We hebben een collectie opgebouwd bestaande

uit 91 culturen, geïsoleerd van elf verschillende waardplanten en afkomstig uit dertien verschillende landen. De culturen werden ofwel vers geïsoleerd van besmette planten of zijn afkomstig uit cultuurcollecties. Sequencerings van de rDNA ITS-regio en het mtDNA *Cox1*-gen doet vermoeden dat clade 8b naast de drie beschreven soorten (*P. porri*, *P. primulae* en *P. brassicae*) meerdere andere soorten bevat die nog onbeschreven zijn. Ook wijst de duidelijke correlatie tussen de fylogenetische data en pathogeniteitsdata op een speciatie onder invloed van de waardplant.

Verschiedende isolaten toonden dimorfe posities in hun ITS-regio, een kenmerk dat typisch is voor interspecifieke hybriden. Klonering van de ITS regio, *Cox1*-sequencerings en genoomgroottebepalingen met behulp van flow-cytometrie ondersteunen deze hypothese. Uit onze resultaten blijkt dat interspecifieke hybridisatie minstens twee keer is voorgekomen binnen deze clade, waarbij verschillende oudersoorten betrokken zijn geweest. Met behulp van flow-cytometrie werd ook opgemerkt dat polyploidie een gemeenschappelijke eigenschap is binnen clade 8b. Het ecologisch belang hiervan wordt momenteel onderzocht.

Een ontmoeting met de Nederlanders: populatiegenetica van *Phytophthora infestans* in Nederland gedurende het laatste decennium

Een set van meer dan duizend *P. infestans*-isolaten afkomstig van aardappelproductievelden en onderzoeksvelden werd verzameld in de periode 2000 - 2009. De genetische diversiteit van de Nederlandse populatie werd bepaald met een set van twaalf zeer informatieve nucleaire SSR-merkers, twee mitochondriale merkers en door de bepaling van het paringstype. Analyse van de genetische diversiteit laat zowel een complex patroon zien, met 322 unieke genotypen, maar onthult ook het bestaan van enkele dominante lijnen die zich klonaal verspreiden. De fluctuaties in het voorkomen van deze klonale lijnen in tijd en ruimte zijn nu voor het eerst duidelijk in kaart

gebracht. De resultaten laten zien dat elk jaar als gevolg van de seksuele cyclus een groot aantal nieuwe genotypen wordt gevormd, waarvan er slechts enkele zo succesvol zijn dat ze lokaal of regionaal een epidemie veroorzaken. Er werden regionale verschillen gevonden die gecorreleerd waren met de teelt van zetmeelaardappelen. Naast de SSR-merkers, die als neutraal beschouwd kunnen worden, zijn enkele functionele merkers ontwikkeld voor virulentie op aardappelcultivars met specifieke *R*-genen, o.a. voor virulentie ten aanzien van het *Blb1*-resistentiegen. Met deze functionele merker konden we laten zien dat de frequentie van virulente isolaten in Nederland laag is (<0.05%) en dat virulente isolaten al in Nederland aanwezig waren voordat er sprake was van selectie. De eerste virulente isolaten werden namelijk al gevonden voordat het *Blb1*-gen geïdentificeerd was, in een periode dat slechts een gering aantal aardappelplanten met het *Blb1*-gen (met name geniteuren) in het veld stonden. In totaal werden uit de periode 2000 -

Dordrecht, The Netherlands
Correspondentie: T.A.J.
van der Lee; e-mail: theo.
vanderlee.wur.nl

2009 tien onafhankelijke genotypen gevonden die virulent zijn op aardappellijnen met het *Blb1*-resistentiegen. Het lijkt er op dat deze *P. infestans*-genotypen ontstaan zijn na een seksuele cyclus en zich daarna niet of nauwelijks

hebben weten te verspreiden door het vormen van aseksuele sporen. Mede door de geringe verspreiding van deze virulente isolaten is *Blb1* momenteel een effectief resistentiegen.

Arthur de Cock¹,
Gregg Robideau²,
Kana Bala²,
Michael Coffey³,
Gloria Abad⁴ &
André Lévesque²

De onvermijdelijke opsplitsing van *Pythium*

Dat het genus *Pythium*, in 1858 beschreven door Pringsheim, morfologisch heterogeen is, is al lang bekend. Het belangrijkste kenmerk dat de *Pythium*-soorten gemeen hebben is de wijze waarop de zoösporen gevormd worden: het protoplasma stroomt door een buis uit het sporangium en de zoösporen worden gevormd buiten het sporangium, vanuit het ongedifferentieerde klompje protoplasma dat slechts is omgeven door een membraan. Verder zijn er echter grote verschillen in morfologie van de voorplantingsstructuren. Het belangrijkste verschil is de vorm van het sporangium, dat uiteenloopt van een ongedifferentieerde hyfe tot een bolvormige of eivormige structuur, al dan niet met interne proliferatie. Er zijn in het verleden verscheidene pogingen gedaan om het genus op te delen, hetzij in subgenera, hetzij in nieuwe genera, op basis van de sporangiumvorm. Deze pogingen zijn nooit breed geaccepteerd.

Het huidige fylogenetische onderzoek bevestigt de heterogeniteit van *Pythium*, waarbij met name een correlatie wordt gevonden met de sporangiumvorm. Andere morfologische verschillen zoals de oögoniumornamentatie blijken veel minder of niet te correleren (Lévesque & de Cock, 2004). Een van de *Pythium*-clades bleek nauwer verwant aan *Phytophthora* dan aan *Pythium* en werd op grond daarvan en vanwege morfologische kenmerken beschreven als een nieuw genus, *Phytopyrium* (Bala *et al.*, 2010). Uzuhashi *et al.* (2010) publiceerden recentelijk een herindeling van *Pythium* in vier nieuwe genera: *Ovatisporangium* (= *Phytopyrium*), *Globisporangium*, *Elongisporangium* en *Pythium* sensu stricto, terwijl een nieuwe soort

geplaatst werd in een nieuw genus *Pilasporangium*. De fylogenetische basis voor deze herindeling was beperkt tot partiële sequenties van het ribosomale LSU en cytochroom oxidase II (COII) terwijl ook het nomenclatorisch onderzoek naar oudere bestaande namen onvolledig was. Bepaalde recente ontwikkelingen waren in dit onderzoek niet meegenomen: de genera *Pythiogeton* (Sarpolegniales!) en *Lagenidium* (Lagenidiales!) blijken temidden van de *Pythium*-clades te clusteren in fylogenetische bomen gebaseerd op LSU en COI. Het genus *Pythium* s.s. blijkt daarbij zelfs gesplitst te worden in twee delen. Overigens is het opduiken van *Pythiogeton* en *Lagenidium* in de *Pythium*-boom niet onlogisch: ze hebben dezelfde wijze van zoösporenvorming als *Pythium*. Deze recente ontwikkelingen maken het opsplitsen van *Pythium* onvermijdelijk. In lopend onderzoek wordt m.b.v. multi-gen-analyse de onderbouwing van een nieuwe indeling van *Pythium* geëvalueerd waarbij zoveel mogelijk isolaten van *Pythiogeton* en *Lagenidium* zullen worden meegenomen. Een nomenclatorisch literatuuronderzoek maakt ook deel uit van deze studie.

Referenties

- Bala K, Robideau GP, Lévesque CA, de Cock AWAM, Abad ZG, Lodhi AM, Shahzad S, Ghaffar A, Coffey MD (2010) *Phytopyrium* Abad, de Cock, Bala, Robideau & Levesque, gen. nov. and *Phytopyrium sindhum* Lodhi, Shahzad & Levesque, sp. nov. *Persoonia*. 24: 136-137
- Lévesque CA & de Cock, AWAM (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the species of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108: 1363-1383
- Uzuhashi S, Tojo M & Kakishima M (2010) Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337-365

Karin Rosendahl &
Patricia van Rijswick

De ontdekking van twee nieuwe *Phytophthora*-soorten in ITS-clade 2a

In de teelt van *Pachysandra* en *Buxus*, beiden behorend tot de Buxaceae-familie, worden

regelmatig ziektebeelden als verwelking, verdroging en afsterving van de planten waargenomen. Eén van de oorzaken is aantasting van de plant vanuit een basisrot door *Phytophthora*-soorten. Twee *Phytophthora*-soorten, respectievelijk van *Pachysandra terminalis* en *Buxus sempervirens*, zijn in diverse laboratoria in Nederland, België

Nieuwe VWA, Divisie Plant,
NRC, Mycologie, Wageningen

en Engeland middels sequentieanalyse van het ITS-gebied eerder foutief geïdentificeerd als *P. citrophthora*. Onderzoek door het Nationaal Referentie Centrum heeft uitgewezen dat het gaat om twee verschillende *Phytophthora*'s met unieke ITS-sequenties, die fylogenetisch ook nog elkaars naaste burens zijn in ITS-clade 2a. Bovendien blijkt na morfologische analyse dat beide soorten homothallisch zijn en dus autonoom seksuele structuren produceren, terwijl *P. citrophthora* alleen in paringstesten incidenteel seksuele structuren produceert. De onlangs beschreven *P. himalsilva* is ook homothallisch en fylogenetisch nauw verwant aan met name de *Phytophthora* sp. uit *Pachysan-*

dra. In alle gevallen werd de ITS-analyse bevestigd door sequentie-analyse van Cytochrome oxidase I (CoxI).

Sequentie-analyse van het ITS-gebied wordt veel gebruikt voor de identificatie van schimmels en *Phytophthora*'s. Maar uit deze praktijkgevallen blijkt weer zeer duidelijk dat zoekresultaten verkregen door het 'blasten' van sequenties in GenBank met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd moeten worden. Voor een juiste en betrouwbare identificatie is nog steeds een combinatie van zowel moleculaire technieken als morfologie noodzakelijk. Een taxonomische beschrijving van beide nieuwe soorten is in voorbereiding.

Kasia Gaszczyk,
Els Verstappen,
Odette Mendes,
Cor Schoen &
Peter Bonants

PRI, Wageningen

Een op padlock probe gebaseerde universele micro-array-detectie methode voor meerdere *Phytophthora*-soorten

Detectie van *Phytophthora* speelt een belangrijke rol in het internationale handelsverkeer, maar ook in het openbaar groen. Er worden steeds meer *Phytophthora*-soorten beschreven. Hiervoor zijn nog geen goede detectiemethoden ontwikkeld. Voor de wel beschreven *Phytophthora*-soorten zijn veelal wel beschreven, maar het betreft in alle gevallen individuele testen. Binnen dit project is een diagnostische methode ontwikkeld die toe te passen is *in planta*, en die ook de meest recent beschreven (quarantaine-) soorten omvat. Ook worden meerdere *Phytophthora*-soorten tegelijkertijd gedetecteerd. De ontwikkelde methode omvat een generieke *Phytophthora*-TaqMan PCR gevolgd door een specifieke padlock probe-ligatie in combinatie met een micro-array-detectie. Op basis van DNA-sequentiegegevens (verkregen in WP2 van

het FES-programma Plantgezondheid en beschikbaar in internationale databases) is een generieke TaqMan-PCR-test voor *Phytophthora* ontwikkeld en gevalideerd. Op basis van sequentieverschillen zijn vervolgens padlock probes (PLPs) voor 15-20 voor Nederland relevante *Phytophthora*-soorten ontwikkeld. De lijst is samengesteld in nauw overleg met CBS en nVWA. Deze PLPs worden vervolgens geligeerd op de TaqMan-PCR-amplicons. Na ligatie worden de niet-geligeerde PLPs afgebroken m.b.v. exo-nuclease. De geligeerde PLPs worden in een SYBRGreen-PCR geamplificeerd en de geamplificeerde PLPs worden tenslotte gehybridiseerd op een micro-array platform en gevisualiseerd. De methode is uitgetest op DNA-preparaten van verschillende *Phytophthora*-soorten met positieve resultaten. Elke *Phytophthora*-soort geeft een *signature* op de micro-array te zien. Ook DNA-monsters afkomstig van de nVWA en PRI vanuit eerdere monitoringsexperimenten laten zien dat meerdere *Phytophthora*-soorten tegelijkertijd met grote gevoeligheid gedetecteerd kunnen worden. De methode is derhalve goed inzetbaar voor diagnostische doeleinden.