

Variation in *Phytophthora infestans*: sources and implications

W.G. Flier

Plant Research International, postbus 16, 6700 AA Wageningen

Op 5 juni 2001 promoveerde aan de Wageningen Universiteit Wilbert G. Flier op een proefschrift getiteld: Variation in *Phytophthora infestans*: sources and implications. Promotor was Prof. dr. R.F. Hoekstra, hoogleraar in de genetica; co-promotoren waren Dr. ir. L.J. Turkensteen (Plant Research International) en Prof. dr. W.E. Fry (Cornell University, NY, USA). Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd uitgevoerd bij Plant Research International (Wageningen) en bij PICTIPAPA (Metepc, Mexico).

Inleiding

De oömyceet *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, de veroorzaker van 'het kwaad' ofwel de aardappelziekte, wordt wereldwijd gerekend tot de belangrijkste pathogenen in de teelt van aardappelen en tomaten. Sinds de introductie van het pathogeen in Europa rond 1845 veroorzaakt *P. infestans* regelmatig grote problemen in de teelt van aardappelen. Naast een bescheiden inzet van partieel resistente rassen worden jaarlijks worden grote hoeveelheden fungiciden gebruikt om aardappelen te beschermen tegen de aardappelziekte. Problemen met de *Phytophthora* bestrijding namen toe na de introductie van een geheel nieuwe populatie van het pathogeen vanuit Mexico rond 1976. De huidige *P. infestans* populatie in Nederland bestaat uit isolaten die behoren tot het A1 en het A2 paringstype. Wanneer isolaten van het A1 en het A2 paringstype in geïnfecteerde plantde-

len in elkaars nabijheid groeien, kunnen door middel van seksuele voortplanting oösporen ontstaan. Deze rustsporen kunnen minimaal gedurende één winter overleven in de grond en zijn in staat om in het volgende seizoen nieuwe aardappelgewassen aan te tasten. Algemeen wordt aangenomen dat oösporen samen met asexuele inoculum bronnen zoals afvalhopen en geïnfecteerde aardappelknollen een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van nieuwe aardappelziekte epidemieën. Seksuele voortplanting en de vorming van functionele oösporen in aangetaste aardappelgewassen hebben geleid tot een grotere genetische variatie in populaties van het pathogeen. Agressieve isolaten (isolaten met een hoger ziekteverwekkend vermogen) hebben mogelijk een selectief voordeel en nemen daardoor gedurende het verloop van de epidemie in frequentie toe. De toename van agressieve isolaten leidt tot een *P. infestans* populatie die is gekenmerkt door een hoger ziekteverwekkend vermogen. Een beter inzicht in de epidemiologie en de populatiebiologie van de huidige pathogeenpopulatie is noodzakelijk om in de toekomst betere en meer effectieve bestrijdingsstrategieën tegen de aardappelziekte te kunnen ontwikkelen. De in dit proefschrift gepresenteerde resultaten zijn een weerslag van een studie die beoogde om de bronnen van variatie in *P. infestans* en het effect van de toegenomen genetische variatie op het gedrag van *P. infestans* te onderzoeken.

Variatie in agressiviteit binnen regionale *P. infestans* populaties

In een vergelijkende studie naar de aanwezige variatie in agressiviteit binnen regionale *P. infestans* populaties werd een aanzienlijke fenotypische diversiteit aangetoond voor alle componenten van agressiviteit die werden bepaald door middel van inoculatie-experimenten met hele knollen en bladponsjes. Het ziekteverwekkend vermogen van het meest agressieve isolaat van de reeds verdrongen, asexueel reproducerende pathogeenpopulatie dat beschikbaar is in de isolaatcollectie van Plant Research International bleek vergelijkbaar met het gemiddelde niveau van agressiviteit van de nieuwe, seksueel reproducerende pathogeen populatie. In een bio-toets met bladponsjes bleek de gemiddelde agressiviteit van isolaten, afkomstig uit drie onderzochte regionale *P. infestans* populaties, vergelijkbaar voor wat betreft de infectie-frequentie, maximale groeisnelheid en sporenproductie. De gemiddelde latentie periode van isolaten afkomstig van een volkstuinencomplex in Ede was significant langer dan die van isolaten uit Zuidelijk Flevoland of Drenthe. Er werd geen verband gevonden tussen agressiviteit en het paringstype van een isolaat en ook de diverse componenten van loof- en knolagressiviteit bleken niet of zwak gecorreleerd te zijn. Uit de resultaten van het onderzoek naar het voorkomen van variatie in agressiviteit blijkt dat er veel variatie in ziekteverwekkend

PROMOTIE

vermogen bestaat binnen regionale populaties van het pathogeen.

De rol van oösporen

In Nederland werden oösporen aangetroffen in aangetaste tomatenvruchten en tomatenblad en in blaadjes van aangetaste aardappelplanten die waren verzameld in aardappelopslag en commerciële percelen. De aanwezigheid van infectieuze oösporen werd aangetoond door isolatie van kiemkrachtige oösporen uit aangetaste blaadjes afkomstig van commerciële aardappelpercelen. Oösporen van *P. infestans* werden aangetroffen in bladpopsjes afkomstig van acht verschillende aardappelryassen met verschillende niveaus aan partiële loofresistentie na inoculatie met isolaten van verschillend paringstype. Grote aantallen oösporen werden geproduceerd in het vatbare ras Bintje en het partieel resistente ras Pimpernel. Een relatief lage oösporenproductie werd waargenomen in het matig vatbare ras Nicola. De overleving van oösporen in een zand- en een lichte kleigrond bij blootstelling aan de natuurlijke weersomstandigheden werd gedurende een periode van zes jaar gevolgd. In een biotoets bleken oösporen uit de zandgrond maximaal 48 maanden en oösporen uit de lichte klei maximaal dertig maanden infectieus te zijn. De eerste



Een specifieke populatie van *P. infestans* werd aangetroffen op wilde varianten van aardappel.

bladaantastingen vanuit oösporen werden 84-92 uur na inundatie van de grond waargenomen, en de oösporen bleven infectieus gedurende elf dagen. Oösporen in grondmonsters bleven infectieus tijdens twee cycli van bevochtigen van de grond gevolgd door drogen aan de lucht.

De variatie in productie en vitaliteit van oösporen werd onderzocht door kruisingen te maken met een aantal Mexicaanse isolaten afkomstig van aardappel en de wilde aardappelverwant *Solanum demissum*. De gevormde aantallen oösporen en de vitaliteit van deze sporen verschilden sterk per kruising. In de meeste kruisingen werden veel oö-

sporen gevormd, maar in sommige oudercombinaties werden zeer weinig of geen oösporen geproduceerd. Er bleek een positief verband te bestaan tussen het aantal gevormde oösporen in een kruising en de vitaliteit van deze sporen. De productie en vitaliteit van oösporen is afhankelijk van de algemene ('General Combining Ability', GCA) en de specifieke ('Specific Combining Ability', SCA) kruisingsgeschiktheid van de ouderstammen. Isolaten afkomstig van *S. demissum* produceerden significant meer oösporen in kruisingen met compatibele isolaten welke ook afkomstig waren van *S. demissum* dan in kruisingen met isolaten afkomstig van aardappelpercelen. Voor het eerst werden er oösporen waargenomen in natuurlijk aangetaste blaadjes van de wilde aardappel soort *S. demissum*. Op twee vindplaatsen van *S. demissum* werden oösporen aangetroffen in 10 tot 20 % van de verzamelde blaadjes met twee of meer *Phytophthora* lesies.

Stabiliteit van partiële resistentie tegen *P. infestans*

Aardappelryassen met verschillende niveaus van partiële resistentie werden geïnoculeerd met isolaten van de oude en de nieuwe *P. infestans*



Effecten van *P. infestans* op verschillende aardappelryassen in het veld.

PROMOTIE



Typische symptomen van *P. infestans*.

PROMOTIE

populaties om de invloed van de huidige, meer agressieve isolaten op het niveau en de stabiliteit van resistentie te kunnen bepalen. In experimenten met hele knollen en knolschijfjes werd aangetoond dat knolinfectie en het invasief vermogen (de kolonisatie van knolweefsels door het pathogeen ná infectie) bepaald worden door de knolresistentie van het ras, het ziekteverwekkend vermogen van het pathogeen én ras x isolaat specifieke factoren.

De stabiliteit van loof en knolresistentie van een aantal aardappelrassen werd gedurende twee jaren onder laboratorium en veldomstandigheden geëvalueerd om een beter inzicht te krijgen in de praktische gevolgen van de toegenomen variatie en agressiviteit van de ziekteverwekker. De mate van loofresistentie in met name cultivar. Bintje (vatbaar) en cultivar. Pimpernel (partieel resistent) in kunstmatig geïnfecteerde veldgewassen bleek sterk afhankelijk te zijn van het gebruikte isolaat, terwijl cultivar. Santé een meer stabiele resistentie te zien gaf. Statistische analyses van veld- en laboratoriumproeven toonden aan dat het uiteindelijke (waargenomen) resistentie niveau van een aardappelras met partiële resistentie afhankelijk is van de agressiviteit van het pathogeen en van specificiteit tussen ras en isolaat. De experi-

menteel bepaalde loof- en knolresistentiecijfers van de getoetste rassen bleken niet of nauwelijks gecorreleerd te zijn met de *Phytophthora* resistentiecijfers in de Nederlandse rassenlijst. Het wijdverbreide optreden van specificiteit in de interactie tussen partieel resistente aardappelrassen en *P. infestans* kan consequenties hebben voor de stabiliteit en duurzaamheid van partiële resistentie en noopt tot herbezinning over de wijze waarop *Phytophthora* resistentiecijfers in de Nederlandse rassenlijst worden bepaald. Een beter inzicht in het adaptief vermogen van het pathogeen is noodzakelijk om voorspellingen te kunnen doen over de duurzaamheid van partieel resistente rassen wanneer deze worden blootgesteld aan variabele pathogeen populaties.

Variatiepatronen in seksueel reproducerende *P. infestans* populaties

De relaties tussen *P. infestans* populaties afkomstig van wilde *Solanum* soorten, lokaal geteelde 'Criolla' aardappelrassen in marginale productiesystemen en moderne cultivars in intensieve teeltsystemen in de hooglanden van centraal Mexico

werden onderzocht met behulp van paringstype, allozym en metalaxyl resistentie markers. De vallei van Toluca herbergt de meest variabele *P. infestans* populaties ter wereld en wordt in brede kring beschouwd als het oorsprongsgebied van deze soort. In 1988-1989 (n = 179) en 1997 (n = 401) werden isolaten verzameld uit de drie onderscheiden deelpopulaties. Analyses van genotypische diversiteit werden uitgevoerd op basis van het paringstype en twee allozym loci. Twee groepen van isolaten afkomstig van uiteenlopende productiesystemen die op basis van het paringstype en allozym genotype niet onderscheidbaar bleken werden nader geanalyseerd door middel van 'Restriction Fragment Length Polymorphism' markers (RFLP's). De meeste isolaten in beide groepen bleken unieke (65% en 85%) RFLP genotypen te bezitten, hetgeen in overeenstemming is met de voorspelde diversiteit in een seksueel reproducerende *P. infestans* populatie. De populatiestructuur in 1988-1989 week niet sterk af van die in 1997 met uitzondering van het percentage metalaxyl resistente isolaten (60 versus 13 %) terwijl de grootste genetische diversiteit werd aangetroffen in de isolaten afkomstig van de aardappelcultivars uit het intensieve teeltsysteem.

De hypothese dat *P. infestans* populaties van wilde *Solanum* soorten grotendeels afkomstig zijn van de pathogeen populaties op gecultiveerde aardappelen in de centrale hooglanden van Mexico werd getoetst. In totaal werden 170 isolaten, verzameld in 1997 van aardappelgewassen en wilde *Solanum* soorten, gekarakteriseerd door middel van selectie-neutrale mitochondriale (mtDNA haplotypes) en 'Amplified Fragment Length Polymorphism' (AFLP) DNA markers. Alle isolaten bleken te behoren tot het Ia haplotype van *P. infestans* en er werden in totaal 158 verschillende genotypen onderscheiden op basis van 165 dominant overervende AFLP markers. Gemiddeld bleek 81,8 % (135) van de AFLP markers polymorf. Er werd een significante differentiatie aangetoond tussen *P. infestans* populaties afkomstig van

wilde *Solanum* soorten en de gecultiveerde aardappel. Populatie-specifieke AFLP markers werden waargenomen in isolaten afkomstig uit de drie bemonsterde populaties (variërend van negen tot zestien markers in geval van isolaten afkomstig uit de intensieve aardappelteelt en wilde *Solanum* soorten). In totaal werden 4 AFLP markers gevonden van welke de aanwezigheid alleen werd aangetoond in isolaten afkomstig van *S. demissum*. Er werden geen aanwijzingen gevonden die de uitgangshypothese ondersteunen. Indirecte schattingen van 'gene-flow' tussen *P. infestans* populaties duiden op een zeer beperkte migratie van isolaten tussen populaties en is in overeenstemming met de eerder gevonden differentiatie tussen pathogeen populaties van aardappel en wilde *Solanum* soorten. Populatie differentiatie en genetische isolatie van waardplant-specifieke populaties van *P. infestans* in de vallei van Toluca lijken samen te hangen met het voorkomen van waardplant-specifieke resistentiegenen en 'genetic drift'.

Een nieuwe homothallische *Phytophthora* soort, nauw verwant aan *P. infestans* en *P. mirabilis* werd in 1999 ontdekt in de vallei van Toluca. Zes isolaten werden verzameld van aangetast bladen van *Ipomoea longipedunculata*, een wilde plant endemisch voor centraal Mexico. Gebaseerd op vergelijkingen van waardreeks, morfologie, allozym

markers, mtDNA haplotype en rDNA basenvolgorde werd geconcludeerd dat het gaat om een nog niet eerder beschreven soort, *Phytophthora ipomoeae*. De soort werd beschreven en een type-exemplaar gedeponeerd bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS) in Baarn.

Conclusies en vooruitblik

Onderzoek naar de aardappelziekte op het grensvlak tussen plantenziektekunde, resistentiemechanismen en populatiebiologie biedt de unieke mogelijkheid om dwarsverbanden te leggen tussen onderzoeksresultaten en deze in een totaalconcept te gieten. Hierdoor is het mogelijk om een beter inzicht te verwerven in de interactie tussen *P. infestans* en de aardappel. Het hier beschreven onderzoek belicht een aantal aspecten betreffende de oorsprong en de gevolgen van genetische variatie in seksueel reproducerende populaties van *P. infestans*. Uit het onderzoek kan geconcludeerd worden dat (I) een aanzienlijke mate van variatie voor agressiviteit in stand wordt gehouden in regionale *P. infestans* populaties in Nederland, (II) oösporen in aanzienlijke aantallen worden gevormd in aardappelgewassen en opslagplanten in Nederland, (III) de vorming en vitaliteit van oösporen sterk afhankelijk is van de combina-

tiesgeschiktheid van de ouder-isolaten, (IV) oösporen drie tot vier jaar kunnen overleven in de bodem, (V) differentiële interacties tussen ras en isolaat interacties een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van de aardappelziekte op partieel resistente rassen en (VI) waardspecifiteit tot populatiedifferentiatie en uiteindelijk tot het ontstaan van nieuwe *Phytophthora* soorten kan leiden.

Zowel telers als veredelaars en gewasbeschermers hebben te maken gekregen met een pathogeen dat zich flexibeler, variabelere, sneller en daardoor minder voorspelbaar is gaan gedragen. Alleen geïntegreerde bestrijdingsstrategieën gebaseerd op betrouwbare ziektevoorspellingsmodellen zullen het voor de aardappelteler mogelijk maken om op een verantwoorde wijze stabiele vormen van waardresistentie, dynamisch fungicidegebruik en cultuurmaatregelen in te passen in een bestrijdingsstrategie voor de aardappelziekte. Implementatie van dergelijke bestrijdingsstrategieën bieden op korte termijn de meeste perspectieven om het gebruik van fungiciden te verminderen. Hiertoe is het noodzakelijk om snel essentiële basisgereedschappen te ontwikkelen door ambitieuze onderzoeksiniciatieven te ontplooiën met een brede kijk op het *Phytophthora* probleem.

PROMOTIE